

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

A monocita-makrofág differenciáció során adott dihidroretinol és a hemoxigenáz-1 hiányának hatása az efferocitózis folyamatára

Vincze-Fige Éva

Témavezető: Prof. Dr. Szondy Zsuzsanna



DEBRECENI EGYETEM

FOGORVOSTUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2023

1. TARTALOMJEGYZÉK

1.	TARTALOMJEGYZÉK	2
2.	RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	5
3.	BEVEZETÉS	9
4.	IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	10
4.1.	Efferocitózis.....	10
4.1.1.	Fagociták vándorlása az elhaló sejtek felé	11
4.1.2.	Az apoptotikus sejtek felismerése	12
4.1.3.	Az elhalt sejtek eltávolítása	15
4.1.4.	Rac aktiválás a Dock180-ELMO1 útvonalon keresztül.....	16
4.1.5.	A bekebelezett apoptotikus sejt emésztése	17
4.2.	Makrofágok.....	19
4.2.1.	A makrofágok eredete.....	19
4.2.2.	Makrofág fenotípusok.....	21
4.3.	Retinol szaturáz enzim és kapcsolódása az efferocitózishoz.....	22
4.4.	Miért éppen hemoxigenáz-1 (HO-1)?.....	25
4.5.	Hemoxigenázok.....	25
5.	CÉLKITŰZÉS	29
6.	ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	30
6.1.	Reagensek.....	30
6.2.	Kísérleti állatok.....	30
6.3.	Csontvelő-eredetű makrofágok (BMDM) izolálása, tenyésztése és kezelése	30
6.4.	Apoptotikus timociták és eriptotikus vörösvértestek létrehozása <i>in vitro</i>	31
6.5.	Timociták apoptózisa során keletkező felülúszó	32
6.6.	Efferocitózis vizsgálatok.....	32
6.7.	Fluoreszcens mikroszkópia	33
6.8.	RNS izolálás, reverz transzkripció PCR és RT-qPCR	34
6.9.	SDS-PAGE és Western-blot.....	34
6.10.	Hemoxigenáz aktivitás mérés.....	35
6.11.	G-fehérje (Rac1, Cdc42, RhoA) aktivitás mérés	35
6.12.	Citokin vizsgálat.....	35
6.13.	mRNS szekvenálás	35
6.14.	Transzkriptek biológiai funkciójának vizsgálata (DEGs).....	36
6.15.	Statisztikai analízis.....	36
7.	EREDMÉNYEK.....	38

7.1. A retinoidok a Bmp-2 és Smad3 fehérjék kifejeződésének fokozásán keresztül befolyásolják az egér csontvelői eredetű makrofágok differenciációját és efferocitózist	38
7.1.1. A makrofág érés során alkalmazott dihidroretinol kezelés számos efferocitózishoz köthető molekula kifejeződését fokozva növeli a makrofágok elhalt sejt felvételét	38
7.1.2. A makrofág érés közben adott DHR közvetlenül a retinsav receptorokon keresztül hatva segíti az efferocitózist	42
7.1.3. A csont morfogenetikus fehérje 2 (BMP-2) expresszióját indukálják a makrofág érés 4. napján adott retinoidok	45
7.1.4. A BMP-2 hozzájárul a differenciálódó makrofágok retinoidok által indukált efferocitotikus kapacitásához	50
7.1.5. A retinoidok indukálják a Smad3-at	50
7.1.6. A Smad3 hozzájárul a retinoid-indukált efferocitózishoz a makrofág differenciáció közben	53
7.1.7. A retinoidok a vaszkuláris endotél növekedési faktor A (VEGFA) expresszióját is fokozzák	54
7.2. A hemoxigenáz-1 az efferocitózis során a makrofágokban hozzájárul mind a bekebelezési mind a gyulladásgátló folyamatokhoz	57
7.2.1. Az apoptotikus sejtek fagocitózisa indukálja a HO-1 kifejeződését a makrofágokban	57
7.2.2. A HO-1 expresszióját szolubilis jelek indukálják az apoptotikus timocitákat fagocitáló makrofágokban, míg az elhalt vörösvértestek jelenlétében lévő makrofágok HO-1 indukciójához szükséges a sejtek felvétele	59
7.2.3. A BACH1 szerepet játszhat a HO-1 upregulációjában az apoptotikus timociták és az eriptotikus vörösvértestek esetében is	60
7.2.4. Az efferocitózis során felszabaduló adenzin, illetve az adenilát cikláz út általában nem játszik szerepet a HO-1 kifejeződésének indukálásában az elhalt sejteket bekebelező makrofágokban	62
7.2.5. Hosszútávú fagocitózis során a HO-1 aktivitás hiánya csökkent fagocitózis kapacitást eredményez az elhalt vörösvértesteket felvevő makrofágokban	65
7.2.6. Az apoptotikus sejt felvétel gátolja a makrofágok alap gyulladásos citokin termelését, míg HO-1 hiányában a gyulladásos citokinek termelése nőtt vagy nem változott	68
8. MEGBESZÉLÉS	72
9. ÖSSZEFOGLALÁS	77
10. SUMMARY	79
11. IRODALOMJEGYZÉK	81
12. KÖZLEMÉNYEK	105
13. TÁRGYSZAVAK	107
14. KEYWORDS	107
15. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	108

16.	FÜGGELÉK	109
------------	-----------------------	------------

2. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

A1R	adenozin A ₁ receptor
A2AR	adenozin A _{2A} receptor
A2BR	adenozin A _{2B} receptor
A3R	adenozin A ₃ receptor
ACAMP	apoptotikus sejt asszociált molekuláris mintázat
AGN	nagy affinitású pán-retinsav receptor antagonist
Akt	szerin/treonin fehérje kináz (protein kináz B)
ALDH1a2	aldehid dehidrogenáz 1 család A2 tagja
ALK2/3	aktivin receptor-szerű kináz 2/3
AMPK	5'-AMP-aktivált fehérje kináz
ANOVA	egyszempontos varianciaanalízis
AP1	aktivátor fehérje 1
ARE	antioxidáns válaszadó elem
aT	apoptotikus timocita
ATRA	csupa-transz retinsav
AXL	tirozin-fehérje kináz receptor
BACH1	BTB és CNC homológ 1
BAI1	agy specifikus angiogenesis gátló 1
BMDM	csontvelői eredetű makrofág
BMP-2	csont morfogenetikus fehérje 2
C1q	komplement komponens 1q
C5/C5a	komplement komponens 5a
Camkk	kalmódulin-függő kináz
cAMP	ciklikus adenzin monofoszfát
Cdc42	sejtosztódás szabályozó fehérje 42
CFDA-SE	karboxifluoreszcein-diacetát-szukcinimidil-észter
ChREBP	szénhidrát válaszelem kötő fehérje
CrkII	csirke tumor vírus no. 10 regulátor kináz II
CX3CR1	CX3C kemokin receptor 1
CXCL8	kemokin C-X-C motívum ligand 8
cyto.D	citokalazin-D
DEAB	N,N-dietilaminobenzaldehid

DEG	eltérő módon expresszált gén
DHR	(13R)-csupa-transz-13,14-dihidroretinol
DHR2	DOCK homológ régió 2
DMEM	Dulbecco módosított sas médium
DMSO	dimetil-szulfoxid
DOCK180	180 kDa citokinézis dedikátor fehérje
ELMO1	bekebelezés és sejtmotilitás fehérje 1
eRBC	eriptotikus vörösvértest
FBS	fötális borjúsérum
FC	változás mértékét kifejező érték
FDR	hamis felfedezési arány
FITC	fluoreszcein-izotiocianát
FOXO1	villafej doboz fehérje O1
FSC	előreszórás (sejtméret)
FVB	Friend leukemia vírus B
G2A	G fehérje kapcsolt receptor
GAP	GTPáz aktiváló fehérje
Gas6	növekedés specifikus gátló 6
GCSF	granulocita kolónia stimuláló faktor
GDF3	növekedési differenciációs faktor 3
GEF	guanin nukleotid kicserélő faktor
G-LISA	G-fehérje kötött immunszorbens vizsgálat
GO	gén ontológia
Hmox1	hemoxigenáz-1 kódoló gén
HO-1	hemoxigenáz-1
HRP	torma peroxidáz
ICAM3	intercelluláris adhézios molekula 3
IFN γ	interferon γ
IGF-1	inzulinszerű növekedési faktor-1
IL	interleukin
JE	monocita kemotaktikus fehérje 1
JunD	AP1 transzkripció faktor alegység
KC	keratinocita eredetű kemokin
Keap1	Kelch-szerű ECH-asszociált fehérje 1

LacZ	β galaktozidáz
LDL	alacsony denzitású lipoprotein
LDN	szelektív csont morfogenetikus fehérje jelátviteli inhibitor
LPC	lizofoszfátidilkolin
LRP1	alacsony denzitású lipoprotein receptor-kapcsolt fehérje 1
LXR	máj X receptor
MAFK	kis Maf fehérje
MAPK	mitogén-aktivált fehérje kináz
MARCO	makrofág receptor kollagén szerkezettel
MARE	Maf felismerő hely
M-CSF	makrofág kolóniastimuláló faktor
MEK1	mitogén aktivált fehérje kináz kináz-1
MerTK	Mer tirozin kináz receptor
MFG-E8	tejzsír csomó epidermális növekedési faktor 8
MIG	interferon γ által indukált monokin
MIP2	makrofág inflammatórikus fehérje 2
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid foszfát
NaOH	nátrium-hidroxid
NLRP3	NLR család pirin domént tartalmazó tag 3
Nrf2	nukleáris faktor 2-höz kapcsolódó faktor 2
P2X	purinerg receptor P2X
P2Y2	P2Y purinerg receptor 2
PD	mitogén aktivált fehérje kináz kináz inhibitor
PI3K	foszfatidil-inozitol-3-kináz
PKC	fehérje kináz C
PPAR	peroxiszóma proliferátor-aktivált receptor
PS	foszfatidilszerin
Rab20	Ras rokon fehérje 20
Rac1	Rac családhoz tartozó kis GTPáz 1
RANTES	aktiválás szabályozott, normál T-sejt expresszált és szekretált
RAR	retinsav receptor
RARE	retinsav válaszadó elem
rBMP-2	rekombináns csont morfogenetikus fehérje 2
RCF	relatív centrifugális erő

RetSat	retinol szaturáz
RhoA	Ras homológ családtag A
ROCK	Rho-asszociált fehérje kináz
ROL	retinol
RpcAMP	ciklikus adenzin monofoszfát antagonist
RT-qPCR	valós idejű kvantitatív PCR
RXR	retinoid X receptor
S1P	szfingozin-1-foszfát
S1PR1-5	szfingozin-1-foszfát receptor 1-5
SDS-PAGE	szódium dodecil szulfát–poliakrilamid gél elektroforézis
SIRP α	szignál regulatórikus fehérje α
SIS3	specifikus Smad3 gátlószer
Smad3	Smad családtag 3
SN	felülúszó
SnPPiX	ón-protoporfirin-IX
SPF	specifikus patogén mentes
SSC	oldalszórás (sejtgranuláltság)
STAT3	szignál transzducer és aktivátor transzkripció 3
TAM	Tyro-Axl-Mer tirozin kinázok
TARC	tímusz- és aktiváció szabályozott kemokin
TG2	transzglutamináz 2
TGF- β	transzformáló növekedési faktor β
THBS-1	trombospondin-1
TIM	T-sejt immunglobulin mucin receptor
TNF	tumor nekrosis faktor
TREM1	mieloid sejteken expresszált triggering receptor 1
TTBS	Tris pufferealt sóoldat Tween® 20 Detergenssel
UCP2	szétkapcsoló fehérje 2
VEGFA	vaszkuláris endotél növekedési faktor A
YY1	yin yang 1
Z-VAD-FMK	karbobenzoxi-valil-alanil-aspartil-(O-metil)-fluorometilketon

3. BEVEZETÉS

Szervezetünk minden egyes nap törekszik a megújulásra. A káros, felesleges, elöregedett vagy haszontalanná vált sejtek elpusztulnak, helyükre pedig újak kerülnek, biztosítva ezzel a szöveti homeosztázis fenntartását. E folyamatsornak kulcsfontosságú lépése az efferocitózis, ami az elpusztult sejtek eltávolítását jelenti. Az efferocitózis hibái esetén az el nem távolított sejtek szétesnek, gyulladás alakul ki a szövetekben, ami ezáltal károsodik, valamint hosszú távon autoimmun és más, krónikus gyulladásal járó megbetegedések (mint például a reumatoid arthritisz) fejlődnek ki. Az eltávolításban nagy szerepet játszanak a makrofágok, melyek képesek érzékelni, felismerni, bekebelezni és lebontani a haldokló, illetve már elhalt sejteket. Amennyiben az efferocitózis a szöveti turnover részeként történik, akkor gyulladás kialakulása nélkül zajlik le, ha azonban egy gyulladásos reakcióban elhalt sejteket távolít el, az efferocitózis folyamatában fenotípust váltó makrofágok állítják le a gyulladás folyamatát és szervezik az azt követő szöveti regenerációt.

Kutatásom középpontjában az elhalt sejtek eltakarításában résztvevő csontvelői eredetű makrofágok álltak. Egyrészt érdekelt, hogy egy eddig kevésbé vizsgált, új retinoid, a dihidroretinol, melyet a retinol szaturáz enzim hoz létre, hogyan hat a makrofágok sejtfeltevő képességére, ha a monocita-makrofág érés során jelen van. Másrészt az vizsgáltam, hogy az érett makrofágokban az elhalt sejtek felvétele során észlelt hemoxigenáz-1 enzim nagyfokú indukciója miatt, illetve hogyan történik olyan sejtek felvétele esetén is, amelyek alig tartalmaznak hemet. Minden apró részlet, ami közelebb visz minket az elhalt sejtek eltávolítása során zajló molekuláris mechanizmusok pontosabb ismeretéhez, segíthet olyan kezelések kialakításában, melyek a fentebb említett autoimmun és gyulladásos megbetegedések leküzdésében hasznosak lehetnek.

4. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

4.1. Efferocitózis

Becslések szerint naponta nagyjából 200 - 300 milliárd sejt pusztul el és termelődik újra a test különböző szöveteiben a homeosztázis fenntartása érdekében (Arandjelovic és Ravichandran 2015; Elliott és Ravichandran 2016). A nem kívánt sejtpopulációk eltávolítása genetikailag meghatározott módon, immunválasz kiváltása nélkül, szabályozott folyamat révén történik, melyet apoptózisnak nevezünk (Henson és Hume 2006; Nagata és mtsai. 2010). Nem kívánt sejtek közé tartoznak az előregedett, feleslegessé vált, baktériumokkal vagy vírusokkal fertőzött, tumorgenezisre képes vagy helyrehozhatatlanul károsodott sejtek, melyek gyors és megfelelő eliminálása kulcsfontosságú nemcsak a homeosztázis és a normál egészségi állapot fenntartásában, hanem autoimmun betegségek, különböző fertőzések vagy a rák kialakulásának megelőzésében is.

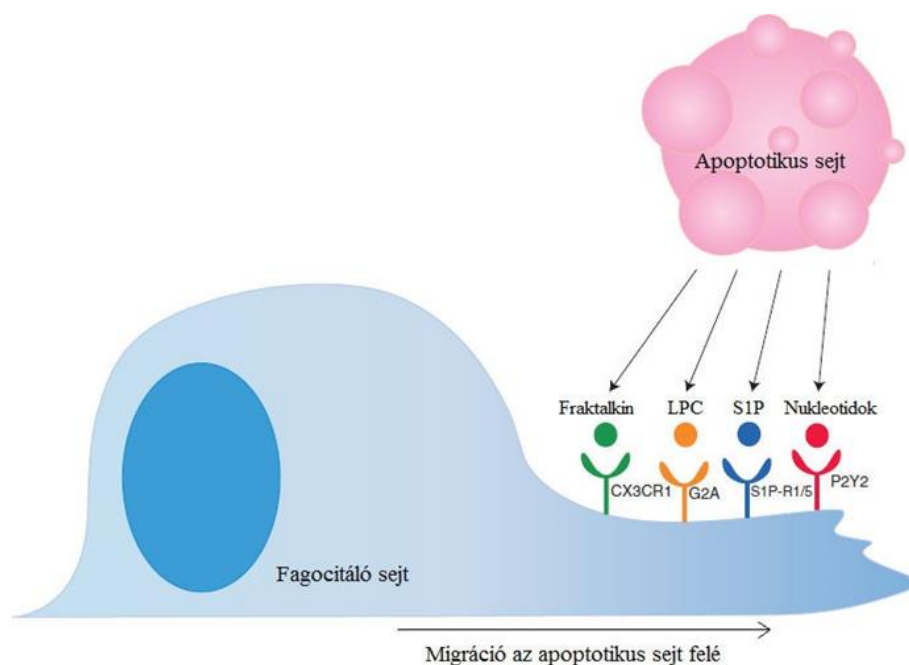
Az apoptózissal elhalt sejtek (apoptotikus sejtek) eltávolítása fagocitózissal történik, melynek során a 0,5 μm -nél nagyobb szilárd anyagok membránnal határolt vezikulákba, ún. fagoszómákba kerülnek, ahol a fagoszóma lizoszómával történő egyesülését követően lebomlanak (Ravichandran és Lorenz 2007). A sejtmaradványok felvételére hivatásos fagocitáló sejtek, úgymint monociták, makrofágok, dendritikus sejtek, eozinofil és neutrofil granulociták (Rabinovitch és mtsai. 1995), valamint nem professzionális fagocitáló sejtek is képesek, például a fibroblaszt és az endotél sejtek (Flannagan és mtsai. 2012). A két fagocitáló sejttípus abban tér el egymástól, hogy a hivatásos fagocitáló sejtek képesek többféle apoptotikus sejt által kibocsájtott jel gyors és hatékony felismerésére (Rosales 2005), valamint gyulladást keltő vagy gátló anyagok kibocsájtására is, attól függően, hogy milyen sejtet, sejtmaradványt bekebeleztek be (Fadok és mtsai. 2001). Az elhalt sejtek fagocitózisa mechanizmusában különbözik a klasszikus értelemben vett fagocitózistól, ezért a folyamatot efferocitózisnak nevezték el a latin „efferre” szó alapján, melynek jelentése „sírba vinni” vagy „eltemetni” (deCathelineau és Henson 2003). Az efferocitózis során először az elhaló sejt magához vonzza a fagocitáló sejteket ún. „találj meg” jelek kibocsájtásán keresztül, majd a fagocitáló sejtek sejtfelszíni efferocitózis-kapcsolt receptoraik segítségével megkülönböztetik az elhaló sejtet az egészséges, élő sejtektől. Az apoptotikus sejtek felszínén megjelenő „egyél meg” jelek érzékelését követően a fagocitáló sejt citoszeletális átrendeződésen megy keresztül, hogy képes legyen bekebelezni a gyakran vele azonos méretű elhalt sejtet. Végül a felvett sejt lebontása és elsősorban a helyi immunválasz csillapítását segítő gyulladáscsökkentő

mediátorok szekréciója következik. Az efferocitózis szakaszait az alábbiakban részletesen ismertetem.

4.1.1. Fagociták vándorlása az elhaló sejtek felé

Az efferocitózis első szakaszában az elhaló sejtek ún. „találj meg” jeleken keresztül üzennek az állapotukról a közelben lévő fagocitáló sejteknek. A „találj meg” jelek az apoptózis korai szakaszában szabadulnak föl, és kemoattraktánsként hatnak, azaz előidézik a professzionális fagocita sejtek migrációját az elhaló sejtek irányába. A „találj meg” jelek lehetnek fehérjék, lipidek, lipidtermékek és nukleotidok. Fehérje jel például a fraktalkin (Truman és mtsai., 2008), ami egy membrán-asszociált fehérje, mely főként elhaló B-sejtekből és neuronokból szabadul fel mátrix metalloproteázok hasítását követően (Hundhausen és mtsai., 2003). A lizofoszfatidilkolin (LPC) volt az első lipid szignál, melyet „találj meg” jelként azonosítottak. A foszfolipáz A2 kaszpáz-3-függő módon történő aktivációja eredményezi a foszfatidilkolin átalakulását LPC-ná (Lauber és mtsai., 2003). Biológiaiilag aktív lipidtermék a szfingozin-1-foszfát (S1P; Gude és mtsai., 2008), melyet szfingozin-kináz 1 vagy 2 hoz létre szfingozin molekula foszforilálásával (Pitman és mtsai., 2016), amely így a fagociták kemotaxisát G-fehérjéhez kapcsolt receptorok aktiválásával indítja el (Garris és mtsai., 2013). Az apoptózis korai szakaszában kis mennyiségű intracelluláris nukleotid például adenozin-trifoszfát (ATP) és uridin-trifoszfát (UTP) szabadul fel kaszpáz-3 függő módon pannexin-1 csatornákon keresztül (Chekeni és mtsai., 2010), melyek bár hamar degradálódnak az extracelluláris térben lévő nukleotidázok által, nagy szerepet játszanak a környező szövetspecifikus makrofágok vonzásában (Ravichandran 2010).

A „találj meg” jelzéseket a fagocitózisra képes sejtek felszínén található különféle receptorok érzékelik (1. ábra), és elindítják a fagocita vándorlását az elhaló sejt felé. A korábban már említett fraktalkint a CX3C kemokin receptor 1 (CX3CR1) érzékeli, míg az LPC-t a G-fehérje kapcsolt G2A receptor. A S1P-ot ötféle receptor is képes felismerni (S1PR1-R5), melyből mind az öt megtalálható a makrofágokon (Rosen és Goetzl, 2005). Egyre több bizonyíték támasztja alá, hogy a nukleotidok a monocitákon és makrofágokon található P2Y2 receptorokon keresztül hatva az előbb felsorolt szignálok jelpályáinak amplifikálásán keresztül indítják el a fagociták mozgását az elhaló sejt felé (Elliott 2009).



1. ábra: Az apoptotikus sejt által kibocsájtott "találj meg" jelek és a fagocita sejten található receptoraik. Az apoptotikus sejtől „találj meg” jelek szabadulnak föl, többek között fraktalkin, LPC, S1P és nukleotidok, melyek a fagocitáló sejt felszínén megjelenő megfelelő receptorhoz kapcsolódnak (CX3CR1, G2A, S1P-R1/5, P2Y2). A „találj meg” jelek felismerése és érzékelése indítja el a makrofágokat a haldokló sejt felé. (Hochreiter-Hufford A., és Ravichandran KS., 2013)

4.1.2. Az apoptotikus sejtek felismerése

Amikor a fagociták a célsejtek közelébe kerülnek, meg kell különböztetniük egymástól az élő és az elhalt sejteket. Ebben a folyamatban segítik őket az apoptotikus sejtfelszínen megjelenő „egyél meg” jelek, valamint az élő sejtek felszínén található „ne egyél meg” jelzések, melyeket a fagocitáló sejtek a sejtfelszínükön található receptoraikon keresztül érzékelnek. Bizonyos fagocita receptorok képesek közvetlenül kapcsolódni az elhaló sejteken lévő ligandjaikhoz, míg más receptorok szolubilis „híd” molekulákat használnak közvetítőként, hogy felismerjék az apoptotikus sejtek „egyél meg” szignáljait. Az alábbiakban részletezem az apoptotikus sejtek felismerését, és az élő sejtek által használt, bekebelezést elkerülő mechanizmusokat.

4.1.2.1. „Egyél meg” jelek és érzékelésük

Az elhaló sejt felszínén sokféle „egyél meg” jel jelenhet meg. Ilyen például a sejt felszínén lévő fehérjék glikozilációja, a sejt felszín töltésének megváltozása (Kinchin és Ravichandran, 2007), az intercelluláris adhéziós molekula 3 (ICAM3) expressziója, oxidált-alacsony denzitású lipoprotein (LDL)-szerű helyek és trombospondin kötőhelyek kialakulása (Fadok és mtsai., 1998), továbbá alapvetően sejten belül található fehérjék, úgymint kalretikulin, annexin I vagy foszfatidilszerin (PS) sejt felszíni megjelenése (Arur és mtsai., 2003; Gardai és mtsai., 2005; Obeid és mtsai., 2007). Ezeket összefoglaló néven apoptotikus sejt asszociált molekuláris mintázatoknak (ACAMP) hívjuk. A számos „egyél meg” jel közül a leginkább ismert, és rendkívül széles körben tanulmányozott jel a PS (2. ábra). Az élő sejtekben a PS-t ATP-függő transzlokázok tartják a lipid kettősréteg belső felében (Balasubramanian és Schroit, 2003), ám amikor a sejt haldoklik, a PS kaspáz-függő módon megjelenik a sejt felszínén (Nagata és mtsai., 2010). Rendkívül gyors módon, mindössze néhány óra alatt a PS koncentrációja az elhaló sejt felszínén nagyjából 280-szeresre nőhet (Ravichandran 2010).

Fontos lépése az efferocitózisnak az elhalt sejtek „egyél meg” jeleinek érzékelése, melyhez rengeteg különböző receptor található a fagocita sejtek felszínén, például komplement receptor 3 és 4, a T-sejt immunglobulin és mucin domén (TIM) család tagjai, mannóz receptorok, „cluster of differentiation” (CD) 36, ún. „scavenger” receptorok, valamint integrin $\alpha_v\beta_3$ és $\alpha_v\beta_5$ receptorok (Park és Kim, 2017). A lektinek az elhaló sejt felszínén jelenlévő megváltozott cukormolekulákhoz képesek kötődni (Ezekowitz és mtsai., 1990), a CD14 az ICAM3-hoz kötődik (Gregory és mtsai., 1998); valamint a „scavenger” receptorok az oxidált-LDL molekulákhoz kapcsolódnak (Gordon 1999). Az elhalt sejtek eltakarításában kulcsfontosságú szerepet betöltő PS-t számos membrán receptor képes felismerni, úgymint a stabilin-1 és 2 (Miyanishi és mtsai., 2007), a TIM-4 (Hanayama és mtsai., 2002), vagy az agy-specifikus angiogenezis gátló 1 (BAI1; Park és mtsai., 2007).

A PS vagy oxidált PS felismerését egyes receptorok esetén a receptort a PS-hez kötő híd molekulák segítik, például az S fehérje, a tej zsírcsomó epidermális növekedési faktor 8 (MFG-E8) vagy a növekedés specifikus gátló 6 (Gas6) (Fadok és mtsai., 1998; Scott és mtsai., 2001; Thorp és mtsai., 2008). Az MFG-E8 fehérje egyrészt az apoptotikus sejt felszínén jelenlévő PS-hez kötődik, másrészt pedig a fagocita sejt felszínén levő integrin $\alpha_v\beta_3/\alpha_v\beta_5$ receptorokhoz, így képezve hidat az apoptotikus sejt és az azt felvevő makrofág között (Birge és mtsai., 2016). A transzglutamináz 2 (TG2) az integrin β_3 koreceptoraként képes megkötni az MFG-E8-at, előidézve ezzel az apoptotikus sejtek felvételét a Rac családhoz tartozó kis

GTPáz 1 (Rac1) aktiválása által. Kollégáim korábban kimutatták, hogy TG2 hiányában az integrin $\beta 3$ receptor működése zavart szenved, ezért a makrofágok nem képesek megfelelő módon felvenni az apoptotikus sejteket (Tóth és mtsai., 2009; Sággy és mtsai., 2019). A Gas6 és az S fehérje az elhaló sejt felszínén megjelenő PS-t a fagocita sejten található Tyro-3-Axl-Mer (TAM) családba tartozó receptorokkal kapcsolják össze (Nakano és mtsai., 1997; Nagata és mtsai., 2010). A CD36 az integrin $\beta 3$ és $\beta 5$ receptorokkal együtt a trombospondinhoz kötődik (Savill és mtsai., 1990); az alacsony denzitású lipoprotein receptor-kapcsolt fehérje 1 (LRP1)/CD91 pedig a kalretikulinnal együtt a komplement C1q komponenshez képes kapcsolódni (Ogden és mtsai., 2001).

Az efferocitózis során az elhaló sejtekből kaszpázfüggő módon felszabaduló ATP, a makrofágok felszínén az 5'-ektonukleotidázok által adenzinná alakul át, hogy így aktiválja az adenzin receptorokat (Elliott és mtsai., 2009; Sándor és mtsai., 2017; Köröskényi és mtsai., 2011; Yamaguchi és mtsai., 2014). Négyféle adenzin receptor létezik, melyek mindegyike G-fehérje kapcsolt receptor. Az adenzin A_1 receptort (A_1R) 10^{-10} - 10^{-8} M koncentrációjú adenzin képes stimulálni és közvetíti az intracelluláris ciklikus AMP (cAMP) szint csökkenését; az adenzin A_{2A} (A_2AR) és A_{2B} (A_2BR) receptorokat magasabb (5×10^{-7} M és 1×10^{-5} M) koncentrációjú adenzinnal lehet stimulálni és a cAMP szint növelését mediálják; míg az adenzin A_3 receptorok (A_3R) 10^{-6} M adenzin koncentrációval stimulálhatóak és az adenilát cikláz gátlását közvetítik (Fredholm és mtsai., 2011). Az adenzin receptorok választ azonban a sejt felszíni expressziójuk is meghatározza, így, ha összehasonlítjuk a ligand hatásosságát a cAMP szint változásában receptor sűrűség alapján, megfigyelhető, hogy az adenzin szinte azonos hatású az A_1R -ok, az A_2AR -ok és az A_3R -ok esetében, de körülbelül 50-szer kisebb hatású az A_2BR -oknál (Fredholm és mtsai., 2001). Ennek eredményeként, fiziológias körülmények között, az adenzin főleg az A_{1A} , A_{2B} és A_3 receptorokon keresztül fejt ki hatását. A makrofágokról ismert, hogy A_{2A} , A_{2B} és A_3 receptorokat fejeznek ki (Fredholm és mtsai., 2011). Az efferocitózis során az A_2AR -ok kifejeződése fokozódik, míg az A_3R -oké csökken (Duró és mtsai., 2014). Ez arra utal, hogy az A_3 receptorok közvetítik az adenzin hatását az efferocitózis közben a fagocitózis kezdetén és azt megelőzően, míg később az A_{2A} receptorok hatása válik dominánssá. Saját és más laborok tanulmányai azt mutatják, hogy az adenzin A_{2A} receptorok az adenilát cikláz útvonalat aktiválva hozzájárulnak az apoptotikus sejteltakarítás gyulladáscsökkentő programjához (Köröskényi és mtsai., 2011; Yamaguchi és mtsai., 2014), míg az adenzin A_3 receptorok inkább a makrofágok kemotaktikus navigációjában vesznek részt (Joós és mtsai., 2017).

4.1.2.2. „*Ne egyél meg*” jelek az élő sejtek felszínén

A fagocitáló sejtek nem csak az előző részben ismertetett „*egyél meg*” jelek alapján tudják megkülönböztetni az élő sejteket az elhaló sejtektől, hanem ún. „*tolerálj*” vagy „*ne egyél meg*” jelek is segítik őket. Ilyen jel a CD47 membránfehérje, ami az egészséges sejtek felszínén található. Ha ezt a jelet felismeri a fagocita sejt a szignál regulatórikus fehérje (SIRP)- α receptora segítségével, akkor nem történik bekebelezés, még a PS jelenlétében sem (Gardai és mtsai., 2005; Tsai és mtsai., 2008). Apoptózis során a CD47 expressziója jelentősen csökken, segítve ezzel a sejt felvételt (Lv és mtsai., 2015). Hasonló funkcióval bír a CD31 (Brown és mtsai., 2002), valamint a CD24 molekula is (Barkal és mtsai., 2019).

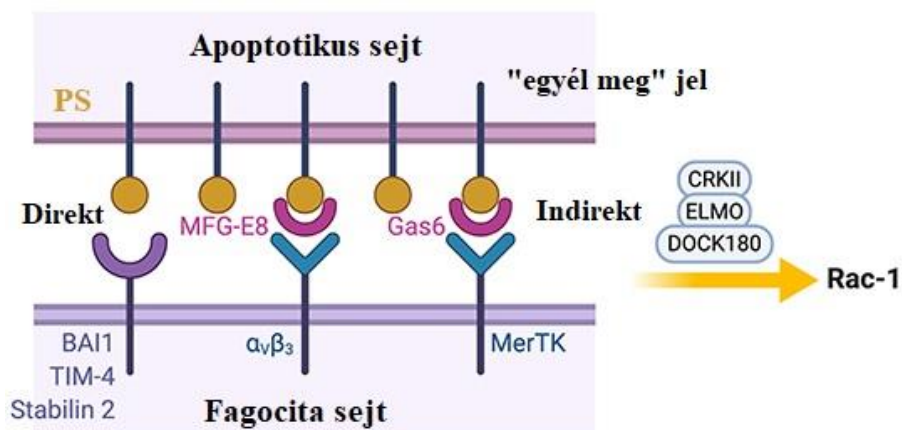
4.1.3. Az elhalt sejtek eltávolítása

Amikor az apoptotikus sejttel megtörtént a kapcsolódás, a fagocitáló sejt egy citoszeletális átalakuláson megy keresztül, mely feltétlenül szükséges az elhalt sejt bekebelezéséhez. Ebben a folyamatban fontos szerepet töltenek be a Rho családba tartozó GTPázok, melyek „molekuláris kapcsolóként” működnek a jelátviteli útvonalak szabályozásában. Guanozin trifoszfát (GTP) kötött formában vannak aktív állapotban, amit a specifikus guanin-nukleotid-kicserélő faktorok (GEF) hoznak létre azáltal, hogy a guanozin difoszfátot (GDP) GTP-vé cserélik. A „kikapcsolásban” a GTPáz aktiváló fehérjék (GAP) vesznek részt, melyek a GTP GDP-vé való hidrolízisét katalizálják. A kis G-fehérjék Ras szupercsaládjába tartozó GTPáz a RhoA, a Cdc42 és a Rac fehérje. Az elhalt sejtek eltakarítási folyamatában a RhoA általi szabályozása a Rho-asszociált fehérje kinázon (ROCK) keresztül történik. Az aktív, GTP-hez kötött Rho növeli a ROCK kináz aktivitását, amely a miozin könnyű lánc foszforilációját idézi elő, elősegítve ezáltal a sejtösszehúzódást (Riento és Ridley, 2003). A kontraktilitás akár negatívan is befolyásolhatja a fagociták álláb kialakító képességét és a haldokló sejtek felvételét, így a RhoA gátlása a bekebelezés korai szakaszában lehet előnyös. A RhoA gátló szerepe a bekebelezésben ellentétben áll a komplement-receptor által közvetített fagocitózissal gyakorolt pozitív hatásával (Olazabal és mtsai., 2002). Ez magyarázhatja azt a morfológiai megfigyelést, amely során a komplement-receptor által közvetített fagocitózis során úgy tűnik, mintha a célsejtek „belesüllyednének” a fagocitákba (Aderem és mtsai., 1999), míg az apoptotikus sejtek bekebelezése aktív membrán mozgást igényel (Hoffmann és mtsai., 2001). A RhoA-val ellentétben a GTP-hez kötött Rac fehérje mennyisége folyamatosan növekszik az apoptotikus sejtek felismerését követően (Albert és mtsai., 2000; Leverrier és Ridley., 2001;

Tosello-Tramont és mtsai., 2007). A Rac aktiválása evolúciósan konzervált esemény, amely kulcsfontosságú az apoptotikus sejtek eltakarítása szempontjából. Jelenleg a pontos szerepe a Cdc42-nek nem teljesen tisztázott, de bizonyos fehérjéket, melyek a Cdc42-GTP-hez kötődnek, összefüggésbe hoztak az apoptotikus sejtek bekebelezésével (Leverrier és mtsai., 2001; Leverrier és Ridley., 2001).

4.1.4. Rac aktiválás a Dock180-ELMO1 útvonalon keresztül

Számos *Caenorhabditis elegans*ban, *Drosophila melanogaster*ben és különböző emlősmodellekben végzett tanulmány vezetett egy csoportnyi fehérje megismeréséhez, melyek a Rac aktiválásában játszanak fontos szerepet. A 180 kDa fehérje, a Dock180 és a bekebelezés és sejtmotilitás fehérje 1 (ELMO1) számos citoskeletális átrendeződéssel járó folyamatban vesznek részt, mint amilyen a sejtek migrációja, az izomfúzió vagy az elhalt sejtek fagocitózisa (Nagata és mtsai., 2010). A Dock180 egy Rac GEF, melyből hiányzik a hagyományos Dbl-homológ és pleckstrin-homológ domén, ami a GTP kicseréléshez szükséges (Brugnera és mtsai., 2002). Az ELMO fehérjét adaptor fehérjeként azonosították, amely képes direkt módon kapcsolódni a Dock180-nal, létrehozva ezzel egy nem szokványos, két részből álló Rac GEF-et (Brugnera és mtsai., 2002). Az ELMO hozzákapcsolódása a Dock180 karboxi-terminál régiójához megnöveli a Dock180 aktivitását és ez azt eredményezi, hogy közvetlenül hozzákapcsolódik a transzmembrán receptor BAI1 karboxil végéhez (Park és mtsai., 2007). Az ELMO1 önmagában nem képes az elhalt sejtek felvételét indukálni, ám a Dock180 fehérjével együtt erősen növelik a GTP kötött Rac szintjét, ezáltal pedig a sejtfelvételt (Gumienny és mtsai., 2001; Hasegawa és mtsai., 1996). Tosello-Tramont kísérletekkel igazolta, hogy a CrkII (csirke tumor vírus no. 10 regulátor kináz II) adapter fehérje kapcsolódása a Dock180-ELMO komplexhez segíti a hatékony bekebelezést, azonban a közvetlen interakció a CrkII és a Dock180 fehérje között nem feltétele az elhalt sejtek eltakarításának (Tosello-Tramont és mtsai., 2007). Több fagocita receptort azonosítottak, melyek a Dock180-ELMO útvonalat használják. Ilyen a 2. ábrán látható integrin $\alpha_v\beta_3$ és $\alpha_v\beta_5$, a TAM receptorcsaládba tartozó Mer tirozin kináz receptor (MerTK), és a már korábban említett BAI1 (Park és mtsai., 2007).



2. ábra: A leginkább tanulmányozott „egyél meg” jel, a foszfatidilszerin (PS) és érzékelése a fagocita sejt felszínén megjelenő receptorok által. A BAI1, TIM4 és a stabilin 2 a PS közvetlen felismerésére képes receptor, míg az integrin receptorok ($\alpha_v\beta_3$) és a tirozin kináz receptorok (MerTK) közvetett módon ún. híd molekulák (MFG-E8, Gas6) segítségével együtt ismerik fel a PS-t. (Asare és mtsai., 2020)

4.1.5. A bekebelezett apoptotikus sejt emésztése

A felismerés és bekebelezés után az apoptotikus sejt eltávolításának folyamata még nem teljes, a felvett anyagot megfelelően le is kell bontani. Ehhez elengedhetetlen a fagocita által felvett célsejt membránnal körülhatárolt partikulumának, az ún. fagoszómának az elsavasodása, majd egyesülése a lizoszómával, mely számos emésztőenzimet tartalmaz (Kinchen és Ravichandran, 2008). A lebontás során a felvett sejt alapvető alkotóelemeire bomlik szét: nukleotidokra, zsírookra, peptidekre és aminosavakra. Mivel a fagociták gyakran nem csak egy, hanem több sejtet, sejtmaradványt is felvesznek, ezért különösen fontos a homeosztázis fenntartása. Ebben segít például a mitokondriális membrán fehérje, az UCP2, mely szétkapcsolja az oxidatív foszforilációt az ATP szintézisétől, lecsökkentve a sejtek mitokondriális membránpotenciálját, ezáltal pozitívan szabályozva a fagociták sejtfelvevő kapacitását (Park és mtsai., 2011); vagy a lizoszómális enzimek közül a DNáz II, ami a DNS lebontásáért felelős (Kawane és mtsai., 2001).

4.1.6. A fagociták válaszreakciója: gyulladáscsökkentő jelátvitel

Az efferocitózis egyik kulcsfontosságú biológiai jellemzője, hogy nem generál immunogén választ és gyulladásos folyamatokat. Ellentétben a kórokozók felvételével vagy az Fc receptor mediált fagocitózissal, az apoptotikus sejtek bekebelezése nem vezet a makrofágok gyulladás elősegítő citokintermeléséhez. *In vitro* vizsgálatok segítségével már korábban kimutatták, hogy az apoptotikus sejteket felvevő makrofágok gyulladáscsökkentő citokineket bocsájtanak ki, például transzformáló növekedés faktor (TGF)- β -át (Fadok és mtsai., 2001) vagy interleukin (IL) 10-et (Voll és mtsai., 1997). Ezek a citokinek regulátor T-sejtek differenciálódását indukálják, ami a gyulladásos válasz kialakulásának megelőzésében játszik fontos szerepet (Green és mtsai., 2009). Ezzel egy időben az apoptotikus sejtek jelenléte gátolja a pro-inflammatórikus citokinek, például tumor nekrosis faktor (TNF), IL-1 és IL-12 termelődését (Voll és mtsai., 1997). Ez a gátlás nagyrészt a bekebelező makrofágokból felszabaduló TGF- β -nak tulajdonítható (Lucas és mtsai., 2006). Érdekes módon az elhalt sejt konkrét „lenyelése” nem feltétele a gyulladáscsökkentő citokinek termelődésének. Huynh és kollégái 2002-ben kimutatták, hogy PS vezikulák jelenléte is képes stimulálni a TGF- β termelődését és kibocsátását.

A TGF- β egy multifunkcionális citokin, ami számos fejlődési folyamat szabályozásában vesz részt (Massagué 2012). A TGF- β szupercsalád tagjai, úgymint a csont morfogenetikus fehérjék (BMP-k), a növekedési és differenciációs faktorok és az aktivinek, számos biológiai folyamatot szabályoznak, például a sejtek proliferációját, differenciációját, migrációját, apoptózist, angiogenezist, de szerepük van az embrionális fejlődés irányításában is (Massagué 2012). A ligandok kötődése a BMP szerin/treonin kináz receptorokhoz aktiválja azok kináz aktivitását, melyek a Smad fehérjéket foszforilálva továbbítják a jeleket a receptortól a célgénekhez (Wrana és mtsai., 1994). Előfordul, hogy a BMP jelek által kiváltott folyamat nemcsak a Smad fehérjéken keresztül, hanem más intracelluláris jelátviteli molekulákon keresztül regulálódik. Ezeket összefoglaló néven a BMP jelátvitel „nem-Smad” útvonalának nevezik, és érinthetik az extracelluláris szignál által szabályozott protein kináz (MEK1/Erk), a p38 mitogén által aktivált protein kináz, a c-Jun N-terminális kináz és a foszfatidil-inozitol 3-kináz által irányított jelpályákat (Zhang, 2009). Jelenleg 9 Smad fehérjét ismerünk, melyek közül a Smad2 és Smad3 specifikusan TGF- β és aktivin mediátorok (Nakagawa és mtsai., 2004). A BMP-2 leginkább a csont falósejtjeinek (oszteoklasztok) kialakulását segíti, főként azáltal, hogy a kolónia stimuláló faktor-1 expresszióját indukálja az oszteoklaszt képződés során (Sun és mtsai., 2014). Bár a BMP-2 általában a Smad 1/5/8 és esetleg 9 transzkripció

faktorokon keresztül hat (Holtzhausen és mtsai., 2014), kimutatták, hogy egy nem szabályos útvonalon keresztül is hathat, amely a BMP-2/TGF- β 1 receptor heterodimereken keresztül aktiválódik, és részét képezi a Smad3 is (Holtzhausen és mtsai., 2014).

4.2. Makrofágok

A makrofágok fontos szerepet töltenek be a veleszületett immunitásban, a szöveti homeosztázis fenntartásában, helyreállításában, továbbá alapvető szövetspecifikus funkciókat látnak el, és megvédik a szervezetet a fertőzésektől. Képesek eltávolítani az apoptotikus sejteket, elpusztítani a fertőzést okozó ágenseket, például baktériumokat, továbbá korlátozzák a sejtnekrózist, miközben aktiválják az adaptív immunválasz résztvevőit a patogén-asszociált antigének lebontásával és prezentálásával az effektor T-sejtek felé (Martin és mtsai., 2014; Blander, 2017).

4.2.1. A makrofágok eredete

Sok éven át a kutatók úgy gondolták, hogy a makrofágok kizárólag a keringő monociták differenciálódásából keletkeznek, ám a sejtek közötti morfológiai és funkcionális különbségek nem támasztják alá ezt a hipotézist (Epelman és mtsai., 2014). A legújabb tanulmányokban bebizonyították, hogy a legtöbb felnőtt szövetben megtalálható rezidens, vagy más néven szöveti makrofágok embrionális prekursor sejtekből jönnek létre, és a fejlődés igen korai szakaszában, az embrionális korban a megfelelő szövetbe vándorolnak, így már a megszületés előtt az adott szövetben tartózkodnak, ahol felnőtt korban önmegújulás révén tartják fenn magukat (Ginhoux és Guilliams, 2016).

Jelenlegi tudásunk szerint az emlős makrofágok három forrásból fejlődnek ki, ami a hemopoetikus (vérképző) őssejtek három generációjának felel meg (Gomez és mtsai., 2015). A vérképző őssejtek első generációja már a szikhólyag falában előbukkan (Gomez és mtsai., 2015). Ezek az erősen specializálódott makrofágok a mikrogliák, melyek a központi idegrendszer fontos résztvevői, továbbá egyedülállónak tekinthetők a makrofágok között, mivel nem rendelkeznek monocita stádiummal (Hoeffel és mtsai., 2015). A hemopoetikus sejtek második generációja, az eritro-mieloid progenitor néven ismert sejtek, a szikhólyag kapillárisainak hemogén endotéliumából származnak. Ezekből a prekursorokból differenciálódó makrofágok molekuláris fenotípusos mintázata rendkívül hasonló az első generációs makrofágokéhoz, nagy különbség azonban, hogy a differenciálódásuk már a

monocita stádiumon keresztül megy végbe (Perdiugero és Geissmann, 2016; Hoeffel és mtsai., 2015, Gomez és mtsai., 2015). Az eritro-mieloid sejtek ezen generációjából fejlődik ki a legtöbb szöveti makrofág populáció. A harmadik generáció az aorto-gonado-mezonefrális zóna homogén endotéliumából fejlődik ki, és a különböző szervek, például a máj, további kolonizálása a feladatuk (Hoeffel és mtsai., 2015).

Több típusa ismert a szöveti makrofágoknak: a máj Kupffer sejtjei, a vesében található mezangiális makrofágok, a csontszövetben jelen lévő oszteoklasztok vagy az agy mikroglia sejtjei. Nagyfokú heterogenitásuk és diverzifikációjuk elengedhetetlen ahhoz, hogy feladatukat el tudják látni a különféle szövetekben. Számos transzkriptomikai kutatás támasztja alá, hogy a szöveti makrofágok az adott szövetre jellemző specifikus géneket fejeznek ki (Gautier és mtsai., 2012).

A monociták rövid életű, rendkívül képlékeny és dinamikus sejtek, melyek kiegészítik a klasszikus szövet-rezidens mononukleáris fagocita sejteket. A vérben cirkuláló monocita prekursor sejtek különböző citokinek és növekedési faktorok hatására szövetekbe vándorolnak, ahol makrofágokká differenciálódnak az érzékelt jeleknek megfelelően (Fujiwara és Kobayashi, 2005). Míg a szöveti makrofágok inkább a szövetek ki- és átalakulásában, illetve azok homeosztázisának fenntartásában játszanak szerepet, a monocita eredetű makrofágok elsősorban a gazdaszervezet védelmét segítik, illetve a szöveti sérülésekre adott biológiai választ vezénylik. A különbözőségeiktől eltekintve, az embrionális és a felnőtt eredetű makrofágok számos szervben együtt léteznek, arányuk pedig függ az adott szervtől és a kórélettani körülményektől, például gyulladástól vagy éppen regenerációtól (Davies és mtsai., 2013; Galli és mtsai., 2011; Sheng és mtsai., 2015; Varol és mtsai., 2015).

A makrofágokat tanulmányozó kutatások általában *in vitro* környezetben vizsgálják a makrofágokat. Egerek esetében leggyakrabban a csontvelői eredetű makrofágokat (BMDM) tanulmányozzák, ahogyan tettem ezt én is a kutatásaim során. Ilyenkor megfelelő környezetet teremtünk, és különböző stimulusokat használunk a differenciálódás előidézéséhez, például makrofág kolónia stimuláló faktort (M-CSF) alkalmazunk, mely jelentős hatással van a polarizációra (Fleetwood és mtsai., 2007). Egy korábbi tanulmányban azt találták, hogy az M-CSF egy olyan jelátviteli útvonalat aktivál, mely IL-10 expresszióhoz vezet, ezáltal pedig a szöveti gyógyulást indukálja (Fleetwood és mtsai., 2007). *In vitro* körülmények között a makrofágok képesek megváltoztatni a polarizáltságukat, például citokinek, mikrobák vagy egyéb modulátorok hatására (Murray és mtsai., 2014).

Kísérleteim egy részében én is azt tanulmányoztam, hogy a differenciáció során alkalmazott retinoid származékok hogyan befolyásolják a makrofágok génkészletét, illetve fagocitáló

képességét. Az általunk alkalmazott módszer egy általánosan elfogadott modell, ugyanakkor nem szabad elfelejteni, hogy a mikrokörnyezet nagy hatással van a makrofágokra, és *in vitro* körülmények között nem tudunk pont olyan környezetet teremteni, mint a szövetekben. *In vivo* a különböző polarizációjú és különböző aktivációs markerekkel rendelkező makrofágok más sejtekkel együtt vannak jelen a szövetekben, folyamatos kölcsönhatásban. A mikrokörnyezet hatását és fontosságát igazolják azok a kísérletek is, melyekben azt tapasztalták, hogy a környezetükből kivett szöveti makrofágok transzkriptómja drasztikusan megváltozott az áthelyezés után (Gosselin és mtsai., 2017). Jó példa erre egy Gosselin és munkatársai által végzett kutatás, melyben kimutatták, hogy egér és ember mikroglia sejtek génexpressziójában több száz gén kifejeződése változott meg azáltal, hogy a normál szöveti környezetből tenyésztői környezetbe helyezték át őket.

4.2.2. Makrofág fenotípusok

A mikrokörnyezet által és a változatos stimulusok hatására létrejövő makrofágokat alapvetően két fő fenotípushoz soroljuk: a patogének eltávolításában részt vevő gyulladásos M1, illetve az alternatívan aktiválódó, sejtproliferációban és szöveti regenerálásban részt vevő, gyulladásellenes M2 fenotípushoz (Angsana és mtsai., 2016; Elliott és mtsai., 2017).

Ha a makrofágokat patogén-asszociált molekuláris mintázatok vagy gyulladásos citokinek, úgymint IL-12, TNF- α vagy interferon (IFN)- γ aktiválják, akkor a polarizáció az M1 fenotípus irányába tolódik el (Atri és mtsai., 2018). Általánosságban elmondható, hogy az M1 típusú makrofágok veszik fel a harcot az extracelluláris patogénekkel szemben, illetve fokozzák a daganatellenes hatást. Az M2 makrofágok leginkább a sebgyógyulásban és a gyulladás csökkentésében játszanak szerepet. Funkcióikból adódóan többféle alcsoportot találunk közöttük (M2a, M2b, M2c vagy M2d), mint az M1 makrofágok esetében. A különböző alcsoportokhoz tartozó makrofágok más növekedési faktorokat, citokineket és kemokineket állítanak elő (Martin és mtsai., 2014). A témában rendelkezésünkre álló rengeteg információ ellenére a makrofág polarizáció molekuláris mechanizmusa még nem teljesen ismert.

Gyulladás vagy sérülés esetén az érintett szerv sorsát az M1/M2 makrofág-egyensúly polarizációja szabályozza, illetve határozza meg. Ha a fertőzés vagy gyulladás elég súlyos, akkor a makrofágok először az M1 fenotípust mutatják, és TNF- α -t, IL-1 β -t, IL-12-t és IL-23-at szabadítanak fel az adott inger ellen. De ha az M1 fázis sokáig áll fenn, az szövetkárosodást okozhat, ezért az M2 makrofágok nagy mennyiségű IL-10-et és TGF- β -t bocsátanak ki, hogy

elnyomják a gyulladást, hozzájárulnak a szövetek helyreállításához és megtartsák a homeosztázist (Shapouri-Moghaddam és mtsai., 2018).

Az efferocitózis a makrofágokat az M2 fenotípus felé tolja el, melyre jellemző, hogy csökkentik a gyulladást elősegítő citokinek, úgymint a korábban említett TNF- α , a kemokin „C-X-C motívum” ligand (CXCL)-8, IL-6 szintjét, és fokozzák a gyulladásgátló mediátorok, mint amilyen az IL-10 és a TGF- β felszabadulását (Fadok és mtsai., 1998; Dalli és Serhan, 2012). Utóbbi fontos szerepet játszik azáltal, hogy gátolja a további monociták és makrofágok toborzását. Az esetlegesen kialakult gyulladás megszüntetése a gyulladást elősegítő citokinek és ún. rezolváló mediátorok közötti egyensúly által szabályozott (Korns és mtsai., 2011). Ilyen rezolváló mediátorok többek között a lipoxinok és rezolvinok, melyek képesek fokozni az apoptotikus sejtek makrofágok általi eltakarítását (Schif-Zuck és mtsai., 2011). A rezolvin E4-ről kimutatták, hogy hatékonyan korlátozza a neutrofil infiltrációt, valamint előidézi az apoptotikus neutrofilek és a már elöregedett vörösvérsejtek makrofágok általi felvételét (Schif-Zuck és mtsai., 2011). Valószínűleg a rezolvin D1 az öregedés során javítja az efferocitózist azáltal, hogy korlátozza az öregedő sejt által közvetített MerTK hasítást (Nishi és mtsai., 2014). A MerTK-kötő hídmolekulák hozzájárulnak az efferocitózis-asszociált gyulladás megoldásához (Nishi és mtsai., 2014; Toda és mtsai., 2014), a TAM tirozin kináz receptorcsalád tagjai pedig az elhalt sejtek makrofágok általi felismerésében, eltakarításában és gyulladáscsökkentő szignálok aktiválásában játszanak szerepet (Qi és mtsai., 2013; Toda és mtsai., 2014).

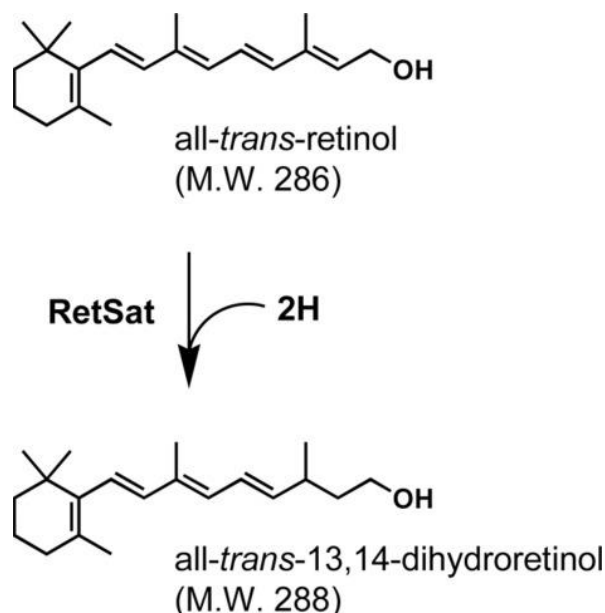
A hatékony efferocitózis folyamata során a haldokló, elhalt sejtek eltűnnek, ezzel pedig elkerülhető, hogy a széteső sejtekből felszabaduló anyagok a környező területekbe kijutva ártalmassá váljanak. Ellenkező esetben az elhalt sejtek másodlagosan nekrotikussá válhatnak, veszély-asszociált molekuláris mintázatokat (DAMP) szabadíthatnak fel a normál szövetekben, ezáltal pedig fokozhatják az esélyét neurodegeneratív rendellenességek, veseproblémák, különböző ráktípusok, vagy asztma kialakulásának (Razi és mtsai., 2023).

4.3. Retinol szaturáz enzim és kapcsolódása az efferocitózishoz

In vivo a makrofágok különböző mértékben vannak kitéve az apoptotikus sejteknek, ezért mindenképpen kell számukra egy gyorsan és hatékonyan működő mechanizmus, ami szükség esetén felkészíti őket a megnövekedett számú elhalt sejt fokozott felvételére. Ebben segítenek a lipidérzékelő receptorok, például a máj X receptor (LXR) (Noelia és mtsai., 2009), vagy a peroxiszóma proliferátor-aktivált receptorok (PPAR; Roszer és mtsai., 2011; Mukundan és

mtsai., 2009), melyek képesek érzékelni a felvett apoptotikus sejt mennyiségét, és válaszreakcióként fokozzák a makrofágok fagocitáló kapacitását azáltal, hogy különféle efferocitózis-kapcsolt molekula expresszióját indukálják. Ezek a receptorok retinoid X receptor (RXR) heterodimerként működnek.

A laboratóriumunkban végzett korábbi tanulmányban kimutatták, hogy a lipidérzékelő receptorok aktiválása fokozza a makrofágokban a retinsav szintézist (Garabuczi és mtsai., 2013), ami részben közvetíti a lipidérzékelő receptorok efferocitózis fokozására gyakorolt hatását az elhalt sejtek eltakarítása során (Sarang és mtsai., 2014). Az apoptotizáló csecsemőmirigyben azonban nem tudták kimutatni a klasszikusan ismert retinsavak termelődését, annak ellenére sem, hogy a RARE LacZ egérben, melyben a LacZ riporter gén expressziója teljes mértékben függ az endogén retinsav szintézistől, megnövekedett retinsav szintézist detektáltak apoptózis indukciót követően (Garabuczi és mtsai., 2013). Ehelyett egy retinaldehyd-dehidrogenáz-függő módon előállított vegyületet találtak, ami molekulatömege alapján valószínűleg dihidroretinol származék. Továbbá ezzel párhuzamosan a retinol szaturáz enzim (RetSat) indukcióját is kimutatták (Sarang és mtsai., 2014).



3. ábra: A retinol szaturáz enzim (RetSat) által katalizált reakció. (Moise és mtsai., 2004)

A RetSat, más néven a csupa-transz-retinol-13,14-reduktáz, egy ún. oxidoreduktáz, amely elsősorban az endoplazmatikus retikulumban és a citoplazmában található, és a csupa-transz-retinol C13-C14 kettős kötésének telítését hajtja végre, ezzel létrehozva a (13R)-csupa-transz-13,14-dihidroretinolt (dihidroretinol, DHR, 3. ábra). A RetSat fehérje a sejtmagban is

megtalálható, de a pontos sejtmagbéli funkciói azonban még mindig homályosak (Moise és mtsai., 2004; Heidenreich és mtsai., 2017). A májban a PPAR α (Sun és mtsai., 2008), a zsírszövetben a PPAR γ (Schupp és mtsai., 2009) és a hepatocitákban a FOXO1 (Shin és mtsai., 2012) a RetSat fő szabályozói. A RetSat által létrehozott DHR vegyület megtalálható a retinol-szaturált expresszálo sejtekben és a retinil-palmitáttal táplált egerek májában (Moise és mtsai., 2008) is. A DHR *in vivo* egyrészt csupa-transz-13,14-dihidroretinsavvá alakul, amely a retinsav receptor (RAR) rendkívül szelektív agonistája, másrészt 9-cisz-13,14-dihidroretinsavvá, ami az RXR receptor meglehetősen szelektív agonistája (Moise és mtsai., 2009). Vannak, akik úgy gondolják, hogy a 9-cisz-13,14-dihidroretinsav lehet a régóta keresett fiziológiai RXR ligand (Krężel és mtsai., 2019). Ugyanakkor az is bebizonyosodott, hogy a RetSat más biológiai funkciókat is elláthat, mivel a hiányából adódó összes következmény nem állítható helyre DHR-rol adásával (Schupp és mtsai., 2009; Pang és mtsai., 2017; Heidenreich és mtsai., 2017).

A RetSat hiányos egerek tanulmányozása során kollégáim azt találták, hogy az apoptotikus sejtek 1 órás felvételét követően meghatározott rövid távú fagocitózist nem befolyásolta a RetSat elvesztése, amikor azonban a fagocitózist 5 órás folyamatos efferocitózis után vizsgálták, csökkent a RetSat-null makrofágok fagocitáló kapacitása a vad típusú kontrollhoz képest (Sarang és mtsai., 2019). Ezenkívül a csontvelőből származó makrofágok (BMDM) 5 napos differenciálódási folyamatának utolsó 2 napján alkalmazott DHR kezelés fokozta a TG2 expressziót, és elősegítette az eredményül kapott makrofágok efferocitózis funkcióját (Sarang és mtsai., 2019). Sarang és mtsai. továbbá azt találták, hogy a RetSat null egerek károsodott efferocitózisa enyhe autoimmunitás kialakulásához vezetett. Ezek az adatok összességében azt mutatják, hogy a RetSat hozzájárul az apoptotikus sejtek hatékony efferocitózisához.

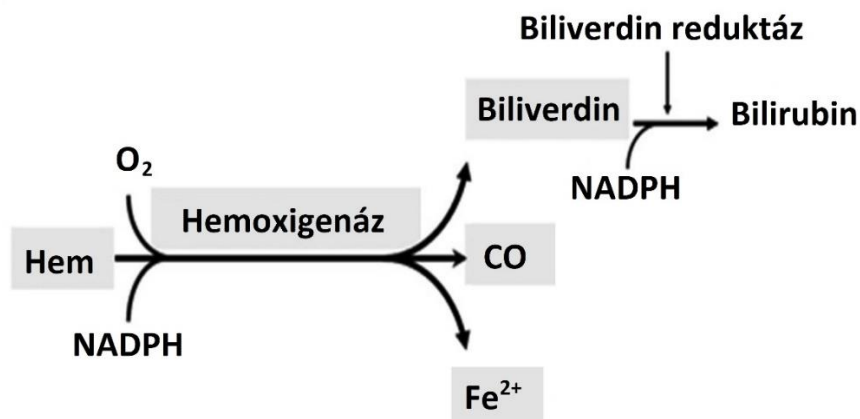
Bár a DHR *in vivo* oxidálódik csupa-transz-13,14-dihidroretinsavvá, kollégáimnak nem sikerült kimutatni más, retinoidra érzékeny, efferocitózis-kapcsolt gének indukcióját DHR jelenlétében (Sarang és mtsai., 2019), amelyeket korábbi, érett BMDM-okon végzett vizsgálataik során azonosítottak (Sarang és mtsai., 2014). Mivel egyes tanulmányok azt mutatták, hogy a RetSat útvonal a RAR-receptoroktól függetlenül is működhet a PPAR γ (Moise és mtsai., 2010) vagy a szénhidrát válaszelem-kötő fehérje (ChREBP) (Heidenreich és mtsai., 2017) aktivitásának szabályozásával, ezért a kutatásaim során az egyik célom az volt, hogy meghatározzam, a DHR jelenléte hogyan segíti elő az efferocitózist a makrofág differenciálódás során.

4.4. Miért éppen hemoxigenáz-1 (HO-1)?

Az előző fejezetben említett RetSat hiányos makrofágok hosszútávú fagocitózisában megfigyelt defektus okának meghatározásához kollégáim RNS szekvenálást végeztek RetSat^{+/+} és RetSat^{-/-} BMDM-okon, ahol azt találták, hogy a RetSat hiányában kevesebb MFG-E8 molekulát termelnek a makrofágok (Sarang és mtsai., 2019). Meg kell azonban jegyezni, hogy az RNS szekvenálásnál problémát jelentett az, hogy egér csontvelőből differenciáltatott makrofágokat szintén egerekből származó apoptotikus timocitákkal inkubáltak együtt. Bár az irodalmi adatok alapján ez használható módszer, mégis viszonylag sok timocita mRNS-t sikerült detektálni, így ezek az adatok kevésbé voltak használhatóak, mert bizonyos gének esetében nem lehetett elkülöníteni a makrofágból és a bekebelezett timocitából származó mRNS adatokat. Ugyanakkor a kutatócsoportunk észrevette, hogy az elhalt sejtként használt apoptotikus timociták bár nagyon kevés hemet tartalmaznak, az őket fagocitáló makrofágokban a hem lebontását végző hemoxigenáz-1 (HO-1) enzim kifejeződésének nagyfokú indukcióját eredményezték. Mivel az apoptotikus timociták nem tartalmaznak HO-1-et, a mért növekedés a makrofágokból származott.

4.5. Hemoxigenázok

A hem (vas-protoporfirin IX) egy nélkülözhetetlen molekula minden olyan sejtmaggal rendelkező sejt számára, amely érzékeli vagy felhasználja az oxigént (Shibahara, 2003). Különböző hemoproteinek, például a hemoglobin, mioglobin, citokrómok, oldható guanilil-cikláz prosztetikus részeként funkcionál (Mancus és mtsai., 2006). Régóta ismert, hogy a hem tartalmú fehérjék lebontásából származó szabad hem toxikus a szervezet számára, ezért azt mihamarabb el kell távolítani, vagy át kell alakítani. Ebben a folyamatban vesznek részt a hemoxigenázok, melyeknek két izoformája ismert emberekben, a hemoxigenáz-1 és 2 (HO-1, HO-2). Mindkét enzim képes a prooxidáns hemet antioxidáns biliverdinné alakítani, melyet azonnal bilirubinná redukál a biliverdin reduktáz enzim (Turkseven és mtsai., 2005). Ahogyan az a 4. ábrán látható, az átalakulás során nem csak a hem semlegesítődik, hanem a biliverdin mellett két másik bioaktív metabolit is keletkezik: szénmonoxid és elemi vas (Montellano és mtsai., 2000).



4. ábra: A hemoxigenázok által katalizált enzimatikus reakció. A hem lebontása során szénmonoxid (CO), elemi vas (Fe^{2+}) és biliverdin képződik. A biliverdint a NADPH-függő biliverdin reduktáz alakítja tovább bilirubinná. (Araujo és mtsai., 2012)

A hemoxigenázok nem csak a mérgező hem eltávolításában vesznek részt, hanem szerepet játszanak számos szerv megfelelő működésében is, valamint gyulladáscsökkentő szerepük van például a makrofágokban (Vijayan és mtsai., 2018). A HO-1 fontosságát mutatja az a tény, hogy eddig csak két humán HO-1 hiányos esetet regisztráltak, így elég korlátozott információ áll rendelkezésre ennek a génhiánynak az emberi fenotípusra gyakorolt hatásairól (Radhakrishnan és mtsai., 2011). A HO-1 hiánya az élettel szinte összeegyeztethetetlen, ugyanakkor a fentebb említett két regisztrált esetben hasonló fenotípusokat figyeltek meg, melyeket gyulladás, nefropátia, asplénia, vérszegénység és szöveti vaslerakódás jellemez. A genetikailag módosított egereket széles körben alkalmazzák a HO-1 szerepének jellemzésére, ugyanakkor meg szeretném jegyezni, hogy a HO-1^{+/-} egerek párosítása nem eredményezi a várt mendeli utód arányt, a legtöbb esetben a HO-1 gén null deléciója halálos (Poss és Tonegawa, 1997).

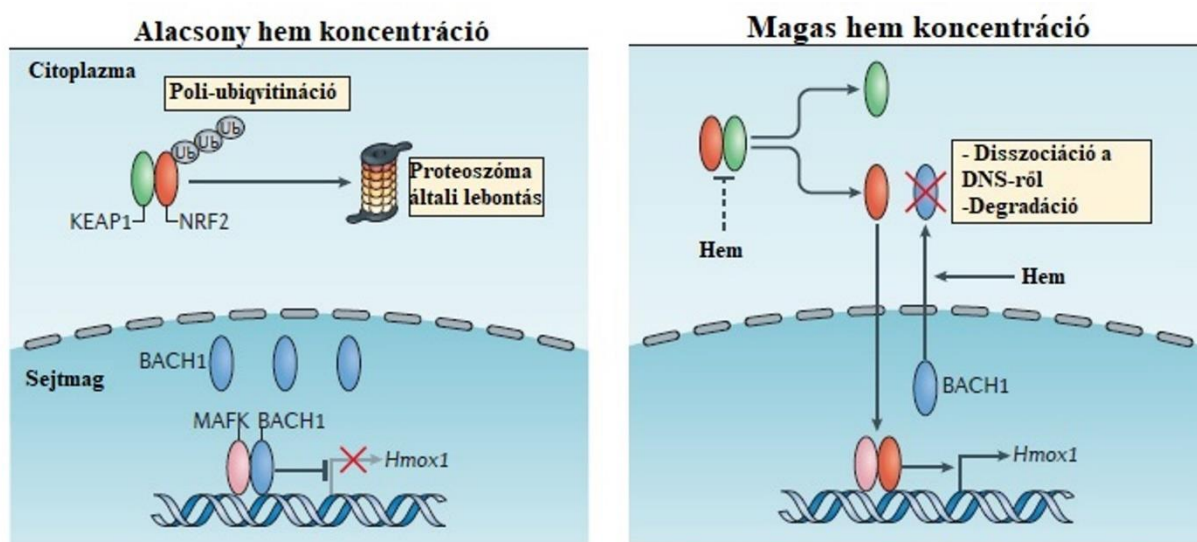
Eddigi ismereteink alapján úgy tudjuk, hogy a HO-2 folyamatosan expresszálódik, míg a HO-1 különböző stimulusok, például UV sugárzás, oxidatív stressz, lipopoliszacharidok stb. hatására indukálódó fehérje (Johnson és mtsai., 1995; Dunn és mtsai., 2014). A két izoforma körülbelül 43%-ban azonos az aminosav szekvenciájukat tekintve (Cruse és Maines, 1988), továbbá mindkét fehérjét egy 24 aminosavból álló szekvencia, az ún. „hem-kötő zseb” jellemzi, ami lehetővé teszi a hem megkötését (Ishikawa és mtsai., 1998). Ezen túlmenően mindkét fehérje tartalmaz egy hidrofób régiót a COOH-végen, amely membrán horgonyként működik, és a fehérjéket az endoplazmatikus retikulumhoz köti (Ishikawa és mtsai., 1991). A HO-1 ezen kívül megtalálható a mitokondriumban és a sejtmagban is, bár úgy tűnik, hogy az ezeken a

helyeken történő megjelenése a COOH vég csonkolásával és a HO-1 enzimaktivitás elvesztésével jár (Biswas és mtsai., 2014; Lin és mtsai., 2007). A HO-2 tartalmaz olyan hemszabályozó doméneket, melyek hiányoznak a HO-1-ből (McCoubrey és mtsai., 1997), így bár mindkét HO fehérje hemet használ szubsztrátként és kofaktorként, fiziológiai tulajdonságaikban különböznek.

A HO-1 indukcióját számos transzkripciós faktor aktiválhatja, úgymint az Nrf2 (nukleáris faktor 2-höz kapcsolódó faktor 2), az aktivátor fehérje 1 (AP1) vagy a Yin Yang 1 (YY1). Ellenkező esetben pedig a BTB és CNC homológ 1 (BACH1) és az AP1 transzkripciós faktor alegység, a JunD képesek represszálni a HO-1 expresszióját (Shan és mtsai., 2004; Hock és mtsai., 2007). Különböző extra- és intracelluláris stimulusok aktiválhatják a mitogén-aktivált fehérje kinázokat (MAPK), a fehérje kináz C-t (PKC), az 5'-AMP-aktivált fehérje kinázt (AMPK) és a foszfoinozitol 3 kináz/Rac-alfa-szerin/treonin fehérje kináz (PI3K/Akt) jelátviteli útvonalakat, melyek a HO-1 aktiválásához vezetnek az Nrf2 transzkripciós faktoron keresztül. Az oxidatív stressz, hipoxia, felhalmozódott hem vagy IL-6 hatására más transzkripciós faktorokon keresztül is megtörténhet a HO-1 aktiválása, például a már említett AP1-en, YY1-en vagy a szignál transzducer és aktivátor transzkripció 3 (STAT3)-on keresztül. A metalloporfirinek, például az ón-protoporfirin-IX (SnPPIX), cink protoporfirin-IX vagy amanganáz protoporfirin-IX és a króm mezoporfirinek képesek kompetitíven gátolni a HO-1 aktivitást *in vitro* és *in vivo* egyaránt. A HO-1 erősen expresszálódik azokban a szövetekben, ahol nagy számban vannak jelen degradálódó vörösvértestek, például a lépben, a májban és a csontvelőben (Tenhunen és mtsai., 1969).

Bár számos stresszhatás képes aktiválni a fentebb említett különböző transzkripciós faktor családok tagjait, a makrofágokban jellemzően két fő transzkripciós faktor szabályozza a HO-1 transzkripcióját: az Nrf2 és a STAT3 (Kobayashi és mtsai., 2004; Ricchetti és mtsai., 2004). Az 5. ábrán látható, hogy alapesetben, amikor alacsony a szabad hem koncentrációja, az Nrf2 a citoszólban található Kelch-szerű ECH-asszociált fehérje 1 (Keap1) kötött állapotban. A kapcsolódás által a Keap1 fehérje gátolja az Nrf2 sejtmagba való bejutását, valamint segíti a proteasóma általi lebontását (Itoh és mtsai., 1999). Ezzel párhuzamosan a sejtmagban található BACH1 heterodimert alkot egy kis Maf fehérjével, és a HO-1 negatív regulátoraként gátolja a HO-1 transzkripcióját azáltal, hogy hozzákapcsolódik a Maf felismerő helyhez (MARE; Sun és mtsai., 2002). Magas hem koncentráció esetén vagy egyéb prooxidáns stimulus hatására a BACH1 leválik a DNS-ről, kikerül a sejtmagból és inaktiválódik, ezáltal teret engedve a Keap1-ről levált Nrf2-nek, ami bejut a sejtmagba, ahol kis Maf fehérjékhez kapcsolódva együtt interakcióba lépnek a HO-1 promóter antioxidáns válaszadó elemével (ARE), ezáltal aktiválva

a HO-1 átírását (Paine és mtsai., 2010; Kaspar és mtsai., 2009). Az Nrf2 a Keap1-től független is szabályozható és aktiválható foszforiláció által, melyet számos jel kiválthat, köztük az Nrf2 más fehérjékkel való kapcsolódása vagy epigenetikai faktorok, mint amilyenek a mikroRNS-ek (Paine és mtsai., 2010). Továbbá a BACH1 486-os tirozinjának foszforilációjával is előidézhető a BACH1 sejtmagból kiinduló exportja (Kaspar és mtsai., 2010).



5. ábra: A hemoxigenáz-1 gén (*Hmox1*) expresszió szabályozásában részt vevő BTB és CNC homológ 1 (*Bach1*) és nukleáris faktor 2-höz kapcsolódó faktor 2 (*Nrf2*). Az Nrf2 és a kis Maf fehérjék (például a Mafk) együtt, heterodimert alkotva aktiválják a *Hmox1* gén expresszióját. Az Nrf2 általi aktivációt blokkolja a Bach1 és Mafk alkotta heterodimer alacsony hem koncentráció esetén (bal oldali ábra). Alacsony hem koncentráció esetén az Nrf2 poliubiquitinálódik, és proteoszóma általi lebontásra kerül a Kelch-szerű ECH-asszociált fehérje 1 (KEAP1) általi interakció révén. Magas hem koncentráció esetén a Bach1 ledisszociál a DNS-ről, kikerül a sejtmagból, ahol inaktiválódik, lehetővé téve a MAFK Nrf2-höz való kapcsolódását, mely együtt aktiválja a *Hmox1* gén expresszióját (jobb oldali ábra). (Igarashi és mtsai., 2017)

5. CÉLKITŰZÉS

- I. Az apoptotikus sejtek felvételét követően a makrofágok retinoidokat termelnek, melyek efferocitózis-kapcsolt gének expresszióját fokozzák, ezáltal növelik a sejtfelvételt. Munkacsoportunk korábbi eredményei alapján a termelődő retinoid valószínűleg a dihidroretinol (DHR), melyet a retinol szaturáz enzim hoz létre, ami a fagocitózis során és a makrofágok differenciációja során is indukálódik. Retinol szaturáz hiányában a makrofágok efferocitózis képessége romlik, míg terméke, a DHR fokozza az efferocitózis képességet. Így munkám első felében célul tűztem ki a DHR célgénjeinek azonosítását, továbbá hatásmechanizmusának vizsgálatát csontvelői eredetű makrofágok differenciációja során, hogy választ kapjunk arra, a DHR hogyan, milyen módon fokozza az apoptotikus sejtek makrofágok általi eltakarítását.
- II. A laboratóriumunkban végzett korábbi vizsgálataink során azt találtuk, hogy a hemet alig tartalmazó apoptotikus timociták felvételét követően jelentősen indukálódik a makrofágokban a hemoxigenáz-1 (HO-1) enzim. Így felmerült a kérdés: vajon egyéb funkciója is lehet ennek a fehérjének az elhalt sejtek eltakarítási folyamatában? Ezért kutatómunkám második részében azt vizsgáltam, hogyan és miért indukálódik a HO-1 apoptotikus sejtek felvétele során makrofágokban, és hogy milyen szerepet tölthet be a keletkező HO-1 fehérje.

6. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

6.1. Reagensek

Amennyiben a felhasznált vegyszerek és reagensek neve mögött nem szerepel a gyártó és/vagy forgalmazó cég neve, akkor a kísérlethez használt anyag a Sigma-Aldrich (Budapest, Magyarország) cégtől származik.

6.2. Kísérleti állatok

A legtöbb kísérlethez 4 hetes, valamint 2-5 hónapos C57BL/6 egereket használtunk. Néhány esetben azonban BACH1 (Sun és mtsai., 2002), HO-1 (Poss és Tonegawa, 1997), adenosin A_{2A} receptor (Ledent és mtsai., 1997), adenosin A₃ receptor (Lee és mtsai., 2003) hiányos és ezek korban megfelelő C57BL/6, C57BL/6xFVB vagy FVB törzsű testvéreit használtuk fel. A HO-1 hiányos egerek kivételével a kísérletekhez felhasznált állatokat a Debreceni Egyetem Élettudományi Központjának Állatházában, specifikus, patogén mentes környezetben tenyésztették. A HO-1 hiányos egereket Dr. Anupam Agarwal (Alabama Egyetem, Birmingham, USA) biztosította, és 2004-től a Jagellói Egyetem Biokémiai, Biofizikai és Biotechnológiai Intézetének állatházában tenyésztették őket szintén SPF körülmények között. A kísérleteket jóváhagyta a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatkísérleti Bizottsága (az engedély száma: 7/2016/DEMÁB).

6.3. Csontvelő-eredetű makrofágok (BMDM) izolálása, tenyésztése és kezelése

A 2-5 hónapos egerek izofluránnal végzett feláldozása után a csontvelői progenitor sejteket fiziológiás sóoldattal történő mosással nyertük ki a combcsontokból. A kinyert sejteket minden esetben 37 °C-os termosztátban, 5%-os CO₂ jelenlétében tenyésztettük.

A HO-1 tanulmányozása során a csontvelő-eredetű sejteket DMEM sejtenyésző tápfolyadékban differenciáltattuk 5 napon keresztül, mely tápközeg 10% főtális borjúsérumot (FBS), makrofág kolóniastimuláló faktor (M-CSF) forrásként 20% L929 fibroblaszt sejtvonalról származó felülúszót, 2 mM L-glutamint, 100 U/ml penicillint és 100 µg/ml sztreptomicint tartalmazott. Az 5 naposan használt makrofágok tenyésztése során minden

esetben lemostuk a 3. napon az úszó sejteket, és friss, a korábbival megegyező tápfolyadékot adtunk a letapadt, differenciálódó sejteknek.

Az eriptotikus vörösvértestek (eryptotic red blood cells; eRBC) fagocitózisa és a makrofágok citokin kibocsátásának vizsgálata során használt HO-1^{+/+} és ^{-/-} egerek esetében a csontvelői progenitor sejteket 5 napig, magas glükóztartalmú DMEM médiumban differenciáltattuk 10% FBS, 10 ng/ml tisztított humán rekombináns M-CSF (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), 100 U/ml penicillin és 100 µg/ml sztreptomycin jelenlétében.

A retinoidok hatásának tanulmányozása során használt csontvelői progenitorokat 5 napon át tenyésztettük DMEM tápfolyadékban, melyben 10% L929 fibroblaszt sejtvonalról származó felülúszó, 2 mM L-glutamin, 100 U/ml penicillin és 100 µg/ml sztreptomycin volt. Azokban a kísérletekben, ahol 1 µM retinol (ROL), 1 µM dihidroretinol (DHR), 30 nM csupa-transz retinsav (ATRA) vagy 50 ng/ml rekombináns csont morfogenetikus fehérje (rBMP)-2 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) önmagában vagy 0,5 µM AGN194310-zel, egy pan-RAR antagonistával (Tocris Bioscience, Abingdon, UK), 0,3 µM LDN193189-cel, egy BMP-2 receptor antagonistával (Tocris Bioscience, Abingdon, UK), 2,5 µM PD98059-cel, egy MEK inhibitorral (Merck, Kenilworth, NJ, USA), 10 µM SIS3-mal, egy SMAD3 aktivációt gátló vegyülettel (Tocris Bioscience, Abingdon, UK), 10 µM diszulfirammal, egy aldehid dehidrogenáz inhibitorral, vagy 25 µM N,N-dietilaminobenzaldehiddel (DEAB), egy retinaldehid dehidrogenáz inhibitorral együtt volt jelen, a gátlószerekkel 30 percig előkezeltük a sejteket a differenciáció 4. napjának kezdetén, majd ezt követően adtuk a további reagenseket a sejt kultúrához. Végül a 2-6 vagy 48 óra múlva összegyűjtött sejteket mRNS szekvenáláshoz, RT-qPCR-hoz vagy efferocitózis vizsgálatokhoz használtuk fel.

6.4. Apoptotikus timociták és eriptotikus vörösvértestek létrehozása *in vitro*

A kísérletekhez használt apoptotikus timocitákat 4 hetes C57BL/6 egerek csecsemőmirigyéből kinyert timocitákból széruméheztetéssel hoztuk létre. A timocitákat (10⁷ sejt/ml) 37 °C-on, 5%-os CO₂ jelenlétében inkubáltuk 2 mM L-glutamint, 100 U/ml penicillint és 100 µg/ml sztreptomocint tartalmazó DMEM tápfolyadékban. Az FBS hiányának következtében a sejtelhalás mértéke 24 órás tenyésztést követően propidium jodid/annexinV-FITC festés alapján több, mint 80% (Köröskényi és mtsai., 2011).

Néhány kísérlethez eriptotikus vörösvértesteket használtunk, melyek létrehozásához C57BL/6 egerek izofluránnal végzett feláldozását követően a vért szemüregből vagy szívből

nyertük ki. A véralvadást heparinnal gátoltuk, és az így kapott vért 4 °C-on, 211 RCF-en 10 percig centrifugáltuk, majd a plazmát és a fehérvérsejteket eltávolítottuk. A vörösvértesteket 4 °C-on tartva háromszor mostuk Hanks' sóoldattal (5 mM KCl, 0,5 mM KH₂PO₄, 135 mM NaCl, 4 mM NaHCO₃, 0,3 mM Na₂HPO₄·2H₂O, 5 mM glükóz, 10 mM HEPES, 2.5 mM CaCl₂, pH 7,5), majd 1 µg/ml ionomicinnel kezeltük 2,5 órán keresztül. A sejtelhalás mértéke ebben az esetben is körülbelül 80%-os (Sarang és mtsai., 2007). A sejtszámot mindegyik sejttípus esetében Bürker kamra segítségével határoztuk meg.

6.5. Timociták apoptózisa során keletkező felülúszó

A timocitákat a 24 órás széruméheztetéssel történő elhalás során bizonyos esetekben 20 µM Z-VAD-FMK-val kezeltük. Az elhaló sejtek sejt kultúrák médiumát minden esetben 211 RCF-en 10 perc centrifugálást követően összegyűjtöttük, és 0,22 µm-es steril fecskendő szűrőn átszűrtük (VWR International, cat. number 514-0073, Mississauga, ON, Kanada), hogy eltávolítsuk az apoptotikus testecskéket. A felülúszót 20% FBS tartalmú DMEM médiummal keverve 1:1 arányban adtuk a makrofágokhoz.

6.6. Efferocitózis vizsgálatok

Az áramlási citometriás kísérletekhez használt apoptotikus timocitákat Cell Tracker DeepRed (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA, 2,5 µM) fluoreszcens festékkel jelöltük, míg az eriptotikus vörösvértesteket az ionomicines kezelést követően PKH26 (4µM) Red Fluorescent Cell Linker Kittel a gyártó által megadott protokoll alapján. Az efferocitózis vizsgálatokhoz a makrofágokat minden esetben 12-lyukú sejtenyésztő platen (cat. number 92012) differenciáltattuk 2x10⁵ makrofág/lyuk sejtszámmal, és az elhalt sejteket 1:5 makrofág:célsejt arányban inkubáltuk együtt.

A HO-1 tanulmányozása során az apoptotikus timocitákat vagy eriptotikus vörösvértesteket 2 ml, 10% FBS-t, 2 mM L-glutamint, 100 U/ml penicilint és 100 µg/ml sztreptomocint tartalmazó DMEM médiumban lévő makrofágokhoz adtuk, bizonyos esetekben 20 µM SnPPiX, hemoxigenáz 1 és 2 inhibitor (Porphyrin Products, Logan, UT, USA) folyamatos jelenléte mellett.

A retinoidok hatásának vizsgálata során a makrofágokon lévő 2 ml médium 10% L929 fibroblaszt sejtvonalról származó felülúszót, 2 mM L-glutamint, 100 U/ml penicilint és 100 µg/ml sztreptomocint tartalmazott. Néhány esetben LDN193189-et vagy SIS3-at adtunk a

makrofágokhoz a célsejtekkel együtt. A rövidtávú fagocitózis vizsgálatoknál a fluoreszcensen jelölt elhalt sejteket 1 órás inkubációt követően lemostuk. A közép- és hosszútávú fagocitózis vizsgálatok esetében a makrofágokat először festetlen apoptotikus sejtekkel inkubáltuk 6, illetve 24 órán keresztül, majd ezt követően adtuk hozzájuk a jelölt elhalt sejteket. Egy órás inkubációt követően a jelölt elhalt sejteket eltávolítottuk, a makrofágokat tripszines kezelést követően összegyűjtöttük, és a sejtek fluoreszcenciáját Becton Dickinson FACSCalibur áramlási citométerrel analizáltuk. A makrofág populációt a méretük és denzitometritásuk alapján kapuztuk ki (SSC/FSC), majd ezen populáción belül az FL2 és FL4 csatornában detektálva határoztuk meg a kibocsájtott fluoreszcens jel alapján az elhalt sejteket evett makrofágok százalékos arányát.

Továbbá az efferocitózist követően a makrofágokban lezajlott génexpressziós változások méréséhez valós idejű kvantitatív PCR-t (RT-qPCR) alkalmaztunk. Ehhez a makrofágokat festetlen célsejtekkel inkubáltuk 1:5 arányban, majd a fentebb említett különböző idejű inkubálási idő letelte után TRI (Thermo Fisher Scientific) reagenst adtunk a sejtekhez. Néhány kísérletben 30 perccel az elhalt sejtek adása előtt a makrofágokat egy cAMP analóggal, (RpcAMP; 100 μ M), forskolinnal (10 μ M), ami egy adenilát cikláz aktivátor, vagy SB203580-nal, egy p38 MAP kináz inhibitorral (10 μ M) kezeltük elő.

6.7. Fluoreszcens mikroszkópia

Az apoptotikus timocitákat 2,5 μ M Cell Tracker DeepRed (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) festékkel jelöltük, az eriptotikus vörösvértesteket pedig PKH26 (4 μ M) Red Fluorescent Cell Linker Kittel a gyártó által megadott munkautasítás alapján. A makrofágokat vagy a fagocitózis vizsgálat előtt 24 órával jelöltük 10 μ M karboxifluorescein-diacetát-szukcinimidil-észterrel (CFDA-SE), vagy a fagocitózist követően festettük őket NucBlue Live Cell Stain Ready Probes reagenssel (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) a gyártó által megadott instrukciók szerint. Mindkét típusú elhalt sejtet mintánként 1:5 (makrofág:célsejt) arányban inkubáltuk együtt 2×10^5 C57BL/6 típusú makrofággal, majd 1 óra múlva lemostuk a fel nem vett elhalt sejteket. A fagocitózist követően 1%-os paraformaldehiddel fixáltuk a BMDM-okat, és fluoreszcens mikroszkóppal felvételeket készítettünk a fagocitáló makrofágokról (FLOID™ Cell Imaging Station, Thermo Fisher, Waltham, MA, USA).

6.8. RNS izolálás, reverz transzkripció PCR és RT-qPCR

A génexpressziós változások detektálásához a különböző módokon kezelt, illetve kezeletlen BMDM mintákból TRI reagens (ThermoFisher, Waltham, MA, USA) segítségével a gyártó által megadott utasításokat követve nyertük ki a totál RNS-t. A reverz transzkripció PCR megkezdése előtt a minták RNS koncentrációját nukleázmentes vízzel 100 ng/μl koncentrációra állítottuk be. A totál RNS cDNS-sé történő átírásához High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kitet (Life Technologies, Budapest, Magyarország) használtunk, és a gyártó által megadott protokoll alapján jártunk el. A valós idejű kvantitatív PCR technika alkalmazása során génspecifikus FAM-MGB-jelölt próbát tartalmazó oligo mixeket (TaqMan Gene Expression Assay, Life Technologies, Budapest, Magyarország) használtunk, minden esetben három technikai párhuzamos alkalmazásával. A különböző gének relatív génexpressziós szintjét Roche LightCycler LC 480 valós idejű PCR segítségével mértük, majd a kapott adatok kiértékelését összehasonlító CT módszerrel végeztük, normalizáló génként ciklofilin-A-t vagy β-aktint használva.

6.9. SDS-PAGE és Western-blot

Hogy elérjük a teljes sejtfehérje mennyiséget, a minták összegyűjtését követően proteázgátló koktélt tartalmazó, jéghideg lízis pufferrel tártuk fel a sejteket. A minták fehérje mennyiségét Bio-Rad Protein Assay festékkel (Bio-Rad, Budapest, Magyarország) határoztuk meg, majd a fehérjéket tartalmazó felülúszót loading pufferrel együtt forraltuk 100 °C-on, 10 percig. Az apoptotikus timocita, eritrotikus vörösvértest és csontvelői makrofág lizátumokat 12%-os SDS poliakrilamid gélen futtattuk. Ezt követően az elektroforézissel elválasztott fehérjéket Immobilion-P polivinilidén-fluorid membránra (Merck Millipore) juttattuk át Bio-Rad félszáraz blottolóval. A blokkoláshoz TTBS-ben oldott 5%-os zsírszegény tejpor oldatot használtunk, majd a membránon lévő fehérjéket monoklonális anti-HO-1 (MA1-112, ThermoFisher, Waltham, MA, USA, 1:500 hígításban) és monoklonális anti-β-aktin (A5441, 1:10000 hígításban) elsődleges antitestekkel egy éjszakán keresztül reagáltattuk 4°C-on. Ezt követően TTBS pufferrel mostuk a membránt szobahőmérsékleten, 1 órán át, majd HRP-vel konjugált másodlagos antitestekkel inkubáltuk együtt. A fehérjéket Immobilon Western Chemiluminescent HRP szubsztrát (Merck Millipore) használatával detektáltuk, majd ImageJ szoftver segítségével meghatároztuk az előhívott sávok pixelsűrűségét.

6.10. Hemoxigenáz aktivitás mérés

Az eriptotikus vörösvértesteket 1:5 makrofág:célsejt arányban adtuk 10^5 C57BL/6 makrofághoz, és 6 órán keresztül inkubáltuk együtt a sejteket 20 μ M SnPPIX jelenlétében vagy hiányában, az *Efferocitózis vizsgálatok* c. részben leírtak szerint. Ezt követően 1 db mintához 10^6 makrofágot gyűjtöttünk össze (6 lyuk/minta) 800 μ l jéghideg PBS-ben, és azonnal -70°C -ra helyeztük. A HO-1 aktivitást később határoztuk meg Balla és mtsai. (Balla és mtsai., 1992) által leírtak alapján.

6.11. G-fehérje (Rac1, Cdc42, RhoA) aktivitás mérés

Ahogy az *Efferocitózis vizsgálatok* c. fejezetben leírtam, 2×10^5 C57BL/6 makrofághoz 1:5 BMDM/célsejt arányban adtunk apoptotikus timocitákat vagy eriptotikus vörösvértesteket 24 órán keresztül, 20 μ M SnPPIX jelenlétében vagy hiányában. $1,4 \times 10^6$ makrofágot gyűjtöttünk össze mintánként (8 lyuk/minta), majd G-LISA Rac1, Cdc42 és RhoA activation assay kiteket (Cytoskeleton Inc., Denver, CO, USA) használva határoztuk meg a három G-fehérje aktivitásának mértékét a gyártó által megadott eljárás szerint.

6.12. Citokin vizsgálat

A citokin termelés vizsgálatához 12-lyukú sejtenyésző edényben differenciáltattunk vad típusú és HO-1 hiányos csontvelői eredetű makrofágokat 5×10^5 sejt/lyuk sűrűségben. Ahhoz, hogy meghatározzuk, pontosan milyen citokineket termelnek a makrofágok az elhalt sejtek jelenlétében, a BMDM-okat egyrészt apoptotikus timocitákkal (melyeket C57BL/6 egerekből izoláltunk), másrészt eriptotikus vörösvértestekkel (melyeket C57BL/6xFVB egerekből nyertünk ki) inkubáltuk együtt 1:5 makrofág:elhalt sejt arányban. 6 óra múlva lemostuk a felesleges elhalt sejteket, és a makrofágokat további 18 órán keresztül tenyésztettük DMEM médiumban. A tenyésztési idő letelte után összegyűjtöttük a makrofágokon lévő tápfolyadékot és Mouse Cytokine Array (Proteome Profile Array from R&D Systems, Minneapolis, MI, USA) segítségével analizáltuk. A pixeldenzitást ImageJ szoftverrel határoztuk meg.

6.13. mRNS szekvenálás

Illumina szekvenáló platformot használva nagy áteresztőképességű mRNS szekvenálást végeztünk azért, hogy információt nyerjünk az 1 μ M ROL vagy 1 μ M DHR jelenlétében, illetve

hiányában differenciálódó makrofágok teljes transzkriptomjáról. A makrofág differenciálódás 4. napjának kezdetén 1 μ M ROL-t vagy 1 μ M DHR-t adtunk a sejtekhez, majd 2 óra, illetve 48 óra múlva összegyűjtöttük a sejteket RNS szekvenáláshoz. Agilent BioAnalyzer készüléken vizsgáltuk a minták teljes RNS tartalmát és minőségét, melyek meghatározásához Eukaryotic Total RNA Nano Kitet (Agilent, Santa Clara, CA, USA) használtunk a gyártó által megadott protokoll szerint. Minden mintacsoport esetében 4 technikai párhuzamost készítettünk, melyek közül azt a 3 mintát választottuk ki a könyvtárkészítéshez, melyek >7 RNS integritásértékkel (RIN) rendelkeztek. TruSeq RNA Sample Preparation Kit (Illumina) felhasználásával, a gyártó által megadott lépéseket követve hoztuk létre a teljes RNS-ből az RNS-Seq könyvtárakat. Az RNS-eket a poly-A végükkel oligo-dT-vel konjugált mágneses gyöngyökhöz kötöttük, majd az összegyűjtött mRNS-eket 94 °C-on fragmentáltuk. Az elsődleges cDNS szálát reverz transzkripcióval hoztuk létre véletlenszerű primerek felhasználásával, majd a második szál szintézisét követően dupla-szálú cDNS-eket generáltunk. A végek javítása, az A-farok létrehozása és az adapter szekvenciák ligálása után PCR segítségével felszaporítottuk az immár adapter-ligált szakaszokat, majd végül szekvenáló könyvtárakat hoztunk létre. Az adatokat a StrandNGS nevű programmal elemeztük, a normalizálás pedig a DESeq1 algoritmussal történt. A minták mRNS szekvenálását a Debreceni Egyetem Genomi Medicina és Bioinformatikai Szolgáltató Laboratóriumának munkatársai végezték Illumina HiSeq2500 készülékkel, 50 bázispáros ún. „single-end” szekvenálást alkalmazva.

6.14. Transzkriptek biológiai funkciójának vizsgálata (DEGs)

Annak érdekében, hogy megismerjük az adott transzkriptek biológiai funkcióját, az online platformon elérhető Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes (<https://string-db.org/>) 11.5-ös verzióját használtuk, melynek segítségével azonosítottuk a DEG-ek közötti felülreprezentált génontológiai biológiai folyamatokat. A GO kategórián belüli gének statisztikailag szignifikáns feldúsulását az Aggregate Fold Change teszt Benjamini és Hochberg féle FDR többszörös teszt korrekciós módszerrel határoztuk meg ($FDR < 0,05$).

6.15. Statisztikai analízis

Minden adat legalább 3 egymástól független, minimum 3 egér felhasználásával különböző napokon végzett kísérlet eredményeinek átlagát ($\pm$ SD) mutatja be. Két csoport összehasonlításánál a szignifikanciát kétszélű, nem egyenlő varianciájú Student-féle t-próbával

adtuk meg, míg 2-nél több csoport összehasonlítása esetén egy utas ANOVA-t használtunk Tukey-féle többszörös analízissel. A statisztikai elemzésekhez GraphPad Prism 6.01-es verzióját használtuk, és statisztikailag szignifikánsnak tekintettük a $p < 0.05$ értéket, melyet csillaggal jelöltünk (*).

7. EREDMÉNYEK

7.1. A retinoidok a Bmp-2 és Smad3 fehérjék kifejeződésének fokozásán keresztül befolyásolják az egér csontvelői eredetű makrofágok differenciációját és efferocitózist

7.1.1. A makrofág érés során alkalmazott dihidroretinol kezelés számos efferocitózishoz köthető molekula kifejeződését fokozva növeli a makrofágok elhalt sejt felvételét

Hogy megerősítsük a korábban kapott eredményeket (Sarang és mtsai., 2019), először teszteltük, hogy a dihidroretinol (DHR) jelenléte a makrofág differenciálódás során valóban befolyásolja-e a létrejövő makrofágok efferocitózist. A 6A ábrán látható, hogy a DHR szignifikánsan növelte az 5 nap differenciáció után tesztelt makrofágok fagocitáló képességét. Mivel egy, a laboratóriumunkban folytatott korábbi tanulmány azt mutatta, hogy a DHR a TG2 és az MFG-E8 kifejeződését csak a differenciáció utolsó 2 napján indukálja (Sarang és mtsai., 2019), megnéztük, hogy a DHR képes-e fokozni a makrofágok efferocitózist akkor is, ha csak a differenciáció 4. napjának kezdetén adjuk az érő sejtekhez. A 6A ábrán látható, hogy a DHR így is ugyanolyan növekedést tudott előidézni az efferocitózis mértékében, mint amikor a differenciáció teljes 5 napos periódusa alatt jelen volt, ami azt jelzi, hogy a DHR az utolsó két napban fejt ki efferocitózis fokozó hatását. A 6B ábrán éppen fagocitáló makrofágokról készült fluoreszcens felvételek láthatóak, melyek az mutatják, hogy a DHR nemcsak a makrofágok apoptotikus sejt felvételét fokozta, hanem az elhalt sejtek makrofágokhoz való hozzákapcsolódását is elősegítette.

A differenciáció végén fokozott expressziót mutató efferocitózis-kapcsolt gének azonosításához DHR-t adtunk a differenciálódó sejtekhez a differenciáció 4. napjának kezdetén, és 2 nappal később összegyűjtöttük a már érett makrofágokat mRNS szekvenáláshoz. Az összegyűjtött sejtekből 781 eltérő módon expresszált gént (DEG) azonosítottunk a kezeletlen és a DHR-lal kezelt csontvelői eredetű makrofágok között (legalább 1,5-szeres változás és $<0,05$ korrigált p érték alapján). 357 transzkript megnövekedett, míg 424 transzkript csökkent génexpressziós értékeket mutatott a DHR-lal kezelt sejtekben. A csökkenést, illetve növekedést mutató transzkriptek átlag fold change (FC) értéke $-2,66 \pm 1,89$ és $6,55 \pm 22,52$,

míg a medián FC érték -2,08 és 2,36 volt. A funkcionális analízis feltárta, hogy a makrofág éréshez, fagocitózishoz és sebgyógyuláshoz köthető gének nagy számban fordulnak elő az upregulált DEG-ek között. A DHR-lal kezelt makrofágokban megnövekedett expressziót mutató gének között 10 olyat találtunk, mely az efferocitózishoz köthető (1. táblázat), bár a Gene Ontology csak 5-öt mutatott ezekből.

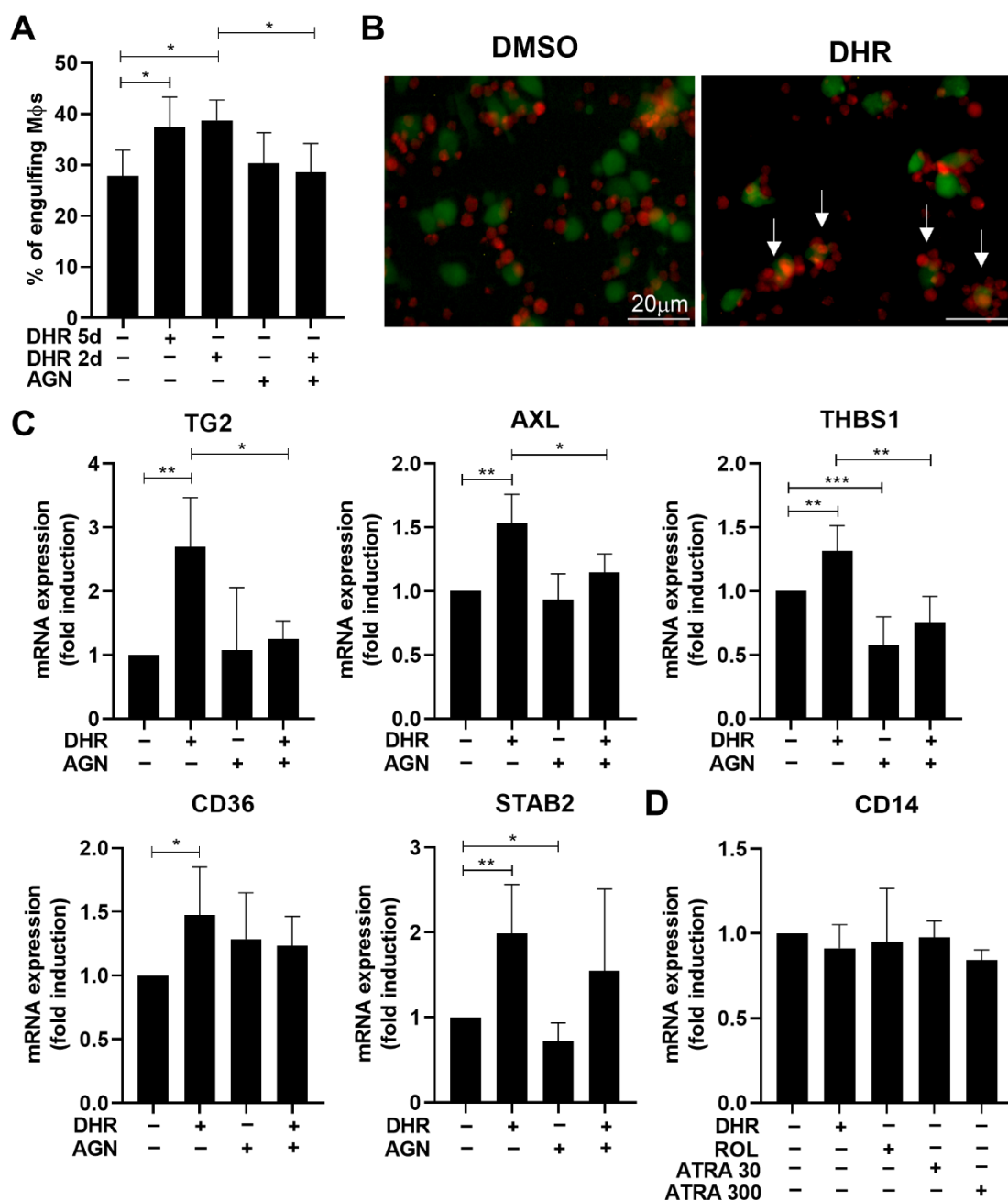
1. táblázat: A különbözőképpen expresszált efferocitózis-kapcsolt gének listája a differenciáció utolsó 48 órájában DMSO-val vagy 1 μ M DHR-lal kezelt csontvelői eredetű makrofágokban, legalább 1,5-szörös változás (FC) és korrigált p érték ($p < 0,05$) alapján.

Korr. p érték	FC	Gén szimbólum	Gén név
1.21×10^{-6}	212.53	Camkk1	kalcium/kalmodulin-függő fehérje kináz 1, alfa
1.73×10^{-3}	8.35	P2rx1	purinerg receptor P2X, ligand-kapuzott ion csatorna, 1
1.04×10^{-7}	4.1	Smad3	SMAD családtag 3
4.38×10^{-3}	3.65	Marco	makrofág receptor kollagén szerkezettel
1.34×10^{-7}	3.59	Rab20	RAB20, RAS onkogén család tag
1.07×10^{-3}	3.21	Stab2	stabilin 2
4.88×10^{-4}	1.99	THBS-1	trombospondin-1
6.24×10^{-8}	1.58	Tgm2	transzglutamináz 2, C polipeptid
5.23×10^{-3}	1.56	Axl	AXL receptor tirozin kináz
1.43×10^{-4}	1.53	CD36	CD36 antigén

A tíz génből öt efferocitózis receptor vagy ko-receptor (stabilin-2, TG2, Axl, MARCO és CD36), egy ún. „bridging” molekula (THBS-1) és egy Rab családhoz tartozó (Rab20) molekula, mely a fagoszóma éréshez járul hozzá (Taefehshokr és mtsai., 2021). A korábbi eredményeinkkel összhangban (Sarang és mtsai., 2019), a TG2 és THBS-1-en kívül, az érett BMDM-okban azonosított többi retinoid érzékeny fagocitózis gén, úgymint Tim-4, C1q és CD14 (Sarang és mtsai., 2014) expresszióját nem befolyásolta a makrofág differenciáció során jelenlévő DHR. Továbbá, erősen indukálódott a kalmodulin-függő kináz 1 (Camkk1) enzim és a purinerg receptor P2X (P2X₁). A Camkk1-ről ismert, hogy kifejeződése a makrofágok differenciációja során fokozódik (Woods és mtsai., 2005), a Camkk2-vel együtt pozitívan szabályozza az AMP-függő kináz aktivitását (Bae és mtsai., 2011), melyről ismert, hogy fokozza az efferocitózist (Marques-da-Silva és mtsai., 2011). A P2X₁-ről azt találták, hogy ATP jelenlétében elősegíti az apoptotikus sejtek makrofágokhoz való kötődését (Chen és mtsai., 2019), ami magyarázatot adhat a 6B ábrán látható megfigyelésünkre, hogy a DHR jelenlétében differenciálódó makrofágokhoz több apoptotikus sejt kapcsolódik. Ezen felül a Smad3 transzkripciós faktor indukcióját tapasztaltuk, melyről ismert, hogy fokozza az efferocitózist

azáltal, hogy számos efferocitózis-kapcsolt gén expresszióját megnöveli (Napoli, 1999). Érdekes módon, az elemzés során nem találtunk változást az MFG-E8 hídmolekula expressziójában, pedig egy korábbi tanulmányunkban DHR-érzékenynek bizonyult (Sarang és mtsai., 2019).

Az eredményeink igazolása céljából RT-qPCR technikával meghatároztuk a makrofágokban annak az öt, DHR által indukált efferocitózis-kapcsolt molekula mRNS expresszióját, melyek megnövekedett expressziója a nem kezelt sejtekhez képest a 6C ábrán látható. A korábban az érett makrofágokban retinsav érzékeny fagocitózis receptorokként azonosított Tim-4, C1q vagy CD14 (Sarang és mtsai., 2014) expressziója azonban nem indukálódott még akkor sem, amikor az ATRA koncentrációt 300 nM-ra emeltük. Ezek közül a CD14 expressziója a 6D ábrán látható.



6. ábra: A dihidroretinol jelenléte a makrofág érés során fokozza a makrofágok efferocitózisát azáltal, hogy számos efferocitózis-kapcsolt molekula expresszióját fokozza RAR-függő módon. (A) A sejtfelvevő makrofágok százalékos aránya, melyeket 1 μM DHR jelenlétében vagy hiányában differenciáltattuk 5 napon keresztül, illetve úgy, hogy csak az utolsó két napban volt jelen a DHR és/vagy 0,5 μM erősen szelektív pán-RAR antagonistá, az AGN194310. (B) Reprezentatív fluoreszcens mikroszkóppal készült felvételek, melyeken az apoptotikus sejteket (piros) felvevő makrofágok (zöld) láthatóak. Utóbbiak az érési folyamat utolsó két napján 1 μM DHR jelenléte vagy hiánya mellett differenciálódtak. A makrofágok által bekebelezett apoptotikus sejtek narancssárga színűek, mivel a zölddel és pirossal jelölt két

különböző sejttípus átfedésbe kerül a sejtfelvétel során. A nyilak a makrofágokhoz kötődő apoptotikus timocitákat mutatják. (C) RT-qPCR segítségével meghatározott efferocitózis-kapcsolt gének mRNS expressziója makrofágokban, melyek az érési folyamat utolsó két napján 1 μ M DHR és 0,5 μ M AGN194310 jelenlétében vagy hiányában differenciálódtak. Normalizáló génként β -aktint használtunk. (D) CD14 mRNS indukció hiánya 1 μ M DHR, 1 μ M ROL és 30 vagy 300 nM ATRA mellett. Az eredményeket átlag $\pm$ SD értékként tüntettük fel (az A és D ábránál $n=3$, míg a B és C ábra esetében $n=4$). Csillagokkal jelöltük a statisztikailag szignifikáns különbségeket: * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$. Mindegyik sejtkultúra tartalmazott 0,5 v/v% DMSO-t is.

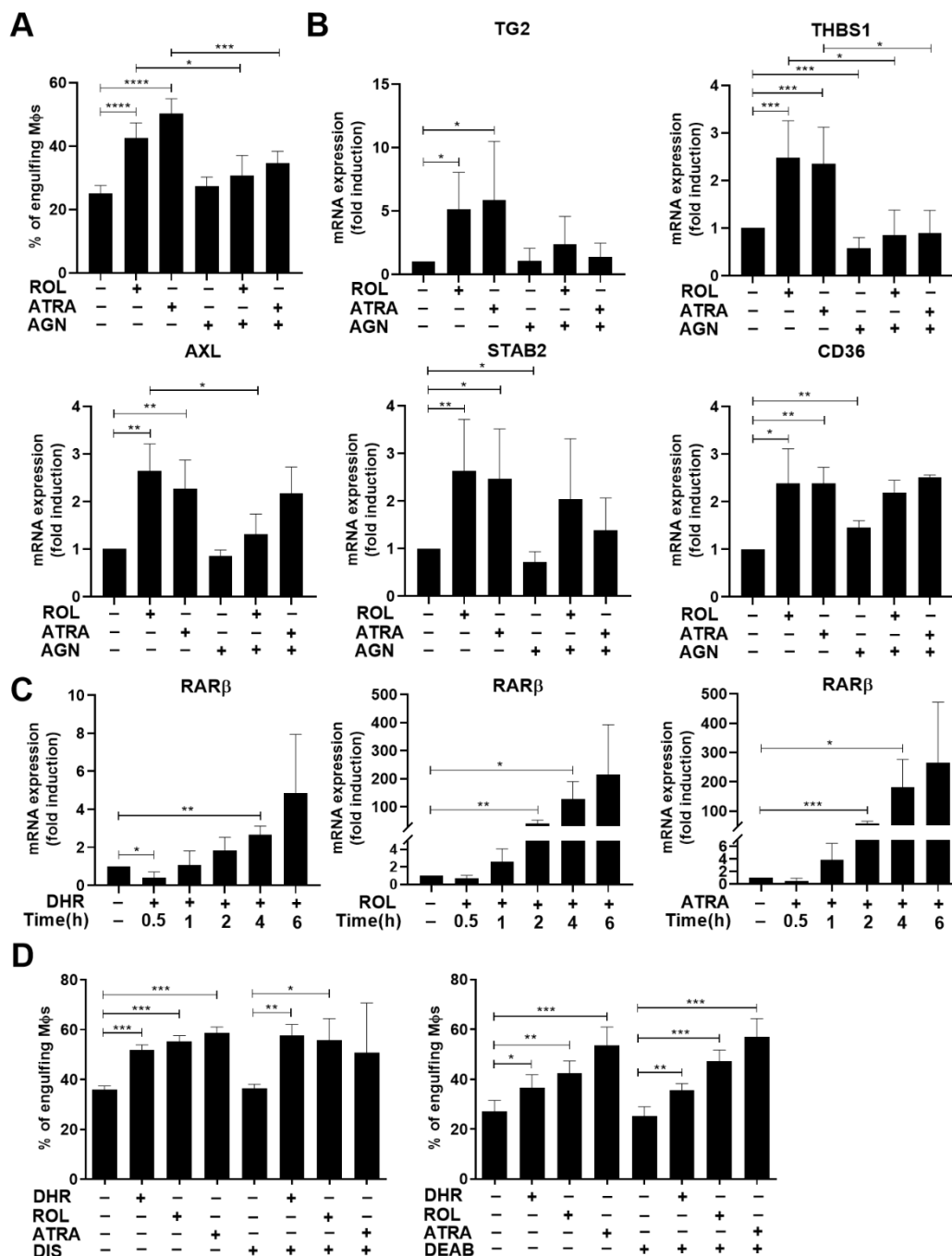
7.1.2. A makrofág érés közben adott DHR közvetlenül a retinsav receptorokon keresztül hatva segíti az efferocitózist

Korábbi tanulmányaink azt mutatták, hogy a DHR dihidroretinsavvá átalakulva fejti ki hatását a RA receptorokra (Sarang és mtsai., 2014), ezért kíváncsiak voltunk, hogy a ROL, ami átalakítható ATRA-vá (Napolí, 1999), vagy maga az ATRA, amelyről ismert, hogy a RAR-ok elsődleges liganduma, helyettesíthető-e DHR-lal az efferocitózis szabályozásában, ha az 5 napos makrofág differenciáció végén, a differenciáció 4. napjának kezdetén adjuk a sejtkultúrákhoz.

A 7A ábrán látható, hogy a makrofág érés 4. napjának kezdetén adott ROL és ATRA is fokozza az apoptotikus timociták felvételét. Továbbá a ROL és ATRA képes indukálni ugyanazt az 5 efferocitózis-kapcsolt gént, melyeket a DHR is indukált (7B ábra). Ezen felül, az erősen szelektív pán-RAR antagonistá AGN194310 nemcsak a makrofágok DHR által előidézett efferocitózis kapacitását (6A ábra), valamint számos efferocitózis-kapcsolt gén expresszióját (6C ábra) gyengítette, hanem a ROL és ATRA által előidézett génindukciókat is gátolta (7A és 7B ábra). Érdekes módon, azonban nem az összes fagocitózis-kapcsolt retinoid indukált gén expresszióját blokkolta a pán-RAR transzkripciós antagonistá vegyület jelenléte, ami arra utal, hogy csak a TG2 és a THBS-1 indukálódik egyértelműen RAR transzkripciófüggő módon. Meglepő módon, ez volt az a két fagocitózis molekula, melyekről korábban a laboratóriumunkban kimutatták, hogy RAR-függő módon indukálódnak érett csontvelői eredetű makrofágokban (Sarang és mtsai., 2014). Úgy tűnik, hogy az AXL, a stabilin-2 és a CD36 más módon indukálódik. Ez a mechanizmus magában foglalhatja a RAR-ok közvetlen interakcióját más transzkripciós faktorokkal, mely kölcsönhatás a transzaktivációjukhoz vagy transzrepressziójukhoz vezet, s amelybe egy transzkripciós antagonistá nem feltétlenül

avatkozik bele (Tóth és mtsai., 2011; Chen és mtsai., 1995). A folyamatban résztvevő RAR valószínűleg a RAR β , mert ez volt az egyetlen RAR, melyet a DHR indukált (1.táblázat), valamint az indukcióját sikerült RT-qPCR-al is igazolni mindhárom retinoid esetében (7C ábra). Továbbá ezek az adatok azt is bizonyítják, hogy a különböző gének nyitottak a RAR által közvetített szabályozásra a differenciálódás 4. napjának kezdetén, összehasonlítva az érett makrofágokkal.

A ROL vagy DHR megfelelő retinsavvá való átalakulásához (ATRA vagy all-trans dihidroretinsav) ugyanazok az aldehyd-dehidrogenázok és retinaldehyd-dehidrogenázok szükségesek (Moise és mtsai., 2008 és 2009; Napoli, 1999). Azonban sem a diszulfiram, mely aldehyd dehidrogenáz inhibitor, sem a retinaldehyd dehidrogenáz inhibitor DEAB nem akadályozta meg a ROL vagy DHR által kiváltott efferocitózist a differenciálódó makrofágokban (7D ábra). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a ROL vagy a DHR a RAR aktivitást közvetlenül a receptorhoz kapcsolódva szabályozhatja (Repa és mtsai., 1993), nem pedig retinsavvá alakulva. Ahogyan az ezen eredmények alapján várható volt, ezek a vegyületek nincsenek hatással az ATRA-indukált efferocitózisra sem.



7. ábra: A retinol és a csupa-transz retinsav jelenléte a makrofág differenciáció utolsó két napján fokozott efferocitózist eredményez a BMDM-okban azáltal, hogy számos efferocitózis-kapcsolt molekula expresszióját szabályozzák RAR-függő módon. (A) Fagocitáló makrofágok százalékos aránya, melyek 1 μ M ROL vagy 30nM ATRA jelenlétében vagy hiányában differenciálódtak az utolsó 2 napban önmagukban, vagy 0,5 μ M erősen szelektív pán-RAR antagonistá, az AGN194310, jelenléte mellett. (B) RT-qPCR technikával meghatározott efferocitózis-kapcsolt gének mRNS expressziója makrofágokban, melyek a differenciálódási folyamat utolsó két napján 1 μ M ROL vagy 30 nM ATRA és/vagy 0,5 μ M AGN194310

jelenlétében vagy hiányában differenciálódtak. Normalizáló génként β -aktint használtunk. (C) A $RAR\beta$ mRNS expresszió időfüggő indukciója a makrofág érés utolsó két napján jelen lévő $1\ \mu\text{M}$ DHR, $1\ \mu\text{M}$ ROL vagy $30\ \text{nM}$ ATRA mellett. (D) Fagocitáló makrofágok százalékos aránya, melyeket az aldehid dehidrogenáz gátló diszulfiram ($10\ \mu\text{M}$), és a retinaldehid dehidrogenáz gátló DEAB ($25\ \mu\text{M}$) inhibitorokkal 30 percig előkezeltünk a makrofág érés 4. napjának kezdetén, majd ezt követően $1\ \mu\text{M}$ DHR-t, $1\ \mu\text{M}$ ROL-t vagy $30\ \text{nM}$ ATRA-t adtunk a sejtekhez, melyek a makrofág érés utolsó 48 órájában jelen voltak. Az eredményeket átlag $\pm$ SD értéként tüntettük fel ($n=3$). Csillagokkal jelöltük a statisztikailag szignifikáns különbségeket: $*p<0,05$, $**p<0,01$, $***p<0,001$, $****p<0,0001$. Mindegyik sejt kultúra tartalmazott $0,5\ \text{v/v}\%$ DMSO-t.

7.1.3. A csont morfogenetikus fehérje 2 (BMP-2) expresszióját indukálják a makrofág érés 4. napján adott retinoidok

Annak meghatározásához, hogy mely gének közvetíthetik a retinoidok hatását a differenciálódás során, DHR-t és ROL-t adtunk a differenciálódó makrofágokhoz a 4. nap elején, és a sejteket 2 órával később összegyűjtöttük mRNS szekvenáláshoz.

A 2. táblázatban látható, hogy 106 DEG-et azonosítottunk a DHR-lal kezelt és nem kezelt differenciálódó makrofágok között (legalább 1,5-szeres változás és $<0,05$ korrigált p érték alapján). 74 transzkript volt megnövekedett génexpresszióval jellemezhető, és 32 transzkript mutatott csökkent génexpressziót a DHR-lal kezelt sejtekben. A csökkenést, valamint növekedést mutató transzkriptek átlag FC értéke $-2,28 \pm 0,72$ és $3,34 \pm 4,4$, míg a medián FC érték $-2,08$ és $2,15$ volt. Valószínűleg a DHR és a ROL ugyanarra a transzkripciósi útvonalra hat, mert ugyanazok a gének indukálódtak a ROL hatására is. A fokozott kifejeződést mutató gének közül kiválasztottuk a BMP-2 növekedési faktort, mert egyrészt azt találtuk, hogy erősen indukálódott a 48 órás mintákban, másrészt korábban kimutatták, hogy RAR célgén (Heller és mtsai., 1999).

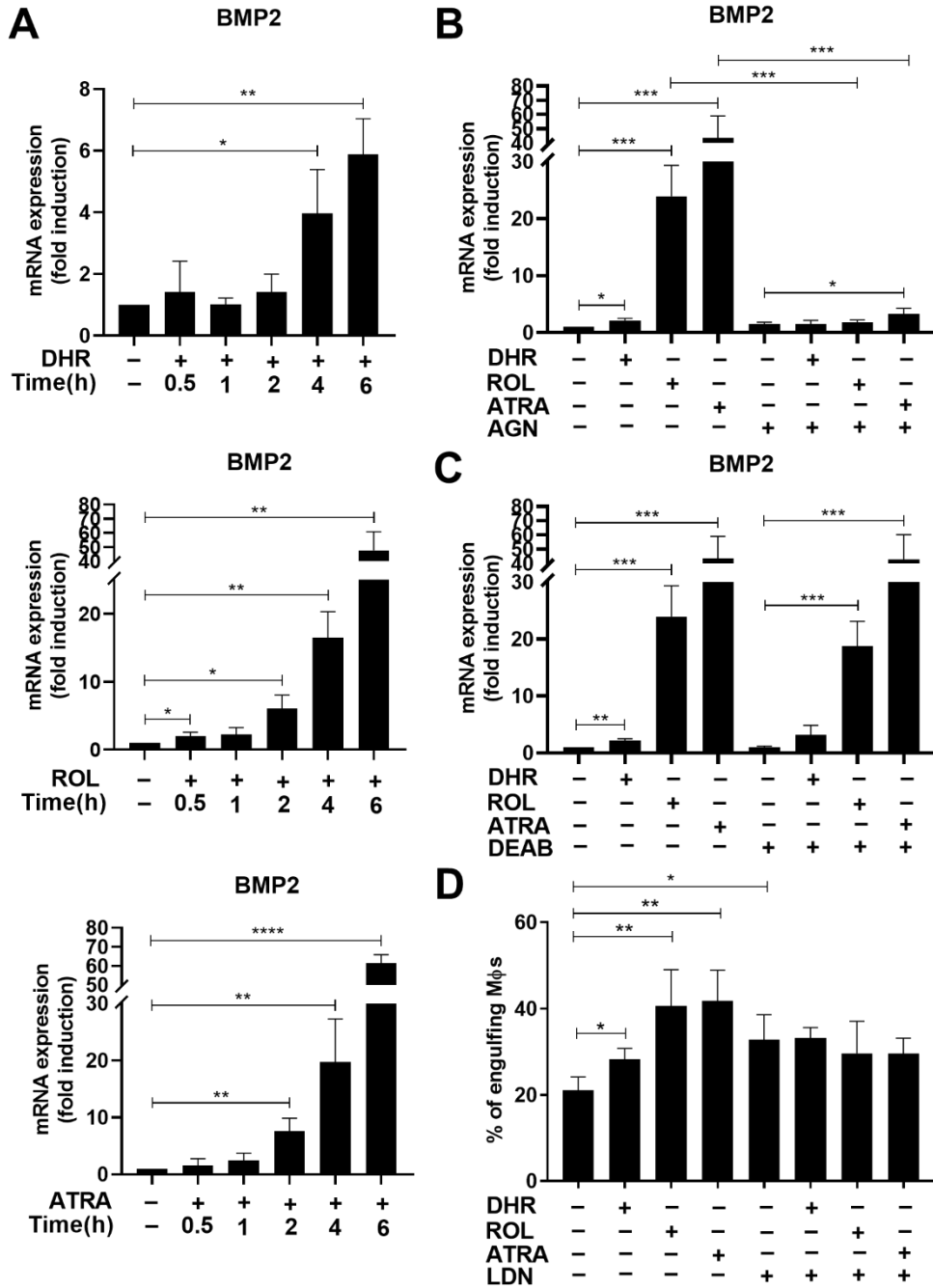
2. táblázat: A 106 gén, melyek különbözőképpen expresszálódtak a monocita differenciáció negyedik napjának kezdetén adott, 2 órán keresztül jelen lévő DMSO-val és $1\ \mu\text{M}$ DHR-lal kezelt makrofágok között (legalább 1,5-szeres változás és $<0,05$ korrigált p érték alapján).

Fokozott génexpressziót mutató transzkriptek			
Korr. P Érték	FC	Gén szimbólum	Gén név
1.8×10^{-8}	30.3	Hic1	hipermetilált rákban 1
1.2×10^{-6}	25.0	Camkk1	kalcium/kalmodulin-függő fehérje kináz 1, alfa
2.4×10^{-3}	10.8	Gm15927	jósolt gén 15927
8.9×10^{-8}	7.6	Bmp2	csont morfogenetikus fehérje 2
2.1×10^{-5}	7.4	B230378P21Rik	RIKEN cDNA B230378P21 gén
3.2×10^{-6}	6.1	Art2a-ps	ADP-ribosziltranszferáz 2a, pseudogén
2.4×10^{-3}	5.1	Dll1	delta-szerű 1 (Drosophila)
2.8×10^{-5}	5.0	Tox3	TOX magas mobilitású csoport box családtag 3
1.6×10^{-3}	4.8	Fam20a	szekvencia hasonlóság család 20, tag A
4.3×10^{-5}	4.5	Kcnip3	Kv csatorna interakciós fehérje 3
6.1×10^{-3}	4.2	AI848285	expresszált szekvencia AI848285
3.4×10^{-4}	4.1	Kcng1	pkálium feszültség-kapuzott csatorna, alcsalád G, tag 1
2.9×10^{-4}	3.9	Il2rb	interleukin 2 receptor, béta lánc
1.5×10^{-2}	3.3	Vash1	vazohibin 1
2.0×10^{-7}	3.2	Gm13431	jósolt gén 13431
5.4×10^{-3}	3.1	Bfsp1	gyöngyös filament szerkezeti fehérje 1, lencse-CP94-ben
8.6×10^{-5}	3.1	Hbegf	heparin-kapcsolt EGF-szerű növekedési faktor
4.9×10^{-8}	3.1	Pram1	PML-RAR alfa-regulált adaptor molekula 1
9.6×10^{-3}	2.9	Fam124a	szekvencia hasonlóság család 124, tag A
5.9×10^{-5}	2.8	Shcbp11	Shc SH2-domén kötő fehérje 1-szerű
1.2×10^{-6}	2.8	Nppa	nnátriuretikus peptid típus A
2.1×10^{-7}	2.8	Hivep2	ember immunodeficiencia vírus típus I enhancer kötő fehérje 2
3.8×10^{-5}	2.7	Robo3	roundabout homolog 3 (Drosophila)
9.1×10^{-7}	2.7	Vegfa	vaszkuláris endotél növekedési faktor A
3.2×10^{-3}	2.7	Gm9733	jósolt gén 9733
1.0×10^{-7}	2.7	Smad3	SMAD családtag 3
8.3×10^{-4}	2.6	Tubb3	tubulin, béta 3 osztály III
5.4×10^{-3}	2.5	Gm7148	jósolt gén 7148
1.7×10^{-4}	2.3	Btnl4	butirofilin-szerű 4
3.4×10^{-3}	2.3	Rpsa-ps3	riboszómális fehérje SA, pseudogén 3
6.5×10^{-8}	2.3	Osgin1	oxidatív stressz indukált növekedés inhibitor 1
8.8×10^{-9}	2.2	Dtx4	deltex 4 homológ (Drosophila)
1.3×10^{-10}	2.2	Ptgs1	prostaglandin-endoperoxid szintáz 1
1.3×10^{-7}	2.2	Rab20	RAB20, RAS onkogén családtag
4.8×10^{-3}	2.2	Gm11870	jósolt gén 11870
6.9×10^{-7}	2.2	Il21r	interleukin 21 receptor
4.4×10^{-4}	2.1	Map6d1	MAP6 domént tartalmazó 1
1.9×10^{-3}	2.1	Corin	corin
2.6×10^{-9}	2.1	2510009E07Rik	RIKEN cDNA 2510009E07 gén
2.0×10^{-6}	2.1	Socs2	citokin jelátvitel 2 szuppresszor
1.1×10^{-9}	2.0	Mcart1	mitokondriális hordozó tripla ismétlődés 1

2.2×10^{-7}	2.0	Asb10	ankirin ismétlődés és SOCS box-tartalmú 10
6.9×10^{-8}	2.0	Neur13	neuralizált homológ 3 homolog (Drosophila)
1.4×10^{-4}	1.9	Mex3b	mex3 homológ B (C. elegans)
2.0×10^{-5}	1.9	Hs3st3b1	heparán szulfát (glukozamin) 3-O-szulfotranszferáz 3B1
1.3×10^{-3}	1.9	Gm15708	jósolt gén 15708
1.1×10^{-2}	1.9	Pih1d2	PIH1 domént tartalmazó 2
1.4×10^{-5}	1.9	Hrh1	hisztamin receptor H1
4.5×10^{-3}	1.9	Elmo3	bekebelezés és sejt motilitás 3
1.3×10^{-5}	1.9	AA467197	expresszált szekvencia AA467197
2.5×10^{-6}	1.8	Gm22	jósolt gén 22
4.5×10^{-8}	1.8	Fam117a	szekvencia hasonlóság család 117, tag A
2.1×10^{-6}	1.8	Dchs1	dachszousz 1 (Drosophila)
9.8×10^{-7}	1.8	Klh12	kelch-szerű 12 (Drosophila)
1.8×10^{-8}	1.8	Dusp5	duál specifikus foszfatáz 5
6.7×10^{-3}	1.8	Sema3d	sema domén, immunoglobulin domén (Ig), rövid alap domén, szekretált, (semaforin) 3D
9.6×10^{-3}	1.7	1700042O10Rik	RIKEN cDNA 1700042O10 gén
1.4×10^{-6}	1.7	Cmah	citidin monofoszfo-N-acetilneuraminiksav hidroxiláz
1.4×10^{-5}	1.7	Pilrb1	páros immunoglobulin-szerű típus 2 receptor béta 1
1.2×10^{-4}	1.7	Vangl2	vang-szerű 2 (van gogh, Drosophila)
2.1×10^{-7}	1.7	Ikbke	kappaB kináz epszilon inhibitor
4.9×10^{-8}	1.7	Fam20c	szekvencia hasonlóság család 20, tag C
8.9×10^{-8}	1.7	Tagap	T sejt aktivációs Rho GTPáz aktiváló fehérje
2.5×10^{-7}	1.6	Ma1b	v-maf muszkuloaponeurotikus fibroszarkóma onkogén család, fehérje B (avian)
3.9×10^{-4}	1.6	Vdr	D- vitamin receptor
5.4×10^{-7}	1.6	Gda	guanin deamináz
5.3×10^{-5}	1.6	Fbxo32	F-box fehérje 32
1.2×10^{-5}	1.6	Gm16010	jósolt gén 16010
2.0×10^{-7}	1.6	Bcl3	B sejt leukémia/limfóma 3
1.9×10^{-7}	1.6	Hcfc2	gazdasejt faktor C2
1.4×10^{-6}	1.6	Cd97	CD97 antigén
1.6×10^{-7}	1.6	Lfng	LFNG O-fukozilpeptid 3-béta-N-acetilglukozaminiltranszferáz
4.2×10^{-6}	1.5	Aifm2	apoptózis indukáló faktor, mitokondrium asszociált 2
1.8×10^{-6}	1.5	Spsb4	splA/rianodin receptor domén és SOCS box tartalmú 4
Csökkent génexpressziót mutató transzkriptek			
Korr. P érték	FC	Gén szimbólum	Gén név
2.3×10^{-3}	-4.1	Klf5	Kruppel-szerű faktor 5
1.3×10^{-3}	-3.9	Zfp831	cink-ujj fehérje 831
6.8×10^{-3}	-3.6	St8sia6	ST8 alfa-N-acetil-neuraminid alfa-2,8-szialiltranszferáz 6
3.6×10^{-4}	-3.2	Gm1564	jósolt gén 1564
9.3×10^{-5}	-3.1	Efnal	efrin A1

1.2×10^{-3}	-3.0	Plat	plazminogén aktivátor, szöveti
1.0×10^{-2}	-2.9	Ucp3	szétkapcsoló fehérje 3 (mitokondriális)
2.6×10^{-3}	-2.7	Havcr1	hepatitisz A vírus celluláris receptor 1
5.4×10^{-3}	-2.7	Heyl	hairy/hasadásfokozó YRPW motívum-szerű
1.7×10^{-3}	-2.7	Akr1b7	aldo-keto reduktáz család 1, tag B7
5.6×10^{-3}	-2.5	Mir425	microRNS 425
2.5×10^{-4}	-2.4	Ighv6-3	immunoglobulin nehéz variábilis 6-3
2.5×10^{-3}	-2.2	Cyp4f41-ps	citokróm P450, család 4, alcsalád f, polipeptidi 41 pszeudogén
4.7×10^{-5}	-2.2	Emr4	EGF-szerű modul tartalmú, mucin-szerű, hormon receptor-szerű szekvencia 4
9.4×10^{-5}	-2.1	Styk1	szérin/treonin/tirozin kináz 1
2.0×10^{-4}	-2.1	Gpr182	G fehérje-kcsaplt receptor 182
1.2×10^{-5}	-2.1	U6	U6 spliceoszomálid RNS
1.8×10^{-4}	-2.0	Ch25h	koleszterol 25-hidroxiláz
8.2×10^{-9}	-1.9	Rnd3	Rho család GTPáz 3
1.7×10^{-2}	-1.8	Gm6776	jósolt pszeudogén 6776
1.1×10^{-2}	-1.8	Pxdc1	PX domént tartalmazó 1
1.2×10^{-4}	-1.8	Socs3	citokin jelátvitel 3 szuppresszor
1.7×10^{-6}	-1.8	Tnf	tumor nekrozis faktor
1.8×10^{-10}	-1.8	Cited2	Cbp/p300-interaktiváló transzaktivátor, Glu/Asp-gazdag karboxi-terminális doménnal, 2
3.1×10^{-6}	-1.6	Spata13	spermatogenezis asszociált 13
1.8×10^{-8}	-1.6	Rasgef1b	RasGEF domén család, tag 1B
7.3×10^{-6}	-1.6	Gpr85	G fehérje-kapcsolt receptor 85
1.5×10^{-4}	-1.6	Rgs7bp	G-fehérje jelátvitel 7-kapcsolt fehérje szabályozó
1.3×10^{-7}	-1.5	Dusp1	duál specifikus foszfatáz 1
1.2×10^{-3}	-1.5	Tnfaip3	tumor nekrozis faktor, alfa-indukált fehérje 3
1.9×10^{-3}	-1.5	Gm16541	jósolt gén 16541
4.7×10^{-6}	-1.5	Tmem178	transzmembrán fehérje 178

A BMP-2 mRNS expressziója időfüggő módon indukálódott a differenciálódás 4. napján hozzáadott mindhárom retinoiddal (8A ábra). A retinoidok adását követő 6 óra után azt tapasztaltuk, hogy az AGN194310 teljesen megakadályozta a BMP-2 mRNS mindhárom retinoid által kiváltott indukcióját (8B ábra), bizonyítva ezzel a RAR-ok transzkripció szerepét. Mivel a DEAB-bal történő retinaldehid dehidrogenáz gátlásnak nem volt hatása a retinoidok által indukált efferocitózisra (7D ábra), ezért kíváncsiak voltunk, vajon hatással van-e a retinoidok által kiváltott BMP-2 expresszióra. Azonban, ahogyan az a 8C ábrán látható, a DEAB nem volt hatással a BMP-2 mRNS expresszióra sem, ami ugyancsak azt mutatja, hogy közvetlen kötődés által szabályozhatja a ROL és DHR a RAR aktivitást.



8. ábra: A retinoidok indukálják a makrofágok differenciálódása során a BMP-2-t, mely hozzájárulhat a retinoidok általi fokozott efferocitózishoz. (A) A BMP-2 mRNS expresszió időfüggő növekedése a makrofág differenciáció 4. napjának kezdetén adott 1 μ M DHR, 1 μ M ROL vagy 30 nM ATRA jelenlétében. (B) BMP-2 mRNS expressziója a makrofág érés 4. napjának kezdetétől 6 órán keresztül jelenlévő 1 μ M DHR, 1 μ M ROL, 30 nM ATRA és 0,5 μ M AGN194310 gátlószer jelenléte vagy hiánya mellett. (C) A makrofág érés 4. napjának kezdetén adott 1 μ M DHR, 1 μ M ROL, 30 nM ATRA és 25 μ M DEAB retinaldehid dehidrogenáz gátlószer jelenléte vagy hiánya mellett mért BMP-2 mRNS expresszió. (D) A makrofág

*differentiáció 4. napjának kezdetén, az 1 μ M DHR-lal, 1 μ M ROL-lal vagy 30 nM ATRA-val együtt adott LDN193189 (0,3 μ M) BMP gátlószer hatása a két nappal később mért efferocitózisra. Az összes eredményt átlag $\pm$ SD értékként tüntettük fel (n=4). Referencia génként β -aktint használtunk. Csillagok jelölik a statisztikailag szignifikáns különbségeket: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. Továbbá 0,5 v/v% DMSO-t is tartalmazott mindegyik sejtkultúra.*

7.1.4. A BMP-2 hozzájárul a differenciálódó makrofágok retinoidok által indukált efferocitotikus kapacitásához

A BMP-2 poteniciális, retinoid-indukált efferocitózisban betöltött szerepének vizsgálatához a retinoidokkal együtt egy BMP receptor (ALK2/3 szerin/treonin kináz) gátlószert (LDN193189) adtunk a makrofágokhoz. A 8D ábrán látható, hogy bár az LDN193189 a differenciáció során adva önmagában is növelte a makrofágok alap efferocitózisát, a retinoidok által kiváltott efferocitózis növekedést gátolta. Amikor a BMP receptor inhibitort érett, kezeletlen BMDM-okhoz adtuk az efferocitózis kezdetekor, akkor az inhibitor jelenléte nem volt hatással az 1 órás efferocitózisra (az adatokat nem közöljük), ami arra utal, hogy a BMP-2 receptor jelátvitelnek a makrofág differenciáció során kell működnie, az efferocitózist megelőzően.

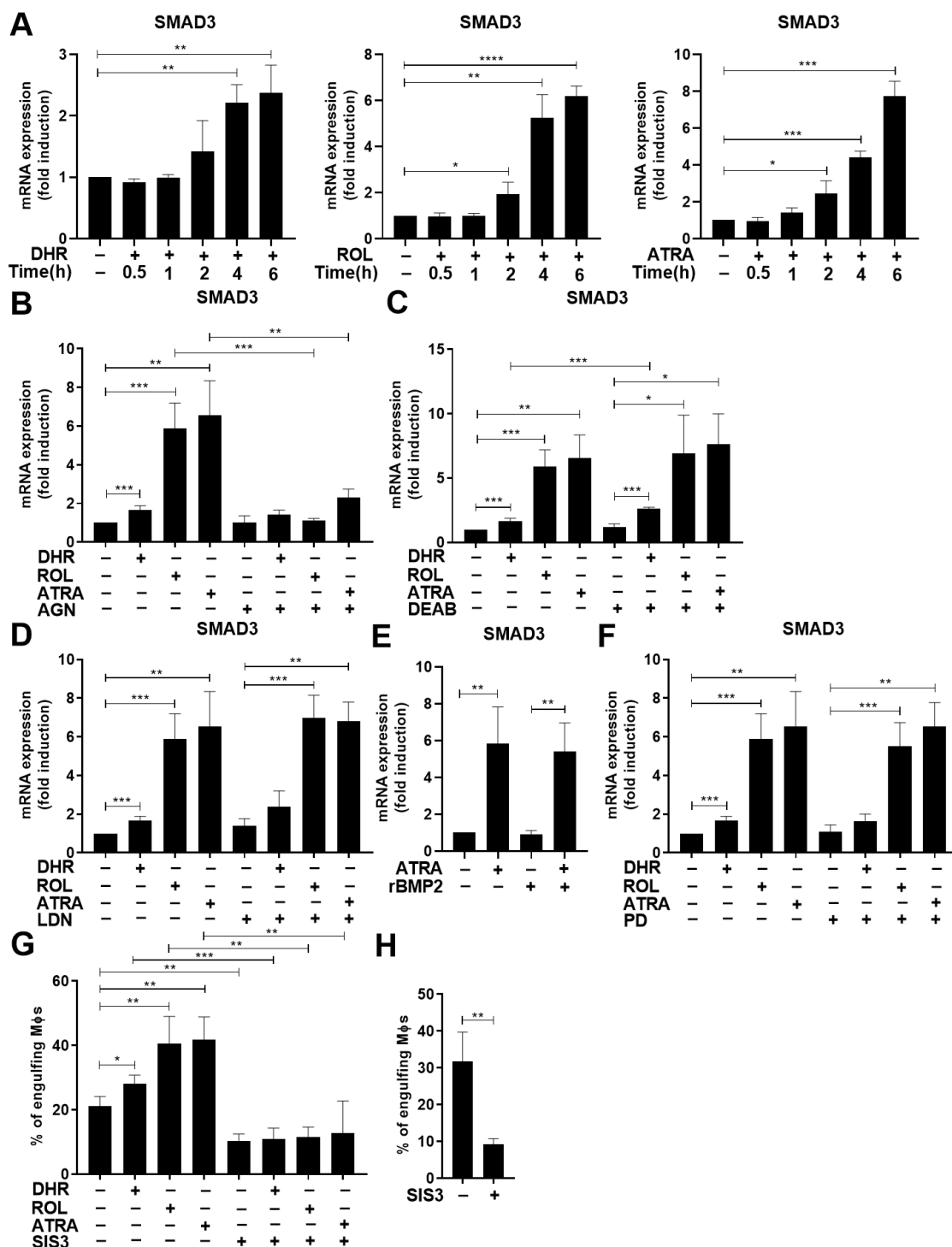
7.1.5. A retinoidok indukálják a Smad3-at

Megfigyeltük, hogy a DHR adását követően a BMP-2 mellett a Smad3 mRNS is indukálódott (2.táblázat). A Smad3 egy olyan transzkripciós faktor, melyről ismert, hogy a transzformáló növekedési faktor (TGF)- β hatását közvetíti, illetve a makrofágokban szerepe van az efferocitózisban (Chen és mtsai., 2019). Mi is azt tapasztaltuk, hogy a makrofág differenciáció negyedik napján adott retinoidok időfüggő módon indukálták a Smad3 mRNS expressziót (9A ábra). A 9B ábrán látható, hogy 6 órával a retinoidok és az AGN194310 makrofágokhoz adását követően az AGN194310 teljesen legátolta a Smad3 mRNS indukciót mindhárom retinoid esetében, bizonyítva ezzel a RAR-ok transzkripciós szerepét. Másrésről, a DEAB-bal történő retinaldehid dehidrogenáz gátlás nem volt hatással a retinoidok által előidézett efferocitózisra, továbbá a BMP-2 mRNS expresszióra sem (9C ábra).

Ezt követően vizsgáltuk, hogy szerepe van-e a BMP-2-nek a retinoidok által kiváltott Smad3 mRNS indukcióban. Azonban, ahogyan az a 9D ábrán látható, a Smad3 retinoidok által

előidézett mRNS expresszióját az LDN193189 BMP-2 inhibitor nem befolyásolta, továbbá nem idézett elő változást a rekombináns BMP-2 sem önmagában, sem ATRA-val együtt alkalmazva (9E ábra).

Korábbi vizsgálatok azt mutatták, hogy a differenciálódó monociták által termelt TGF- β autokrin módon fejti ki hatását (Gonzalez-Junca és mtsai., 2019), valamint a TGF- β képes szabályozni a Smad3 expressziót a mitogén aktivált fehérje kináz kináz-1-en (MEK1) keresztül (Ross és mtsai., 2007). Meglepő módon, a PD98059 általi MEK1 gátlás során nem tapasztaltunk a retinoid-indukált Smad3 expresszióban változást (9F ábra). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy nem a BMP-2, illetve nem a TGF- β közvetíti a retinoidok hatását a Smad3 expresszióra.



9. ábra: A makrofág érés során a retinoidok indukálják a Smad3-at, mely hozzájárulhat a retinoidok által kiváltott fokozott efferocitózishoz. (A) A Smad3 mRNS expresszió növekedése az idő függvényében olyan differenciálódó makrofágokban, melyek az érési folyamat 4. napjától kezdődően 1 μ M DHR, 1 μ M ROL vagy 30 nM ATRA jelenlétében differenciálódtak. (B) Retinoid-indukált Smad3 mRNS expresszió gátlása 0,5 μ M AGN194310 inhibitorral a makrofág érés 4.napjának kezdetén, 6 órával a retinoidok adását követően mérve. (C) A

*retinaldehid dehidrogenázok 25 μ M DEAB-bal történő gátlásának hatása a Smad3 mRNS expresszióra a makrofág differenciáció 4.napjának elején, 6 órával a retinoidok (1 μ M DHR, 1 μ M ROL vagy 30 nM ATRA) adása után mérve. (D) A makrofágérés 4. napjának kezdetén, a retinoidokkal együtt adott BMP gátlószer LDN193189 (0,3 μ M) hatása a Smad3 expresszióra, 6 órával a sejt kultúrához adásukat követően. (E) A 4 napig differenciáltatott makrofágokhoz retinoidokkal együtt adott rekombináns BMP-2 hatása a Smad3 mRNS expresszióra, 6 óra inkubálási idő után mérve. (F) 5 μ M PD98059 MEK1 gátlószer hatása a Smad3 mRNS expresszióra a makrofágérés 4.napjának kezdetén, 6 órával a retinoidok és a gátlószer adását követően mérve. (G) A makrofág differenciáció 4. napjának kezdetén, az 1 μ M DHR-lal, 1 μ M ROL-lal vagy 30 nM ATRA-val együtt jelenlévő 0,5 μ M Smad3 jelátvitel inhibitor (SIS3) hatása a két nappal később mért efferocitózisra. (H) Az apoptotikus timocitákkal együtt adott SIS3 (0,5 μ M) hatása a BMDM-ok efferocitózisára. A bemutatott eredményeket átlag $\pm$ SD értékként tüntettük fel (n=4). Az RT-qPCR során referencia génként β -aktint használtunk. Csillagok jelölik a statisztikailag szignifikáns különbségeket: * p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001, **** p <0,0001. Valamint 0,5 v/v% DMSO-t tartalmazott mindegyik sejt kultúra.*

7.1.6. A Smad3 hozzájárul a retinoid-indukált efferocitózishoz a makrofág differenciáció közben

Ahhoz, hogy vizsgálni tudjuk a Smad3 transzkripció faktor retinoid-indukált efferocitózisban betöltött szerepét a makrofág differenciáció során, a retinoidok mellett SIS3 TGF- β 1 receptor (ALK5 kináz) gátlószert adtunk a sejtekhez a differenciációjuk 4. napjának elején, melyről ismert, hogy gátolja a Smad3 jelátvitelt. A sejtek efferocitózis kapacitását két nappal később detektáltuk, melynek eredményeként a 9G ábrán látható, hogy a SIS3 szignifikánsan gátolta az alap efferocitózist, és megakadályozta a retinoidok által kiváltott efferocitózis növekedést, ami arra utal, hogy a TGF- β receptor/Smad 3 jelátvitelnek meghatározó szerepe van az efferocitózis fokozásában a makrofágok érése során. Ezenkívül az elhalt sejtekkel egy időben adott SIS3 gátolta az érett csontvelői eredetű makrofágok efferocitózisát (9H ábra), bizonyítva ezzel a Smad3 efferocitózisban betöltött meghatározó szerepét. A mi eredményeinkkel összhangban, a Smad3 részvételét az efferocitózis folyamatában már korábban megfigyelték (Chen és mtsai., 2019). Fontosnak tartom megemlíteni, hogy a SIS3-mal együtt történő 2 napos inkubálás jelentősen csökkentette (45%-kal) a makrofágok életképességét a kontrollokhoz képest (az adatokat nem mutatjuk), mely összhangban van azzal a megfigyeléssel, hogy a TGF- β 1, ami autokrin módon hat a

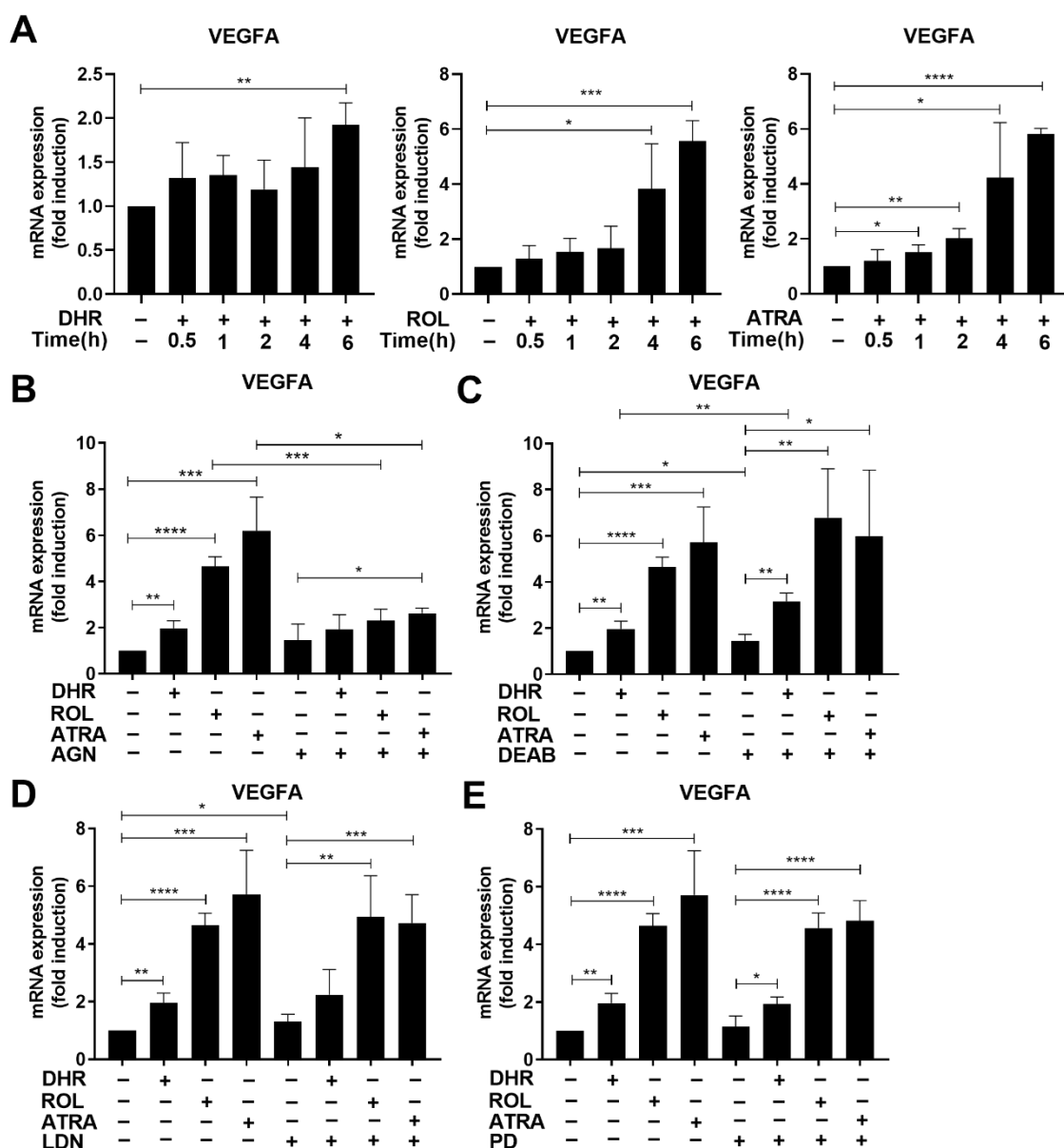
differentiálódó makrofágokra, nagymértékben hozzájárul a túlélésükhöz (Gonzalez-Junca és mtsai., 2019).

7.1.7. A retinoidok a vaszkuláris endotél növekedési faktor A (VEGFA) expresszióját is fokozzák

A korai, fokozott expressziót mutató gének között (2. táblázat), melyek a retinoid hatást közvetítik az efferocitózisban, olyan géneket is találtunk, mint például a D-vitamin receptor vagy a vaszkuláris endotél növekedési faktor A (VEGFA), mely kapcsolatba hozható az M2 monocita/makrofág polarizációval. A D-vitamin receptorról ismert, hogy a makrofágok M2 irányba való elköteleződését segíti (Gunasekar és mtsai., 2018), míg a VEGFA növekedési faktort M2 pro-reparatív monocita/makrofágok termelik, melyek az angiogenezist irányítják (Shibuya és mtsai., 2011). Ezek alapján a VEGFA mRNS expresszió szabályozására voltunk kíváncsiak.

Hasonlóan a BMP-2-höz és a Smad3-hoz, a retinoidok idő- és RAR transzkripció függő módon indukálták a VEGFA mRNS expressziót (10A és 10B ábra), és a DEAB nem volt hatással erre a növekedésre (10C ábra). Az LDN193189 és a PD98059 hatásának hiánya (10D és 10E ábra) arra utal, hogy az ALK2-, ALK3-, vagy MEK1-mediált jelátvitel nem játszik szerepet a VEGFA mRNS expresszió szabályozásában. Smad3 hiányos makrofágokat használó korábbi tanulmányokban azonban kimutatták, hogy a Smad3 részt vesz a makrofágok VEGFA szabályozásában (Chen és mtsai., 2019), ami arra utal, hogy a retinoidok közvetve növelhetik a VEGFA expresszióját a Smad3 szint emelésén keresztül (9A ábra).

Korábbi tanulmányok azt mutatták, hogy az *in vivo* differenciált peritoneális makrofágokhoz képest a csontvelői eredetű makrofágok az M1-M2 polarizációs spektrumon inkább az M1 felé törekszenek (Zajd és mtsai., 2020). Érdekes módon, magát a BMP-2-t M2 típusú makrofágok termelik (Loi és mtsai., 2016; Wang és mtsai., 2022). Ezért M2 marker géneket kerestünk azokban a makrofágokban, melyek az érésük utolsó 48 órájában DHR jelenlétében differenciálódtak, hogy megnézzük, a retinoid kezelés az M2 polarizáció irányába tolja-e el a makrofág differenciációt. A 3. táblázatban találhatóak az általunk összegyűjtött M2 marker gének, melyek a DHR jelenlétében fokozott expressziót mutattak.



10. ábra: A makrofág differenciáció során a VEGFA is indukálódik a retinoidok hatására.

(A) A VEGFA mRNS időfüggő növekedése makrofágokban a differenciáció 4. napjának kezdetétől jelenlévő 1 μ M DHR, 1 μ M ROL vagy 30 nM ATRA esetén. (B) A retinoid-indukált VEGFA mRNS expresszió gátlása 0,5 μ M AGN194310-zel, a makrofág érés 4. napjának kezdetén, 6 órával a retinoidok adását követően. (C) A retinaldehid dehidrogenázok 25 μ M DEAB-bal történő gátlásának hatása a VEGFA mRNS expresszióra a makrofág differenciáció 4. napjának elején, 6 órával a retinoidok adása után. (D) 0,3 μ M LDN193189 vagy (E) 5 μ M PD98059 gátlószerek hatása a VEGFA mRNS expresszióra, 30 perccel a retinoidok előtt adva a makrofág érés 4. napjának kezdetén, 6 órával a sejt kultúrához adást követően. Az eredmények átlag $\pm$ SD értéként vannak megadva ($n=4$). Az RT-qPCR során normalizáló génként β -aktint használtunk, továbbá csillagok jelölik a statisztikailag szignifikáns különbségeket: * $p<0,05$,

*****p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001. A sejtkultúrák mindegyike tartalmazott 0,5 v/v% DMSO-t.***

3. táblázat: M2 makrofág marker gének listája, melyek különbözőképpen expresszázódtak a makrofág érés negyedik napjának kezdetén adott, 48 órán át jelen lévő DMSO-val és 1 µM DHR-lal kezelt BMDM-ok között (legalább 1,5-szörös változás és <0,05 korrigált p érték alapján). Az M2 makrofág-asszociált gén lista a <https://www.bosterbio.com/tissue-markers-cellmarkers/macrophage-markers> webhely alapján készült, és 73 gént tartalmazott. Ezt az irodalmi keresésekből származó génekkel bővítettünk és kiterjesztettük arra a 357 génre, amelyek 48 órás DHR-kezelést követően fokozott expressziót mutattak.

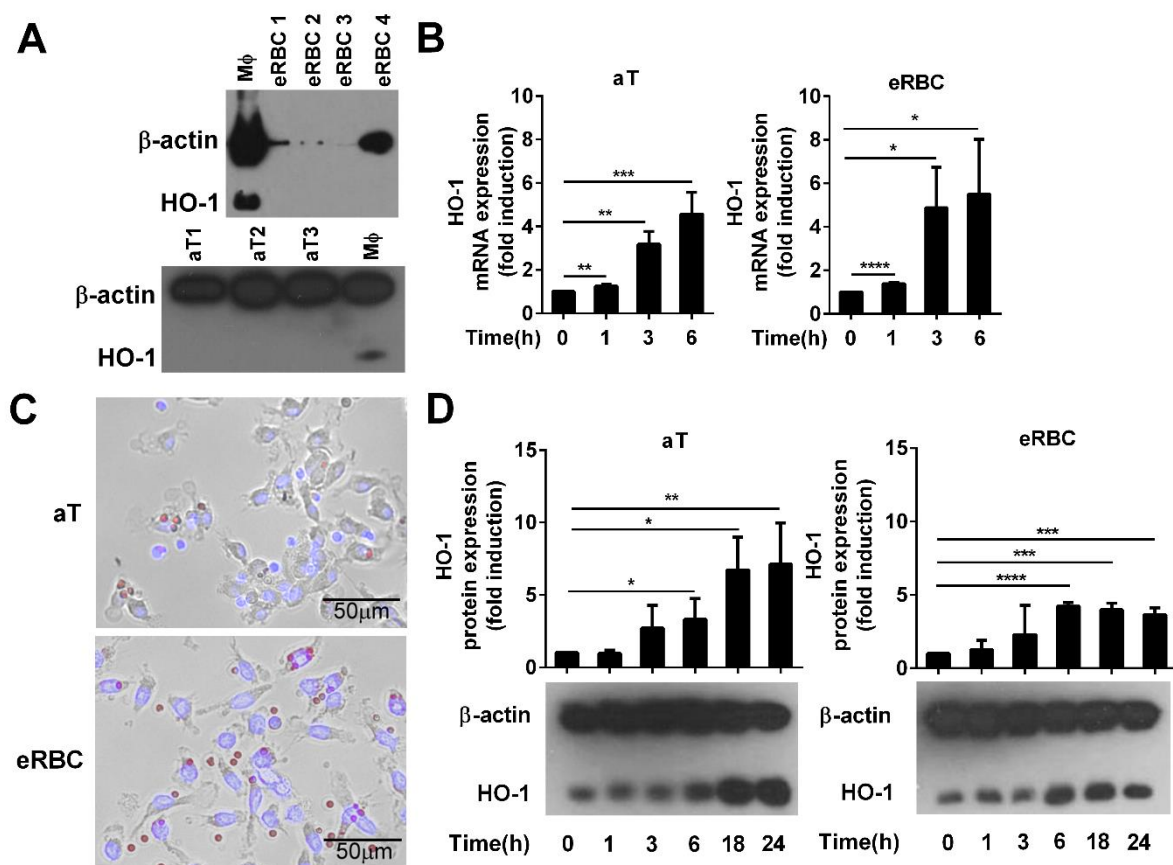
Korr. p érték	FC	Gén szimbólum	Gén név
8.93×10^{-8}	249.6	Bmp2	csont morfogenetikus fehérje 2
1.83×10^{-4}	14.8	Cyp26b1	citokróm P450, család 26, alcsalád b, polipeptid 1
9.13×10^{-7}	4.4	Vegfa	vaszkuláris endotél növekedési faktor A
3.76×10^{-4}	4.1	Aldh1a2	aldehid dehidrogenáz 1, alcsalád A2
4.38×10^{-3}	3.6	Marco	makrofág receptor kollagén szerkezettel
4.85×10^{-7}	2.8	Clec7a	C-típusú lektin domén család 7, tag a
2.01×10^{-4}	1.9	Irf4	interferon szabályozó faktor 4
5.56×10^{-5}	1.7	Siglec1	sziálsav kötő Ig-szerű lektin 1, szialoadhezin
6.24×10^{-8}	1.6	Tgm2	transzglutamináz 2, C polipeptid
1.43×10^{-4}	1.5	Cd36	CD36 antigén

7.2. A hemoxigenáz-1 az efferocitózis során a makrofágokban hozzájárul mind a bekebelezési mind a gyulladásgátló folyamatokhoz

7.2.1. Az apoptotikus sejtek fagocitózisa indukálja a HO-1 kifejeződését a makrofágokban

Hogy vizsgálni tudjuk a HO-1 szerepét és indukciójának mechanizmusát az apoptotikus sejteket felvevő makrofágokban, kiválasztottunk két különböző hemtartalmú célsejtet: az apoptotikus timocitákat, melyek hemtartalma meglehetősen alacsony, a detektálható értéken aluli (Philip és mtsai., 2015), és az eriptotikus vörösvértesteket, melyek hemtartalma igen magas, tekintve, hogy a tömegük alapján a hemoglobin alkotja a vörösvértestek szárazanyag tartalmának 96%-át (Weed és mtsai., 1963). Ismert, hogy a HO-1 szövetspecifikusan expresszálódik (www.proteinatlas.org, 2017), így először azt vizsgáltuk, hogy az apoptotikus timociták vagy az eriptotikus vörösvértestek expresszálják-e a HO-1 fehérjét. Ahogyan az a 11A ábrán látható, a HO-1 fehérje nem expresszálódott ezekben a sejt típusokban számottevő mennyiségben, így alkalmasnak bizonyultak további kísérletekhez, mivel nem zavarnak be az elhalt sejtek felvétele után a makrofágokban bekövetkező HO-1 kifejeződésének detektálásába.

Az 11B-D ábrákon látható, hogy függetlenül a hemtartalmuktól, mindkét elhalt sejt típus indukálta 6 órán belül a sejt felvevő makrofágokban a HO-1 mRNS expresszióját, valamint az is, hogy a HO-1 fehérje szintje 24 órával később is emelkedett maradt. Meglepő módon, a hemtartalomban lévő nagyfokú eltérés ellenére nem találtunk szignifikáns különbséget az indukció mértékében a két különböző sejt típus 6 órás felvétele során.



11. ábra: Az apoptotikus timociták és a magas hemtartalmú eriptotikus vörösvértestek is képesek a HO-1 expresszióját indukálni a fagocitáló makrofágokban. (A) Apoptotikus timociták (aT) és eriptotikus vörösvértestek (eRBC) HO-1 fehérje szintjét bemutató Western blotok. A felvitt fehérjemennyiség kontrolljaként β -aktint használtunk. M ϕ =makrofág. (B) Apoptotikus timocitákat vagy eriptotikus vörösvértesteket felvevő makrofágok különböző időpontokban mért HO-1 mRNS szintje. Az mRNS expressziót RT-qPCR technika segítségével határoztuk meg, normalizáló génként ciklofilin A-t használva. Az eredményeket nem fagocitáló makrofágok alap HO-1 expressziójához hasonlítva tüntettük fel. (C) Fluoreszcens mikroszkóppal készült reprezentatív képek az apoptotikus timocitákat vagy eriptotikus vörösvértesteket bekebelező makrofágokról. Lépték skála: 50 μ m. (D) Apoptotikus timocitákat vagy eriptotikus vörösvértesteket bekebelező makrofágok különböző időpontokban mért HO-1 fehérje szintje, melyet Western blot technikával határoztunk meg β -aktint használva a felvitt fehérjemennyiség kontrolljaként. Egy reprezentatív Western blotot mutatok be. Az eredményeket nem fagocitáló makrofágok alap HO-1 fehérje szintjéhez hasonlítva adtuk meg. Az eredményeket átlag $\pm$ SD értéként tüntettük fel ($n=3$). A statisztikailag szignifikáns különbségeket csillagok jelölik: * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$, **** $p<0,0001$.

7.2.2. A HO-1 expresszióját szolubilis jelek indukálják az apoptotikus timocitákat fagocitáló makrofágokban, míg az elhalt vörösvértestek jelenlétében lévő makrofágok HO-1 indukciójához szükséges a sejtek felvétele

Amennyiben az elhalt sejt hemtartalma szerepet játszik a HO-1 indukciójában, akkor a makrofágoknak először mindenképpen fel kell vennie az elhalt sejtet. Ezért, hogy megvizsgáljuk a hem szerepét a HO-1 indukcióban az elhalt sejtek felvétele során, citokalazin-D-vel gátoltuk az aktin polimerizációt, ezzel együtt pedig az elhalt sejtek felvételét. Ahogyan az a 12A ábrán látható, a citokalazin-D jelenléte erősen gátolta mind az apoptotikus timociták, mind az eriptotikus vörösvértestek felvételét. Azonban, a citokalazin-D csak az eriptotikus vörösvértestek esetében gátolta a HO-1 indukcióját. A 12B ábrán látható, hogy az apoptotikus timociták esetében a citokalazin-D bekebelezést gátló hatása mellett is indukálódott a HO-1.

Ezek az eredmények azt sugallják, hogy az intracelluláris hem nem a fő kiváltója a HO-1 indukciójának az apoptotikus timociták esetében, ezért elkezdjük vizsgálni, hogy milyen elhalási jelek vehetnek részt a folyamatban. A citokalazin-D gátolja magát a sejt felvételt, de nem befolyásolja az elhalt sejtek érzékelését. A laboratóriumunkban korábban kimutatták, hogy mindkét sejt típus képes expresszálni a foszfatidilszerint (Köröskényi és mtsai., 2011; Sarang és mtsai., 2007), mely egy univerzális sejtelhalási sejtfelszíni jelnek tekinthető, és a legtöbb makrofágon megtalálható fagocitareceptor képes direkt vagy indirekt módon felismerni (Lemke 2019). Így, ha feltételezzük, hogy a sejtfelszíni jelek az apoptotikus timociták és eriptotikus vörösvértestek esetében hasonlóak, akkor ezek az eredmények arra utalnak, hogy az eriptotikus vörösvértestek a felvételt követően a makrofágon belül képesek indukálni a HO-1-et, míg az apoptotikus timociták szolubilis jeleket használnak. Ezt bizonyítja az a megfigyelésünk, hogy az összegyűjtött sejttenyésző folyadék, mely a timociták sejtelhalása során keletkezett, képes volt önmagában is kiváltani a BMDM-okban a HO-1 indukcióját (12C ábra), míg ugyanez az eriptotikus vörösvértestek esetében nem mondható el (az eredményeket nem mutatom be). Mivel a HO-1 indukciójának mértéke szignifikánsan kisebb az apoptotikus felülúszó esetében, mint az elhalt timociták jelenlétében (az eredmények nem kerültek bemutatásra), ez jelenthetné azt, hogy egy fagocita receptor játszhat szerepet, amit az eriptotikus vörösvértestek nem képesek aktiválni. A degradáció és a szolubilis faktor hígítása (a felülúszót 1:1 arányban adtuk a makrofágokhoz komplett sejttenyésző folyadékkal), ami az efferocitózis során magasabb

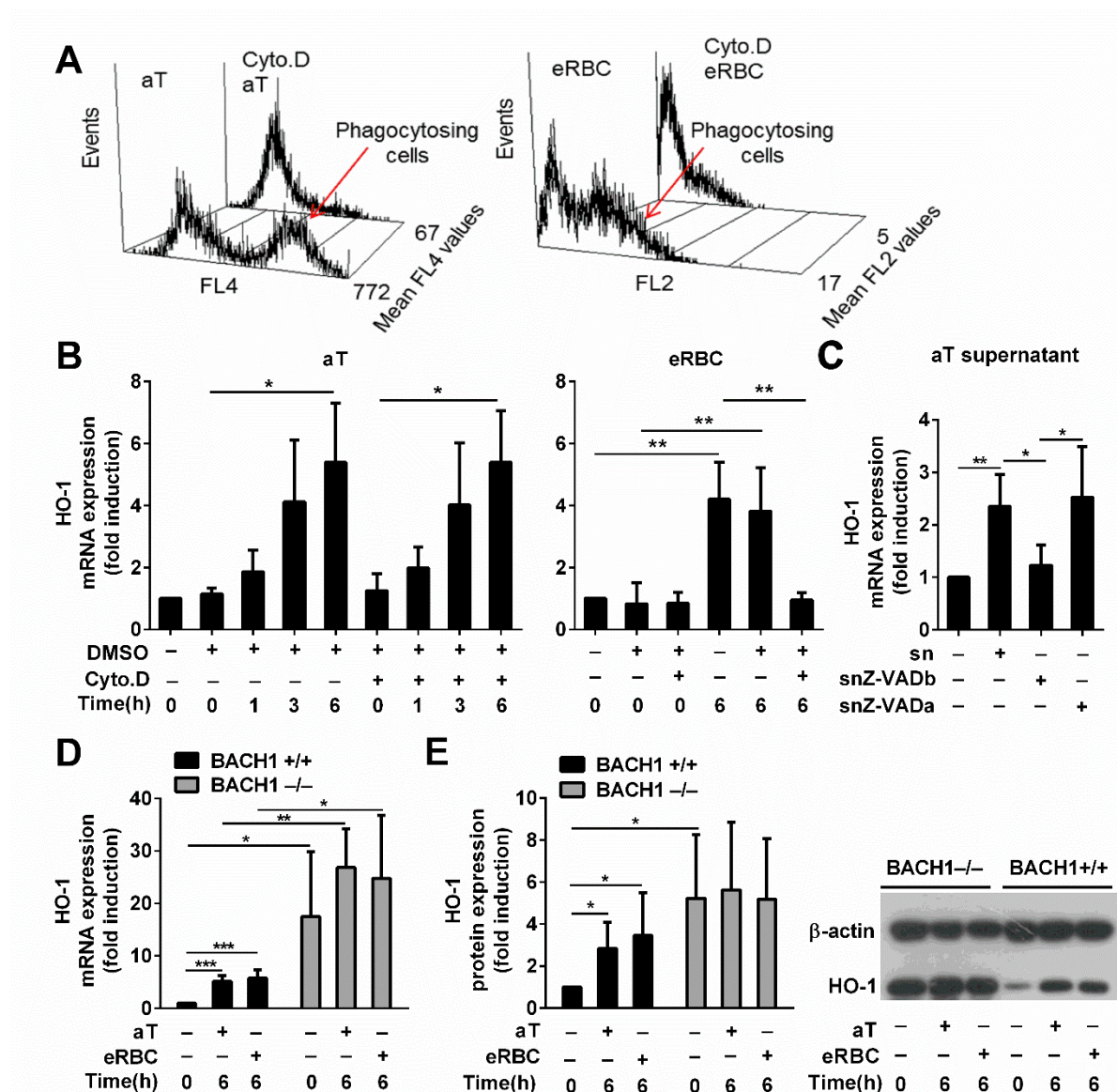
koncentrációban szabadul fel a makrofágok körül talán magyarázat a megfigyelt kismértékű különbségre.

A továbbiakban azt vizsgáltuk, hozzájárulnak-e a kaspázok a HO-1 indukcióját kiváltó szolubilis jel keletkezéséhez. Amikor a felülúszót 20 μ M Z-VAD-FMK, egy pán-kaspáz inhibitor, jelenlétében széruméheztetéssel elhaló timocitákról gyűjtöttük össze, akkor ezen felülúszó jelenlétében a HO-1 mRNS expresszió nem indukálódott. Ezzel szemben, amikor a Z-VAD-FMK-t együtt adtuk az apoptotikus timocákról külön nyert felülúszóval, akkor nem figyeltünk meg a HO-1 mRNS expressziójában változást a korábbiakhoz képest, ami azt bizonyítja, hogy a Z-VAD-FMK nincs hatással a makrofágokra (12C ábra). Ezek a megfigyelések azt mutatják, hogy a szolubilis szignál, ami a HO-1 indukcióért felelős, kaspázfüggő módon termelődik az elhaló timocitákban. Ez a megfigyelésünk harmóniában áll azzal a mások által korábban publikált eredménnyel, mely szerint az elhaló timocitákban kaspázfüggő módon termelődő „találj meg” jel, név szerint a szfingozin-1-foszfát (Hait és mtsai., 2006), nem csak a makrofágok migrációját szabályozza, hanem szerepet játszik a HO-1 expresszió növelésében is p38 MAPK-függő módon (Weis és mtsai., 2009).

7.2.3. A BACH1 szerepet játszhat a HO-1 upregulációjában az apoptotikus timociták és az eriptotikus vörösvértestek esetében is

Ha csak a hem játszik szerepet a makrofágok HO-1 fokozódásában az eriptotikus vörösvértestek felvételét követően, akkor ez a szabályozás teljesen meg kellene szűnjön a BACH1 hiányában, mivel ismert, hogy a hem a BACH1 transzkripció represszorán keresztül szabályozza a HO-1 expresszióját (Ogawa és mtsai., 2001). Úgy tűnik, hogy a BACH1-nek nagyon erős szuppresszív hatása van a HO-1 alap expressziójára a makrofágokban, ugyanis a nem kezelt BACH1 hiányos makrofágokban is szignifikánsan emelkedett HO-1 expressziót detektáltunk mRNS és fehérje szinten is (12D és 12E ábra), összehasonlítva a vad típusú kontrollokkal. Ahogyan azt feltételeztük, az eriptotikus vörösvértestek jelenléte nem indukálta tovább ezt az emelkedett HO-1 szintet (12D és 12E ábra). Meglepő módon, azonban ugyanezt tapasztaltuk az apoptotikus timociták felvétele során is. Úgy gondoljuk, a két transzkripció faktor, az Nrf2 és a BACH1 közötti versengés szabályozhatja a HO-1 expresszióját, ami valószínűleg egy fontos eleme ennek a szabályozásnak, mert ha a negatív szabályozó hiányzik, akkor a transzkripció maximálisan aktivált. Alternatív módon mindkét, akár az elhaló vörösvértestek, akár az elhaló timociták által indukált jelátviteli útvonal célpontja lehet a

BACH1. Összességében ezek az adatok azt mutatják, hogy az eriptotikus vörösvértestek a felvételüket követően indukálják a HO-1-et a makrofágokban a hemtartalmukon keresztül, míg az apoptotikus timociták szolubilis jeleket használnak, és mindkét jelátviteli útvonal célpontja lehet a BACH1 transzkripciós faktor.



12. ábra: Fagocitáló makrofágokban a HO-1 expresszió BACH1-függő, indukciója az eriptotikus vörösvértestek fagocitózisa során sejtfelvétel-függő, míg az apoptotikus timociták felvétele esetében szolubilis jelek kellenek hozzá. (A) A fagocitózis kezdése előtt 30 perccel adott aktin polimerizációt blokkoló 5 μ M citokalazin-D (Cyto.D) hatása. az egy órás fagocitózis során, mindkét típusú elhalt sejt makrofágok általi felvétele során. Az ábra az átlag fluoreszcencia intenzitást mutatja a makrofág populációkon belül. (B) RT-qPCR segítségével meghatározott HO-1 mRNS expresszió az apoptotikus timocitákat vagy eriptotikus

vörösvértesteket felvevő makrofágokban 5 μ M citokalazin-D jelenlétében vagy hiányában. Normalizáló génként ciklofilin A-t használtunk. (C) HO-1 mRNS expresszió indukciója makrofágokban, melyek 20 μ M Z-VAD-FMK jelenlétében (snZ-VADb) vagy hiányában (sn), 24 órás széruméheztetés során elhaló timocitákról összegyűjtött felülúszónak lettek kitéve. A Z-VAD-FMK célsejtjeinek detektálásához a Z-VAD-FMK-t direkt módon is alkalmaztuk Z-VAD-FMK hiányában generált felülúszóval együtt (sn-VADa). A mRNS expressziót 6 órával a felülúszók adását követően határoztuk meg RT-qPCR technikával, normalizáló génként ciklofilin A-t használva. (D) HO-1 mRNS expresszió indukciója BACH1^{+/+} és BACH1^{-/-} makrofágokban apoptotikus timociták vagy eriptotikus vörösvértestek jelenlétében. A mRNS expresszió meghatározásához RT-qPCR technikát használtunk, a normalizáló gén ciklofilin A volt. Az eredményt BACH1^{+/+} makrofágok alap HO-1 mRNS expressziójához hasonlítva adtuk meg. (E) HO-1 fehérje expresszió indukciója BACH1^{+/+} és BACH1^{-/-} makrofágokban apoptotikus timociták vagy eriptotikus vörösvértestek jelenlétében. A fehérje szinteket Western blot technikával állapítottuk meg és a felvitt fehérjemennyiség kontrolljaként β -aktint használtunk. Egy reprezentatív Western blotot mutatok be. Az eredményeket BACH1^{+/+} makrofágok alap HO-1 fehérje szintjéhez hasonlítva adtuk meg. Az eredményeket átlag $\pm$ SD értéként tüntettük fel (n=3), továbbá csillagok jelzik a statisztikailag szignifikáns különbségeket: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

7.2.4. Az efferocitózis során felszabaduló adenzin, illetve az adenilát cikláz út általában nem játszik szerepet a HO-1 kifejeződésének indukálásában az elhalt sejteket bekebelező makrofágokban

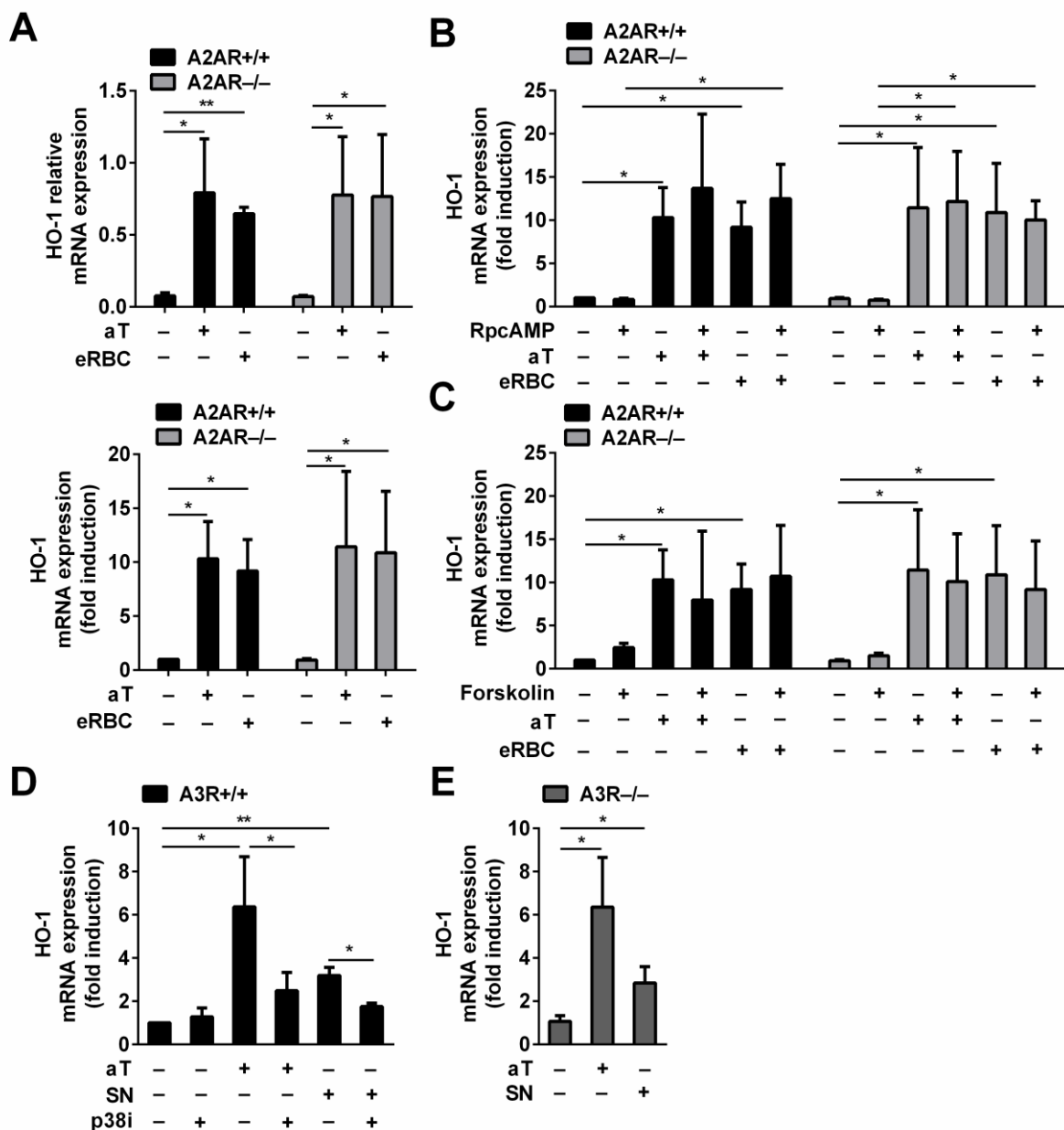
Többek között Immenschuh és munkatársainak tanulmánya azt sugallta, hogy az adenilát cikláz útvonalnak szerepe lehet a HO-1 expresszió szabályozásában (Immenschuh és mtsai., 2002), így azt kezdtük el vizsgálni, hogy a jól ismert szfingozin-1-foszfát mellett (Weis és mtsai., 2009) lehet-e az efferocitózis során szintén megjelenő adenzin is (Sándor és mtsai., 2017) a HO-1 kifejeződést szabályozó szolubilis szignál fagocitáló makrofágok számára. Hogy megválaszoljuk ezt a kérdést, vad típusú és A_{2A} receptor hiányos makrofágokhoz adtunk apoptotikus timocitákat vagy eriptotikus vörösvértesteket, és meghatároztuk a HO-1 expresszióját. Ahogyan az a 13A ábrán látható, az A_{2A}R hiánya nem befolyásolta a makrofágok alap HO-1 szintjét. Továbbá, az A_{2A}R-ok hiánya nem volt hatással sem az

apoptotikus timociták, sem az eriptotikus vörösvértestek által indukált HO-1 mRNS szintre, ami arra utal, hogy az adenosin nem járul hozzá az elhalt sejtek által indukált HO-1 expresszió fokozódásához.

Ezután tanulmányoztuk, hogy az adenilát cikláz útvonal hozzájárul-e a HO-1 expresszió indukálásához az efferocitózis közben. Ehhez teszteltük az RpcAMP, ami cAMP kompetitív gátlószer (Van Haastert és mtsai., 1984), hatását az elhalt sejtek által indukált HO-1 expresszióra. A 13B ábrán látható, hogy az RpcAMP jelenléte nincs hatással sem az alap, sem az indukált HO-1 expresszióra a csontvelői eredetű makrofágokban, melyek vagy apoptotikus timocitát vagy eriptotikus vörösvértestet vettek fel, az A2AR-ok expressziójától függetlenül. Ez az eredmény azt jelenti, hogy nem jön létre más szolubilis szignál az efferocitózis során, ami hozzájárulhatna a HO-1 expresszió aktiválásához az adenilát cikláz útvonalon keresztül.

Végül tanulmányoztuk, hogy az adenilát cikláz útvonalnak van-e bármilyen hatása a HO-1 expresszióra a BMDM-okban, ha forskolin, egy erős adenilát cikláz aktivátor (Seamon és mtsai., 1981) is jelen van. A forskolin önmagában vagy az apoptotikus sejtek felvétele közben adva sem növelte a HO-1 expressziót, ami arra utal, hogy az irodalmi eredményekkel szemben az adenilát cikláz útvonal egyáltalán nem járul hozzá a HO-1 expresszió szabályozásához a csontvelői eredetű makrofágok elhalt sejtek eltakarítása során (13C ábra).

Az adenilát cikláz útvonal gátlása mellett az A₃ receptorok aktiválhatják a p38 MAPK jelátviteli útvonalat is sejttípus függő módon (Hammarberg és mtsai., 2004). Mivel korábbi tanulmányok szerint a szfingozin-1-foszfát és a p38 MAPK útvonal is részt vesz a folyamatban az apoptotikus timocitákról származó felülúszó esetén (Weis és mtsai., 2009), így vizsgáltuk, hogy az apoptotikus felülúszó által indukált HO-1 expresszióban szerepet játszanak-e az A₃ receptorok. A 13D ábrán látható, hogy a p38 MAPK útvonal gátlása szinte teljesen megakadályozta a HO-1 indukcióját a makrofágokban mind az apoptotikus timociták, mind az elhaló timocitákról származó felülúszó jelenlétében. Ez az eredmény megerősíti, hogy a p38 MAPK útvonal szerepet játszik az apoptotikus timociták által indukált HO-1 expresszióban, továbbá a résztvevő szolubilis jel egy olyan szignál, ami a p38 MAPK útvonalon keresztül hat. Azonban az A₃ receptorok hiánya A3R hiányos makrofágok fagocitózisát vizsgálva nem volt hatással a HO-1 indukációjára sem az apoptotikus timociták, sem a róluk származó felülúszó esetében (13E ábra). A p38 MAPK útvonal gátlása vagy az A3R-ok hiánya sem volt hatással a HO-1 kifejeződésére az eriptotikus vörösvértestek felvétele során sem (az eredményt nem mutatom be). Eredményeink összességében azt mutatják, hogy az adenosin nem vesz részt a fagocitáló makrofágok HO-1 indukálásában.



13. ábra: Az adenozin nem vesz részt a HO-1 expresszió indukálásában az apoptotikus sejteket felvevő csontvelői eredetű makrofágokban. (A) HO-1 mRNS expresszió A2AR^{-/-} és A2AR^{+/+} makrofágokban, apoptotikus timocitákkal vagy eriptotikus vörösvértestekkel történő 6 órás inkubációt követően. A fenti ábra a relatív génexpressziót mutatja, míg az alsó ábra fold értékeket prezentál. (B) HO-1 mRNS expresszió A2AR^{+/+} és A2AR^{-/-} makrofágokban 100 μ M RpcAMP (kompetitív cAMP gátlószer) jelenlétében, 6 órával az apoptotikus timociták vagy eriptotikus vörösvértestek adását követően. (C) A2AR^{+/+} és A2AR^{-/-} makrofágokban mért HO-1 mRNS expresszió adenilát cikláz aktivátor forskolin (10 μ M) jelenlétében, 6 órával az apoptotikus timociták vagy eriptotikus vörösvértestek adását követően. Mindegyik sejt kultúra 0,1 v/v% DMSO-t is tartalmazott, ami az aktivátor oldószere. (D) 6 órával az apoptotikus

*timociták és a róluk származó felülűszó (SN) adása után mért HO-1 mRNS expresszió 10 μ M SB203580 (p38 MAPK inhibitor) jelenléte mellett A3R^{+/+} makrofágokban. Mindegyik sejtkultúra tartalmazott 0,1 v/v% DMSO-t is, ami a gátlószer oldószere volt. (E) A3^{-/-} makrofágokban detektált HO-1 mRNS expresszió apoptotikus timocitákkal vagy a róluk származó felülűszóval történő 6 órás inkubálás után. Az mRNS expressziót RT-qPCR segítségével határoztuk meg, normalizáló génként ciklofilin A-t használva. Az eredményeket nem fagocitáló A2AR^{+/+} vagy A3R^{+/+} makrofágokhoz hasonlítva adtuk meg, és átlag $\pm$ SD értékként tüntettük fel (n=3). Csillagokkal jelöltük a statisztikailag szignifikáns eltéréseket: *p<0,05, **p<0,01.*

7.2.5. Hosszútávú fagocitózis során a HO-1 aktivitás hiánya csökkent fagocitózis kapacitást eredményez az elhalt vörösvértesteket felvevő makrofágokban

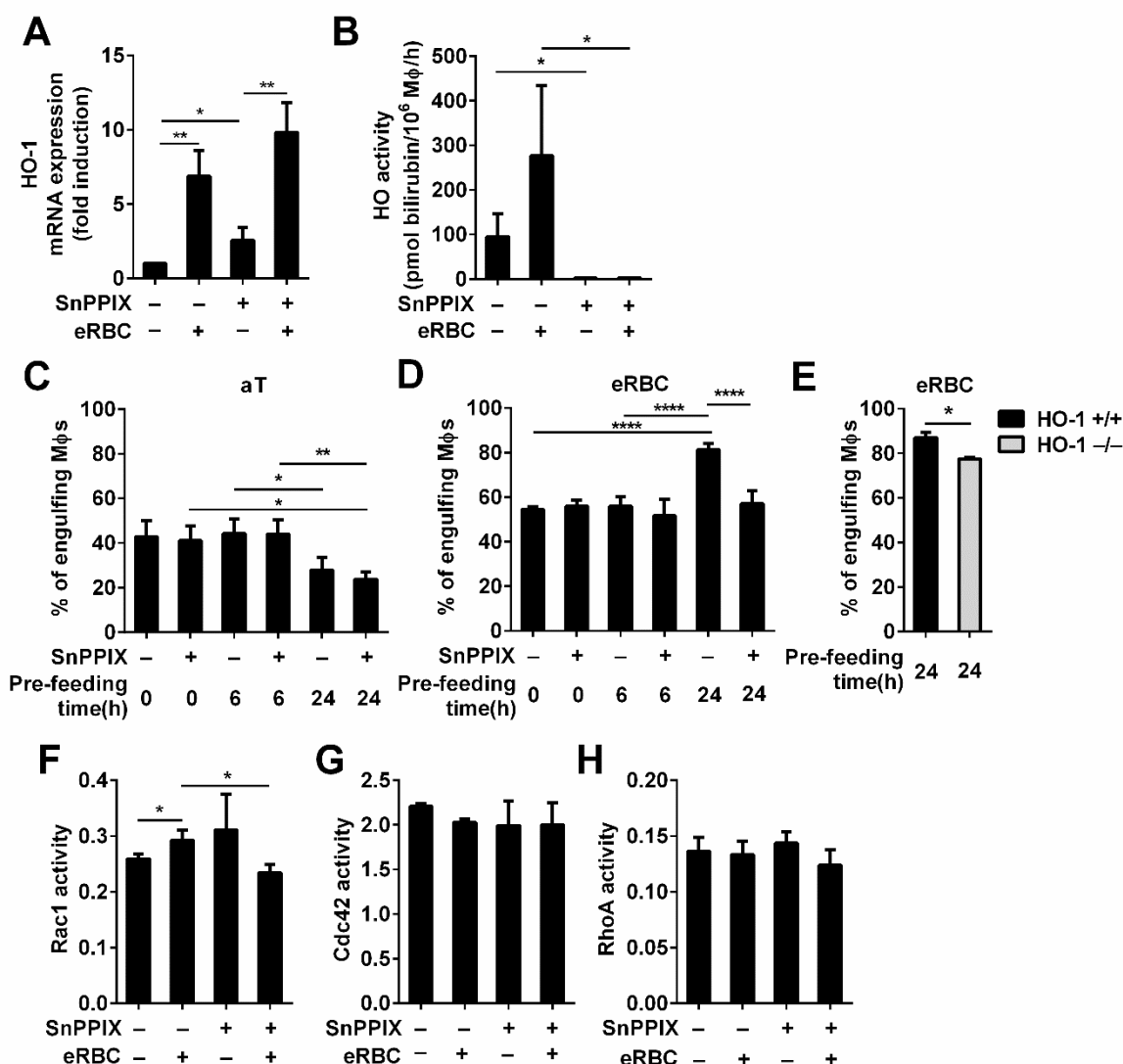
A továbbiakban vizsgáltuk, hogy a HO aktivitás elvesztése hatással van-e az apoptotikus sejtek fagocitózisára. Ehhez a makrofágok előkezelése során gátoltuk a HO-1 és HO-2 aktivitást SnPPIX gátlószerrel (Drummond és mtsai., 1981). Egy korábbi tanulmánnyal összhangban (Mucha és mtsai., 2018), az SnPPIX HO-1 mRNS expresszió növekedést idézett elő a fagocitáló és a nem fagocitáló makrofágoknál is (14A ábra). Ezután azt teszteltük, hogy az alkalmazott gátlószer koncentráció elegendő-e a szuperindukált HO aktivitás gátlásához az eriptotikus vörösvértesteknek kitett makrofágokban. Ahogyan az a 14B ábrán látható, az általunk használt 20 μ M-os koncentráció hatékonyan gátolta a HO aktivitást.

Mindkét típusú elhalt sejt esetében vizsgáltuk a fagocitózist egyrészt azonnal az elhalt sejtek makrofágokhoz adását követően (rövidtávú fagocitózis), másrészt 6 órás folyamatos fagocitózist követően (középtávú fagocitózis), harmadrészt pedig 24 órás folyamatos fagocitózist követően (hosszútávú fagocitózis). A 14C ábrán látható, hogy bár mindkét HO aktivitást gátoltuk, az apoptotikus timocitákat felvevő makrofágok fagocitáló képességére hosszú távon nem volt hatással az SnPPIX. Azonban ugyanakkora időtartalmú fagocitózisnál az SnPPIX képes volt a magas hemtartalmú eriptotikus vörösvértesteket felvevő makrofágok fagocitáló képességét gátolni (14D ábra). Az SnPPIX nem csak az eriptotikus vörösvértesteket felvevő makrofágok százalékos arányát csökkentette, hanem a középérték fluoreszcencia is lecsökkent 75,7 $\pm$ 11,9-ről 44,8 $\pm$ 8,1-re (p<0,01), ami arra utal, hogy kevesebb makrofág vett fel kevesebb elhalt vörösvértestet. Az annexin V-fluoreszcein izotiocianáttal és propídium jodiddal

végzett festési kísérletek azt mutatták, hogy ez a csökkenés nem hozható összefüggésbe a fagocitáló makrofágok életképességének csökkenésével (az életképesség 95% körüli volt mindegyik sejt kultúrában), továbbá ezt támasztja alá a HO-1 hiányos makrofágokkal végzett hosszútávú fagocitózis vizsgálat is (14E ábra). Ezen eredmények alapján elmondható, hogy a megfigyelt csökkenés nem az alkalmazott gátlószer mellékhatásának következménye.

Az elhalt sejtek fagocitózisában rengeteg fagocita receptor játszik szerepet (Arandjelovic és mtsai., 2015). Számos jel, ami hatással van az efferocitózisra, szabályozza a fagocita receptorok expresszióját a makrofágokban. Így vizsgáltuk, hogy az elhalt vörösvértestek felvétele HO-1 aktivitás gátlása mellett milyen hatással van ezen gének expressziójára. Azonban meglepő módon nem tapasztaltunk változást a tesztelt kulcsfontosságú fagocita receptorok és ún. bridging molekulák (Tim4, TG2, MerTK, integrin $\beta 3/\beta 5$, stabilin 2, CD14, MFG-E8, CD36, trombospondin) mRNS expressziójában 24 órás elhalt vörösvértest fagocitózist követően (az adatokat nem mutatom be). Tehát a HO aktivitás hiánya feltehetően más mechanizmuson keresztül gátolja az efferocitózist.

A hatékony efferocitózis elérése érdekében, a fagocita receptorok által elindított jelátviteli útvonalak számos kis G fehérjén keresztül szabályozzák a citoszkeletáris váz átrendeződését. A Rac1 és Cdc42 aktivációja szükséges az efferocitózishoz (Kinchin és mtsai., 2005; Leverrier és mtsai., 2001), míg a RhoA aktivációja gátló hatású (Tosello-Tramont és mtsai., 2003). Később, Forster rezonancia energia transzfer bioszenzorokat használva kimutatták, hogy ezek a kis G fehérjék időben szabályozott módon működnek, azaz a Rac1 és a Cdc42 korán aktiválódik, hogy elősegítsék a fagocita csésze képződését az aktin polimerizáción keresztül, majd ezt követően a RhoA is aktiválódik, amelynek a mechanikus visszahúzódásban és a fagoszóma internalizációjában van fontos szerepe (Nakaya és mtsai., 2008). Ezért úgy döntöttünk, megvizsgáljuk ezen három G fehérje általános aktivitását 24 órás eriptotikus vörösvértest fagocitózist követően vad típusú makrofágokban SnPPIX gátlószer hiányában és jelenlétében egyaránt. A 14F-H ábrákon látható, hogy növekedett Rac1 aktivációt detektáltunk, azonban nem volt változás az aktivált RhoA és Cdc42 mennyiségében a 24 órás elhalt vörösvértest efferocitózist követően. A gátlószer önmagában nem volt hatással ezen G fehérjék aktivitására. Azonban az inhibitor gátolta a fagocitózis által indukált Rac1 aktivációt.



14. ábra: Az elhalt vörösvértesteket felvevő makrofágok fagocitáló képességére hosszútávon hatással van a HO-1 aktivitás hiánya, míg az apoptotikus timocitákat bekebelező makrofágoknál ez nem figyelhető meg. (A) 6 órás, 20 μ M-os SnPPIX (HO gátlószer) kezelést követően mért HO-1 mRNS expresszió eriptotikus vörösvértesteket felvevő makrofágokban. Az mRNS expressziót RT-qPCR-rel határoztuk meg és normalizáló génként ciklofilin A-t használtunk. Az eredményeket nem kezelt makrofágokhoz viszonyítva adtuk meg. (B) A makrofágokban mért HO aktivitás 6 órával az eriptotikus vörösvértestek adását követően, 20 μ M-os SnPPIX gátlószer jelenléte mellett. (C) Az apoptotikus timocitákat bekebelező makrofágok fagocitáló képessége 0, 6 és 24 órás folyamatos fagocitózist követően 20 μ M SnPPIX jelenlétében és hiányában. (D) Eriptotikus vörösvértesteket felvevő makrofágok fagocitáló képessége 0, 6 és 24 órás folyamatos fagocitózist követően 20 μ M SnPPIX jelenléte és hiánya mellett. (E) Eriptotikus vörösvértesteket bekebelező HO-1^{+/+} és HO-1^{-/-} makrofágok fagocitáló képessége 24 órás folyamatos fagocitózis után. (F) Rac1, (G) Cdc42, és (H) RhoA

aktivitás az elhalt vörösvértesteket 24 óráig fagocitáló makrofágokban, 20 μ M SnPPIX jelenlétében vagy hiányában. Az aktivitást Rac1, Cdc42 és RhoA G-LISA aktivációs assay kitékkel határoztuk meg. A nem kezelt kontroll kultúrák minden esetben tartalmaztak 0,26 mM NaOH-t (pH 7,0), az SnPPIX oldószerét. Az eredményeket átlag $\pm$ SD értékként tüntettük fel ($n=3$, kivéve D, ahol $n=7$). A statisztikailag szignifikáns változásokat csillagokkal jelöltük: * $p<0,05$, ** $p<0,01$, **** $p<0,0001$.

7.2.6. Az apoptotikus sejtfelvétel gátolja a makrofágok alapgyulladásí citokin termelését, míg HO-1 hiányában a gyulladásí citokinek termelése nőtt vagy nem változott

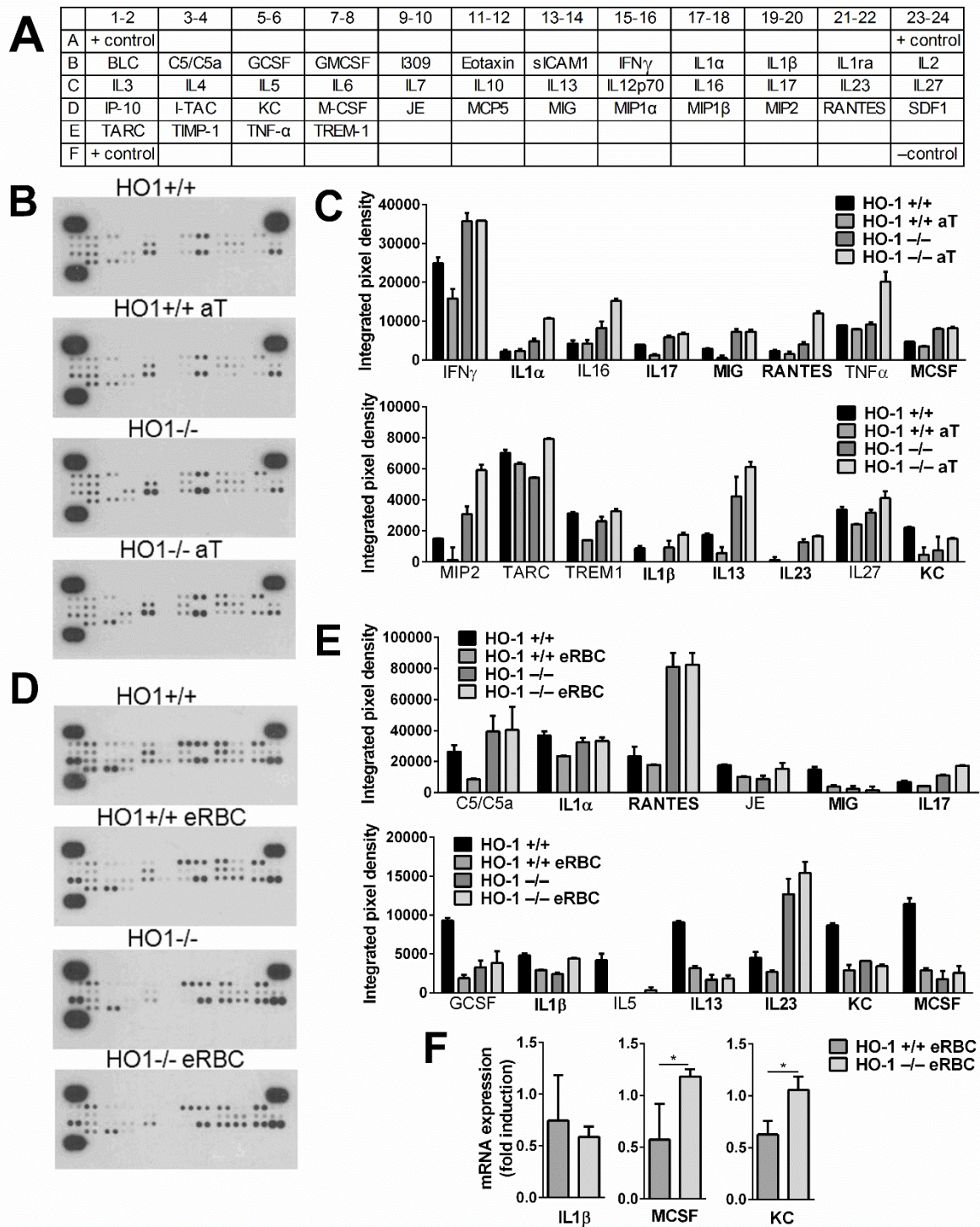
A fagocitózísnak rengeteg különbözı célsejtje lehet, például baktériummal vagy vírussal fertőzött sejtek, melyek a makrofágokban gyulladásos választ generálnak, beleértve a makrofágok által termelt gyulladásí citokin termelést, azonban az elhalt sejtek felvétele a makrofágokban gyulladáscsökkentő, ún. „anti-inflammatórikus” fenotípust eredményez. Az elhalt sejtek nem csak hogy nem segítik elő a gyulladást, hanem aktívan elnyomják a gyulladásos programot (Szondy és mtsai., 2017). Több tanulmány is azt feltételezi, hogy a HO-1-nek gyulladáscsökkentő szerepe is lehet (Vijayan és mtsai., 2018; Ryter és mtsai., 2006 és 2016; Pae és mtsai., 2009), ezért vizsgáltuk, hogy a HO-1 kifejeződésének fokozódása hozzájárul-e az elhalt sejtek által indukált gyulladáscsökkentő programhoz. Ehhez a kísérlethez vad típusú és HO-1 hiányos makrofágok gyulladásí citokin termelését vizsgáltuk elhalt timociták és vörösvértestek jelenlétében. Sajnos a 14A ábrán látható HO-1 indukció következtében nem tudtuk megismételni a kísérleteket SnPPIX jelenlétében, hogy megvizsgáljuk a HO-1 aktivitás hiányának hatását is, mert nem lehet elkülöníteni a HO-1 aktivitás hiányát a HO-1 fehérje indukció hatásától.

A makrofágok citokin szekréciós profiljának kiértékelése rendkívül érzékeny citokin antitest array módszerrel történt, amely lehetővé teszi több, alacsony koncentrációjú citokin egyidejű kimutatását egy vizsgálatban (pg/ml tartomány). Az általunk használt citokin array 40féle citokint képes kimutatni, és a térképe az 15A ábrán látható. Először a kezeletlen vad típusú és HO-1 hiányos makrofágokban keletkező, majd felszabaduló citokineket vizsgáltuk *in vitro*. A 15B-E ábrákon bemutatott adatoknál látszik, hogy a nem fagocitáló makrofágoknál is kimutatható volt a legtöbb citokin, bár néhány esetben nagyon alacsony szinten. A HO-1 hiánya nem befolyásolta szignifikánsan a felszabaduló citokinek összetételét, ugyanakkor nagy egyéni

eltéréseket tapasztaltunk a gyulladást elősegítő citokinek mennyiségében, a különböző egerekből származó HO-1^{+/+} és HO-1^{-/-} makrofágok esetében. Azonban, ahogyan a 15C és 15E összefoglaló ábrákon látható, apoptotikus timociták vagy eriptotikus vörösvértestek jelenlétében néhány citokin mennyisége nőtt, vagy változatlan maradt a HO-1 hiányos makrofágok esetében, összehasonlítva a megfelelő vad típusú makrofágok citokin termelésével. Félkövér jelöléssel emeltük ki azt a 9 db (IL-1 α és β , IL-17, MIG, RANTES, M-CSF, IL-13, IL-23 és KC) gyulladást keltő citokint, melyekre hatással volt a HO-1 hiánya mindkét típusú elhalt sejt fagocitózisa során. Érdekes módon azt találtuk, hogy az IL-1R antagonistá hasonló módon reagál, nemcsak ebben a tanulmányban, hanem egy korábbi tanulmányban is (Köröskényi és mtsai., 2011). Ez összhangban van azzal a megfigyeléssel, hogy az IL1 termelése és aktivitása külön szabályozott, továbbá a veleszületett memória is hatással lehet az IL-1 hatásra (Madei és mtsai., 2017).

Hogy megerősítsük az eredményeinket, kiválasztottunk hármat ezek közül a citokinek közül, melyek mRNS szintjét is meghatároztuk ugyanazokban a makrofágokban, melyekről összegyűjtöttük a felülúszót. Mivel az egyéni különbségek nemcsak a citokin termelésben, hanem a mRNS szintekben is megmutatkoznak, ezért az eriptotikus vörösvértesteket fagocitáló HO-1^{+/+} és HO-1^{-/-} makrofágokban bekövetkező változásokat fold expresszióban adtuk meg. A 15F ábrán látható, hogy az M-CSF és KC mRNS szintje is megemelkedett az eriptotikus vörösvértesteknek kitett makrofágokban HO-1 hiányában. Ugyanakkor az IL-1 β esetében ezt nem tudtuk kimutatni. Az IL-1 β fehérje szintjét azonban erősen meghatározza a kaszpáz-1 aktiváció mértéke, és a HO-1-ről kimutatták, hogy gyengíti a pirin domain 3-at tartalmazó NOD-szerű receptorok (NLRP3) inflammaszóma aktivitását (Vitali és mtsai., 2020).

Összességében az adataink arra utalnak, hogy a HO-1 indukálása hozzájárulhat az elhalt sejteket felvevő makrofágok gyulladásgátló hatásához.



15. ábra: A HO-1 hiánya megváltoztatja az apoptotikus sejtfevétel gyulladáságtoló hatását az efferocitózis során. (A) A membránokon detektált 40 féle citokin térképe. (B) A kontroll és az apoptotikus timocitákkal együtt inkubált HO-1^{+/+} és HO-1^{-/-} makrofágok citokin panelei. A makrofágokat 6 órán keresztül inkubáltuk apoptotikus timociták jelenlétében vagy hiányában, majd ezt követően az elhalt sejteket eltávolítottuk és friss médiumot adtunk a BMDM-okhoz. 18 órával később összegyűjtöttük a felülúszót, amit citokin array segítségével vizsgáltunk. (C)

*Gyulladáskeltő citokinek, amelyek szintjét elnyomta az apoptotikus timociták felvétele a HO-1^{+/+}, de nem a HO-1^{-/-} makrofágokban. (D) A kontroll és az eriptotikus vörösvértestekkel együtt inkubált HO-1^{+/+} és HO-1^{-/-} makrofágok citokin paneljei. A makrofágokat 6 órán keresztül inkubáltuk eriptotikus vörösvértestek jelenlétében vagy hiányában, majd eltávolítottuk az elhalt sejteket és friss médiumot adtunk a makrofágokhoz. A felülúszót 18 órával később összegyűjtöttük, és citokin array segítségével analizáltuk. (E) Gyulladáskeltő citokinek, amelyek szintjét elnyomta az eriptotikus vörösvértestek jelenléte a HO-1^{+/+}, de nem a HO-1^{-/-} makrofágokban. Félkövér jelöléssel láttuk el azokat a citokineket, melyek hasonlóan viselkedtek az apoptotikus timociták és az eriptotikus vörösvértestek felvétele közben. A három, különböző időpontokban elvégzett kísérletből egy reprezentatív eredmény látható. (F) Az IL-1 β , M-CSF és KC mRNS expresszió változása 6 órás eriptotikus vörösvértest felvételt követően HO-1^{+/+} és HO-1^{-/-} makrofágokban, 24 órával a fagocitózis kezdete után. Az mRNS szintet RT-qPCR segítségével határoztuk meg, normalizáló génként ciklofilin A-t használva. Az eredményeket átlag $\pm$ SD értéként tüntettük fel (n=3). Csillag jelzi a statisztikailag szignifikáns különbséget: *p<0,05.*

8. MEGBESZÉLÉS

Egészséges körülmények között a makrofágoknak két fő szerepe van az elhalt sejtek eltakarítása során: (1) felveszik, majd lebontják az elhalt sejteket úgy, hogy (2) közben nem idéznek elő gyulladást. Disszertációm alapját az a laboratóriumunkban korábban végzett tanulmány szolgáltatta, melyben kollégáim azt találták, hogy a DHR jelenléte az egér csontvelői eredetű makrofágok érésének utolsó két napjában növeli a létrejövő BMDM-ok fagocitózis kapacitását (Sarang és mtsai., 2019), de a retinsav hatásának kitett, érett makrofágokhoz képest más efferocitózishoz köthető génekre hat (Sarang és mtsai., 2014). Ezért azt feltételeztük, hogy a DHR más jelátviteli útvonalon keresztül hathat a makrofágok differenciálódása közben, mint a retinsav a már érett BMDM-okban az efferocitózis elősegítésében. A disszertációmban bemutatott adatok azonban azt mutatják, hogy a DHR ugyanazon a jelátviteli útvonalon keresztül hat, mint a ROL és az ATRA által mediált RAR-ok, de más gének érzékenyek a retinoid kezelésre a differenciálódás közben, mint a már érett makrofágokban. Érdekes módon azonban a ROL vagy DHR retinsavvá való átalakulásának gátlása nem akadályozta meg a génexpresszióra, vagy az efferocitózisra gyakorolt hatásukat, ami arra utal, hogy a ROL és a DHR közvetlenül aktiválhatja a RAR-okat a differenciálódó makrofágokban anélkül, hogy releváns retinsavakká alakulnának át (Repa és mtsai., 1993). Adataink azt bizonyítják, hogy a ROL és a DHR a RAR receptorokon keresztül hat, de a retinoidok fagocitózis receptorok génexpressziójára gyakorolt hatását nem feltétlenül kell, hogy a RAR-ok közvetlen transzkripciós aktivitása közvetítse. Köztudott, hogy a transzkripció elősegítése mellett az ATRA-hoz kötött RAR-ok az AP1 transzrepresszióját is kiválthatják (Chen és mtsai., 1995), és kollégáim is kimutatták, hogy a RAR-ok képesek elősegíteni a glükokortikoid receptor transzkripciós aktivitását, közvetlen receptor/receptor kölcsönhatáson keresztül, a DNS-kötés szükségessége nélkül (Tóth és mtsai., 2011). Egyes szintetikus retinoid receptor antagonisták megkülönböztethetik ezeket a biológiai aktivitásokat, mivel az ATRA-hoz kötött receptor különböző részei vesznek részt ezekben az aktivitásokban, és a szintetikus antagonistá retinoidok nem feltétlenül versenyeznek mindegyikkel (Tóth és mtsai., 2011; Repa és mtsai., 1993). Ezenkívül a retinoid-kötött RAR-oknak akár nem-genomikus hatásai is lehetnek, amelyek közvetve befolyásolják a transzkripciót (Unsworth és mtsai., 2018).

A retinoid jelátvitel két mediátorát azonosítottuk differenciálódó makrofágokban, a BMP-2-t és a Smad3-at, amelyek hozzájárulnak a megfigyelt efferocitózis kapacitás növekedéséhez. Mind a BMP-2, mind a Smad3 direkt RAR-szabályozott célgénnek bizonyult (Ross és mtsai., 2007; Zou és mtsai., 2021), és adataink alapján sem a retinoid-indukált BMP-2, sem a

differentiálódáshoz kapcsolódó TGF- β 1 jelátvitel nem járul hozzá a Smad3 retinoidok általi upregulációjához. A BMP-2 általában a Smad 1/5/8 és talán 9 transzkripció faktorokon keresztül hat (Holtzhausen és mtsai., 2014). Ezen túlmenően azonban azt találták, hogy differentiálódó sejtekben a BMP-2 egy nem kanonikus útvonalon keresztül is hat, mely magában foglalja a BMP-2/TGF- β 1 receptor heterodimereket és a Smad3-at (Holtzhausen és mtsai., 2014). Bár ezt a lehetőséget nem vizsgáltuk részletesen, eredményeink alapján nem zárhatjuk ki, hogy a retinoidok nemcsak a BMP-2 és TGF- β révén, hanem egy BMP-2/BMP-2 és TGF- β 1 heterodimer receptor/ Smad3-függő módon is elősegíthetik az efferocitózist a differentiálódó makrofágokban.

A monociták csontvelőből származó immunsejtek, amelyek körülbelül 2 napig keringenek, mielőtt távoznak a keringésből. A keringő monociták kórokozókat keresnek, és reagálnak a fagocita funkcióik ellátásához szükséges gyulladásos jelekre, vagy a monociták különböző szövetekbe vándorolnak, ahol makrofágokká alakulnak. A létrejövő makrofágok nem alkotnak egységes sejtpopulációt, és jelentős mértékű a heterogenitás, amit az immunkörnyezet határoz meg (Li és mtsai., 2020). Egerekben az efferocitózist követően létrejövő monocita eredetű makrofágokat klasszikusan két csoportba sorolják: a gyulladást elősegítő M1, és a gyulladást gátló M2 makrofág csoportokba. Az M2 makrofágok további csoportokra oszthatóak, melyek részt vesznek a gyulladás megszüntetésében, az antigénprezentációban és a szövetek helyreállításában (Li és mtsai., 2020). Utóbbiakról ismert, hogy növekedési faktorokat és pro-angiogén szövetjavító faktorokat szabadítanak fel, mint amilyen a VEGFA, a növekedési differenciációs faktor 3 (GDF3), vagy az inzulinszerű növekedési faktor-1 (IGF-1) (Li és mtsai., 2020).

In vivo a monociták makrofágokká történő differentiálódását az endotél gáton keresztüli migráció váltja ki (Francke és mtsai., 2011). *In vitro* BMDM differenciálódás esetén a monocita és makrofág differenciálódási szakaszok nem különíthetők el egyértelműen. Ez a különbség nagy valószínűséggel összefügg azzal a ténnyel, hogy a BMDM differenciálódás egy adherencia által közvetítettérés, mivel ennek a tapadásnak a gátlása monocita képződést eredményez (Francke és mtsai., 2011). Így a BMDM differenciálódás csak részben utánozza az *in vivo* monocita eredetű makrofág differenciálódási folyamatot, mintegy átugorva a monocitaérés egy lépését (Zajd és mtsai., 2020).

A csontvelőből származó monociták gyakran jelennek meg, és differenciálódnak makrofágokká azokban a szövetekben, ahol megnövekedett sejtelhalás következik be, például vázizom-sérülések során (Szondy és mtsai., 2022) vagy zsírban gazdag étrend által indukált zsírsejt elhalás során (Cinti és mtsai., 2005). Így a retinoidok által kiváltott efferocitózis

kapacitás növekedés hozzájárul az elhalt sejtek hatékony eltávolításához ezekben a szövetekben, megelőzve ezzel a krónikus gyulladást és az autoimmun betegségek kialakulását (Szondy és mtsai., 2014). Ezenkívül a Smad3 a TGF- β gyulladáscsökkentő hatásának meghatározó közvetítője (Werner és mtsai., 2000), amelyről ismert, hogy az efferocitózis során a bekebelezést végző makrofágok által szabadul fel (Fadok és mtsai., 1998).

A retinoidok által fokozott D-vitamin receptor vagy a VEGFA expresszió a monocita-makrofág differenciálódás során azt is jelzi, hogy a retinoidok elősegítik olyan M2-típusú makrofágok képződését, amelyek részt vesznek a szövetek helyreállításának szabályozásában. A retinoid hozzáadása után 48 órával észlelt TG2 vagy ALDH1a2 fokozódása szintén ezt a nézetet támasztja alá (He és mtsai., 2021). Továbbá nemrég mutatták be egy infarktusz szívizom modellben a Smad3 szerepét a makrofágok szövetjavító válaszainak közvetítésében (Chen és mtsai., 2022).

Megfigyeléseinkkel összhangban, a differenciálódó monociták egérdaganatból felszabaduló ATRA általi M2 polarizációját figyelték meg a tumor környezetében, ahol a létrejövő tumor-asszociált M2-szerű makrofágok immunszuppressziót közvetítettek és elősegítették a tumor növekedését (Devalaraja és mtsai., 2020). Azt is megállapították, hogy az ATRA elősegíti a differenciálódó monociták M2 polarizációját az *L. major* fertőzés során is egerekben (Vellozo és mtsai., 2017). Összességében adataink további bizonyítékot szolgáltatnak arra, hogy a makrofágok differenciálódása során ható retinoidok elősegítik az M2-szerű, immunszuppresszív, pro-reparatív makrofágok képződését, és elsőként mutattuk be, hogy a retinoidok hatását részben a BMP-2 és a Smad3 közvetítik.

Miközben kollégáim a RetSat hiányos egerek csontvelőjéből differenciáltatott makrofágokkal dolgoztak, azt vették észre, hogy ezen makrofágok hosszútávú fagocitózisa zavart szenved (Sarang és mtsai., 2019). A defektus okának feltárásához RetSat^{+/+} és RetSat^{-/-} csontvelői eredetű makrofágokon RNS szekvenálást végeztek. Az adatok elemzése során azt találták, hogy az alacsony hemtartalmú elhalt timocitákat felvevő makrofágokban a hem degradációjáért felelős HO-1 enzim jelentős mértékben indukálódott, így kutatómunkám második felében arra a kérdésre kerestem a választ, hogy vajon miért expresszálódik a HO-1 ekkora mértékben, illetve van-e esetleg más szerepe is a HO-1-nek az efferocitózisban. A kísérletekben kétféle elhalt sejtípust használtam, a már említett alacsony hemtartalmú apoptotikus timociták mellett a magas hemtartalmú eritrotikus vörösvértesteket.

Összességében az eredményeink ezen a területen azt mutatják, hogy az elhalt sejtek fokozzák a HO-1 kifejeződését a makrofágokban: az apoptotikus timociták olyan, oldható szignálokon keresztül, mely nem tartalmazza az adenozint, vagy más cAMP-t fokozó

molekulát, ugyanakkor szüksége van a p38 MAPK jelátviteli útvonalra; az eriptotikus vörösvértestek pedig a felvételüket követően. Valószínűleg mindkét útvonal magában foglalja a BACH1 szabályozását. A HO-1 aktivitás gátlás nem befolyásolta a makrofágok fagocitáló kapacitását az alacsony hemtartalmú sejtek felvétele során, még 24 órás folyamatos sejtfelvétel esetén sem, míg ugyanez a fagocitózis gátlását eredményezte magas hemtartalmú sejtek felvétele során. Az utóbbi esetben a HO aktivitás hiánya hatással volt a bekebelezés által kiváltott Rac1 aktiválásra. Normál esetben az apoptotikus sejtfelvétel elnyomja az alap gyulladásokeltő citokintermelődést a vad típusú makrofágokban, azonban HO-1 hiányában fokozott vagy változatlan pro-inflammatorikus citokin felszabadulást tapasztaltunk mindkét sejttípus bekebelezése során. A HO-1 gyulladáscsökkentő hatása magyarázatot adhat arra, miért képesek még az alacsony hemtartalmú elhalt sejtek is szabályozni a HO-1-et a makrofágokban, és miért használnak alternatív jeleket, mint az intracelluláris hem akkumuláció. Adataink összességében azt mutatják, hogy a HO-1 hozzájárul a makrofágok sejtfeltevő és gyulladáscsökkentő programjához is az efferocitózis során.

Az eredményeink összhangban vannak egy másik tanulmánnyal, mely azt mutatja, hogy a HO-1 hiányos egereknek nem változik meg a csecsemőmirigy szerkezete és funkciója (Kapturczak és mtsai., 2004), ahol a folyamatosan képződő timociták nagy része elhal és eltakarítódik, jelezve ezzel a megfelelő hem anyagcserét az eltakarítást végző makrofágokban. Ugyanakkor ezekre az egerekre jellemző a splenomegália és a fibrotikus szerkezet erős károsodása a lépben (Kovtunovych és mtsai., 2010), ahol az előregedett vörösvértestek többségének eltakarítása történik. Az ilyen lépben az eriptotikus vörösvértesteket feltevő szövetspecifikus makrofágok elhalnak a hem akkumulációjának következtében (Kovtunovych és mtsai., 2010). A makrofágok különböző érzékenységet a hem felhalmozódására ebben a két szövetben *in vivo* magyarázza a HO-2 egyidejű, folyamatos kifejeződése a HO-1^{-/-} makrofágokban (Kovtunovych és mtsai., 2010; Bellner és mtsai., 2015), amelynek aktivitása elegendő a csecsemőmirigyben az apoptotikus timociták fagocitózisa során keletkező alacsony mennyiségű hem kezelésére, de nem elegendő az efferocitózis során a magas hemtartalmú eriptotikus vörösvértestek kezelésére a lépben. Ennek megfelelően, amikor mindkét HO-t gátoltuk az SnPPIX-cel, akkor szignifikánsan nagyobb gátlást figyeltünk meg az elhalt vörösvértestek hosszútávú fagocitózisa során, mint amikor a HO-1 csak önmagában hiányzott (14. ábra), ami alátámasztja, hogy az efferocitózis gátlás mértéke függ a fennmaradó HO aktivitástól.

A mi adataink nem támasztják alá azt a tanulmányt, melyben a szerzők azt közölték, hogy a hem felhalmozódása a makrofágokban (az ő esetükben hemolízis során) túlaktiválja a Cdc42-

t azáltal, hogy hozzákötődik a DOCK8 guanin nukleotid kicserélő faktorhoz (Martins és mtsai., 2016). A mi eredményeink inkább azt mutatják, hogy a HO-1 aktivitás hiánya a Rac1 aktivációra van hatással fagocitózis közben. Egy korábbi tanulmányban azt találták, hogy a CO, ami az egyik terméke a HO aktivitásnak, elősegíti az efferocitózist (Kim és mtsai., 2015). Így eredményeink alapján feltételezhető, hogy HO aktivitás hiányában fiziológias szinten a hem akkumulációja és a szénmonoxid létrejöttének hiánya együtt gyakorol hatást a hosszútávú efferocitózisra, és ez főként az efferocitózis hatékonyságát meghatározó Rac1 aktivitást befolyásolja.

9. ÖSSZEFOGLALÁS

A szervezetben elhalt sejtek eltávolítása a csontvelői eredetű makrofágok által (efferocitózis) kulcsfontosságú a szöveti homeosztázis fenntartásában és az esetlegesen kialakult gyulladás felszámolásában. Kollégáim korábban azt találták, hogy a retinol szaturáz enzim terméke, a (13R)-csupa-transz-13,14-dihidroretinol (DHR) jelenléte a monocita differenciáció során növeli a létrejövő makrofágok efferocitózis kapacitását, ezért munkám során a DHR hatásmechanizmusának meghatározása volt az egyik célom. Ennek érdekében retinol (ROL) vagy DHR jelenlétében, illetve hiányában differenciáltatott csontvelőből származó makrofágok génexpressziós profilját vizsgáltam mRNS szekvenálással. A génkészlet-dúsítási analízissel számos efferocitózishoz köthető molekulát azonosítottunk, amelyeket mindkét vegyület szabályozott, azonban a transzglutamináz 2 (TG2) kivételével egyik sem volt az érett makrofágokban korábban már azonosított, retinoid által szabályozott fagocita receptor. Ezért ellenőriztük a DHR korai célgénjeit a makrofágok differenciálódása során, és 74 felszabályozott gént találtunk. A retinoidok hatásának közvetítésére a legígéretesebb jelöltek BMP-2 és a Smad3 voltak, amelyek expressziója szignifikánsan növekedett. A differenciálódó makrofágokban a DHR, a retinol és a csupa-transz-retinsav (ATRA) is képes volt indukálni ennek a két génnek az expresszióját retinsav receptor (RAR)-függő módon, bár a DHR kevésbé, míg az ATRA a leghatékonyabban. Továbbá a retinoidok a D-vitamin receptor és a vaszkuláris endothél növekedési faktor A (VEGFA) expresszióját is fokozták. Összességében ez azt jelzi, hogy a retinoidok elősegítik a pro-reparatív M2 makrofág populáció kialakulását a makrofág érés során, illetve elmondható, hogy fokozzák az efferocitózist azáltal, hogy indukálják a BMP-2 jelátvitelt a RAR működésének szabályozásán keresztül.

A hemoxigenáz-1 (HO-1) létfontosságú szerepet tölt be a hem katabolizmusában, és ekvimoláris mennyiségű biliverdint, CO-t és szabad vasat termel. A kutatócsoportunk egy korábbi tanulmányban azt találta, hogy a fagocitózis során az elhalt sejként használt apoptotikus timociták, melyek kevés hemet tartalmaznak, nagymértékben fokozták a HO-1 kifejeződését az őket felvevő makrofágokban. Ezért kutatómunkám második felében a HO-1 efferocitózisban betöltött szerepét vizsgáltam. Elhalt sejként kétféle sejttípust használtam, a kevés hemet tartalmazó apoptotikus timocitákat, és a nagymennyiségű hemet tartalmazó eriptotikus vörösvértesteket (eRBC). Mindkét elhalt sejttípust felvevő makrofágok erősen fokozták a HO-1 kifejeződését. Az apoptotikus timociták általi indukció teljes mértékben az oldható szignáloktól függ, amelyek egyike sem aktiválja az adenilát-cikláz, míg az eRBC-k

esetében ez sejtfelvétel függő. Valószínűleg mindkét út magában foglalja a HO-1 gén represszorának, a BACH1 transzkripciós faktornak a szabályozását. Az apoptotikus timociták hosszú távú folyamatos efferocitózisát nem befolyásolja a HO-1 elvesztése, de az eRBC-két gátolja. Ez később egy belső jelátviteli útvonalhoz kapcsolódik, amely megakadályozza a Rac1 aktivitás efferocitózis által kiváltott növekedését. Míg az apoptotikus sejtek felvétele elnyomta a vad típusú makrofágokban a bazális pro-inflammatórikus citokin termelést, addig a HO-1 hiányos makrofágok megnövekedett mennyiségű proinflammatórikus citokint termeltek. Összességében az adataink alapján elmondható, hogy a HO-1 szükséges a magas hemtartalmú elhalt sejtek felvétele esetén a hem lebontásához, így a megfelelő bekebelezési folyamathoz, és általában hozzájárul az apoptotikus sejt közvetítette gyulladásgátló válasz kialakulásához az efferocitózis során.

10. SUMMARY

The clearance of apoptotic cells by macrophages (efferocytosis) plays a key role in the maintenance of tissue homeostasis and in eliminating the inflammation. Previous work in our laboratory has shown that (13R)-all-trans-13,14- dihydroretinol (DHR) that is produced by retinol saturase enzyme, administered during bone marrow-derived macrophage (BMDM) differentiation increased the efferocytic capacity of the generated mature macrophages. In this study, I aimed to determine the mechanism of DHR action. Total gene expression analysis of BMDMs, which were differentiated in the presence or absence of retinol (ROL) or DHR was carried out by total mRNA sequencing. Gene set enrichment analysis identified several efferocytosis-related genes that were upregulated by both compounds. However, none of them were the retinoid-regulated phagocytic receptors, except transglutaminase 2 (TG2), that my colleagues identified previously in mature macrophages. That is why we checked the early target genes of DHR during macrophage differentiation, and found 74 upregulated genes. To mediate the effect of retinoids, the most promising candidates were BMP-2 and Smad3, whose expressions were increased significantly. During monocyte differentiation DHR, retinol, and retinoic acid all induced the expression of these two genes in a RAR-dependent manner, DHR being the less, retinoic acid being the most effective inducer. We also found, that retinoids upregulate the expression of the vitamin D receptor and the vascular endothelial growth factor A. Altogether our data demonstrate that retinoids during monocyte differentiation promote the generation of pro-reparative M2 macrophages and increase their efferocytotic capacity by inducing a BMP-2 and smad signaling via activating RARs.

Heme oxygenase-1 (HO-1) plays an important role in the catabolism of heme and yields equimolar amounts of biliverdin, carbon monoxide, and free iron. In a previous study in our research group has found that the low amount heme-containing apoptotic thymocytes strongly increased the expression of HO-1 in engulfing macrophages. Therefore, in the second half of my research work, I aimed to investigate the role of HO-1 in the efferocytosis program. In this project, I used two types of dead cells, apoptotic thymocytes, which barely contains heme, and the high amount of heme-containing eryptotic red blood cells (eRBCs). I found that both of them strongly upregulate HO-1 in macrophages. The induction by apoptotic thymocytes is fully dependent on soluble signals, while in the case of eRBCs, it is cell uptake dependent. Both pathways involve the regulation of BACH1 transcription faktor, the repressor of the HO-1 gene. The loss of HO-1 has no effect on the long-term continuous efferocytosis of apoptotic thymocytes, while that of eRBCs is inhibited. This latter is connected to an internal signaling

pathway induced by the accumulated heme that prevents the increase in Rac1 activity triggered by the efferocytosis receptors and required for proper efferocytosis. Normally, the clearance of apoptotic cells suppresses the basal pro-inflammatory cytokine production in wild-type macrophages. However, in the absence of HO-1, we found enhanced amounts of pro-inflammatory cytokines produced by engulfing macrophages. Altogether our data indicate that HO-1 is necessary for both the proper degradation of hem and engulfment of high hem-containing apoptotic cells, and generally for the anti-inflammatory effects mediated by the apoptotic cells.

11. IRODALOMJEGYZÉK

- Aderem, A., & Underhill, D. M. (1999). Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol*, 17, 593-623. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.17.1.593>
- Albert, M. L., Kim, J. I., & Birge, R. B. (2000). α phavbeta5 integrin recruits the CrkII-Dock180-rac1 complex for phagocytosis of apoptotic cells. *Nat Cell Biol*, 2(12), 899-905. <https://doi.org/10.1038/35046549>
- Angsana, J., Chen, J., Liu, L., Haller, C. A., & Chaikof, E. L. (2016). Efferocytosis as a regulator of macrophage chemokine receptor expression and polarization. *Eur J Immunol*, 46(7), 1592-1599. <https://doi.org/10.1002/eji.201546262>
- Arandjelovic, S., & Ravichandran, K. S. (2015). Phagocytosis of apoptotic cells in homeostasis. *Nat Immunol*, 16(9), 907-917. <https://doi.org/10.1038/ni.3253>
- Araujo, J.A., Zhang, M., Yin, F. (2012). Heme oxygenase-1, oxidation, inflammation, and atherosclerosis. *Front Pharmacol*. 19;3:119. <https://doi.org/10.3389/fphar.2012.00119>.
- Arur, S., Uche, U. E., Rezaul, K., Fong, M., Scranton, V., Cowan, A. E., Mohler, W., & Han, D. K. (2003). Annexin I is an endogenous ligand that mediates apoptotic cell engulfment. *Dev Cell*, 4(4), 587-598. [https://doi.org/10.1016/s1534-5807\(03\)00090-x](https://doi.org/10.1016/s1534-5807(03)00090-x)
- Asare, P. F., Roscioli, E., Hurtado, P. R., Tran, H. B., Mah, C. Y., & Hodge, S. (2020). LC3-Associated Phagocytosis (LAP): A Potentially Influential Mediator of Efferocytosis-Related Tumor Progression and Aggressiveness. *Front Oncol*, 10, 1298. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.01298>
- Atri, C., Guerfali, F. Z., & Laouini, D. (2018). Role of Human Macrophage Polarization in Inflammation during Infectious Diseases. *Int J Mol Sci*, 19(6). <https://doi.org/10.3390/ijms19061801>
- Bae, H. B., Zmijewski, J. W., Deshane, J. S., Tadie, J. M., Chaplin, D. D., Takashima, S., & Abraham, E. (2011). AMP-activated protein kinase enhances the phagocytic ability of macrophages and neutrophils. *Faseb j*, 25(12), 4358-4368. <https://doi.org/10.1096/fj.11-190587>
- Balasubramanian, K., & Schroit, A. J. (2003). Aminophospholipid asymmetry: A matter of life and death. *Annu Rev Physiol*, 65, 701-734. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.65.092101.142459>

Balla, G., Jacob, H. S., Balla, J., Rosenberg, M., Nath, K., Apple, F., Eaton, J. W., & Vercellotti, G. M. (1992). Ferritin: a cytoprotective antioxidant strategem of endothelium. *J Biol Chem*, 267(25), 18148-18153.

Barkal, A. A., Brewer, R. E., Markovic, M., Kowarsky, M., Barkal, S. A., Zaro, B. W., Krishnan, V., Hatakeyama, J., Dorigo, O., Barkal, L. J., & Weissman, I. L. (2019). CD24 signalling through macrophage Siglec-10 is a target for cancer immunotherapy. *Nature*, 572(7769), 392-396. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1456-0>

Bellner, L., Marrazzo, G., van Rooijen, N., Dunn, M. W., Abraham, N. G., & Schwartzman, M. L. (2015). Heme oxygenase-2 deletion impairs macrophage function: implication in wound healing. *Faseb j*, 29(1), 105-115. <https://doi.org/10.1096/fj.14-256503>

Birge, R. B., Boeltz, S., Kumar, S., Carlson, J., Wanderley, J., Calianese, D., Barcinski, M., Brekken, R. A., Huang, X., Hutchins, J. T., Freimark, B., Empig, C., Mercer, J., Schroit, A. J., Schett, G., & Herrmann, M. (2016). Phosphatidylserine is a global immunosuppressive signal in efferocytosis, infectious disease, and cancer. *Cell Death Differ*, 23(6), 962-978. <https://doi.org/10.1038/cdd.2016.11>

Biswas, C., Shah, N., Muthu, M., La, P., Fernando, A. P., Sengupta, S., Yang, G., & Dennery, P. A. (2014). Nuclear heme oxygenase-1 (HO-1) modulates subcellular distribution and activation of Nrf2, impacting metabolic and anti-oxidant defenses. *J Biol Chem*, 289(39), 26882-26894. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.567685>

Blander, J. M. (2017). The many ways tissue phagocytes respond to dying cells. *Immunol Rev*, 277(1), 158-173. <https://doi.org/10.1111/imr.12537>

Brown, S., Heinisch, I., Ross, E., Shaw, K., Buckley, C. D., & Savill, J. (2002). Apoptosis disables CD31-mediated cell detachment from phagocytes promoting binding and engulfment. *Nature*, 418(6894), 200-203. <https://doi.org/10.1038/nature00811>

Brugnera, E., Haney, L., Grimsley, C., Lu, M., Walk, S. F., Tosello-Tramont, A. C., Macara, I. G., Madhani, H., Fink, G. R., & Ravichandran, K. S. (2002). Unconventional Rac-GEF activity is mediated through the Dock180-ELMO complex. *Nat Cell Biol*, 4(8), 574-582. <https://doi.org/10.1038/ncb824>

Carlos Rosales (2005) Molecular mechanism of phagocytosis.

- Chekeni, F. B., Elliott, M. R., Sandilos, J. K., Walk, S. F., Kinchen, J. M., Lazarowski, E. R., Armstrong, A. J., Penuela, S., Laird, D. W., Salvesen, G. S., Isakson, B. E., Bayliss, D. A., & Ravichandran, K. S. (2010). Pannexin 1 channels mediate 'find-me' signal release and membrane permeability during apoptosis. *Nature*, 467(7317), 863-867. <https://doi.org/10.1038/nature09413>
- Chen, B., Huang, S., Su, Y., Wu, Y. J., Hanna, A., Brickshawana, A., Graff, J., & Frangogiannis, N. G. (2019). Macrophage Smad3 Protects the Infarcted Heart, Stimulating Phagocytosis and Regulating Inflammation. *Circ Res*, 125(1), 55-70. <https://doi.org/10.1161/circresaha.119.315069>
- Chen, B., Li, R., Hernandez, S. C., Hanna, A., Su, K., Shinde, A. V., & Frangogiannis, N. G. (2022). Differential effects of Smad2 and Smad3 in regulation of macrophage phenotype and function in the infarcted myocardium. *J Mol Cell Cardiol*, 171, 1-15. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2022.06.009>
- Chen, J. Y., Penco, S., Ostrowski, J., Balaguer, P., Pons, M., Starrett, J. E., Reczek, P., Chambon, P., & Gronemeyer, H. (1995). RAR-specific agonist/antagonists which dissociate transactivation and AP1 transrepression inhibit anchorage-independent cell proliferation. *Embo j*, 14(6), 1187-1197. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1995.tb07102.x>
- Cinti, S., Mitchell, G., Barbatelli, G., Murano, I., Ceresi, E., Faloia, E., Wang, S., Fortier, M., Greenberg, A. S., & Obin, M. S. (2005). Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J Lipid Res*, 46(11), 2347-2355. <https://doi.org/10.1194/jlr.M500294-JLR200>
- Cruse, I., & Maines, M. D. (1988). Evidence suggesting that the two forms of heme oxygenase are products of different genes. *J Biol Chem*, 263(7), 3348-3353.
- Dalli, J., & Serhan, C. N. (2012). Specific lipid mediator signatures of human phagocytes: microparticles stimulate macrophage efferocytosis and pro-resolving mediators. *Blood*, 120(15), e60-72. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-04-423525>
- Davies, L. C., Jenkins, S. J., Allen, J. E., & Taylor, P. R. (2013). Tissue-resident macrophages. *Nat Immunol*, 14(10), 986-995. <https://doi.org/10.1038/ni.2705>
- deCathelineau, A. M., & Henson, P. M. (2003). The final step in programmed cell death: phagocytes carry apoptotic cells to the grave. *Essays Biochem*, 39, 105-117. <https://doi.org/10.1042/bse0390105>

- Devalaraja, S., To, T. K. J., Folkert, I. W., Natesan, R., Alam, M. Z., Li, M., Tada, Y., Budagyan, K., Dang, M. T., Zhai, L., Lobel, G. P., Ciotti, G. E., Eisinger-Mathason, T. S. K., Asangani, I. A., Weber, K., Simon, M. C., & Haldar, M. (2020). Tumor-Derived Retinoic Acid Regulates Intratumoral Monocyte Differentiation to Promote Immune Suppression. *Cell*, 180(6), 1098-1114.e1016. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.042>
- Drummond, G. S., & Kappas, A. (1981). Prevention of neonatal hyperbilirubinemia by tin protoporphyrin IX, a potent competitive inhibitor of heme oxidation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78(10), 6466-6470. <https://doi.org/10.1073/pnas.78.10.6466>
- Dunn, L. L., Midwinter, R. G., Ni, J., Hamid, H. A., Parish, C. R., & Stocker, R. (2014). New insights into intracellular locations and functions of heme oxygenase-1. *Antioxid Redox Signal*, 20(11), 1723-1742. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5675>
- Duró, E., Pallai, A., Köröskényi, K., Sarang, Z., & Szondy, Z. (2014). Adenosine A3 receptors negatively regulate the engulfment-dependent apoptotic cell suppression of inflammation. *Immunol Lett*, 162(2 Pt B), 292-301. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2014.06.014>
- Elliott, M. R., Cheken, F. B., Trampont, P. C., Lazarowski, E. R., Kadl, A., Walk, S. F., Park, D., Woodson, R. I., Ostankovich, M., Sharma, P., Lysiak, J. J., Harden, T. K., Leitinger, N., & Ravichandran, K. S. (2009). Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. *Nature*, 461(7261), 282-286. <https://doi.org/10.1038/nature08296>
- Elliott, M. R., Koster, K. M., & Murphy, P. S. (2017). Efferocytosis Signaling in the Regulation of Macrophage Inflammatory Responses. *J Immunol*, 198(4), 1387-1394. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601520>
- Elliott, M. R., & Ravichandran, K. S. (2016). The Dynamics of Apoptotic Cell Clearance. *Dev Cell*, 38(2), 147-160. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2016.06.029>
- Epelman, S., Lavine, K. J., & Randolph, G. J. (2014). Origin and functions of tissue macrophages. *Immunity*, 41(1), 21-35. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.06.013>
- Ezekowitz, R. A., Sastry, K., Bailly, P., & Warner, A. (1990). Molecular characterization of the human macrophage mannose receptor: demonstration of multiple carbohydrate recognition-like domains and phagocytosis of yeasts in Cos-1 cells. *J Exp Med*, 172(6), 1785-1794. <https://doi.org/10.1084/jem.172.6.1785>

- Fadok, V. A., Bratton, D. L., Guthrie, L., & Henson, P. M. (2001). Differential effects of apoptotic versus lysed cells on macrophage production of cytokines: role of proteases. *J Immunol*, 166(11), 6847-6854. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.11.6847>
- Fadok, V. A., Bratton, D. L., Konowal, A., Freed, P. W., Westcott, J. Y., & Henson, P. M. (1998). Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J Clin Invest*, 101(4), 890-898. <https://doi.org/10.1172/jci1112>
- Fadok, V. A., Warner, M. L., Bratton, D. L., & Henson, P. M. (1998). CD36 is required for phagocytosis of apoptotic cells by human macrophages that use either a phosphatidylserine receptor or the vitronectin receptor (alpha v beta 3). *J Immunol*, 161(11), 6250-6257.
- Flannagan, R. S., Jaumouillé, V., & Grinstein, S. (2012). The cell biology of phagocytosis. *Annu Rev Pathol*, 7, 61-98. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-011811-132445>
- Fleetwood, A. J., Lawrence, T., Hamilton, J. A., & Cook, A. D. (2007). Granulocyte-macrophage colony-stimulating faktor (CSF) and macrophage CSF-dependent macrophage phenotypes display differences in cytokine profiles and transcription faktor activities: implications for CSF blockade in inflammation. *J Immunol*, 178(8), 5245-5252. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.8.5245>
- Francke, A., Herold, J., Weinert, S., Strasser, R. H., & Braun-Dullaeus, R. C. (2011). Generation of mature murine monocytes from heterogeneous bone marrow and description of their properties. *J Histochem Cytochem*, 59(9), 813-825. <https://doi.org/10.1369/0022155411416007>
- Fredholm, B. B., AP, I. J., Jacobson, K. A., Linden, J., & Müller, C. E. (2011). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and classification of adenosine receptors--an update. *Pharmacol Rev*, 63(1), 1-34. <https://doi.org/10.1124/pr.110.003285>
- Fredholm, B. B., Irenius, E., Kull, B., & Schulte, G. (2001). Comparison of the potency of adenosine as an agonist at human adenosine receptors expressed in Chinese hamster ovary cells. *Biochem Pharmacol*, 61(4), 443-448. [https://doi.org/10.1016/s0006-2952\(00\)00570-0](https://doi.org/10.1016/s0006-2952(00)00570-0)
- Fujiwara, N., & Kobayashi, K. (2005). Macrophages in inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*, 4(3), 281-286. <https://doi.org/10.2174/1568010054022024>

- Galli, S. J., Borregaard, N., & Wynn, T. A. (2011). Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils. *Nat Immunol*, 12(11), 1035-1044. <https://doi.org/10.1038/ni.2109>
- Garabuczi, É., Kiss, B., Felszeghy, S., Tsay, G. J., Fésüs, L., & Szondy, Z. (2013). Retinoids produced by macrophages engulfing apoptotic cells contribute to the appearance of transglutaminase 2 in apoptotic thymocytes. *Amino Acids*, 44(1), 235-244. <https://doi.org/10.1007/s00726-011-1119-4>
- Gardai, S. J., McPhillips, K. A., Frasch, S. C., Janssen, W. J., Starefeldt, A., Murphy-Ullrich, J. E., Bratton, D. L., Oldenborg, P. A., Michalak, M., & Henson, P. M. (2005). Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte. *Cell*, 123(2), 321-334. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.08.032>
- Garris, C. S., Wu, L., Acharya, S., Arac, A., Blaho, V. A., Huang, Y., Moon, B. S., Axtell, R. C., Ho, P. P., Steinberg, G. K., Lewis, D. B., Sobel, R. A., Han, D. K., Steinman, L., Snyder, M. P., Hla, T., & Han, M. H. (2013). Defective sphingosine 1-phosphate receptor 1 (S1P1) phosphorylation exacerbates TH17-mediated autoimmune neuroinflammation. *Nat Immunol*, 14(11), 1166-1172. <https://doi.org/10.1038/ni.2730>
- Gautier, E. L., Shay, T., Miller, J., Greter, M., Jakubzick, C., Ivanov, S., Helft, J., Chow, A., Elpek, K. G., Gordonov, S., Mazloom, A. R., Ma'ayan, A., Chua, W. J., Hansen, T. H., Turley, S. J., Merad, M., & Randolph, G. J. (2012). Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages. *Nat Immunol*, 13(11), 1118-1128. <https://doi.org/10.1038/ni.2419>
- Ginhoux, F., & Guilliams, M. (2016). Tissue-Resident Macrophage Ontogeny and Homeostasis. *Immunity*, 44(3), 439-449. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.02.024>
- Gomez Perdiguero, E., Klapproth, K., Schulz, C., Busch, K., Azzoni, E., Crozet, L., Garner, H., Trouillet, C., de Bruijn, M. F., Geissmann, F., & Rodewald, H. R. (2015). Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors. *Nature*, 518(7540), 547-551. <https://doi.org/10.1038/nature13989>
- Gonzalez-Junca, A., Driscoll, K. E., Pellicciotta, I., Du, S., Lo, C. H., Roy, R., Parry, R., Tenvooren, I., Marquez, D. M., Spitzer, M. H., & Barcellos-Hoff, M. H. (2019). Autocrine TGF β Is a Survival Faktor for Monocytes and Drives Immunosuppressive Lineage

Commitment. *Cancer Immunol Res*, 7(2), 306-320. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.Cir-18-0310>

Gordon, S. (1999). Macrophage-restricted molecules: role in differentiation and activation. *Immunol Lett*, 65(1-2), 5-8. [https://doi.org/10.1016/s0165-2478\(98\)00116-3](https://doi.org/10.1016/s0165-2478(98)00116-3)

Gosselin, D., Skola, D., Coufal, N. G., Holtman, I. R., Schlachetzki, J. C. M., Sajti, E., Jaeger, B. N., O'Connor, C., Fitzpatrick, C., Pasillas, M. P., Pena, M., Adair, A., Gonda, D. D., Levy, M. L., Ransohoff, R. M., Gage, F. H., & Glass, C. K. (2017). An environment-dependent transcriptional network specifies human microglia identity. *Science*, 356(6344). <https://doi.org/10.1126/science.aal3222>

Green, D. R., Ferguson, T., Zitvogel, L., & Kroemer, G. (2009). Immunogenic and tolerogenic cell death. *Nat Rev Immunol*, 9(5), 353-363. <https://doi.org/10.1038/nri2545>

Gregory, C. D., Devitt, A., & Moffatt, O. (1998). Roles of ICAM-3 and CD14 in the recognition and phagocytosis of apoptotic cells by macrophages. *Biochem Soc Trans*, 26(4), 644-649. <https://doi.org/10.1042/bst0260644>

Gude, D. R., Alvarez, S. E., Paugh, S. W., Mitra, P., Yu, J., Griffiths, R., Barbour, S. E., Milstien, S., & Spiegel, S. (2008). Apoptosis induces expression of sphingosine kinase 1 to release sphingosine-1-phosphate as a "come-and-get-me" signal. *Faseb j*, 22(8), 2629-2638. <https://doi.org/10.1096/fj.08-107169>

Gumienny, T. L., Brugnera, E., Tosello-Tramont, A. C., Kinchen, J. M., Haney, L. B., Nishiwaki, K., Walk, S. F., Nemergut, M. E., Macara, I. G., Francis, R., Schedl, T., Qin, Y., Van Aelst, L., Hengartner, M. O., & Ravichandran, K. S. (2001). CED-12/ELMO, a novel member of the CrkII/Dock180/Rac pathway, is required for phagocytosis and cell migration. *Cell*, 107(1), 27-41. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(01\)00520-7](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00520-7)

Gunasekar, P., Swier, V. J., Fleegel, J. P., Boosani, C. S., Radwan, M. M., & Agrawal, D. K. (2018). Vitamin D and macrophage polarization in epicardial adipose tissue of atherosclerotic swine. *PLoS One*, 13(10), e0199411. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199411>

Hait, N. C., Oskeritzian, C. A., Paugh, S. W., Milstien, S., & Spiegel, S. (2006). Sphingosine kinases, sphingosine 1-phosphate, apoptosis and diseases. *Biochim Biophys Acta*, 1758(12), 2016-2026. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.08.007>

- Hammarberg, C., Fredholm, B. B., & Schulte, G. (2004). Adenosine A3 receptor-mediated regulation of p38 and extracellular-regulated kinase ERK1/2 via phosphatidylinositol-3'-kinase. *Biochem Pharmacol*, 67(1), 129-134. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2003.08.031>
- Hanayama, R., Tanaka, M., Miwa, K., Shinohara, A., Iwamatsu, A., & Nagata, S. (2002). Identification of a faktor that links apoptotic cells to phagocytes. *Nature*, 417(6885), 182-187. <https://doi.org/10.1038/417182a>
- Hasegawa, H., Kiyokawa, E., Tanaka, S., Nagashima, K., Gotoh, N., Shibuya, M., Kurata, T., & Matsuda, M. (1996). DOCK180, a major CRK-binding protein, alters cell morphology upon translocation to the cell membrane. *Mol Cell Biol*, 16(4), 1770-1776. <https://doi.org/10.1128/mcb.16.4.1770>
- He, L., Jhong, J. H., Chen, Q., Huang, K. Y., Strittmatter, K., Kreuzer, J., DeRan, M., Wu, X., Lee, T. Y., Slavov, N., Haas, W., & Marneros, A. G. (2021). Global characterization of macrophage polarization mechanisms and identification of M2-type polarization inhibitors. *Cell Rep*, 37(5), 109955. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109955>
- Heidenreich, S., Witte, N., Weber, P., Goehring, I., Tolkachov, A., von Loeffelholz, C., Döcke, S., Bauer, M., Stockmann, M., Pfeiffer, A. F. H., Birkenfeld, A. L., Pietzke, M., Kempa, S., Muenzner, M., & Schupp, M. (2017). Retinol saturase coordinates liver metabolism by regulating ChREBP activity. *Nat Commun*, 8(1), 384. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00430-w>
- Heller, L. C., Li, Y., Abrams, K. L., & Rogers, M. B. (1999). Transcriptional regulation of the Bmp2 gene. Retinoic acid induction in F9 embryonal carcinoma cells and *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 274(3), 1394-1400. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.3.1394>
- Henson, P. M., & Hume, D. A. (2006). Apoptotic cell removal in development and tissue homeostasis. *Trends Immunol*, 27(5), 244-250. <https://doi.org/10.1016/j.it.2006.03.005>
- Hochreiter-Hufford, A., & Ravichandran, K. S. (2013). Clearing the dead: apoptotic cell sensing, recognition, engulfment, and digestion. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5(1), a008748. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008748>
- Hock, T. D., Liby, K., Wright, M. M., McConnell, S., Schorpp-Kistner, M., Ryan, T. M., & Agarwal, A. (2007). JunB and JunD regulate human heme oxygenase-1 gene expression in renal epithelial cells. *J Biol Chem*, 282(9), 6875-6886. <https://doi.org/10.1074/jbc.M608456200>

- Hoeffel, G., Chen, J., Lavin, Y., Low, D., Almeida, F. F., See, P., Beaudin, A. E., Lum, J., Low, I., Forsberg, E. C., Poidinger, M., Zolezzi, F., Larbi, A., Ng, L. G., Chan, J. K., Greter, M., Becher, B., Samokhvalov, I. M., Merad, M., & Ginhoux, F. (2015). C-Myb(+) erythro-myeloid progenitor-derived fetal monocytes give rise to adult tissue-resident macrophages. *Immunity*, 42(4), 665-678. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.03.011>
- Hoffmann, P. R., deCathelineau, A. M., Ogden, C. A., Leverrier, Y., Bratton, D. L., Daleke, D. L., Ridley, A. J., Fadok, V. A., & Henson, P. M. (2001). Phosphatidylserine (PS) induces PS receptor-mediated macropinocytosis and promotes clearance of apoptotic cells. *J Cell Biol*, 155(4), 649-659. <https://doi.org/10.1083/jcb.200108080>
- Holtzhausen, A., Golzio, C., How, T., Lee, Y. H., Schiemann, W. P., Katsanis, N., & Blobe, G. C. (2014). Novel bone morphogenetic protein signaling through Smad2 and Smad3 to regulate cancer progression and development. *Faseb j*, 28(3), 1248-1267. <https://doi.org/10.1096/fj.13-239178>
- Hundhausen, C., Misztela, D., Berkhout, T. A., Broadway, N., Saftig, P., Reiss, K., Hartmann, D., Fahrenholz, F., Postina, R., Matthews, V., Kallen, K. J., Rose-John, S., & Ludwig, A. (2003). The disintegrin-like metalloproteinase ADAM10 is involved in constitutive cleavage of CX3CL1 (fractalkine) and regulates CX3CL1-mediated cell-cell adhesion. *Blood*, 102(4), 1186-1195. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-12-3775>
- Huynh, M. L., Fadok, V. A., & Henson, P. M. (2002). Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF-beta1 secretion and the resolution of inflammation. *J Clin Invest*, 109(1), 41-50. <https://doi.org/10.1172/jci11638>
- Igarashi, K., Kurosaki, T., & Roychoudhuri, R. (2017). BACH transcription faktors in innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*, 17(7), 437-450. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.26>
- Immenschuh, S., Kietzmann, T. (2002) Molecular Mechanism of Heme Oxygenase-1 Gene Induction by Activation of the Protein Kinase A-Dependent Signaling Pathway. In *Heme Oxygenase in Biology and Medicine*; Abraham, N.G., Ed.; Springer: Boston, MA, USA,; pp. 365–375.
- Ishikawa, K., Matera, K. M., Zhou, H., Fujii, H., Sato, M., Yoshimura, T., Ikeda-Saito, M., & Yoshida, T. (1998). Identification of histidine 45 as the axial heme iron ligand of heme oxygenase-2. *J Biol Chem*, 273(8), 4317-4322. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.8.4317>

Ishikawa, K., Sato, M., & Yoshida, T. (1991). Expression of rat heme oxygenase in *Escherichia coli* as a catalytically active, full-length form that binds to bacterial membranes. *Eur J Biochem*, 202(1), 161-165. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1991.tb16357.x>

Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Ishii, T., Igarashi, K., Engel, J. D., & Yamamoto, M. (1999). Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev*, 13(1), 76-86. <https://doi.org/10.1101/gad.13.1.76>

Johnson, R. A., Lavesa, M., Askari, B., Abraham, N. G., & Nasjletti, A. (1995). A heme oxygenase product, presumably carbon monoxide, mediates a vasodepressor function in rats. *Hypertension*, 25(2), 166-169. <https://doi.org/10.1161/01.hyp.25.2.166>

Joós, G., Jákim, J., Kiss, B., Szamosi, R., Papp, T., Felszeghy, S., Sághy, T., Nagy, G., & Szondy, Z. (2017). Involvement of adenosine A3 receptors in the chemotactic navigation of macrophages towards apoptotic cells. *Immunol Lett*, 183, 62-72. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2017.02.002>

Kapturczak, M. H., Wasserfall, C., Brusko, T., Campbell-Thompson, M., Ellis, T. M., Atkinson, M. A., & Agarwal, A. (2004). Heme oxygenase-1 modulates early inflammatory responses: evidence from the heme oxygenase-1-deficient mouse. *Am J Pathol*, 165(3), 1045-1053. [https://doi.org/10.1016/s0002-9440\(10\)63365-2](https://doi.org/10.1016/s0002-9440(10)63365-2)

Kaspar, J. W., & Jaiswal, A. K. (2010). Antioxidant-induced phosphorylation of tyrosine 486 leads to rapid nuclear export of Bach1 that allows Nrf2 to bind to the antioxidant response element and activate defensive gene expression. *J Biol Chem*, 285(1), 153-162. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.040022>

Kaspar, J. W., Niture, S. K., & Jaiswal, A. K. (2009). Nrf2:INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress. *Free Radic Biol Med*, 47(9), 1304-1309. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.07.035>

Kawane, K., Fukuyama, H., Kondoh, G., Takeda, J., Ohsawa, Y., Uchiyama, Y., & Nagata, S. (2001). Requirement of DNase II for definitive erythropoiesis in the mouse fetal liver. *Science*, 292(5521), 1546-1549. <https://doi.org/10.1126/science.292.5521.1546>

Kim, W., Kim, H. U., Lee, H. N., Kim, S. H., Kim, C., Cha, Y. N., Joe, Y., Chung, H. T., Jang, J., Kim, K., Suh, Y. G., Jin, H. O., Lee, J. K., & Surh, Y. J. (2015). Taurine Chloramine Stimulates Efferocytosis Through Upregulation of Nrf2-Mediated Heme Oxygenase-1

Expression in Murine Macrophages: Possible Involvement of Carbon Monoxide. *Antioxid Redox Signal*, 23(2), 163-177. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5825>

Kinchen, J. M., Cabello, J., Klingele, D., Wong, K., Feichtinger, R., Schnabel, H., Schnabel, R., & Hengartner, M. O. (2005). Two pathways converge at CED-10 to mediate actin rearrangement and corpse removal in *C. elegans*. *Nature*, 434(7029), 93-99. <https://doi.org/10.1038/nature03263>

Kinchen, J. M., & Ravichandran, K. S. (2007). Journey to the grave: signaling events regulating removal of apoptotic cells. *J Cell Sci*, 120(Pt 13), 2143-2149. <https://doi.org/10.1242/jcs.03463>

Kinchen, J. M., & Ravichandran, K. S. (2008). Phagosome maturation: going through the acid test. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(10), 781-795. <https://doi.org/10.1038/nrm2515>

Kobayashi, A., Kang, M. I., Okawa, H., Ohtsuji, M., Zenke, Y., Chiba, T., Igarashi, K., & Yamamoto, M. (2004). Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2. *Mol Cell Biol*, 24(16), 7130-7139. <https://doi.org/10.1128/mcb.24.16.7130-7139.2004>

Korns, D., Frasch, S. C., Fernandez-Boyanapalli, R., Henson, P. M., & Bratton, D. L. (2011). Modulation of macrophage efferocytosis in inflammation. *Front Immunol*, 2, 57. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2011.00057>

Kovtunovych, G., Eckhaus, M. A., Ghosh, M. C., Ollivierre-Wilson, H., & Rouault, T. A. (2010). Dysfunction of the heme recycling system in heme oxygenase 1-deficient mice: effects on macrophage viability and tissue iron distribution. *Blood*, 116(26), 6054-6062. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-03-272138>

Köröskényi, K., Duró, E., Pallai, A., Sarang, Z., Kloor, D., Ucker, D. S., Beceiro, S., Castrillo, A., Chawla, A., Ledent, C. A., Fésüs, L., & Szondy, Z. (2011). Involvement of adenosine A2A receptors in engulfment-dependent apoptotic cell suppression of inflammation. *J Immunol*, 186(12), 7144-7155. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002284>

Krężel, W., Rühl, R., & de Lera, A. R. (2019). Alternative retinoid X receptor (RXR) ligands. *Mol Cell Endocrinol*, 491, 110436. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2019.04.016>

Lauber, K., Bohn, E., Kröber, S. M., Xiao, Y. J., Blumenthal, S. G., Lindemann, R. K., Marini, P., Wiedig, C., Zobywalski, A., Baksh, S., Xu, Y., Autenrieth, I. B., Schulze-Osthoff, K., Belka, C., Stuhler, G., & Wesselborg, S. (2003). Apoptotic cells induce migration of phagocytes via

caspase-3-mediated release of a lipid attraction signal. *Cell*, 113(6), 717-730. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00422-7](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00422-7)

Leal, E. C., & Carvalho, E. (2022). Heme Oxygenase-1 as Therapeutic Target for Diabetic Foot Ulcers. *Int J Mol Sci*, 23(19). <https://doi.org/10.3390/ijms231912043>

Ledent, C., Vaugeois, J. M., Schiffmann, S. N., Pedrazzini, T., El Yacoubi, M., Vanderhaeghen, J. J., Costentin, J., Heath, J. K., Vassart, G., & Parmentier, M. (1997). Aggressiveness, hypoalgesia and high blood pressure in mice lacking the adenosine A2a receptor. *Nature*, 388(6643), 674-678. <https://doi.org/10.1038/41771>

Lee, H. T., Ota-Setlik, A., Xu, H., D'Agati, V. D., Jacobson, M. A., & Emala, C. W. (2003). A3 adenosine receptor knockout mice are protected against ischemia- and myoglobinuria-induced renal failure. *Am J Physiol Renal Physiol*, 284(2), F267-273. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00271.2002>

Leverrier, Y., Lorenzi, R., Blundell, M. P., Brickell, P., Kinnon, C., Ridley, A. J., & Thrasher, A. J. (2001). Cutting edge: the Wiskott-Aldrich syndrome protein is required for efficient phagocytosis of apoptotic cells. *J Immunol*, 166(8), 4831-4834. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.8.4831>

Leverrier, Y., & Ridley, A. J. (2001). Requirement for Rho GTPases and PI 3-kinases during apoptotic cell phagocytosis by macrophages. *Curr Biol*, 11(3), 195-199. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(01\)00047-1](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(01)00047-1)

Li, L., Song, J., Chuquisana, O., Hannocks, M. J., Loismann, S., Vogl, T., Roth, J., Hallmann, R., & Sorokin, L. (2020). Endothelial Basement Membrane Laminins as an Environmental Cue in Monocyte Differentiation to Macrophages. *Front Immunol*, 11, 584229. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.584229>

Lin, Q., Weis, S., Yang, G., Weng, Y. H., Helston, R., Rish, K., Smith, A., Bordner, J., Polte, T., Gaunitz, F., & Dennery, P. A. (2007). Heme oxygenase-1 protein localizes to the nucleus and activates transcription factors important in oxidative stress. *J Biol Chem*, 282(28), 20621-20633. <https://doi.org/10.1074/jbc.M607954200>

Loi, F., Córdova, L. A., Pajarinen, J., Lin, T. H., Yao, Z., & Goodman, S. B. (2016). Inflammation, fracture and bone repair. *Bone*, 86, 119-130. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2016.02.020>

- Lucas, M., Stuart, L. M., Zhang, A., Hodivala-Dilke, K., Febbraio, M., Silverstein, R., Savill, J., & Lacy-Hulbert, A. (2006). Requirements for apoptotic cell contact in regulation of macrophage responses. *J Immunol*, 177(6), 4047-4054. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.6.4047>
- Ly, Z., Bian, Z., Shi, L., Niu, S., Ha, B., Tremblay, A., Li, L., Zhang, X., Paluszynski, J., Liu, M., Zen, K., Liu, Y. (2015). Loss of Cell Surface CD47 Clustering Formation and Binding Avidity to SIRP α Facilitate Apoptotic Cell Clearance by Macrophages. *J Immunol*, 195(2), 661–671. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1401719>
- Madej, M. P., Töpfer, E., Boraschi, D., & Italiani, P. (2017). Different Regulation of Interleukin-1 Production and Activity in Monocytes and Macrophages: Innate Memory as an Endogenous Mechanism of IL-1 Inhibition. *Front Pharmacol*, 8, 335. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00335>
- Mancuso, C., Perluigi, M., Cini, C., De Marco, C., Giuffrida Stella, A. M., & Calabrese, V. (2006). Heme oxygenase and cyclooxygenase in the central nervous system: a functional interplay. *J Neurosci Res*, 84(7), 1385-1391. <https://doi.org/10.1002/jnr.21049>
- Marques-da-Silva, C., Burnstock, G., Ojcius, D. M., & Coutinho-Silva, R. (2011). Purinergic receptor agonists modulate phagocytosis and clearance of apoptotic cells in macrophages. *Immunobiology*, 216(1-2), 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2010.03.010>
- Martin, C. J., Peters, K. N., & Behar, S. M. (2014). Macrophages clean up: efferocytosis and microbial control. *Curr Opin Microbiol*, 17, 17-23. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2013.10.007>
- Martins, R., Maier, J., Gorki, A. D., Huber, K. V., Sharif, O., Starkl, P., Saluzzo, S., Quattrone, F., Gawish, R., Lakovits, K., Aichinger, M. C., Radic-Sarikas, B., Lardeau, C. H., Hladik, A., Korosec, A., Brown, M., Vaahtomeri, K., Duggan, M., Kerjaschki, D., . . . Knapp, S. (2016). Heme drives hemolysis-induced susceptibility to infection via disruption of phagocyte functions. *Nat Immunol*, 17(12), 1361-1372. <https://doi.org/10.1038/ni.3590>
- Massagué, J. (2012) TGF β signalling in context. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 13(10):616-30. <https://doi.org/10.1038/nrm3434>.
- McCoubrey, W. K., Jr., Huang, T. J., & Maines, M. D. (1997). Heme oxygenase-2 is a hemoprotein and binds heme through heme regulatory motifs that are not involved in heme catalysis. *J Biol Chem*, 272(19), 12568-12574. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.19.12568>

- Miyanishi, M., Tada, K., Koike, M., Uchiyama, Y., Kitamura, T., & Nagata, S. (2007). Identification of Tim4 as a phosphatidylserine receptor. *Nature*, 450(7168), 435-439. <https://doi.org/10.1038/nature06307>
- Moise, A. R., Alvarez, S., Domínguez, M., Alvarez, R., Golczak, M., Lobo, G. P., von Lintig, J., de Lera, A. R., & Palczewski, K. (2009). Activation of retinoic acid receptors by dihydroretinoids. *Mol Pharmacol*, 76(6), 1228-1237. <https://doi.org/10.1124/mol.109.060038>
- Moise, A. R., Domínguez, M., Alvarez, S., Alvarez, R., Schupp, M., Cristancho, A. G., Kiser, P. D., de Lera, A. R., Lazar, M. A., & Palczewski, K. (2008). Stereospecificity of retinol saturase: absolute configuration, synthesis, and biological evaluation of dihydroretinoids. *J Am Chem Soc*, 130(4), 1154-1155. <https://doi.org/10.1021/ja710487q>
- Moise, A. R., Kuksa, V., Imanishi, Y., & Palczewski, K. (2004). Identification of all-trans-retinol:all-trans-13,14-dihydroretinol saturase. *J Biol Chem*, 279(48), 50230-50242. <https://doi.org/10.1074/jbc.M409130200>
- Moise, A. R., Lobo, G. P., Erokwu, B., Wilson, D. L., Peck, D., Alvarez, S., Domínguez, M., Alvarez, R., Flask, C. A., de Lera, A. R., von Lintig, J., & Palczewski, K. (2010). Increased adiposity in the retinol saturase-knockout mouse. *Faseb j*, 24(4), 1261-1270. <https://doi.org/10.1096/fj.09-147207>
- Montellano, P. R. (2000). The mechanism of heme oxygenase. *Curr Opin Chem Biol*, 4(2), 221-227. [https://doi.org/10.1016/s1367-5931\(99\)00079-4](https://doi.org/10.1016/s1367-5931(99)00079-4)
- Mucha, O., Podkalicka, P., Czarnek, M., Biela, A., Mieczkowski, M., Kachamakova-Trojanowska, N., Stepniowski, J., Jozkowicz, A., Dulak, J., & Loboda, A. (2018). Pharmacological versus genetic inhibition of heme oxygenase-1 - the comparison of metalloporphyrins, shRNA and CRISPR/Cas9 system. *Acta Biochim Pol*, 65(2), 277-286. https://doi.org/10.18388/abp.2017_2542
- Mukundan, L., Odegaard, J. I., Morel, C. R., Heredia, J. E., Mwangi, J. W., Ricardo-Gonzalez, R. R., Goh, Y. P., Eagle, A. R., Dunn, S. E., Awakuni, J. U., Nguyen, K. D., Steinman, L., Michie, S. A., & Chawla, A. (2009). PPAR-delta senses and orchestrates clearance of apoptotic cells to promote tolerance. *Nat Med*, 15(11), 1266-1272. <https://doi.org/10.1038/nm.2048>
- Murray, P. J., Allen, J. E., Biswas, S. K., Fisher, E. A., Gilroy, D. W., Goerdts, S., Gordon, S., Hamilton, J. A., Ivashkiv, L. B., Lawrence, T., Locati, M., Mantovani, A., Martinez, F. O., Mege, J. L., Mosser, D. M., Natoli, G., Saeij, J. P., Schultze, J. L., Shirey, K. A., . . . Wynn, T.

- A. (2014). Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity*, 41(1), 14-20. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.06.008>
- N, A. G., Bensinger, S. J., Hong, C., Beceiro, S., Bradley, M. N., Zelcer, N., Deniz, J., Ramirez, C., Díaz, M., Gallardo, G., de Galarreta, C. R., Salazar, J., Lopez, F., Edwards, P., Parks, J., Andujar, M., Tontonoz, P., & Castrillo, A. (2009). Apoptotic cells promote their own clearance and immune tolerance through activation of the nuclear receptor LXR. *Immunity*, 31(2), 245-258. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.06.018>
- Nagata, S. (2010). Apoptosis and autoimmune diseases. *Ann N Y Acad Sci*, 1209, 10-16. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05749.x>
- Nagata, S., Hanayama, R., & Kawane, K. (2010). Autoimmunity and the clearance of dead cells. *Cell*, 140(5), 619-630. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.02.014>
- Nakagawa, T., Li, J.H., Garcia, G., Mu, W., Piek, E., Böttinger, E.P., Chen, Y., Zhu, H.J., Kang, D.H., Schreiner, G.F., Lan, H.Y., Johnson, R.J. (2004) TGF-beta induces proangiogenic and antiangiogenic factors via parallel but distinct Smad pathways. *Kidney Int.* 66(2):605-13. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2004.00780.x>
- Nakano, T., Ishimoto, Y., Kishino, J., Umeda, M., Inoue, K., Nagata, K., Ohashi, K., Mizuno, K., & Arita, H. (1997). Cell adhesion to phosphatidylserine mediated by a product of growth arrest-specific gene 6. *J Biol Chem*, 272(47), 29411-29414. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.47.29411>
- Nakaya, M., Kitano, M., Matsuda, M., & Nagata, S. (2008). Spatiotemporal activation of Rac1 for engulfment of apoptotic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(27), 9198-9203. <https://doi.org/10.1073/pnas.0803677105>
- Napoli, J. L. (1999). Retinoic acid: its biosynthesis and metabolism. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 63, 139-188. [https://doi.org/10.1016/s0079-6603\(08\)60722-9](https://doi.org/10.1016/s0079-6603(08)60722-9)
- Nishi, C., Toda, S., Segawa, K., & Nagata, S. (2014). Tim4- and MerTK-mediated engulfment of apoptotic cells by mouse resident peritoneal macrophages. *Mol Cell Biol*, 34(8), 1512-1520. <https://doi.org/10.1128/mcb.01394-13>
- Obeid, M., Panaretakis, T., Joza, N., Tufi, R., Tesniere, A., van Endert, P., Zitvogel, L., & Kroemer, G. (2007). Calreticulin exposure is required for the immunogenicity of gamma-

irradiation and UVC light-induced apoptosis. *Cell Death Differ*, 14(10), 1848-1850. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402201>

Ogawa, K., Sun, J., Taketani, S., Nakajima, O., Nishitani, C., Sassa, S., Hayashi, N., Yamamoto, M., Shibahara, S., Fujita, H., & Igarashi, K. (2001). Heme mediates derepression of Maf recognition element through direct binding to transcription repressor Bach1. *Embo j*, 20(11), 2835-2843. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.11.2835>

Ogden, C. A., deCathelineau, A., Hoffmann, P. R., Bratton, D., Ghebrehiwet, B., Fadok, V. A., & Henson, P. M. (2001). C1q and mannose binding lectin engagement of cell surface calreticulin and CD91 initiates macropinocytosis and uptake of apoptotic cells. *J Exp Med*, 194(6), 781-795. <https://doi.org/10.1084/jem.194.6.781>

Olazabal, I. M., Caron, E., May, R. C., Schilling, K., Knecht, D. A., & Machesky, L. M. (2002). Rho-kinase and myosin-II control phagocytic cup formation during CR, but not FcγR, phagocytosis. *Curr Biol*, 12(16), 1413-1418. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(02\)01069-2](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(02)01069-2)

Pae, H. O., & Chung, H. T. (2009). Heme oxygenase-1: its therapeutic roles in inflammatory diseases. *Immune Netw*, 9(1), 12-19. <https://doi.org/10.4110/in.2009.9.1.12>

Paine, A., Eiz-Vesper, B., Blasczyk, R., & Immenschuh, S. (2010). Signaling to heme oxygenase-1 and its anti-inflammatory therapeutic potential. *Biochem Pharmacol*, 80(12), 1895-1903. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2010.07.014>

Pang, X. Y., Wang, S., Jurczak, M. J., Shulman, G. I., & Moise, A. R. (2017). Retinol saturase modulates lipid metabolism and the production of reactive oxygen species. *Arch Biochem Biophys*, 633, 93-102. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2017.09.009>

Park, D., Han, C. Z., Elliott, M. R., Kinchen, J. M., Trampont, P. C., Das, S., Collins, S., Lysiak, J. J., Hoehn, K. L., & Ravichandran, K. S. (2011). Continued clearance of apoptotic cells critically depends on the phagocyte Ucp2 protein. *Nature*, 477(7363), 220-224. <https://doi.org/10.1038/nature10340>

Park, D., Tosello-Trampont, A. C., Elliott, M. R., Lu, M., Haney, L. B., Ma, Z., Klivanov, A. L., Mandell, J. W., & Ravichandran, K. S. (2007). BAI1 is an engulfment receptor for apoptotic cells upstream of the ELMO/Dock180/Rac module. *Nature*, 450(7168), 430-434. <https://doi.org/10.1038/nature06329>

- Park, S. Y., Jung, M. Y., Kim, H. J., Lee, S. J., Kim, S. Y., Lee, B. H., Kwon, T. H., Park, R. W., & Kim, I. S. (2008). Rapid cell corpse clearance by stabilin-2, a membrane phosphatidylserine receptor. *Cell Death Differ*, 15(1), 192-201. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402242>
- Park, S. Y., & Kim, I. S. (2017). Engulfment signals and the phagocytic machinery for apoptotic cell clearance. *Exp Mol Med*, 49(5), e331. <https://doi.org/10.1038/emm.2017.52>
- Perdiguerro, E. G., & Geissmann, F. (2016). The development and maintenance of resident macrophages. *Nat Immunol*, 17(1), 2-8. <https://doi.org/10.1038/ni.3341>
- Philip, M., Funkhouser, S. A., Chiu, E. Y., Phelps, S. R., Delrow, J. J., Cox, J., Fink, P. J., & Abkowitz, J. L. (2015). Heme exporter FLVCR is required for T cell development and peripheral survival. *J Immunol*, 194(4), 1677-1685. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1402172>
- Pitman, M. R., Costabile, M., & Pitson, S. M. (2016). Recent advances in the development of sphingosine kinase inhibitors. *Cell Signal*, 28(9), 1349-1363. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2016.06.007>
- Poss, K. D., & Tonegawa, S. (1997). Heme oxygenase 1 is required for mammalian iron reutilization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(20), 10919-10924. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.20.10919>
- Qi, N., Liu, P., Zhang, Y., Wu, H., Chen, Y., & Han, D. (2013). Development of a spontaneous liver disease resembling autoimmune hepatitis in mice lacking tyro3, axl and mer receptor tyrosine kinases. *PLoS One*, 8(6), e66604. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066604>
- Rabinovitch, M. (1995). Professional and non-professional phagocytes: an introduction. *Trends Cell Biol*, 5(3), 85-87. [https://doi.org/10.1016/s0962-8924\(00\)88955-2](https://doi.org/10.1016/s0962-8924(00)88955-2)
- Radhakrishnan, N., Yadav, S. P., Sachdeva, A., Pruthi, P. K., Sawhney, S., Piplani, T., Wada, T., & Yachie, A. (2011). Human heme oxygenase-1 deficiency presenting with hemolysis, nephritis, and asplenia. *J Pediatr Hematol Oncol*, 33(1), 74-78. <https://doi.org/10.1097/MPH.0b013e3181fd2aae>
- Ravichandran, K. S. (2010). Find-me and eat-me signals in apoptotic cell clearance: progress and conundrums. *J Exp Med*, 207(9), 1807-1817. <https://doi.org/10.1084/jem.20101157>
- Ravichandran, K. S., & Lorenz, U. (2007). Engulfment of apoptotic cells: signals for a good meal. *Nat Rev Immunol*, 7(12), 964-974. <https://doi.org/10.1038/nri2214>

- Razi, S., Yaghmoorian Khojini, J., Kargarijam, F., Panahi, S., Tahershamsi, Z., Tajbakhsh, A., & Gheibihayat, S. M. (2023). Macrophage efferocytosis in health and disease. *Cell Biochem Funct*, 41(2), 152-165. <https://doi.org/10.1002/cbf.3780>
- Repa, J. J., Hanson, K. K., & Clagett-Dame, M. (1993). All-trans-retinol is a ligand for the retinoic acid receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(15), 7293-7297. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.15.7293>
- Ricchetti, G. A., Williams, L. M., & Foxwell, B. M. (2004). Heme oxygenase 1 expression induced by IL-10 requires STAT-3 and phosphoinositide-3 kinase and is inhibited by lipopolysaccharide. *J Leukoc Biol*, 76(3), 719-726. <https://doi.org/10.1189/jlb.0104046>
- Riento, K., & Ridley, A. J. (2003). Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4(6), 446-456. <https://doi.org/10.1038/nrm1128>
- Rosen, H., & Goetzl, E. J. (2005). Sphingosine 1-phosphate and its receptors: an autocrine and paracrine network. *Nat Rev Immunol*, 5(7), 560-570. <https://doi.org/10.1038/nri1650>
- Ross, K. R., Corey, D. A., Dunn, J. M., & Kelley, T. J. (2007). SMAD3 expression is regulated by mitogen-activated protein kinase kinase-1 in epithelial and smooth muscle cells. *Cell Signal*, 19(5), 923-931. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2006.11.008>
- Roszer, T., Menéndez-Gutiérrez, M. P., Lefterova, M. I., Alameda, D., Núñez, V., Lazar, M. A., Fischer, T., & Ricote, M. (2011). Autoimmune kidney disease and impaired engulfment of apoptotic cells in mice with macrophage peroxisome proliferator-activated receptor gamma or retinoid X receptor alpha deficiency. *J Immunol*, 186(1), 621-631. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002230>
- Ryter, S. W., Alam, J., & Choi, A. M. (2006). Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications. *Physiol Rev*, 86(2), 583-650. <https://doi.org/10.1152/physrev.00011.2005>
- Ryter, S. W., & Choi, A. M. (2016). Targeting heme oxygenase-1 and carbon monoxide for therapeutic modulation of inflammation. *Transl Res*, 167(1), 7-34. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2015.06.011>
- Sághy, T., Köröskényi, K., Hegedűs, K., Antal, M., Bankó, C., Bacsó, Z., Papp, A., Stienstra, R., & Szondy, Z. (2019). Loss of transglutaminase 2 sensitizes for diet-induced obesity-related

inflammation and insulin resistance due to enhanced macrophage c-Src signaling. *Cell Death Dis*, 10(6), 439. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1677-z>

Sándor, K., Pallai, A., Duró, E., Legendre, P., Couillin, I., Sághy, T., & Szondy, Z. (2017). Adenosine produced from adenine nucleotides through an interaction between apoptotic cells and engulfing macrophages contributes to the appearance of transglutaminase 2 in dying thymocytes. *Amino Acids*, 49(3), 671-681. <https://doi.org/10.1007/s00726-016-2257-5>

Sarang, Z., Joós, G., Garabuczi, É., Rühl, R., Gregory, C. D., & Szondy, Z. (2014). Macrophages engulfing apoptotic cells produce nonclassical retinoids to enhance their phagocytic capacity. *J Immunol*, 192(12), 5730-5738. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400284>

Sarang, Z., Mádi, A., Koy, C., Varga, S., Glocker, M. O., Ucker, D. S., Kuchay, S., Chishti, A. H., Melino, G., Fésüs, L., & Szondy, Z. (2007). Tissue transglutaminase (TG2) facilitates phosphatidylserine exposure and calpain activity in calcium-induced death of erythrocytes. *Cell Death Differ*, 14(10), 1842-1844. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402193>

Sarang, Z., Sághy, T., Budai, Z., Ujlaky-Nagy, L., Bedekovics, J., Beke, L., Méhes, G., Nagy, G., Rühl, R., Moise, A. R., Palczewski, K., & Szondy, Z. (2019). Retinol Saturase Knock-Out Mice are Characterized by Impaired Clearance of Apoptotic Cells and Develop Mild Autoimmunity. *Biomolecules*, 9(11). <https://doi.org/10.3390/biom9110737>

Savill, J., Dransfield, I., Hogg, N., & Haslett, C. (1990). Vitronectin receptor-mediated phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *Nature*, 343(6254), 170-173. <https://doi.org/10.1038/343170a0>

Schif-Zuck, S., Gross, N., Assi, S., Rostoker, R., Serhan, C. N., & Ariel, A. (2011). Saturated-efferocytosis generates pro-resolving CD11b low macrophages: modulation by resolvins and glucocorticoids. *Eur J Immunol*, 41(2), 366-379. <https://doi.org/10.1002/eji.201040801>

Schupp, M., Lefterova, M. I., Janke, J., Leitner, K., Cristancho, A. G., Mullican, S. E., Qatanani, M., Szwegold, N., Steger, D. J., Curtin, J. C., Kim, R. J., Suh, M. J., Albert, M. R., Engeli, S., Gudas, L. J., & Lazar, M. A. (2009). Retinol saturase promotes adipogenesis and is downregulated in obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(4), 1105-1110. <https://doi.org/10.1073/pnas.0812065106>

Scott, R. S., McMahon, E. J., Pop, S. M., Reap, E. A., Caricchio, R., Cohen, P. L., Earp, H. S., & Matsushima, G. K. (2001). Phagocytosis and clearance of apoptotic cells is mediated by MER. *Nature*, 411(6834), 207-211. <https://doi.org/10.1038/35075603>

Seamon, K. B., Padgett, W., & Daly, J. W. (1981). Forskolin: unique diterpene activator of adenylate cyclase in membranes and in intact cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78(6), 3363-3367. <https://doi.org/10.1073/pnas.78.6.3363>

Shan, Y., Lambrecht, R. W., Ghaziani, T., Donohue, S. E., & Bonkovsky, H. L. (2004). Role of Bach-1 in regulation of heme oxygenase-1 in human liver cells: insights from studies with small interfering RNAs. *J Biol Chem*, 279(50), 51769-51774. <https://doi.org/10.1074/jbc.M409463200>

Shapouri-Moghaddam, A., Mohammadian, S., Vazini, H., Taghadosi, M., Esmaili, S. A., Mardani, F., Seifi, B., Mohammadi, A., Afshari, J. T., & Sahebkar, A. (2018). Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J Cell Physiol*, 233(9), 6425-6440. <https://doi.org/10.1002/jcp.26429>

Sheng, J., Ruedl, C., & Karjalainen, K. (2015). Most Tissue-Resident Macrophages Except Microglia Are Derived from Fetal Hematopoietic Stem Cells. *Immunity*, 43(2), 382-393. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.07.016>

Shibahara, S. (2003). The heme oxygenase dilemma in cellular homeostasis: new insights for the feedback regulation of heme catabolism. *Tohoku J Exp Med*, 200(4), 167-186. <https://doi.org/10.1620/tjem.200.167>

Shibuya, M. (2011). Vascular Endothelial Growth Faktor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis: A Crucial Target for Anti- and Pro-Angiogenic Therapies. *Genes Cancer*, 2(12), 1097-1105. <https://doi.org/10.1177/1947601911423031>

Shin, D. J., Joshi, P., Hong, S. H., Mosure, K., Shin, D. G., & Osborne, T. F. (2012). Genome-wide analysis of FoxO1 binding in hepatic chromatin: potential involvement of FoxO1 in linking retinoid signaling to hepatic gluconeogenesis. *Nucleic Acids Res*, 40(22), 11499-11509. <https://doi.org/10.1093/nar/gks932>

Sun, J., Hoshino, H., Takaku, K., Nakajima, O., Muto, A., Suzuki, H., Tashiro, S., Takahashi, S., Shibahara, S., Alam, J., Taketo, M. M., Yamamoto, M., & Igarashi, K. (2002). Hemoprotein Bach1 regulates enhancer availability of heme oxygenase-1 gene. *Embo j*, 21(19), 5216-5224. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf516>

Sun, S.X., Guo, H.H., Zhang, J., Yu, B., Sun, K.N., Jin, Q.H. (2014) BMP-2 and titanium particles synergistically activate osteoclast formation. *Braz J Med Biol Res.* 47(6):461-9. <https://doi.org/10.1590/1414-431x20132966>.

Sun, Y., Ng, L., Lam, W., Lo, C. K., Chan, P. T., Yuen, Y. L., Wong, P. F., Tsang, D. S., Cheung, W. T., & Lee, S. S. (2008). Identification and characterization of a novel mouse peroxisome proliferator-activated receptor alpha-regulated and starvation-induced gene, Ppsig. *Int J Biochem Cell Biol*, 40(9), 1775-1791. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2008.01.006>

Szondy, Z., Al-Zaeed, N., Tarban, N., Fige, É., Garabuczi, É., & Sarang, Z. (2022). Involvement of phosphatidylserine receptors in the skeletal muscle regeneration: therapeutic implications. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, 13(4), 1961-1973. <https://doi.org/10.1002/jcsm.13024>

Szondy, Z., Garabuczi, E., Joós, G., Tsay, G. J., & Sarang, Z. (2014). Impaired clearance of apoptotic cells in chronic inflammatory diseases: therapeutic implications. *Front Immunol*, 5, 354. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00354>

Szondy, Z., Sarang, Z., Kiss, B., Garabuczi, É., & Köröskényi, K. (2017). Anti-inflammatory Mechanisms Triggered by Apoptotic Cells during Their Clearance. *Front Immunol*, 8, 909. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00909>

Taefehshokr, N., Yin, C., & Heit, B. (2021). Rab GTPases in the differential processing of phagocytosed pathogens versus efferocytosed apoptotic cells. *Histol Histopathol*, 36(2), 123-135. <https://doi.org/10.14670/hh-18-252>

Tenhunen, R., Marver, H. S., & Schmid, R. (1969). Microsomal heme oxygenase. Characterization of the enzyme. *J Biol Chem*, 244(23), 6388-6394.

Thorp, E., Cui, D., Schrijvers, D. M., Kuriakose, G., & Tabas, I. (2008). Mertk receptor mutation reduces efferocytosis efficiency and promotes apoptotic cell accumulation and plaque necrosis in atherosclerotic lesions of apoe^{-/-} mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 28(8), 1421-1428. <https://doi.org/10.1161/atvbaha.108.167197>

Toda, S., Segawa, K., & Nagata, S. (2014). MerTK-mediated engulfment of pyrenocytes by central macrophages in erythroblastic islands. *Blood*, 123(25), 3963-3971. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-01-547976>

Tosello-Trampont, A. C., Kinchen, J. M., Brugnera, E., Haney, L. B., Hengartner, M. O., & Ravichandran, K. S. (2007). Identification of two signaling submodules within the

CrkII/ELMO/Dock180 pathway regulating engulfment of apoptotic cells. *Cell Death Differ*, 14(5), 963-972. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402094>

Tosello-Trampont, A. C., Nakada-Tsukui, K., & Ravichandran, K. S. (2003). Engulfment of apoptotic cells is negatively regulated by Rho-mediated signaling. *J Biol Chem*, 278(50), 49911-49919. <https://doi.org/10.1074/jbc.M306079200>

Tóth, B., Garabuczi, E., Sarang, Z., Vereb, G., Vámosi, G., Aeschlimann, D., Blaskó, B., Bécsi, B., Erdődi, F., Lacy-Hulbert, A., Zhang, A., Falasca, L., Birge, R. B., Balajthy, Z., Melino, G., Fésüs, L., & Szondy, Z. (2009). Transglutaminase 2 is needed for the formation of an efficient phagocyte portal in macrophages engulfing apoptotic cells. *J Immunol*, 182(4), 2084-2092. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0803444>

Tóth, K., Sarang, Z., Scholtz, B., Brázda, P., Ghyselinck, N., Chambon, P., Fésüs, L., & Szondy, Z. (2011). Retinoids enhance glucocorticoid-induced apoptosis of T cells by facilitating glucocorticoid receptor-mediated transcription. *Cell Death Differ*, 18(5), 783-792. <https://doi.org/10.1038/cdd.2010.136>

Truman, L. A., Ford, C. A., Pasikowska, M., Pound, J. D., Wilkinson, S. J., Dumitriu, I. E., Melville, L., Melrose, L. A., Ogden, C. A., Nibbs, R., Graham, G., Combadiere, C., & Gregory, C. D. (2008). CX3CL1/fractalkine is released from apoptotic lymphocytes to stimulate macrophage chemotaxis. *Blood*, 112(13), 5026-5036. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-06-162404>

Tsai, R. K., & Discher, D. E. (2008). Inhibition of "self" engulfment through deactivation of myosin-II at the phagocytic synapse between human cells. *J Cell Biol*, 180(5), 989-1003. <https://doi.org/10.1083/jcb.200708043>

Turkseven, S., Kruger, A., Mingone, C. J., Kaminski, P., Inaba, M., Rodella, L. F., Ikehara, S., Wolin, M. S., & Abraham, N. G. (2005). Antioxidant mechanism of heme oxygenase-1 involves an increase in superoxide dismutase and catalase in experimental diabetes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 289(2), H701-707. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00024.2005>

Unsworth, A. J., Flora, G. D., & Gibbins, J. M. (2018). Non-genomic effects of nuclear receptors: insights from the anucleate platelet. *Cardiovasc Res*, 114(5), 645-655. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvy044>

- Van Haastert, P. J., Van Driel, R., Jastorff, B., Baraniak, J., Stec, W. J., & De Wit, R. J. (1984). Competitive cAMP antagonists for cAMP-receptor proteins. *J Biol Chem*, 259(16), 10020-10024.
- Varol, C., Mildner, A., & Jung, S. (2015). Macrophages: development and tissue specialization. *Annu Rev Immunol*, 33, 643-675. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032414-112220>
- Vellozo, N. S., Pereira-Marques, S. T., Cabral-Piccin, M. P., Filardy, A. A., Ribeiro-Gomes, F. L., Rigoni, T. S., DosReis, G. A., & Lopes, M. F. (2017). All-Trans Retinoic Acid Promotes an M1- to M2-Phenotype Shift and Inhibits Macrophage-Mediated Immunity to *Leishmania major*. *Front Immunol*, 8, 1560. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01560>
- Vijayan, V., Wagener, F., & Immenschuh, S. (2018). The macrophage heme-heme oxygenase-1 system and its role in inflammation. *Biochem Pharmacol*, 153, 159-167. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.02.010>
- Vitali, S. H., Fernandez-Gonzalez, A., Nadkarni, J., Kwong, A., Rose, C., Mitsialis, S. A., & Kourembanas, S. (2020). Heme oxygenase-1 dampens the macrophage sterile inflammasome response and regulates its components in the hypoxic lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 318(1), L125-L134. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00074.2019>
- Voll, R. E., Herrmann, M., Roth, E. A., Stach, C., Kalden, J. R., & Girkontaite, I. (1997). Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature*, 390(6658), 350-351. <https://doi.org/10.1038/37022>
- Wang, S., Jiang, H., Zheng, C., Gu, M., & Zheng, X. (2022). Secretion of BMP-2 by tumor-associated macrophages (TAM) promotes microcalcifications in breast cancer. *BMC Cancer*, 22(1), 34. <https://doi.org/10.1186/s12885-021-09150-3>
- Weed, R. I., Reed, C. F., & Berg, G. (1963). Is hemoglobin an essential structural component of human erythrocyte membranes? *J Clin Invest*, 42(4), 581-588. <https://doi.org/10.1172/jci104747>
- Weis, N., Weigert, A., von Knethen, A., & Brüne, B. (2009). Heme oxygenase-1 contributes to an alternative macrophage activation profile induced by apoptotic cell supernatants. *Mol Biol Cell*, 20(5), 1280-1288. <https://doi.org/10.1091/mbc.e08-10-1005>
- Werner, F., Jain, M. K., Feinberg, M. W., Sibinga, N. E., Pellacani, A., Wiesel, P., Chin, M. T., Topper, J. N., Perrella, M. A., & Lee, M. E. (2000). Transforming growth factor-beta 1

inhibition of macrophage activation is mediated via Smad3. *J Biol Chem*, 275(47), 36653-36658. <https://doi.org/10.1074/jbc.M004536200>

Woods, A., Dickerson, K., Heath, R., Hong, S. P., Momcilovic, M., Johnstone, S. R., Carlson, M., & Carling, D. (2005). Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells. *Cell Metab*, 2(1), 21-33. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2005.06.005>

Wrana, J.L., Attisano, L., Wieser, R., Ventura, F., Massagué, J. (1994) Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. *Nature*. 370(6488):341-7. <https://doi.org/10.1038/370341a0>.

Yamaguchi, H., Maruyama, T., Urade, Y., & Nagata, S. (2014). Immunosuppression via adenosine receptor activation by adenosine monophosphate released from apoptotic cells. *Elife*, 3, e02172. <https://doi.org/10.7554/eLife.02172>

Zajd, C. M., Ziemba, A. M., Miralles, G. M., Nguyen, T., Feustel, P. J., Dunn, S. M., Gilbert, R. J., & Lennartz, M. R. (2020). Bone Marrow-Derived and Elicited Peritoneal Macrophages Are Not Created Equal: The Questions Asked Dictate the Cell Type Used. *Front Immunol*, 11, 269. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00269>

Zhang, Y.E. Non-Smad pathways in TGF-beta signaling. (2009) *Cell Res*. (1):128-39. <https://doi.org/10.1038/cr.2008.328>.

Zou, M. L., Chen, Z. H., Teng, Y. Y., Liu, S. Y., Jia, Y., Zhang, K. W., Sun, Z. L., Wu, J. J., Yuan, Z. D., Feng, Y., Li, X., Xu, R. S., & Yuan, F. L. (2021). The Smad Dependent TGF- β and BMP Signaling Pathway in Bone Remodeling and Therapies. *Front Mol Biosci*, 8, 593310. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.593310>

www.proteinatlas.org/ENSG00000100292-HMOX1/tissue (accessed on 1 November 2017).

12. KÖZLEMÉNYEK



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/347/2023.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Vincze-Fige Éva

Doktori Iskola: Fogorvostudományi Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Vincze-Fige, É.**, Sarang, Z., Sós, L., Szondy, Z.: Retinoids Promote Mouse Bone Marrow-Derived Macrophage Differentiation and Efferocytosis via Upregulating Bone Morphogenetic Protein-2 and Smad3.
Cells. 11 (18), 1-22, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/cells11182928>
IF: 6
2. **Vincze-Fige, É.**, Szendrei, J., Sós, L., Kraszevska, I., Potor, L., Balla, J., Szondy, Z.: Heme Oxygenase-1 Contributes to Both the Engulfment and the Anti-Inflammatory Program of Macrophages during Efferocytosis.
Cells. 10 (3), 652-669, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/cells10030652>
IF: 7.666





További közlemények

3. Garabuczi, É., Tarban, N., **Vincze-Fige, É.**, Patsalos, A., Halász, L., Szendi-Szalmári, T., Sarang, Z., Király, R., Szondy, Z.: Nur77 and PPAR γ regulate transcription and polarization in distinct subsets of M2-like reparative macrophages during regenerative inflammation.
Front. Immunol. 14, 1-14, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2023.1139204>
IF: 7.3 (2022)
4. Szondy, Z., Al Zaeed, N., Tarban, N., **Vincze-Fige, É.**, Garabuczi, É., Sarang, Z.: Involvement of phosphatidylserine receptors in the skeletal muscle regeneration: therapeutic implications.
J. Cachexia Sarcopenia Muscle. 13 (4), 1961-1973, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/jcsm.13024>
IF: 8.9

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 29,866

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
13,666**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudománymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2023.07.11.



13. TÁRGYSZAVAK

adenozin A_{2A} receptor
BACH1
BMP-2
dihidroretinol
efferocitózis
gyulladás
hemoxigenáz-1
makrofág differenciáció
retinoidok
Smad3

14. KEYWORDS

adenosine A_{2A} receptor
BACH1
BMP-2
dihydroretinol
efferocytosis
inflammation
heme oxygenase-1
macrophage differentiation
retinoids
Smad3

15. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsősorban köszönettel tartozom témavezetőmnek, Prof. Dr. Szondy Zsuzsának, akihez bármikor fordulhattam, mindig segített és tanácsokkal látott el a kutatásokkal kapcsolatban, valamint nem utolsósorban motivált a konferenciákon való részvételekkel.

Köszönöm a Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet igazgatójának, Prof. Dr. Tőzsér Józsefnek, hogy az intézet hallgatójaként részt vehettem a PhD képzésben.

Hálás szívvel gondolok vissza a PhD hallgatóként eltöltött évekre, amiben nagy szerepe van a kollégáimnak (Dr. Budai Zsófia, Dr. Perjési-Kiss Beáta, Dr. Péntek-Garabuczi Éva, Dr. Köröskényi Krisztina és Dr. Sarang Zsolt). Nem csak szakmai tudásukkal segítettek, hanem a barátaimná is váltak. Külön köszönöm Sós Lászlónak a kísérletek kivitelezésében nyújtott segítségét.

Köszönöm Szegediné Szilágyi Piroska, Erdős Evelin, valamint a teljes Kísérleti Állatház kiváló háttérmunkáját.

A lengyelországi tanulmányutam során szerzett tapasztalataimért hálás vagyok Prof. Dr. József Dulaknak, Agnieszka Jazwa-Kusiornak és Izabela Krasewskanak, akiktől nem csak a HO-1 hiányos egereket kaptam, hanem rengeteg segítséget és támogatást is az ott töltött időszakban.

Nem tartanék ma itt, ha nincs mögöttem teljes mellszélességgel a családom. Köszönöm a szüleimnek, hogy minden döntésemben támogattak, folyamatosan érdeklődtek a munkám felől és „időt” is biztosítottak az értekezés megírásához; a testvéremnek, hogy olyankor is lelket öntött belém, amikor másnak nehezen sikerült; a férjemnek, aki megvigasztalt a nehezebb pillanatokban, és bátorított a folytatásra; a kisfiamnak, aki nagyon jól és sokat aludt, hogy én tudjak közben az értekezéssel foglalkozni; valamint a barátaimnak, akik egy-egy jó beszélgetéssel járultak hozzá a mentális egészségemhez.

Végezetül köszönöm az alábbi pályázatok támogatását: National Research, Development and Innovation Office (124244 és 138162); GINOP-2.3.2-15-2016-00006 projekt (az Európai Unió és az Európai Regionális Fejlesztési Alap társfinanszírozásával); EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-0009 projekt; EFOP3.4.2-VEKOP-15-2015-00001 projekt.

16. FÜGGELÉK