

Doktori (PhD) értekezés tézisei

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

Vincze-Fige Éva

Témavezető: Dr. Szondy Zsuzsanna



DEBRECENI EGYETEM  
Fogorvostudományi Doktori Iskola  
Debrecen, 2023

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

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében  
a klinikai orvostudományok tudományágban

Írta: Vincze-Fige Éva  
okleveles molekuláris biológus

Készült a Debreceni Egyetem Fogorvostudományi doktori iskolája keretében

Témavezető: Prof. Dr. Szondy Zsuzsanna, az MTA doktora

Az értekezés bírálói: Dr. Sándor Noémi, PhD  
Dr. Koncz Gábor, PhD

A bírálóbizottság:  
elnök: Prof. Dr. Nánási Péter, az MTA doktora  
tagok: Dr. Sándor Noémi, PhD  
Prof. Dr. Dombrádi Viktor, az MTA doktora  
Ifj. Prof. Dr. Gallyas Ferenc, az MTA doktora  
Dr. Koncz Gábor, PhD

Az értekezés védésének helye és időpontja:  
Debreceni Egyetem ÁOK, Gyermekgyógyászati Intézet tanterme

2023. december 4., 11 óra

## 1. 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 elpusztult sejtek eltávolítása, azaz az efferocitózis. Az elhalt sejtek eltakarítási folyamatában jelentkező hibák esetén az el nem távolított sejtek szétesnek, gyulladás alakul ki a szövetekben, ami ezáltal károsodik, és hosszú távon autoimmun, illetve más, krónikus gyulladással járó megbetegedések fejlődnek ki, például reumatoid artritisz. Az eltávolításban fontos szerepet játszanak a makrofágok, melyek érzékelik, felismerik, bekebelezik és lebontják 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. Érdekelt, hogy egy eddig kevésbé vizsgált, új retinoid, a dihidroretinol, melyet a retinol szaturáz enzim hoz létre, hogyan hat a makrofágok sejtfelvevő képességére, ha a monocita-makrofág érés során jelen van. Továbbá vizsgáltam, hogy az érett makrofágokban az elhalt sejtek felvétele során észlelt hemoxigenáz-1 enzim magas indukciója miatt, illetve hogyan történik olyan sejtek felvétele esetén is, amelyek hemtartalma nagyon alacsony. Minden apró részlet, ami közelebb visz minket az elhalt sejtek eltávolítása során zajló molekuláris mechanizmusok pontosabb ismeretéhez, hasznos lehet olyan kezelések kialakításában, melyek a fentebb említett autoimmun és gyulladásos megbetegedések leküzdésében segíthetnek.

## 2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

### 2.1. Efferocitózis

Becslések szerint naponta nagyjából 200 - 300 milliárd sejt pusztul el és termelődik újra a test különböző szöveteiben. A nem kívánt sejtpopulációk eltávolítása genetikailag meghatározott módon, immunválasz kiváltása nélkül, szabályozott folyamat révén történik, melyet apoptózisnak nevezünk. Nem kívánt sejtek közé tartoznak az elöregedett, feleslegessé vált, baktériumokkal vagy vírusokkal fertőzött, tumorgenezisre képes vagy helyrehozhatatlanul károsodott sejtek, melyek gyors és megfelelő eliminálása kulcsfontosságú a homeosztázis és a normál egészségi állapot fenntartásában, valamint az autoimmun betegségek, fertőzések vagy a rák kialakulásának megelőzésében is.

Az apoptózissal elhalt sejtek (apoptotikus sejtek) eltávolítása fagocitózissal történik. A sejtmaradványok felvételére hivatásos fagocitáló sejtek, mint amilyenek a makrofágok, valamint nem professzionális fagocitáló sejtek is képesek, például a fibroblaszt sejtek. A két fagocitáló sejtípus abban tér el egymástól, hogy a hivatásos fagocitáló sejtek képesek többféle apoptotikus sejt által kibocsátott jel gyors és hatékony felismerésére, valamint gyulladást keltő vagy gátló anyagok kibocsátására is, attól függően, hogy milyen sejtet, sejtmaradványt bekeleztek be. Az elhalt sejtek fagocitózisa mechanizmusában különbözik a klasszikus értelemben vett fagocitózistól, ezért a folyamatot efferocitózissal nevezték el.

#### 2.1.1. 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 hatva előidézik a professzionális fagocita sejtek migrációját az elhaló sejtek irányába. A „találj meg” jelek lehetnek fehérjék (fraktalkin), lipidek (lizofoszfatidilkolin, LPC), lipidtermékek (szfingozin-1-foszfát, S1P), és nukleotidok (adenozin-trifoszfát, ATP és uridin-trifoszfát UTP).

A „találj meg” jelzéseket a fagocitózásra képes sejtek felszínén található különféle receptorok érzékelik, és elindítják a fagocita vándorlását az elhaló sejt felé. A fraktalkint a CX3C kemokin receptor 1 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. Egyre több bizonyíték támasztja alá, hogy a nukleotidok a monocitákon és makrofágokon található purinerg P2Y2 receptorokon keresztül hatva az előbb felsorolt szignálok jelpályáinak amplifikálásán keresztül indítják el a fagociták mozgását az elhaló sejt felé.

### 2.1.2. Az apoptotikus sejtek felismerése és érzékelése

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, mint amilyen a sejtfelszínen lévő fehérjék glikozilációja, a sejtfelszín töltésének megváltozása, az intercelluláris adhéziós molekula 3 (ICAM3) expressziója, az oxidált-alacsony denzitású lipoprotein (LDL)-szerű helyek és trombospondin kötőhelyek kialakulása, továbbá alapvetően sejten belül található fehérjék, úgymint kalretikulín, annexin I vagy foszfatidilszerin (PS) sejtfelszíni megjelenése. A leginkább ismert, és széles körben tanulmányozott „egyél meg” jel a PS. Az élő sejtekben a PS-t ATP-függő transzlokázok tartják a lipid kettősréteg belső felében, ám amikor a sejt haldoklik, a PS kaspáz-függő módon megjelenik a sejt felszínén. Rendkívül gyors módon, mindössze néhány óra alatt a PS koncentrációja az elhaló sejt felszínén nagyjából 280-szeresre nőhet.

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. A lektinek az elhaló sejt felszínén jelenlévő megváltozott cukormolekulákhoz képesek kötődni, a CD14 az ICAM3-hoz kötődik; valamint a „scavenger” receptorok az oxidált-LDL molekulákhoz kapcsolódnak. Az elhalt sejtek eltakarításában kulcsfontosságú szerepet betöltő PS-t számos membrán receptor képes felismerni, úgymint a stabilin-1 és 2, a TIM-4, vagy az agy-specifikus angiogenezis gátló 1.

A PS vagy oxidált PS felismerését egyes receptorok esetén a receptort a PS-hez kötő hidmolekulák segítik, például az S fehérje, a tej zsírcsomó epidermális növekedési faktor 8 (MFG-E8) és a növekedés specifikus gátló 6 (Gas6). 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. A transzglutamináz 2 (TG2) az integrin  $\beta_3$  koreceptoraként képes megkötni az MFG-E8-at, előidézve ezzel az apoptotikus sejtek felvételét a Rac családdhoz tartozó kis GTPáz 1 (Rac1) aktiválása által. 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. A CD36 az integrin  $\beta_3$  és  $\beta_5$  receptorokkal együtt a trombospondinhoz kötődik; az alacsony denzitású lipoprotein receptor-kapcsolt fehérje 1 (LRP1)/CD91 pedig a kalretikulinnal együtt a komplement C1q komponenshez képes kapcsolódni.

A fagocitáló sejtek nem csak az „egyél meg” jelek alapján tudják megkülönböztetni az élő sejteket az elhaló sejtektől, hanem ún. „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 regulatorikus fehérje (SIRP)-a receptora segítségével, akkor nem történik bekebelezés, még a

PS jelenlétében sem. Apoptózis során a CD47 expressziója jelentősen csökken, segítve ezzel a sejt felvételt. Hasonló funkcióval bír a CD31, valamint a CD24 molekula is.

Az efferocitózis során az elhaló sejtekből kaszpázfüggő módon ATP szabadul fel, mely a makrofágok felszínén adenoziná alakul át, hogy így aktiválja az adenzin receptorokat. A makrofágokról ismert, hogy A2A, A2B és A3 receptorokat fejeznek ki. Az efferocitózis során az A2AR-ok kifejeződése fokozódik, míg az A3R-oké csökken. Ez arra utal, hogy az A3 receptorok közvetítik az adenzin hatását az efferocitózis közben a fagocitózis kezdetén és azt megelőzően, míg később az A2A receptorok hatása válik dominánssá. Saját és más laborok tanulmányai azt mutatják, hogy az adenzin A2A receptorok az adenilát cikláz útvonalat aktiválva hozzájárulnak az apoptotikus sejteltakarítás gyulladáscsökkentő programjához, míg az adenzin A3 receptorok inkább a makrofágok kemotaktikus navigációjában vesznek részt.

### **2.1.3. Az elhalt sejtek eltávolítása**

Amikor az apoptotikus sejttel megtörtént a kapcsolódás, a fagocitáló sejt egy citoskeletális átalakuláson megy keresztül, mely feltétlenül szükséges az elhalt sejt bekebelezéséhez. Ebben a folyamatban fontos szerepet töltenek be a kis G-fehérjék Ras szupercsaládjába tartozó GTPázok: 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 sejtösszehúzódat. A folyamat során a GTP-hez kötött Rac fehérje mennyisége folyamatosan növekszik az apoptotikus sejtek felismerését követően. A Rac aktiválása evolúciósan konzervált esemény, amely kulcsfontosságú az apoptotikus sejtek eltakarítása szempontjából. A folyamatban részt vesz a 180 kDa fehérje, a Dock180 és a bekebelezés és sejtmozgás fehérje 1 (ELMO1) is. Az ELMO képes direkt módon kapcsolódni a Dock180-nal, mely kapcsolódás megnöveli a Dock180 aktivitását és ez azt eredményezi, hogy közvetlenül hozzákapszolódik a transzmembrán receptor BAI1 karboxil végéhez. 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 sejt felvételt. Több fagocita receptort azonosítottak, melyek a Dock180-ELMO útvonalat használják. Ilyenek például az 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 is. 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.

#### **2.1.4. Az elhalt sejt bekebelezését követő folyamatok**

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. A lebontás során a felvett sejt alapvető alkotóelemeire bomlik szét: nukleotidokra, zsírokra, peptidekre és aminosavakra.

Az efferocitózis egyik kulcsfontosságú biológiai jellemzője, hogy nem generál immunogén választ és gyulladásos folyamatokat, ugyanis az apoptotikus sejteket felvevő makrofágok gyulladáscsökkentő citokineket bocsájtanak ki, például transzformáló növekedés faktor (TGF) $\beta$ -át vagy interleukin (IL) 10-et. Ezzel egy időben az apoptotikus sejtek jelenléte gátolja a pro-inflammatórikus citokinek, például tumor nekrosis faktor (TNF), IL-1 és IL-12 termelését.

A TGF- $\beta$  egy multifunkcionális citokin, ami számos fejlődési folyamat szabályozásában vesz részt. A TGF- $\beta$  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, apoptózisát, angiogenezisét, de szerepük van az embrionális fejlődés irányításában is. A ligandok kötődése a BMP szerin/treonin kináz receptorokhoz aktiválja azok kináz aktivitását, melyek a Smad fehérjéket foszforilálva továbbítják a jeleket a receptortól a célgenekhez. 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 foszfátidil-inozitol 3-kináz által irányított jelpályákat. Jelenleg 9 Smad fehérjét ismerünk, melyek közül a Smad2 és Smad3 specifikusan TGF- $\beta$  és aktivin mediátorok. A BMP-2 leginkább a csont falósejtjeinek (oszteoklasztek) kialakulását segíti, főként azért, hogy a kolónia stimuláló faktor-1 expresszióját indukálja az oszteoklasztek képződés során. Bár a BMP-2 általában a Smad 1/5/8 és esetleg 9 transzkripciós faktorokon keresztül hat, kimutatták, hogy egy nem szabályos útvonalon keresztül is hathat, amely a BMP-2/TGF- $\beta$ 1 receptor heterodimereken keresztül aktiválódik, és részét képezi a Smad3 is.

## **2.2. 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.

A legtöbb felnőtt szövetben megtalálható rezidens (szöveti) makrofágok embrionális prekursor sejtekből jönnek létre, és már az embrionális korban a megfelelő szövetbe vándorolnak, ahol felnőtt korban önmegújulás révén tartják fenn magukat. Jelenlegi tudásunk szerint az emlős makrofágok három forrásból fejlődnek ki, ami a hemopoetikus (vérképző) őssejtek három generációjának felel meg. A vérképző őssejtek első generációja már a szikhólyag falában előbukkanó, erősen specializálódott makrofágok: a mikroglia; a második generáció az eritro-mieloid progenitor néven ismert sejtek; a harmadik generáció pedig az aorto-gonado-mezonefrális zóna homogén endotéliumából fejlődik ki, és a különböző szervek, például a máj, további kolonizálása a feladatuk.

A monociták rövid életű, rendkívül képlékeny, 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. 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.

Fontos szem előtt tartani, hogy 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. Az általunk alkalmazott módszer egy általánosan elfogadott, használható modell, ugyanakkor nem szabad elfelejteni, hogy a mikrokörnyezet nagy hatással van a makrofágokra, továbbá *in vitro* körülmények között nem tudunk olyan környezetet teremteni, mint a szövetekben.

### **2.2.1. Makrofág fenotípusok**

A mikrokörnyezet által és a változatos stimulusok hatására létrejövő makrofágokat alapvetően két fő fenotípushoz soroljuk: a patogének eltávolításában részt vevő gyulladáshoz M1, illetve az alternatívan aktiválódó, sejtproliferációban és szöveti regenerálásban részt vevő, gyulladáscsökkentő M2 fenotípushoz.

Ha a makrofágokat patogén-asszociált molekuláris mintázatok vagy gyulladási citokinek, úgymint IL-12, TNF- $\alpha$  vagy interferon (IFN)- $\gamma$  aktiválják, akkor a polarizáció az M1 fenotípus irányába tolódik el. Általánosságban elmondható, hogy az M1 típusú makrofágok veszik fel a harcot az extracelluláris patogénekkal szemben. Az M2 makrofágok inkább a sebgyógyulásban és a



gyulladás csökkentésében játszanak szerepet. A különböző alcsoportokhoz tartozó makrofágok más növekedési faktorokat, citokineket és kemokineket állítanak elő.

Az efferocitózis a makrofágokat az M2 fenotípus felé tolja el, melyre jellemző, hogy csökkenti a gyulladást elősegítő citokinek, úgymint a TNF- $\alpha$ , a kemokin „C-X-C motívum” ligand (CXCL)-8, IL-6 szintjét, és fokozza a gyulladásgátló mediátorok, mint amilyen az IL-10 és a TGF- $\beta$  felszabadulását. 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.

### **2.3. 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), vagy a peroxiszóma proliferátor-aktivált receptorok, melyek képesek érzékelni a felvett apoptotikus sejt mennyiségét, és válaszként 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, ami részben közvetíti a lipidérzékelő receptorok efferocitózis fokozására gyakorolt hatását az elhalt sejtek eltakarítása során. Az apoptotizáló csecsemőmirigyben azonban nem tudták kimutatni a klasszikusan ismert retinsavak termelődését. Ehelyett egy retinaldehid-dehidrogenáz-függő módon előállított vegyületet találtak, ami molekulatömege alapján valószínűleg dihidroretinol származék. Továbbá ezzel párhuzamosan a retinol szaturáz enzim (RetSat) indukcióját is kimutatták.

A RetSat egy ún. oxidoreduktáz, amely a csupa-transz-retinol C13-C14 kettős kötésének sztereospecifikus telítését hajtja végre, ezzel (13R)-csupa-transz-13,14-dihidroretinolt (dihidroretinol, DHR) létrehozva. 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. Vannak, akik úgy gondolják, hogy a 9-cisz-13,14-dihidroretinsav lehet a régóta keresett fiziológiai RXR ligand.

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. Ezenkívül a csontvelőből származó makrofágok 5 napos differenciálódási folyamatának utolsó 2 napján alkalmazott DHR kezelés fokozta a TG2 expressziót, és elősegítette az eredményül kapott makrofágok efferocitózis funkcióját. Ezek az adatok 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, amelyeket korábbi, érett BMDM-okon végzett vizsgálataik során azonosítottak. Mivel egyes tanulmányok azt mutatták, hogy a RetSat útvonal a RAR-receptoroktól függetlenül is működhet a PPAR $\gamma$  vagy a szénhidrát válaszelem-kötő fehérje aktivitásának szabályozásával, ezért a kutatásaim során az egyik célom az volt, hogy meghatározzam, a DHR jelenléte hogyan segíti elő az efferocitózist a monocita/makrofág differenciálódás során.

#### 2.4. Hemoxigenázok

A RetSat<sup>+/+</sup> és RetSat<sup>-/-</sup> BMDM-okon végzett RNS szekvenálás során kollégáim azt találták, hogy RetSat hiányában kevesebb MFG-E8 molekulát termelnek a makrofágok. Ezen kívül észrevették, 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.

A hem egy nélkülözhetetlen molekula minden olyan sejttaggal rendelkező sejt számára, amely érzékeli vagy felhasználja az oxigént. A hem tartalmú fehérjék lebontásából származó szabad hem azonban toxikus a szervezet számára, ezért 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 semlegesíteni a hemet azáltal, hogy szénmonoxiddá, elemi vassá és biliverdinné alakítja. Utóbbit azonnal bilirubinná redukálja a biliverdin redukáz enzim. A HO-1 fontosságát mutatja az a tény, hogy hiánya az étellel szinte összeegyeztethetetlen. A HO-1<sup>+/-</sup> egerek párosítása nem eredményezi a várt mendeli utód arányt, a legtöbb esetben a HO-1 gén null deléciója halálos.

A HO-2 folyamatosan expresszálódó izoforma, míg a HO-1 különböző stimulusok, például UV sugárzás, oxidatív stressz, lipopoliszacharidok stb. hatására indukálódó fehérje. A makrofágokban jellemzően két fő transzkripció faktor aktiválja a HO-1 transzkripcióját: az Nrf2 (nukleáris faktor 2-

höz kapcsolódó faktor 2) és a STAT3 (szignál transzducer és aktivátor transzkripció 3). Fordítva pedig a BTB és CNC homolog 1 (BACH1) és a JunD képesek represszálni a HO-1 expresszióját. Alapesetben a Kelch-szerű ECH-asszociált fehérje 1 (Keap1) gátolja az Nrf2 citoszolból való sejtmagba jutását, valamint segíti a proteoszóma általi lebontását. Ezzel párhuzamosan a sejtmagban található BACH1 heterodimert alkot egy kis Maf fehérjével, és gátolja a HO-1 transzkripcióját azáltal, hogy hozzákapszolódik a Maf felismerő helyhez (MARE). Magas hem koncentráció esetén vagy egyéb prooxidáns stimulus hatására a BACH1 leválk a DNS-ről, kikerül a sejtmagból és inaktíválódik, 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, ezáltal aktiválva a HO-1 átírását. 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. Továbbá a BACH1 486-os tirozinjának foszforilációjával is előidézhető a BACH1 sejtmagból kiinduló exportja.

A metalloporfirinek, például az ön-protoporfirin-IX (SnPPIX), képesek kompetitíven gátolni a HO-1 aktivitást *in vitro* és *in vivo* egyaránt. A HO-1 magasan expresszálódik azokban a szövetekben, ahol nagy számban vannak jelen degradálódó vörösvértestek, például a lépben, a májban és a csontvelőben.

### 3. CÉLKITÚZÉS

- 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.

## 4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### 4.1. Kísérleti állatok

A legtöbb kísérlethez 4 hetes, valamint 2-5 hónapos C57BL/6 egereket használtunk. Néhány esetben azonban BACH1, HO-1, adenosin A<sub>2A</sub> receptor, adenosin A<sub>3</sub> receptor 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 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).

### 4.2. 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 CO<sub>2</sub> jelenlétében tenyésztettük.

A HO-1 tanulmányozása során a csontvelő-eredetű sejteket DMEM sejtenyésző tápfolyadékban (10% FBS, 20% L929 fibroblaszt sejtvonalról származó felülűszó [M-CSF forrásként], 2 mM L-glutamin, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml sztreptomycin) differenciáltattuk 5 napon keresztül. Az 5 napos 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 (eRBC) fagocitózisa és a makrofágok citokin kibocsátásának vizsgálata során használt HO-1<sup>+/+</sup> és <sup>-/-</sup> egerek esetében a csontvelői progenitor sejteket 5 napig, magas glükóztartalmú DMEM médiumban (10% FBS, 10 ng/ml tisztított humán rekombináns M-CSF, 100 U/ml penicillin és 100 µg/ml sztreptomycin) differenciáltattuk.

A retinoidok hatásának tanulmányozása során használt csontvelői progenitorokat 5 napon át tenyésztettük DMEM tápfolyadékban (10% L929 felülűszó, 2 mM L-glutamin, 100 U/ml penicillin és 100 µg/ml sztreptomycin). Azokban a kísérletekben, ahol retinol (ROL), dihidroretinol (DHR), csupa-transz retinsav (ATRA) vagy rekombináns csont morfogenetikus fehérje (rBMP)-2 önmagában vagy AGN194310-zel, egy pan-RAR antagonistával; LDN193189-cel, egy BMP-2 receptor antagonistával; PD98059-cel, egy MEK inhibitorral; SIS3-mal, egy SMAD3 aktivációt gátló vegyülettel; diszulfirammal, egy aldehid dehidrogenáz inhibitorral; vagy N,N-dietilaminobenzaldehiddel (DEAB), egy retinaldehid dehidrogenáz inhibitorral együtt volt jelen, az

adott reagenst a differenciáció 4. napjának kezdetén adtuk a sejtkultúrához, majd a 2-6 vagy 48 óra múlva összegyűjtött sejteket totál mRNA szekvenáláshoz, RT-qPCR-hoz vagy efferocitózis vizsgálatokhoz használtuk fel.

#### **4.3. Apoptotikus timociták és eriptotikus vörösvértettek létrehozása *in vitro***

A kísérletekhez használt apoptotikus timocitákat 4 hetes C57BL/6 egerek csecsemőmirigyéből kinyert timocitákból, széruméheztetéssel hoztuk létre. Az FBS hiányának következtében a sejtelhalás mértéke 24 órás tenyésztést követően propidium jodid/annexinV-FITC festés alapján több, mint 80%.

Néhány kísérlethez eriptotikus vörösvértetteket (eRBCs) 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 vérből centrifugálást követően a plazmát és a fehérvérsejteket eltávolítottuk. A vörösvértetteket 4 °C-on tartva háromszor mostuk Hanks' sóoldattal, majd ionomicinnel kezeltük 2,5 órán keresztül. A sejtelhalás mértéke ebben az esetben is körülbelül 80%-os.

#### **4.4. Timociták apoptózisa során keletkező felülűszó**

A timocitákat a 24 órás széruméheztetéssel történő elhalás során bizonyos esetekben Z-VAD-FMK-val kezeltük. Az elhaló sejtek sejtkultúrák médiumát centrifugálást követően összegyűjtöttük, és 0,22 µm-es steril fecskendő szűrőn átszűrtük, hogy eltávolítsuk az apoptotikus testecskéket. A felülűszót 20% FBS tartalmú DMEM médiummal keverve 1:1 arányban adtuk a makrofágokhoz.

#### **4.5. Efferocitózis vizsgálatok**

Az áramlási citometriás kísérletekhez használt apoptotikus timocitákat Cell Tracker DeepRed fluoreszcens festékkel jelöltük, míg az eriptotikus vörösvértetteket az ionomicines kezelést követően PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Kittal a gyártó által megadott protokoll alapján. Az efferocitózis vizsgálatokhoz a makrofágokat az elhalt sejteket 1:5 makrofág:célsejt arányban inkubáltuk együtt.

A HO-1 tanulmányozása során az apoptotikus timocitákat vagy eRBC-eket 2 ml, 10% FBS-t, 2 mM L-glutamint, 100 U/ml penicilint és 100 µg/ml sztreptomicint tartalmazó DMEM médiumban lévő makrofágokhoz adtuk, bizonyos esetekben SnPIIX, hemoxigenáz 1 és 2 inhibitor folyamatos jelenléte mellett.

A retinoidok hatásának vizsgálata során a makrofágokon lévő 2 ml médium 10% L929 fibroblaszt sejtvonalról származó felülűszót, 2 mM L-glutamint, 100 U/ml penicilint és 100 µg/ml sztreptomicint tartalmazott. Néhány esetben LDN193189-et vagy SIS3-mat 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 denzitometráltságuk 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 alkalmaztunk. Ehhez a makrofágokat festetlen célsejtekkel inkubáltuk 1:5 arányban, majd a fentebb említett különböző idejű inkubálási idő letelte után TRI reagenst adtunk a sejtekhez. Néhány kísérletben 30 perccel az elhalt sejtek adása előtt a makrofágokat egy cAMP analóggal, (RpcAMP); forskolinnal, ami egy adenilát cikláz aktivátor; vagy SB203580-nal, egy p38 MAP kináz inhibitorral kezeltük elő.

#### **4.6. Fluoreszcens mikroszkópia**

Az apoptotikus timocitákat Cell Tracker DeepRed festékkel jelöltük, az eriptotikus vörösvértesteket pedig PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Kittel a gyártó által megadott munkautasítás alapján. A makrofágokat vagy a fagocitózis vizsgálat előtt 24 órával jelöltük karboxifluorescein-diacetát-szukcinimidil-észterrel (CFDA-SE), vagy a fagocitózist követően festettük őket NucBlue Live Cell Stain Ready Probes reagenssel a gyártó által megadott instrukciók szerint. Mindkét típusú elhalt sejtet mintánként 1:5 (makrofág:célsejt) arányban inkubáltuk együtt  $2 \times 10^5$  C57BL/6 típusú makrofággal, majd 1 óra múlva lemostuk a fel nem vett elhalt sejteket. A fagocitózist követően paraformaldehiddel fixáltuk a BMDM-okat, és fluoreszcens mikroszkóppal felvételeket készítettünk a fagocitáló makrofágookról.

#### **4.7. RNS izolálás, reverz transzkripció PCR és RT-qPCR**

A génexpressziós változások detektálásához a különböző módokon kezelt, illetve kezeletlen BMDM mintákból TRI reagens 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 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 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  $\beta$ -aktint használva.

#### 4.8. 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 határoztuk meg. Az apoptotikus timocita, eriotikus vörösvértest és csontvelői makrofág lizátumokat 12%-os SDS poliakrilamid gélen futtattuk. Ezt követően a fehérjéket Immobilon-P polivinilidén-fluorid membránra juttattuk át Bio-Rad félszáz blotolóval. A blokkoláshoz TTBS-ben oldott 5%-os zsírszegény tejpor oldatot használtunk, majd a membránon lévő fehérjéket monoklonális anti-HO-1 és monoklonális anti- $\beta$ -aktin elsődleges antitestekkel reagáltattuk. Ezt követően TTBS pufferrel mostuk a membránt szobahőmérsékleten, majd HRP-vel konjugált másodlagos antitestekkel inkubáltuk együtt. A fehérjéket Immobilon Western Chemiluminescent HRP szubsztrát használatával detektáltuk, majd ImageJ szoftver segítségével meghatároztuk a pixelsűrűséget.

#### 4.9. Hemoxigenáz aktivitás mérés

Az eRBC-eket 1:5 makrofág:célsejt arányban adtuk  $10^5$  C57BL/6 makrofághoz, és 6 órán át inkubáltuk együtt a sejteket SnPPIX jelenlétében vagy hiányában, az *Efferocitózis vizsgálatok* c. részben leírtak szerint. Ezután 1 db mintához  $10^6$  makrofágot gyűjtöttünk össze jéghideg PBS-ben, és  $-70$  °C-ra helyeztük. A HO-1 aktivitást később határoztuk meg Balla és mtsai. által leírtak alapján.

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

Ahogy az *Efferocitózis vizsgálatok* c. fejezetben leírtam, C57BL/6 makrofágokhoz 1:5 BMDM/célsejt arányban adtunk apoptotikus timocitákat vagy eRBC-eket 24 órán keresztül SnPPIX jelenlétében vagy hiányában. A makrofágokat összegyűjtöttük, majd G-LISA Rac1, Cdc42 és RhoA activation assay kiteket használva határoztuk meg a három G-fehérje aktivitásának mértékét a gyártó által megadott eljárás szerint.

#### 4.11. Citokin vizsgálat

Vad típusú és HO-1 hiányos csontvelői eredetű, differenciáltott makrofágokat apoptotikus timocitákkal (melyeket C57BL/6 egerekből izoláltunk), vagy eRBC-ekkel (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 segítségével analizáltuk. A pixeldenzitást ImageJ szoftverrel határoztuk meg.

#### **4.12. mRNS szekvenálás**

Illumina szekvenáló platformot használva nagy áteresztőképességű mRNS szekvenálást végeztünk. A monocita-makrofág differenciálódás 4. napjának kezdetén 1  $\mu$ M ROL-t vagy 1  $\mu$ M DHR-t adtunk a sejtekhez, majd 2 óra, illetve 48 óra múlva összegyűjtöttük a sejteket az RNS szekvenáláshoz. Agilent BioAnalyzer készüléken vizsgáltuk a minták RNS tartalmát és minőségét, melyek meghatározásához Eukaryotic Total RNA Nano Kitet használtunk a gyártó által megadott protokoll szerint. Minden mintacsoport esetében 4 technikai párhuzamost készítettünk, melyek közül azt a 3 mintát válogattuk ki a könyvtárkészítéshez, melyek  $>7$  RNS integritásértékkel (RIN) rendelkeztek. TruSeq RNA Sample Preparation Kit felhasználásával, a gyártó által megadott lépéseket követve hoztuk létre a teljes RNS-ből az RNS-Seq könyvtárakat. Az RNS-eket a poly-A végűekkel 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 végék 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 algoritlussal 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.

#### **4.13. Transzkriptek biológiai funkciójának vizsgálata (DEGs)**

A Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes 11.5-ös verziójával azonosítottuk a DEG-ek közötti felülreprezentált géntológiai 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 $<0,05$ ).

#### **4.14. 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

csoporthasonlítás 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.

## 5. EREDMÉNYEK

### 5.1 A retinoidok a Bmp-2 és Smad3 fehérjék kifejeződésének fokozásán keresztül befolyásolják az égér csontvelői eredetű makrofágok differenciációját és efferocitózist

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

Először teszteltük, hogy a dihidroretinol (DHR) jelenléte a monocita differenciálódás során valóban befolyásolja-e a létrejövő makrofágok efferocitózist. 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, megnéztük, hogy a DHR képes-e fokozni a makrofágok efferocitózist akkor is, ha csak a differenciáció 4. napjának kezdetén adjuk az érő sejtekhez. A DHR így is ugyanolyan növekedést tudott előidézni az efferocitózis mértékében, ami azt jelzi, hogy a DHR az utolsó két napban fejt ki efferocitózis fokozó hatását. Az éppen fagocitáló makrofágokról készült fluoreszcens felvételeink azt 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 monocitákhoz 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 monocita differenciációhoz, fagocitózishoz és sebgyógyuláshoz köthető gének nagy számban fordulnak elő az upregulált DEG-ek között. A DHR-rel kezelt makrofágokban megnövekedett expressziót mutató gének között 10 olyat találtunk, mely az efferocitózishoz köthető. Ezekből öt efferocitózis receptor vagy ko-receptor (stabilin-2, TG2, Axl, MARCO és CD36), egy ún. „bridging” molekula (THBS-1) és egy Rab családdhoz tartozó (Rab20) molekula, mely a fagoszóma éréshez járul hozzá. A korábbi eredményeinkkel összhangban, a TG2 és THBS-1-en kívül, az érett BMDM-okban azonosított többi retinoidérzékeny fagocitózis gén, úgymint Tim-4, C1q és CD14 expresszióját nem befolyásolta a monocita differenciáció során jelenlévő DHR. Továbbá, erősen indukálódott a kalmodulin-függő kináz 1 (Camkk1) enzim és a purinerg receptor P2X (P2X<sub>1</sub>). Ezen felül a Smad3 transzkripció faktor indukcióját tapasztaltuk, melyről ismert, hogy egyrészt direkt

módon fokozza az efferocitózist, másrészt azért, hogy számos efferocitózis-kapcsolt gén expresszióját megnöveli. Érdekes módon, az elemzés során nem találtunk változást az MFG-E8 hidmolekula expressziójában, pedig egy korábbi tanulmányunkban DHR-érzékenynek bizonyult. A P2X1-ről azt találták, hogy ATP jelenlétében elősegíti az apoptotikus sejtek makrofágokhoz való kötődését, ami magyarázatot adhat arra a megfigyelésünkre, hogy a DHR jelenlétében differenciálódó makrofágokhoz több apoptotikus sejt kapcsolódik

Az eredményeink igazolása céljából RT-qPCR technikával is meghatároztuk a makrofágokban a DHR által indukált efferocitózis-kapcsolt molekulák (TG2, Axl, THBS-1, CD36 és stabilin-2) mRNS expresszióját, melyek megnövekedett expressziót mutattak a nem kezelt sejtekhez képest. A korábban az érett makrofágokban retinsav érzékeny fagocitózis receptorokként azonosított Tim-4, C1q vagy CD14 expressziója azonban nem indukálódott még akkor sem, amikor az ATRA koncentrációt megemeltük.

### **5.1.2. A makrofág érés közben adott DHR közvetlenül a RA receptorokon keresztül hatva segíti az efferocitózist**

Korábbi tanulmányaink azt mutatták, hogy a DHR dihidroretinsavvá átalakulva fejt ki hatását a RA receptorokra, ezért kíváncsiak voltunk, hogy a ROL, ami átalakítható ATRA-vá, vagy maga az ATRA, amelyről ismert, hogy a RAR-ok elsődleges liganduma, helyettesíthető-e DHR-lal az efferocitózis szabályozásában, ha a differenciáció 4. napjának kezdetén adjuk a sejt kultúrákhoz.

A makrofág érés 4. napjának kezdetén adott ROL és ATRA fokozza az apoptotikus timociták felvételét. Továbbá a ROL és ATRA képes indukálni ugyanazt az 5 efferocitózis-kapcsolt gént, melyeket a DHR is indukált. Ezen felül, az erősen szelektív pán-RAR antagonistá AGN194310 nem csak a makrofágok DHR által előidézett efferocitózis kapacitását, valamint számos efferocitózis-kapcsolt gén expresszióját gyengítette, hanem a ROL és ATRA által előidézett génindukciókat is gátolta. Érdekes módon, azonban nem az összes fagocitózis-kapcsolt retinoid indukált gén expresszióját blokkolta a pán-RAR transzkripció 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. 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 transzkripció faktorokkal, mely kölcsönhatás a transzaktivációjukhoz vagy transzrepressziójukhoz vezet, s amelybe egy transzkripció antagonistá nem feltétlenül avatkozik bele. A folyamatban résztvevő RAR valószínűleg a RAR $\beta$ , mert ez volt az egyetlen RAR, melyet a DHR indukált, valamint az indukációját sikerült RT-qPCR-ral is igazolni mindhárom retinoid esetében.

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 retinsavvá való átalakulásához (ATRA/all-transz dihidroretinsav) ugyanazok az aldehid-dehidrogenázok és retinaldehid-dehidrogenázok szükségesek. Azonban sem a diszulfiram, mely aldehid dehidrogenáz inhibitor, sem a retinaldehid dehidrogenáz inhibitor DEAB nem akadályozta meg a ROL vagy DHR által kiváltott efferocitózist a differenciálódó makrofágokban. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a ROL vagy a DHR a RAR aktivitást közvetlenül a receptorhoz kapcsolódva szabályozhatja, nem pedig retinsavvá alakulva. Továbbá ezek a vegyületek nincsenek hatással az ATRA-indukált efferocitózisra sem.

### **5.1.3. A csont morfogenetikus fehérje 2 (BMP-2) expresszióját indukálják a monocita differenciáció 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.

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 felszabályozott gének közül kiválasztottuk a BMP-2 növekedési faktort, mert azt találtuk, hogy erősen indukálódott a 48 órás mintákban, valamint korábban kimutatták, hogy RAR célgén.

A BMP-2 mRNS expressziója időfüggően indukálódott a differenciálódás 4. napján adott mindhárom retinoiddal. A retinoidok adását követő 6 óra után azt tapasztaltuk, hogy az AGN194310 megakadályozta a BMP-2 mRNS mindhárom retinoid által kiváltott indukcióját, bizonyítva ezzel a RAR-ok transzkripciósi szerepét. A DEAB-bal történő retinaldehid dehidrogenáz gátlásnak nem volt hatása a retinoidok által indukált efferocitózisra, és a BMP-2 mRNS expresszióra sem, ami ugyancsak azt mutatja, hogy közvetlen kötődés által szabályozhatja a ROL és DHR a RAR aktivitást.

### **5.1.4. A BMP-2 hozzájárul a differenciálódó makrofágok retinoidok által indukált efferocitotikus kapacitásához**

A BMP-2 potenális, retinoid-indukált efferocitózisban betöltött szerepének vizsgálatához a retinoidokkal együtt egy BMP receptor (ALK2/3 szerin/treonin kináz) gátlószert (LDN193189) adtunk a makrofágokhoz. 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 értet, kezeletlen BMDM-okhoz adtuk az efferocitózis kezdetekor, akkor az inhibitor jelenléte nem volt hatással az 1 órás efferocitózisra, ami arra utal, hogy a BMP-2 receptor jelátvitelnek a makrofág differenciáció során kell működnie, az efferocitózist megelőzően.

### **5.1.5. A retinoidok indukálják a Smad3-at**

Megfigyeltük, hogy a DHR adását követően a BMP-2 mellett a Smad3 mRNS is indukálódott. A Smad3 egy olyan transzkripció faktor, melyről ismert, hogy a TGF- $\beta$  hatását közvetíti, illetve a makrofágokban szerepe van az efferocitózisban. Mi is azt tapasztaltuk, hogy a makrofág differenciáció 4. napján adott retinoidok időfüggő módon indukálták a Smad3 mRNS expressziót. 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 transzkripció szerepét. Másrészt, a DEAB-bal történő retinaldehid dehidrogenáz gátlás nem volt hatással a retinoidok által előidézett efferocitózisra, továbbá a BMP-2 mRNS expresszióra sem.

Vizsgáltuk, hogy van-e szerepe a BMP-2-nek a retinoidok által kiváltott Smad3 mRNS indukcióban, ám a Smad3 retinoidok által előidézett mRNS expresszióját az LDN193189 BMP-2 inhibitor nem befolyásolta, és nem idézett elő változást a rekombináns BMP-2 sem önmagában, sem ATRA-val együtt alkalmazva.

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

### **5.1.6. A Smad3 hozzájárul a retinoid-indukált efferocitózishoz a monocita differenciáció közben**

A retinoidokkal egy időben adtuk a makrofágokhoz a differenciációjuk 4. napjának elején SIS3 TGF- $\beta$ 1 receptor gátlószert, melyről ismert, hogy gátolja a Smad3 jelátvitelt. A sejtek efferocitózis kapacitását két nappal később detektáltuk, és azt tapasztaltuk, hogy a SIS3 szignifikánsan gátolta az alap efferocitózist, és megakadályozta a retinoidok által kiváltott efferocitózis növekedést, ami arra utal, hogy a TGF- $\beta$  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, bizonyítva ezzel a Smad3 efferocitózisban betöltött meghatározó szerepét. Ugyanakkor a SIS3-mal együtt történő 2 napos inkubálás 45%-kal csökkentette a makrofágok életképességét a kontrollokhöz képest, mely összhangban van azzal a megfigyeléssel, hogy a TGF- $\beta$ 1 nagymértékben hozzájárul a túlélésükhöz.



gátolta az apoptotikus timociták és az eriptotikus vörösvértestek felvételét is. Azonban, a citokalazind csak az eriptotikus vörösvértestek esetében gátolta a HO-1 indukcióját.

Ezek az eredmények azt sugallják, hogy az intracelluláris hem nem a fő kiváltója a HO-1 indukciójának az apoptotikus timociták esetében, ezért elkezdtük vizsgálni, hogy milyen elhalási jelek vehetnek részt a folyamatban. Kollégáim korábban kimutatták, hogy mindkét sejtípus képes expresszálni a PS-t, mely egy univerzális sejtelhalási jel, és a legtöbb makrofágon megtalálható fagocitareceptor képes direkt vagy indirekt módon felismerni. Így, ha 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 indukálják a HO-1-et, míg az apoptotikus timociták szolubilis jeleket használnak. Ezt bizonyítja, hogy az általunk összegyűjtött timocita elhalás során keletkezett sejtenyésző folyadék képes volt önmagában is kiváltani a BMDM-okban a HO-1 indukcióját, míg ugyanez az eriptotikus vörösvértestek esetében nem mondható el. A HO-1 indukciójának mértéke kisebb az apoptotikus felülűszó esetében, mint az elhalt timociták jelenlétében. A degradáció és a szolubilis faktor hígítása, ami az efferocitózis során magasabb koncentrációban van jelen a makrofágok körül, magyarázhatja a kismértékű különbséget.

Amikor a felülűszót Z-VAD-FMK, egy pán-kaspáz inhibitor, jelenlétében széruméheztetéssel elhaló timocitákról gyűjtöttük össze, akkor ezen felülűszó jelenlétében a HO-1 mRNS expresszió nem indukálódott. Ezzel szemben, amikor a Z-VAD-FMK-t együtt adtuk az apoptotikus timocákról külön nyert felülűszóval, 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. 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 szfingozin-1-foszfát, nem csak a makrofágok migrációját szabályozza, hanem szerepet játszik a HO-1 expresszió növelésében is p38 MAPK-függő módon.

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

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, összehasonlítva a vad típusú kontrollokkal. Ahogyan azt feltételeztük, az eriptotikus vörösvértestek jelenléte nem indukálta tovább ezt az emelkedett HO-1 szintet. Meglepő módon, azonban ugyanezt tapasztaltuk az apoptotikus timociták felvétele során is. Úgy gondoljuk, a két transzkripciós faktor, az Nrf2 és a BACH1 közötti versengés



szabályozhatja a HO-1 expresszióját. Ha a negatív szabályozó hiányzik, akkor a transzkripció maximálisan aktivált. 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.

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

Mivel néhány korábbi tanulmánya azt sugallta, hogy az adenilát cikláz útvonalnak szerepe lehet a HO-1 expresszió szabályozásában, azt kezdtük el vizsgálni, hogy a jól ismert szfingozin-1-foszfát mellett lehet-e az adenosin is a HO-1 kifejeződést szabályozó szolubilis szignál fagocitáló makrofágok számára. Ezért vad típusú és  $A_{2A}$  receptor hiányos makrofágokhoz adtunk apoptotikus timocitákat vagy eriptotikus vörösvértesteket, és meghatároztuk a HO-1 expresszióját. Az  $A_{2A}$  receptor 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 RpcAMP-t használtunk, ami cAMP kompetitív gátlószer. Az RpcAMP jelenléte nincs hatással sem az alap, sem az indukált HO-1 expresszióra a BMDM-okban, melyek vagy apoptotikus timocitát, vagy eriptotikus vörösvértestet vettek fel, az  $A_{2A}R$ -ok expressziójától függetlenül. Ez alapján 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 (adenilát cikláz aktivátor) 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 BMDM-ok általi elhalt sejtek eltakarítása során.

Az adenilát cikláz útvonal gátlása mellett az  $A_3$  receptorok aktiválhatják a p38 MAPK jelátviteli útvonalat is sejttípus függő módon. Mivel korábbi tanulmányok szerint a szfingozin-1-foszfát és a p38 MAPK útvonal is részt vesz a folyamatban az apoptotikus timocitákról származó felülülő esetén, így vizsgáltuk, hogy az apoptotikus felülülő által indukált HO-1 expresszióban szerepet játszanak-e az  $A_3$  receptorok. A p38 MAPK útvonal gátlása szinte teljesen megakadályozta a HO-1 indukációját a makrofágokban mind elhalt sejttípusról származó felülülő jelenlétében. Ez 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 A<sub>3</sub> receptorok hiánya nem volt hatással a HO-1 indukációjára sem az apoptotikus timociták, sem a róluk származó felülűszo esetében. A p38 MAPK útvonal gátlása vagy az A<sub>3</sub> receptorok hiánya sem volt hatással a HO-1 kifejeződésére az eriptotikus vörösvértestek felvétele során sem. Eredményeink azt mutatják, hogy az adozin nem vesz részt a fagocitáló makrofágok HO-1 indukálásában.

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

Vajon a HO aktivitás elvesztése hatással van az apoptotikus sejtek fagocitózisára? Ennek megválaszolására a makrofágok előkezelése során gátoltuk a HO-1 és HO-2 aktivitást SnPPIX gátlószerelel. Egy korábbi tanulmánnyal összhangban, az SnPPIX HO-1 mRNS expresszió növekedést idézett elő a fagocitáló és a nem fagocitáló makrofágoknál is. Teszteltük, hogy az alkalmazott gátlószere koncentráció elegendő-e a szuperindukált HO aktivitás gátlásához az eriptotikus vörösvértesteknek kitett makrofágokban. Az általunk használt 20 µM-os koncentráció hatékonyan gátolta a HO aktivitást.

Mindkét típusú elhalt sejt esetében vizsgáltuk a fagocitózist azonnal az elhalt sejtek makrofágokhoz adását követően (rövidtávú fagocitózis), 6 óras folyamatos fagocitózist követően (középtávú fagocitózis), és 24 óras folyamatos fagocitózist követően (hosszútávú fagocitózis). 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. Az SnPPIX nem csak az eriptotikus vörösvértesteket felvevő makrofágok százalékos arányát csökkentette, hanem a középérték fluoreszcencia is lecsökkent, ami arra utal, hogy kevesebb makrofág vett fel kevesebb elhalt vörösvértestet. Az annexin V-FITC és PI-dal végzett festési kísérletek azt mutatták, hogy ez a csökkenés nem hozható összefüggésbe a fagocitáló makrofágok életképességének csökkenésével, továbbá ezt támasztja alá a HO-1 hiányos makrofágokkal végzett hosszútávú fagocitózis vizsgálat is. Így elmondható, hogy a megfigyelt csökkenés nem az alkalmazott gátlószere mellékhatásának következménye.

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. Meglepo módon nem tapasztaltunk változást a tesztelt fagocita receptorok és hidmolekulák (Tim4, TG2, MerTK, integrin β3/β5, stabilin 2, CD14,

MFG-E8, CD36, trombospondin) expressziójában 24 órás elhalt vörösvértest fagocitózist követően. Tehát a HO aktivitás hiánya 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 citoskeletaris váz átrendeződését. 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 visszahúzóadásban és a fagoszóma internalizációjában van fontos szerepe. Ezért vizsgáltuk ezen három G fehérje általános aktivitását 24 órás eriptotikus vörösvértest fagocitózist követően vad típusú makrofágokban SnPPIX gátlószer hiányában vagy jelenlétében. Növekedett Rac1 aktivációt detektáltunk, azonban nem volt változás az aktivált RhoA és Cdc42 mennyiségében. A gátlószer önmagában nem volt hatással ezen G fehérjék aktivitására, de az inhibitor gátolta a fagocitózis által indukált Rac1 aktivációt.

### **5.2.6. Az apoptotikus sejtfejtétel gátolja a makrofágok alap gyulladási citokin termelését, míg HO-1 hiányában a gyulladási citokinek termelése nőtt vagy nem változott**

Ismert, hogy az elhalt sejtek aktívan elnyomják a gyulladási programot. Több tanulmány is azt feltételezi, hogy a HO-1-nek gyulladáscsökkentő szerepe is lehet, ezért vizsgáltuk, hogy a HO-1 kifejeződésének fokozódása hozzájárul-e az elhalt sejtek által indukált gyulladáscsökkentő programhoz. Ehhez vad típusú és HO-1 hiányos makrofágok gyulladási citokin termelését vizsgáltuk elhalt timociták és vörösvértestek jelenlétében. Sajnos a 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. Először a kezeletlen vad típusú és HO-1 hiányos makrofágokban keletkező, majd felszabaduló citokineket vizsgáltuk *in vitro*. A nem fagocitáló makrofágoknál is kimutatható volt az általunk vizsgált 40 féle citokin legnagyobb része, 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<sup>+/+</sup> és HO-1<sup>-/-</sup> makrofágok esetében. Azonban az 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. Találtunk 9 db (IL-1 $\alpha$  és  $\beta$ , 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. Azt találtuk, hogy az IL-1R antagonistá hasonló módon reagál, ami összhangban van azzal a megfigyeléssel, hogy az IL1 termelése és aktivitása külön szabályozott.

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<sup>+/+</sup> és HO-1<sup>-/-</sup> makrofágokban bekövetkező változásokat fold expresszióban adtuk meg. Az M-CSF és KC mRNS szintje is megemelkedett az eriptotikus vörösvértesteknek kitett makrofágokban HO-1 hiányában. Ugyanakkor az IL-1 $\beta$  esetében ezt nem tudtuk kimutatni. Az IL-1 $\beta$  fehérje szintjére hatással van a kaszpáz-1 aktiváció mértéke, és a HO-1-ről kimutatták, hogy gyengíti a pirin domain 3-at tartalmazó NOD-szerű receptorok inflammaszóma aktivitását.

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

## 6. MEGBESZÉLÉS

Egészséges körülmények között a makrofágoknak két fő szerepe van az elhalt sejtek eltakarítása során: felvenni és lebontani az elhalt sejteket, miközben nem idéznek elő gyulladást. Kollégáim korábban azt találták, hogy a DHR jelenléte az egér csontvelői eredetű makrofágok érésének utolsó két napjában növeli a létrejövő BMDM-ok fagocitózis kapacitását, de a retinsav hatásának kitett, érett makrofágokhoz képest más efferocitózishoz köthető génekre hat. 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. Azonban azt találtuk, 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 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. 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, és kollégáim is kimutatták, hogy a RAR-ok képesek elősegíteni a glükokortikoid receptor transzkripciós aktivitását, közvetlen receptor/receptor kölcsönhatáson keresztül. 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 antagonista retinoidok nem feltétlenül versenyeznek mindegyikkel. Ezenkívül a retinoid-kötött RAR-oknak akár nem-genomikus hatásai is lehetnek, amelyek közvetve befolyásolják a transzkripciót.

A retinoid jelátvitel két mediátorát azonosítottuk monocitákban, a BMP-2-t és a Smad3-at, amelyek hozzájárulnak a megfigyelt efferocitózis kapacitás növekedéséhez. A BMP-2 és a Smad3 direkt RAR-szabályozott célgénnek bizonyult. Adataink alapján sem a retinoid-indukált BMP-2, sem a differenciálódáshoz kapcsolódó TGF- $\beta$ 1 jelátvitel nem járul hozzá a Smad3 retinoidok általi upregulációjához. A BMP-2 általában a Smad 1/5/8 és 9 transzkripciós faktorokon keresztül hat. Továbbá kimutatták, hogy differenciálódó sejtekben a BMP-2 egy nem kanonikus útvonalon keresztül is hat, mely magában foglalja a BMP-2/TGF- $\beta$ 1 receptor heterodimereket és a Smad3-at. Bár ezt a lehetőséget nem vizsgáltuk részletesen, nem zárhatjuk ki, hogy a retinoidok nemcsak a BMP-2 és TGF- $\beta$  révén, hanem egy BMP-2/BMP-2 és TGF- $\beta$ 1 heterodimer receptor/Smad3-függő módon is elősegíthetik az efferocitózist a differenciálódó makrofágokban.

A monociták csontvelőből származó immunsejtek, amelyek körülbelül 2 napig keringenek, mielőtt távoznak a keringésből. A keringő monociták kórokozókat keresnek, és reagálnak gyulladási jelekre, vagy különböző szövetekbe vándorolnak, ahol makrofágokká alakulnak. A létrejövő makrofágok nem alkotnak egységes sejtpopulációt, amit az immunkörnyezet határoz meg. 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. Utóbbiakról ismert, hogy növekedési faktorokat és pro-angiogén szövetjavító faktorokat szabadítanak fel, mint amilyen a VEGFA, a növekedési differenciációs faktor 3 vagy az inzulinszerű növekedési faktor-1.

A BMDM differenciálódás egy adherencia által közvetített érés, mivel ennek a tapadásnak a gátlása monocita képződést eredményez. Így a BMDM differenciálódás csak részben utánozza az *in vivo* monocita eredetű makrofág differenciálódási folyamatot. A csontvelőből származó monociták gyakran jelennek meg, és differenciálódnak makrofágokká azokban a szövetekben, ahol megnövekedett sejtelhalás következik be, például vázizom-sérülések során vagy zsírban gazdag étrend által indukált zsírsejt elhalás során. 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. Ezenkívül a Smad3 a TGF- $\beta$  gyulladáscsökkentő hatásának meghatározó közvetítője, amelyről ismert, hogy az efferocitózis során a bekebelezést végző makrofágok által szabadul fel.

A retinoidok által fokozott D-vitamin receptor vagy a VEGFA expresszió a monocita 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. Továbbá nemrég mutatták be egy infarktusos szívizom modellben a Smad3 szerepét a makrofágok szövetjavító válaszainak közvetítésében.

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. Azt is megállapították, hogy az ATRA elősegíti a differenciálódó monociták M2 polarizációját az *L. major* fertőzés során egerekben. 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.

Kollégáim korábban kimutatták, hogy a RetSat hiányos egerek csontvelőjéből differenciáltott makrofágok hosszútávú fagocitózisa zavart szenved. A defektus okának feltárásához RetSat<sup>+/+</sup> és RetSat<sup>-/-</sup> 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 eriptotikus 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 adenoizint, 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 sejtlevétel esetén sem, míg ugyanez a fagocitózis gátlását eredményezte magas hemtartalmú sejtek felvételénél. Az utóbbi esetben a HO aktivitás hiánya hatással volt a bekebelezés által kiváltott Rac1 aktiválásra. Normál esetben az apoptotikus sejtlevétel elnyomja az alap gyulladáskeltő citoktermelődést a vad típusú makrofágokban, azonban HO-1 hiányában fokozott vagy változatlan pro-inflammatórikus citokin felszabadulást tapasztaltunk mindkét sejtípus 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 sejtlevelő 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, 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, ahol az előregedett vörösvértestek többségének eltakarítása történik. Az ilyen lépben az eriptotikus vörösvértesteket felvevő szövetspecifikus makrofágok elhalnak a hem akkumulációjának következtében. A makrofágok különböző érzékenységét a hem felhalmozódására ebben a két szövetben *in vivo* magyarázza a HO-2 egyidejű, folyamatos kifejeződése a HO-1<sup>-/-</sup> makrofágokban, amelynek aktivitása elegendő a csecsemőmirigyben az apoptotikus timociták fagocitózisa során keletkező alacsony mennyiségű hem

kezelésére, de nem elegendő az efferocitózis során a magas hemtartalmú eritrotikus 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, 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. 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. 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.



## 7. ÖSSZEFOGLALÁS

A szervezetben elhalt sejtek eltávolítása a csontvelői eredetű makrofágok által (efferocitózis) fontos a szöveti homeosztázis fenntartásában és gyulladás felszámolásában. Kollégáim korábban azt találták, hogy a retinol szaturáz enzim terméke, a (13R)-csupa-transz-13,14-dihidrorretinol (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 vagy DHR jelenlétében, illetve hiányában differenciáltatott csontvelőből származó makrofágok teljes génexpressziós profilját vizsgáltam. A génkészlet-dúsítási analízissel számos efferocitózishoz köthető molekulát azonosítottunk, amelyeket mindkét vegyület szabályozott, azonban a transzglutamináz 2 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 a BMP-2 és a Smad3 voltak. A differenciálódó monocitákban a DHR, a retinol és a csupa-transz-retinsav (ATRA) is képes volt indukálni ennek a két génnek az expresszióját 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 expresszióját is fokozták. Összességében a retinoidok elősegítik a pro-reparatív M2 makrofág populáció kialakulását a monocita differenciálódás során, illetve fokozzák az efferocitózist azáltal, hogy indukálják a BMP-2 jelátvitelt a RAR működésének szabályozásán keresztül.

A hem oxigenáz-1 (HO-1) létfontosságú szerepet tölt be a hem katabolizmusában, és ekvimoláris mennyiségű biliverdint, CO-t és szabad vasat termel. Kutatócsoportunk korábban azt találta, hogy a fagocitózis során az elhalt sejként használt apoptotikus timociták (aT), melyek kevés hemet tartalmaznak, nagymértékben fokozták a HO-1 kifejeződését az őket felvevő makrofágokban. Ezért vizsgáltam a HO-1 efferocitózisban betöltött szerepét. Elhalt sejként az aT-k mellett a sok hemet tartalmazó eriptotikus vörösvértesteket (eRBC) használtam. Mindkét elhalt sejtípust felvevő makrofágok erősen fokozták a HO-1 kifejeződését. Az aT általi indukció teljes mértékben az oldható szignálaktól függ, amelyek egyike sem aktiválja az adenilát-cikláz, míg az eRBC-k esetében ez sejtfelvétel függő. Mindkét út magában foglalja a HO-1 gén represszorának, a BACH1 transzkripciósfaktornak a szabályozását. Az aT-k hosszú távú folyamatos efferocitózist nem befolyásolja a HO-1 elvesztése, de az eRBC-két gátolja. Ez később egy belső jelátviteli útvonalhoz kapcsolódik, mely megakadályozza a Rac1 aktivitás efferocitózis által kiváltott növekedését. Míg az apoptotikus sejtek felvétele elnyomta a vad típusú makrofágokban a bazális pro-inflammatorikus citokin termelést, addig a HO-1 hiányos makrofágok több proinflammatorikus citokint termeltek. Összességében elmondható, hogy a HO-1 szükséges a magas hemtartalmú elhalt sejtek felvétele esetén a hem lebontásához, így a

megfelelő bekelezési folyamathoz, és általában hozzájárul az apoptotikus sejt közvetítette gyulladásátló válasz kialakulásához az efferocitózis során.

## 8. KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE



**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., Kraszewska, 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-Szatmári, T., Sarang, Z., Király, R., Szondy, Z.: Nur77 and PPAR $\gamma$  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 impact faktora: 29,866**

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

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

Debrecen, 2023.07.11.

