

## **Doktori (PhD) értekezés tézisei**

Az EGR2 az alternatív makrofág polarizáció és az alveoláris makrofág mediált gomba elleni védekezés kulcs epigenomikus szabályozója

Dr. Kolostyák Zsuzsanna

Témavezető: Prof. Dr. Nagy László



**DEBRECENI EGYETEM**  
Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola

Debrecen, 2025

**Az EGR2 az alternatív makrofág polarizáció és az alveoláris makrofág mediált gomba elleni védekezés kulcs epigenomikus szabályozója**

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében  
az elméleti orvostudományok tudományágban

Írta: Kolostyák Zsuzsanna okleveles orvosdoktor

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskolája  
keretében

Témavezető: Prof. Dr. Nagy László

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Andreas Wack, PhD

Prof. Dr. Jo Van Genderachter, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Szekanecz Zoltán, az MTA doktora

tagok: Prof. Dr. Andreas Wack, PhD

Prof. Dr. Jo Van Genderachter, PhD

Prof. Dr. Horváth Ildikó, az MTA doktora

Dr. Bohács Anikó, PhD

Az értekezés védésének időpontja:  
Debreceni Egyetem ÁOK Belgyógyászati Intézet "A" épület tanterme  
2025. május 26. 13 óra

## BEVEZETÉS

A makrofágok a veleszületett immunrendszer domináns komponensei, fontos szerepet töltenek be a különböző kórokozók elleni első védelmi vonal létrehozásában. A makrofágok adaptív működése a környezeti stimulusokra adott gyors és plasztikus válasz eredménye, amely speciális epigenetikai, génexpressziós és funkcionális programon alapul.

A belélegzett különböző légszennyező anyagok és kórokozók a tüdő belső felületével közvetlenül lépnek kapcsolatba. Az alveoláris térben megtalálhatóak az erre a szövetre specifikus alveoláris makrofágok (AM), melyek az alveoláris epitheliummal kapcsolódnak. Szerepük kulcsfontosságú a kórokozók és káros ágensek felismerésében és eliminálásában, illetve az ezzel párhuzamosan kialakuló gyulladásos válasz elindításában. Az AM-ok a patogén felismerő receptorok (PRR) segítségével ismerik fel a patogén-asszociált molekuláris mintázatokat (PAMP). Ezután az AM-ok internalizálják a felismert ágenseket majd inaktíválják azokat fagolizozómáikban. A kórokozók sejten belüli elpusztítása a lizozóma savanyításán, a reaktív oxigéngyökök (ROS) képződésén és az enzimatis degradáción alapul.

A folyamat során indukált jelátviteli kaszkádok összetett transzkripciós szabályozó lépéseken keresztül proinflammatorikus citokinek termeléséhez és lipid mediátorok szekréciójához vezetnek, melyek a tüdő akut gyulladásos válaszát szabályozzák. Végül az AM-ok regenerációt elősegítő fenotípusa érvényesül. Az immunmechanizmusok összehangolt működése szükséges a fertőző ágensek elleni védekezéshez. A molekuláris és sejtszintű események nem megfelelő programja azonban olyan kórállapotokhoz vezet, mint az akut tüdőelégtelenség vagy a tüdőfibrózis.

Tanulmányunkban az alternatív makrofág polarizáció mechanizmusának részleteire fókuszáltunk, eredményeink alapján ebben fontos szerepet tölt be az „Early Growth Response 2” (EGR2) transzkripciós faktor. Ennek szerepét AM-okban vizsgálatuk.

# ELMÉLETI HÁTTÉR

## **A makrofágok diverzitása és jelentősége**

A makrofágok sokfélesége abból adódik, hogy képesek reagálni a környezeti jelek széles skálájára, ennek megfelelően specializálódnak és különböző funkciókat látnak el.

A szövetspecifikus makrofágok elsősorban a szikzacskó progenitorjaiból vagy az embrionális máj monocitáiból differenciálódnak. Ezek a sejtek a születés előtt a különböző szövetekbe migrálnak és osztódással tartják fenn a sejtpopulációt. Az embrionális időszakot követően a csontvelői hematopoietikus őssejtekből (HSC) származó keringő monociták is képesek kilépni a szövetekbe, ahol a gyulladásos jelekre válaszul makrofágokká differenciálódnak. Míg a különböző szöveti makrofágoknak számos közös funkciója van, mint a gyulladásos válasz inicializálása, a kórokozók vagy törmelékek bekebelezése és a gyulladást követő regeneráció, addig a szöveti lokalizáció alapján, specifikus szerepeket is ellátnak.

A makrofágok rendkívüli plaszticitását a citokin milió és a szöveti mikrokörnyezet befolyásolja. A polarizáció széles spektrumot képvisel, a szakirodalomban azonban két végpont elkülönül. Ez a klasszikus polarizáció vagy „M1 fenotípus”, melyet többek között Toll-Like Receptor (TLR)-indukált gyulladásos jelátviteli útvonalak aktivitása jellemez, illetve a T helper 2 (Th2) sejtek IL-4/IL-13 citokin szekréciója által indukált alternatív polarizáció vagy „M2 fenotípus”. A klasszikusan polarizált makrofágok gyulladást elősegítő szereppel bírnak, az alternatívan polarizáltak pedig a többek között a parazita fertőzésekben és a regeneratív folyamatokban fontosak. A polarizáció egyensúlya elengedhetetlen a szövetek homeosztázisának fenntartásához, zavara betegségek kialakulásához vezethet.

## **Az alveoláris makrofágok differenciációja és funkciója**

Az AM-ok speciális immunsejtek, amelyek a tüdő alveolusaiban helyezkednek el. Döntő szerepet játszanak a tüdő homeosztázisának fenntartásában és a légzőrendszer védelmében a belélegzett kórokozókkal és részecskékkel szemben.

Az AM-ok a magzati máj monocitáiból differenciálódnak. Az embrionális fejlődés során a magzati máj monocitái a magzati tüdő parenchymájába transzlokálódnak a 13.5-14.5. napon. Itt a lokális mikrokörnyezet vezeti a pre-AM stádium kialakulását, amely a születés után ér véget. A terminálisan érett és működőképes AM-ok a CD45-öt, mint általános immunsejt marker fehérjét, az F4/80-t és a CD11c-t, mint általános makrofág markert, illetve a SiglecF-et, egy specifikus AM felszíni marker fehérje expresszióját mutatják. Az érés közben a CD11b kifejeződésének csökkenése, végül elvesztése következik be. A jól differenciált AM-ok széles körű funkciók ellátására képesek. Alveoláris homeosztázist biztosítják a belélegzett kórokozók felismerésével és eliminációjával, bekebelezik a légszennyező anyagokat és szabályozzák a szurfaktáns termelődését és bontását.

Akut tüdőelégelenség vagy gyulladás során válaszul fokozhatják a sejtörmelékek felvételét, elősegítve az alveoláris stabilitás és funkció megőrzését a regeneratív folyamat során, domináns szerepet töltenek be a szöveti regeneráció és remodelling egyéb mechanizmusaiban.

### **Invasív *aspergillosis***

Az invazív *aspergillosis* egy súlyos gombás fertőzés, amelyet elsősorban az *Aspergillus fumigatus* (AF) okoz, bár más fajok általi fertőzés is kialakulhat. A levegőben lévő spórák belélegzése az emberi szervezetbe való bejutás elsődleges módja. A spórákat az immunkompetens szervezet eliminálja, immunhiányos állapotokban képesek fonalat formálni és behatolni a szövetekbe.

Az invazív *aspergillosis* gyakori különböző immunrendszert gyengítő kórállapotokban, mint például a rosszindulatú hematológiai betegségek esetén, illetve csontvelő átültetésben vagy egyéb szervátültetésben részesült betegek körében. A fertőzés leggyakrabban a tüdőt érinti, ami végül ezen szerv invazív *aspergillosis*ához vezethet. A fő klinikai tünetek közé

tartozik a széles spektrumú antibiotikum-terápia ellenére kialakuló tartós láz, mellkasi fájdalom, köhögés, hemoptysis és a nehézlégzés.

Az invazív *aspergillosis* kezelésének alappillére a gombaellenes terápia, azonban egyes esetekben szükség lehet a fertőzés lokalizációjában a tüdőszövet sebészi eltávolítására is. Az invazív *aspergillosis* prognózisa kezelés nélkül rossz, különösen súlyosan immunhiányos egyéneknél. A mortalitás kezelés mellett is magas, de a korai diagnózis és a gombaellenes terápia megkezdése javíthatja a túlélést.

### **Az „Early Growth Response 2” (EGR2) transzkripció faktor**

Az EGR2 az EGR cink-ujj típusú transzkripció faktor család tagja, amely magában foglalja az EGR1-et, az EGR3-at és az EGR4-et is. Ezek a fehérjék a DNS közvetlen kötése által szabályozzák a génexpressziót. A célgének különböző sejtfolymatokban vesznek részt, mint például a növekedésben, a differenciálódásban és a környezeti ingerekre adott válaszokban.

Az EGR2 kritikus szerepet játszik a perifériás idegrendszer fejlődésében, szükséges az agy embrionális fejlődéshez és specifikusan szabályozza a Schwann-sejtek proliferációjához és differenciálódásához szükséges gének expresszióját. Az immunrendszerrel kapcsolatban szerepe ismert a T-limfociták működése szempontjából. Az EGR2 a T-sejtek fejlődése során expresszálódik a csecsemőmirigyben, ahol szabályozza a timociták differenciálódását.

Az EGR2 expressziót mutat aktivált makrofágokban és az AM-ok marker transzkripció faktor. Csak korlátozott számú tanulmány érintette ezen transzkripció faktor hatásmechanizmusának és pontos funkciójának megértését ebben a sejt típusban.

## CÉLKITŰZÉS

Tanulmányunk első részében az általános cél az volt, hogy azonosítsuk az alternatív makrofág polarizáció transzkripciós szabályozóit teljes genom szintű módszerekkel.

1. Célunk volt a csontvelői eredetű makrofágok (BMDM) rövid- és hosszútávú aktív enhanszereinek feltérképezése IL-4 által indukált alteratív polarizációban.
2. A meghatározott genomi régiók alapján kategorizálni kívántuk a szabályozó események időbeli dinamikáját.
3. Olyan DNS-kötő transzkripciós szabályozók identifikálását tűztük ki célul, amelyek kulcsszerepet töltenek be az epigenetikai változások közvetítésében.
4. Célunk volt, hogy megvizsgáljuk az újonnan talált regulátorok lehetséges szövetspecifikus jelentőségét.

Ezt követően, miután leírtuk az EGR2 transzkripciós faktort, mint az AM fenotípus fontos modulátorát, a következőkkel bővítettük céljainkat:

1. A tüdő sejtösszetételének és szöveti szerkezetének elemzése myeloid-specifikus EGR2-deficiens egerek segítségével.
2. Az EGR2 által közvetített epigenomikai, transzkriptomikai és funkcionális változások leírása az AM-okban.
3. Az EGR2 függő változások *in vivo* kontextusba helyezése.
4. Az EGR2 jelentőségének meghatározása a tüdő érintett patológiás folyamataiban.

## **ANYAG ÉS MÓDSZER**

### **Csontvelői eredetű makrofágok tenyésztése és kezelése**

A csontvelői progenitorok izolálása és differenciálása korábban leírtak szerint történt (Dániel és munkatársai, 2014). A BMDM-okat L929 sejtek felülúszójának hozzáadásával differenciáltattuk. A 6. napon a sejteket IL-4-gyel (20 ng/ml) kezeltük 1 vagy 24 órán keresztül.

### **Kromatin immunprecipitáció**

A kísérletet korábban leírtak szerint végeztük (Dániel és munkatársai, 2014). A könyvtárkészítéshez az Ovation Ultralow Library Systems V2-t (Nugen) alkalmaztuk. A használt antitestek: P300 (sc-585) és H3K27ac (ab4729).

### **Egér vonalak**

Az *Egr2<sup>fl/fl</sup>* egérvonal Patrick Charnays laboratóriuma biztosította részünkre (C57BL/6 háttér). A lizozim Cre (*LysCre*) és *Egr2<sup>fl/fl</sup>* vonal keresztezésével értük el a myeloid specifikus “knock out” (KO) kondíciót (*Egr2<sup>fl/fl</sup>*). Az *Egr2<sup>+/+</sup>* *LysCre* állatokat alkalmaztuk kontrollként.

### **Valós idejű kvantitatív polimeráz láncreakció eRNS és mRNS kimutatáshoz**

A sejtek teljes RNS tartalmát TRIZOL reagens segítségével (Invitrogen) izoláltuk. A reverz transzkripcióhoz nagy kapacitású cDNS reverz transzkripció kitet (Applied Biosystems) alkalmaztunk. Az detektálás SYBR Green (BioRad) interkalációval történt. Az expressziós értékeket delta Ct módszerrel számítottuk ki. A nyers expressziós értékeket Ppia expresszióra normalizáltuk.

### **EGR2-t expresszáló embrionális őssejtől származó myeloid progenitor sejt generálás**

Az EGR2-t expresszáló, doxiciklinnel (DOX) indukálható egér embrionális őssejteket (ESC-eket) DMEM-ben (Thermo-Fischer Scientific) tenyésztettük, kiegészítve 15% borjú szérummal



(FBS) (Thermo-Fischer Scientific), 1000 U/ml leukémia-gátló faktorról (LIF, Merck), sztreptomocinnel (50 µg/ml), penicillinnel (100 U/ml) (Merck) és 200 µg/ml G418 reagenssel. Az embrioid testeket (EB) korábban leírtak szerint hoztuk létre (Botó és munkatársai, 2021). Az ESC-eket Iscove's Modified Dulbecco's Mediumban (Thermo-Fisher Scientific) tenyésztettük, amely 15% FBS-t, vassal telített transferrint (200 ng/ml, Sigma), 4,5 mM monotioglicerint (Sigma) és aszkorbinsavat (50 ng/ml) tartalmazott (Sigma). A disszociált sejteket 3 napig tenyésztettük alfa-MEM-ben, kiegészítve 20% FBS-sel, GM-CSF-fel (50 ng/ml, PeproTech, London, UK) és 50 µM β-merkaptotetanollal (Merck). Az EGR2 indukcióját 1 µg/ml doxiciklinnel indítottuk el.

### **ATAC-seq**

25000 sejt szolgált templátként az ATAC-seq kísérlethez. Az AM-ok magjait ATAC-LB-vel izoláltuk (10 mM Tris-HCl pH 7,4, 10 mM NaCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1% IGEPAL). Az izolált sejtmagokat a Nextera DNA Library Preparation Kit (Illumina) segítségével jelöltük. A megjelölt DNS-t Kapa Hifi Hot Start Kittel (Kapa Biosystems) amplifikáltuk. Az Agilent Bioanalyzer segítségével elemeztük a könyvtárak minőségét. A szekvenálás HiSeq 2500 platformmal történt.

### **RNS-seq**

A sejtek teljes RNS-tartalmát TRIZOL-lal (Invitrogen) izoláltuk. A 7-nél nagyobb RNS-integritású mintákból az Ultra II RNS Sample Preparation Kit (New England BioLabs) segítségével történt a könyvtárkészítés. A cDNS-t random reverz transzkripcióval hoztuk létre. A mintákat Illumina NextSeq 500 készüléken szekvenáltuk.

### **CUT&RUN**

80000 AM-ot alkalmaztunk mintánként. A CUT&RUN-t a CUTANA ChiC/CUT&RUN Kittel (EpiCypher) végeztük a gyártó utasításai szerint. A DNS-t a CUTANA DNS Purification Kit

segítségével tisztítottuk. A könyvtár elkészítéséhez 1 ng DNS-t használtunk, és a NEBNext Ultra II DNA Library Prep Kit (New England Biolabs) segítségével végeztük el. Az Illumina NextSeq 500-at használták a szekvenáláshoz Mid Output Kittel.

### **Alveoláris makrofág izolálás bronchoalveoláris mosással (BAL)**

Az egereket izoflurán (Forane, Baxter) inhalációval termináltuk. A bronchoalveoláris teret háromszor mostuk ki 800 µl foszfáttal pufferolt sóoldattal (PBS), amelyet 200 mM etiléndiamin-tetraecetsavval (EDTA, pH: 7,4) és 1% FBS-sel egészítettünk ki. Az izolált bronchoalveoláris mosofolyadékot (BALF) centrifugáltuk, így a sejtkomponensek elkülönítésére kerültek. A sejteket 200 µl ammónium-klorid-kálium (ACK) lízispufferben szuszpendáltuk a (szennyező vörösvértestek lízise). A sejtekből pelletet hoztunk létre ugyanazokkal a beállításokkal történt centrifugálással.

### **Egysejtes szuszpenzió előállítása teljes tüdőből áramlási citometriás elemzéshez**

Az állatokat izoflurán inhalációval termináltuk. A tüdőt eltávolítottuk és jégen apró darabokra vágtuk, majd a feldolgozás „Tüdő Disszociációs Kittel” történt (Miltenyi Biotec).

### **Áramlási citometria és sejt szeparálás**

A sejteket Fc Receptor Blokkoló Reagenssel (Miltenyi Biotec) 1:100 hígításban inkubáltuk, majd antitestkeverékkel megfestettük. Az intracelluláris festések során az AM-okat a „FoxP3/Transcription Factor Staining Kit” (eBioscience™) 1×fixáló/permeabilizáló reagensével rögzítettük és permeabilizáltuk. Az analízist Cytek Aurora és FACS Aria III (BD Biosciences) spektrális áramlási citométerekkel végeztük.

### **Fagocitózis vizsgálatok**

100000 sejtet szélesztettünk 6 lyukú tenyésztőedényekre 1 ml RPMI tápközegben, amelyet 10% FBS-sel és 5-5% penicillinnel és sztreptomocinnal egészítettünk ki. A sejtek letapadását

követően  $1 \times 10^6$  pHrodo-Red jelölt zymosan, *E. coli*, *S. aureus* vagy dextrán részecskéket (Invitrogen) alkalmaztunk mintánként. Az inkubációs periódus után a csatolt AM-okat felkapartuk és FACS Aria III áramlási citométerrel (BD Biosciences) vizsgáltuk.

### **Konfokális mikroszkópia**

A konfokális mikroszkópiához 50000 AM-ot helyeztünk 8 lyukú kamrás fedőlemezekre (Ibidi), majd  $2 \times 10^6$  Texas-Red jelölt zimozánt (Invitrogen™, Z2843) adtunk hozzá. A konfokális felvételeket Zeiss LSM 880 mikroszkóppal (Carl Zeiss, Jena, Németország) készítettük.

### **„Citokin Array”**

„Quantibody® Mouse Cytokin Array 1000 Kit”-et (QAM-CAA-1000) alkalmaztunk, a kísérletet a RayBiotech cég végezte. A log-skálázott fehérjemennyiség ( $\mu\text{g/ml}$ ) értékek hierarchikus klaszterezését a Cluster 3.0, a nem skálázott hőtérképet pedig a JavaTreeView szoftver alkalmazásával vizualizáltuk.

### **Gomba törzsek**

AF 293 *Aspergillus fumigatus* törzset alkalmaztunk, melyet standard nitrát minimális táptalajon tenyésztettük 37 °C-on. A konídiumok begyűjtése 6 nap növesztés után történt.

### **Zymosan által kiváltott *in vivo* tüdőgyulladás modell**

Az állatokat izoflurán inhalációval érzéstelenítettük, majd intranasalisan 300  $\mu\text{g}$  zymosan részecskével (Invitrogen) kezeltük az állatokat.

### **Alveoláris makrofágok *ex vivo* zimozán kezelése**

Sejttenyészetet hoztunk létre úgy, hogy a sejteket 24 lyukú edényekre szélesztettük 0,5 ml RPMI táptalajban, amelyet 10% FBS-sel és 5-5% penicillinnel és sztreptomocinnal

egésztettünk ki. A sejtek megkötésekor zymosan részecskéket (jelöletlen, Invitrogen) alkalmaztunk 50 µg/ml koncentrációban.

### ***Aspergillus fumigatus* – alveoláris makrofág *ex vivo* modell**

A sejteket 5% penicillint, 5% sztreptomicint és 10% FBS-t tartalmazó RPMI tápközegben tenyésztettük. Az AM-okat *AF* konídiumokkal kezeltük ( $10^6$ /lyuk). 1 óra múlva a médiumot cseréltük, majd 6 órán át inkubáltuk a sejteket. Az AM-ok begyűjtése után decimális hígítási sorozatot készítettünk. A mintákat nitrát minimális táptalajba oltottuk, majd 48 óra elteltével megszámloltuk a kolóniákat (CFU).

### **„Time-lapse” mikroszkópia**

Az AM-ok izolálása, a tenyésztés és a kezelés körülményei megegyeztek az előbbi vizsgálattal. Az *AF* spórák kimosása után 5 másodpercenként időzített képeket készítettünk Olympus mikroszkóppal (Tokió, Japán), 10-szeres nagyítású, 0,25 NA-jú akromatikus objektívekkel (Carl Zeiss, Jena, Németország) és 2 megapixeles UVC USB 2.0 kamerával (Asus Computer International, Fremont, CA, USA).

### ***In vivo Aspergillus fumigatus* infekciós modell**

Immunszuppresszióként i.p. cyclophosphamidot (CP, 250 mg/kg) alkalmaztunk. Az első kezelés 3 nappal a fertőzés előtt történt, majd a fertőzés utáni 1. napon. Ugyanezen napokon gentamicin profilaxist alkalmaztunk (5 mg/ttkg). Egerenként  $3,5 \times 10^6$  *AF* spórárt alkalmaztunk nasalisán.

### **Szövetteni elemzés**

Az izolált szerveket 4%-os pufferolt paraformaldehidben (PFA, pH 7,4) fixáltuk, majd paraffinba ágyztuk. A metszeteket hematoxinil és eozin (H&E), Masson trikróm, Perjódsvav-Schiff (PAS) és Grocott festéssel vizualizáltuk standard protokollal. A myeloperoxidáz (MPO)

immunhisztokémiát nyúl monoklonális primer antitestek alkalmazásával, “Envision (biotinmentes, peroxidáz alapú) Detekciós Kit”-tel (Dako) és DAB szubsztrát kromogénnel (Vector Labs) végeztük.

### **Lipid mediátorok meghatározása nagy teljesítményű folyadékkromatográfiával és tandem tömegspektrometriával (LC-MS/MS)**

Az tudómintát folyékony nitrogénben fagyasztottuk deuterált belső standardokat tartalmazó jéghideg metanolba helyezés után. A tüdőt feldaraboljuk, és 1 órára -80 °C-ra helyeztük. Centrifugálás után a felülúszókból szilárd fázisú extrakciót végeztünk (SPE) C18 oszlopok (Biotage) segítségével. A mintákat nagy teljesítményű folyadékkromatográfiás rendszerrel (HPLC; Shimadzu, Kyoto, Japán) mértük. A HPLC-hez Qtrap5500 tömegspektrométert (AB Sciex, Framingham, MA) kapcsolunk. Az adatgyűjtés az Analyst szoftver v.1.7-es verziójával történt. A lipid mediátorok azonosítására ütemezett többszörös reakció monitorozás (MRM) módszert alkalmaztunk. A lipid mediátorok azonosítását a mintákban a Sciex OS-Q v.1.7 segítségével végeztük, mennyiségét az alapvonal feletti csúcsterületek integrálásával és a külső standard görbék alapján történő interpolációval határoztuk meg.

### **A bronchoalveoláris mosófolyadék fehérjetartalmának elemzése**

A fehérjeszintet BCA Kittel (Thermo Fisher Scientific), a laktát-dehidrogenáz (LDH) aktivitást „LDH Aktivitás Kittel” (Sigma-Aldrich) mértük. A TNF $\alpha$ , IL-6 (Biolegend), CXCL9 (#EMCXCL9), CXCL11 (#EMCXCL9) és CXCL13 (#EMCXCL13) szinteket enzimhez kötött immunszorbens méréssel mutattuk ki (ELISA) (Invitrogen).

### **Az extracelluláris savasodási ráta (ECAR) és az oxigénfogyasztási ráta (OCR) „Seahorse” elemzése**

Az OCR és ECAR értékek mérésére XF96 oximétert (Seahorse Biosciences, North Billerica, MA, USA) alkalmaztunk. Az AM-okat 96 lyukú lemezekre oltottuk egy nappal a kísérlet előtt.

1 órával a vizsgálat előtt a sejttenyésztő tápközeget pufferolatlan közegre cseréltük. Az értékeket 5 perces és 30 másodperc keverési ciklusok után rögzítettük.

### **Western Blot**

Teljes sejt lizátumokat állítottunk elő RIPA lízispuffer alkalmazásával. Az elkészített lizátumokat 4-16% gradiens Bis-Tris poliakrilamid gélben separáltuk elektroforézissel, és transzfer membránra vittük át. A membránokat blokkoltuk, majd 1:1000 anti-EGR2 antitesttel (Abcam, ab108399) jelöltük. Mosás után hozzáadtunk 1:20 000 arányban nyúl ellenes IgG-t (R&D Systems, HAF008), majd a membránokat SuperSignal West Pico PLUS kemilumineszcens szubsztráttal inkubáltuk.

### **Adatok elérhetősége**

Az új generációs szekvenálási adatok a National Center for Biotechnology Information (NCBI) Gene Expression Omnibus (GEO) adattárában (GSE151015 és GSE181087) érhetők el.

### **Statisztika**

A differenciálisan expresszált géneket (DEG) varianciaanalízis (ANOVA) teszttel írtuk le, kiegészítve post-hoc Tukey teszttel. Minden más kísérletben Student-féle t-tesztet alkalmaztunk. A csoportok közötti szignifikáns különbségeket akkor vettük figyelembe, ha a p-érték  $\leq 0,05$  volt (csillaggal jelölve: \* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ , \*\*\* $p \leq 0,001$ , \*\*\*\* $p \leq 0,0001$ ).

## **EREDMÉNYEK**

### **A rövid- és hosszútávú alternatív makrofág polarizáció genomaktivitási mintái**

Az alternatív makrofág polarizáció genomi eseményeinek azonosítására IL-4-gyel kezelt egér BMDM polarizációs modellt alkalmaztunk, majd a cisztróm és a transzkriptom időbeli változásait elemeztük. Kontrollként stimulálatlan BMDM-okat használtunk, a rövid távú polarizációt 1 óra, a hosszú távú polarizációt pedig 24 órás IL-4 citokin kezelés után detektáltuk. Az aktív enhanszerek feltérképezéséhez ChIP-seq alapján meghatároztuk a P300 transzkripció koaktivátor genomi kötőhelyeit, valamint a H3K27ac aktív hisztonjel szintjét. Ezeknek a jeleknek a kombinált megjelenése az aktív enhanszereket definiálja, amelyeket a további elemzések készleteként használtunk.

Első lépésként, hogy betekintést nyerjünk az epigenomikus eseményekbe, genomi régiókat határoztunk meg a P300 és a H3K27ac eltérő szintjei alapján. Az alternatív BMDM polarizáció során közel hasonló mennyiségű aktivált (n=16735) és represszált (n=17582) szabályozóelemet azonosítottunk. 14353 genomiális hely nem változott. A szabályozó elemeket tevékenységi mintázat alapján csoportosítottuk, „korai átmeneti”, „korai stabil” és „késői” kategóriákra különítettük el, mely alapján lehetőség nyílt az epigenomikai változásokat közvetítő domináns transzkripció szabályozók azonosítására.

### **Az EGR2 az alternatív makrofág polarizáció késői szabályozója**

A különböző genomaktivitási mintákat közvetítő potenciális transzkripció faktorok felkutatására motívum dúsulási analízist végzünk a változó genomi régiók alapján. A talált motívumoknak megfelelően ismert makrofág-specifikus transzkripció faktor kötőhelyei mellett olyan le nem írt transzkripció faktor motívumok is dúsultak, amelyek nagy specifitást mutattak a fenntartott genomi aktivitásra. Ezek közül az EGR mind a „korai stabil”, mind a

késői kategóriákban dúsult, jelezve az EGR transzkripciós faktorcsalád potenciális jelentőségét az alternatív makrofág polarizáció szabályozásában és fenntartásában.

Annak meghatározására, hogy az EGR család melyik tagja befolyásolja a genomi aktivitást, elemeztük az EGR-ek összes tagjának mRNS szintjét stimulálatlan és IL-4-gyel kezelt BMDM-okban. Csak az *Egr2* mRNS-e volt kimutatható, és ez emelkedést mutatott a folyamat polarizáció során. Megmértük az EGR2 fehérje szintjét is, amely ugyanazt a tendenciát követte. Vélhetően a családból az EGR2 az alternatív polarizáció modulátora.

Ezután létrehoztunk egy EGR2 knock-out (KO) egérmodellt, amely specifikus a myeloid sejtekre, hogy megvizsgáljuk ennek a transzkripciós faktornak az alternatív polarizációban betöltött szerepét. Kontroll és *Egr2*<sup>f/f</sup> egerekből BMDM-eket állítottunk elő, és IL-4-gyel kezeltük őket különböző időpontokban, 0 és 24 óra között. Ezt követően RT-qPCR-rel mértük az alternatív polarizációs marker gének (*Retnla*, *Ccl17*, *Chil3*, *Chil4*, *Arg1* és *Mrc1*) mRNS expresszióját. Az IL-4 expozíciót követő késői (12 vagy 24 órás) időpontokban minden esetben szignifikáns repressziót észleltünk. Ennek alapján az EGR2 az alternatív makrofág polarizáció késői stádiumú szabályozója.

Az EGR2 ellentétes hatásának ellenőrzésére funkció erősítő kísérleteket végeztünk, amelyek során egér ESC-eredetű myeloid progenitorokat transzfektáltunk doxiciklinnel (DOX) indukálható EGR2 genetikai konstrukttal. Először RT-qPCR méréssel igazoltuk az *Egr2* mRNS fokozott expresszióját DOX kezelés során, majd a funkcióvesztési kísérlethez hasonló M2 marker génkészlet mRNS szintjének emelkedését. Ezen gének mRNS szintjei 24 óra időtartamú IL-4 kezelés esetén még tovább indukálódtak. Ez megerősítette az EGR2 potenciális szerepét az M2 makrofág polarizáció epigenetikai szabályozásában.

### **A tüdő specifikus makrofágok magas EGR2 expressziót mutatnak**

Ezt követően vizsgáltuk az EGR2 potenciális jelentőségét a szövetekben rezidens makrofágokban. Az EGR család tagjainak expresszióját elemeztük a már publikált RNS-seq



adatkészletek (GSE63340) alapján különböző szöveti makrofág és monocita populációból. Ez alapján igazolódott, hogy az *Egr2* relatív specifikus és erős expressziót mutat az AM-okban.

Az AM érés különböző szakaszaiból származó, nyilvánosan elérhető RNS-seq és scRNS-seq adatokban újraelemztük a különböző transzkripciós faktorok expressziós értékeit. Azt találtuk, hogy az EGR2 mRNS szintje különösen a differenciálódás terminális szakaszában emelkedett. Ez az érdekes mintázat felveti a lehetőséget az EGR2 szerepére a specifikus sejtfunkciók koordinálásában a génextpresszió epigenomikus szabályozása által.

### **A myeloid-specifikus EGR2 hiány a tüdő immunsejt összetételének megváltozásához vezet és befolyásolja az alveoláris makrofág fenotípust**

Hipotézisünk tesztelésére megkezdtük az EGR2 myeloid-specifikus elvesztése során bekövetkezett változások elemzését a tüdőben. Először áramlási citometriás méréssel összehasonlítottuk a kontroll és az EGR2 myeloid hiányos egerek teljes tüdejéből izolált különböző sejtek számát.

Az endothel sejtek, a hámsejtek és a fibroblasztok száma közel azonos volt a kontroll és az EGR2 myeloid KO állatok tüdejében. Az immunsejt populációkon belül az érett AM-ok és az intersticiális makrofágok, Ly6C<sup>+</sup> monociták, NK-sejtek, B-sejtek, CD4<sup>+</sup> és CD8<sup>+</sup> T-sejtek számának szignifikáns csökkenését észleltük. Csak a DC-ek mutattak szignifikáns emelkedést a vizsgált populációkhoz képest, a Ly6C<sup>-</sup> monociták, a neutrofil granulociták, az eozinofilek és a  $\gamma\delta$  T sejtek száma közel azonos volt. Eredményeink azt mutatják, hogy az EGR2 direkt és közvetett módon befolyásolja a myeloid és lymfoid immunsejtek összetételét, de nem befolyásolja a nem immunsejt populációk jelenlétét és számát a tüdőben.

Ezt követően formalin fixált, paraffinba ágyazott szövettani mintákat készítettünk EGR2 KO és WT tüdőből. H&E és MPO festést alkalmaztunk a sejtkomponensek megkülönböztetéséhez. A tüdő általános szerkezete érintetlen volt mindkét genetikai háttérben. Különbséget figyeltünk meg az MPO pozitív AM-ok arányában a WT és az EGR2

tüdő között. Az EGR2-hiányos állatokból izolált tüdőkből nagyobb számú AM volt azonosítható ugyanazon méretű területen belül. Ez a megállapítás ellentétesnek tűnik az áramlási citometriás mérések tendenciájával. Az eltérés feloldására megvizsgáltuk a bronchoalveoláris térben lokalizált AM-ok érettségi állapotát úgy, hogy számszerűsítettük a CD11b, CD11c, F4/80 és SiglecF fehérjék expresszióját, mint jól ismert markereket, amelyek az AM differenciálódás különböző szakaszait reprezentálják.

A terminálisan differenciált AM-ok pozitívak a standard CD45 immunsejt-markerre, és magas F4/80, CD11c és SiglecF expressziót mutatnak. A CD11b expressziója csökken az AM érés során. A teljes tüdő homogenizátumból definiáltuk az AM-okat és BAL-lal is izoláltuk őket, hogy elkerüljük a standard markerek váratlan diszregulációjából adódó esetleges hibákat.

A kontroll és az EGR2 deficiens tüdő CD45+ sejtpopulációjában az AM szubpopuláció F4/80 és CD11c expressziója alapján mindkét esetben elkülöníthető volt. Az AM száma szignifikánsan megemelkedett az *Egr2<sup>fl/fl</sup>* tüdőben. Kiválasztottuk ezt a populációt, és elemeztük a SiglecF és CD11b expressziókat. Az *Egr2<sup>fl/fl</sup>* mintákban az AM-ok SiglecF+ al csoportjának közel teljes elvesztését detektáltuk, és a CD11b+ sejtek aránya szignifikánsan magasabb volt. A bronchoalveoláris CD45+ sejteket izoláltuk és ugyanazokkal a markerekkel festettük. Ezek az eredmények megegyeztek az összes tüdőhomogenizátum korábbi eredményeivel. Az EGR2 myeloid-specifikus elvesztése nem blokkolja teljesen az AM-ek differenciálódását, hanem modulált érési fenotípushoz vezet.

Az EGR2 hiányos AM-ek általános metabolikus funkcionalitásának jellemzésére Agilent Seahorse XF Analyzer alapú kísérleteket használtunk, valamint meghatároztuk a mitokondriális oxigénáramot és az ECAR-t. *Ex vivo* mértük az anyagcsere folyamatokat. A bazális, etomoxir- és oligomicin-dependens légzésben lényegében azonos OCR értékek voltak mérhetőek a kontroll és *Egr2<sup>fl/fl</sup>* sejtekben. Az ECAR esetében az *Egr2<sup>fl/fl</sup>* AM-okban kisfokú csökkenést észleltünk.

Végül arra a következtetésre jutottunk, hogy az EGR2 myeloid-specifikus hiánya egy metabolikusan intakt makrofághoz vezet, amely az alveoláris térben nagyobb arányban lokalizálódik és a sejtfelszíni markerek egyedi profilját képviseli.

### **Az EGR2, mint valószínűleg közvetlenül DNS-hez kötött transzkripció faktor, az alveoláris makrofágok domináns epigenomikai modulátora**

Ezt követően arra törekedtünk, hogy megértsük az EGR2 által közvetített molekuláris eseményeket az AM-ok kromatinjában, ezért ATAC-seq kísérletet végeztünk. Ezáltal leírtuk a kontroll és EGR2-hiányos AM-ok kromatin nyitottságában mutatkozó különbségeket. Az *Egr2<sup>fl/fl</sup>* AM-ok kromatinjában 1906 zárt és 4792 nyitott genomi régiót azonosítottunk a kontroll sejtekhez képest. Feltérképeztük a differenciálisan hozzáférhető régiók (DAR) genomi eloszlási profilját. A DAR-ok mindkét osztálya nagyobb arányban lokalizálódott az enhanszer régióban, mint a promóter régióban.

A DAR-okon belül a DNS-hez közvetlenül kötődő transzkripció faktorok motívumainak azonosítására *de novo* dúsulási elemzést végeztünk. A zárt DAR-ok esetében az EGR-motívumok jelentős feldúsulása volt megfigyelhető (50,53%), a nyitott régiókon pedig hiányzott, ami arra utal, hogy az EGR2 valószínűleg nem működik közvetlen represszorként. Az EGR2 molekuláris funkciójának további vizsgálata érdekében úgy döntöttünk, hogy a kromatin hozzáférhetőségi vizsgálatait integráljuk a transzkriptomikai elemzésekkel.

### **Az EGR2 közvetlenül szabályozza a transzkripciót és döntő szerepet játszik a kórokozók eliminációjával kapcsolatos génhálózat szabályozásában**

Ezen valószínűsíthetően direkt aktiváló transzkripció események molekuláris sajátosságainak feltárása érdekében megvizsgáltuk a kapcsolatot a potenciális EGR2-hez kötött enhanszerek és a hozzájuk kapcsolódó szabályozott gének között. RNS-seq kísérleteket

végeztünk a kontroll és az *Egr2<sup>fl/fl</sup>* AM-okon. Ez 364 szignifikánsan alacsonyabb és 621 szignifikánsan indukált gén azonosításához vezetett az EGR2-t nem tartalmazó AM-okban.

A zárt DAR-ok és az alacsony expressziójú DEG-ek integrálásával azonosítottuk, hogy nagyszámú zárt DAR található 100 kilobázispár (kbp) távolságon belül ( $n = 373$ ), azonban több mint 1000 DAR helyezkedett el nagyobb mint 1000 kbp távolságra az alacsonyabban kifejeződő génektől. A DAR-okat és a DEG-eket egy szigorúbb,  $\pm 100$  kbp távolságra vonatkozó kritérium alkalmazásával integráltuk a gén TSS-eitől. 158 DEG-t azonosítottunk az EGR2 lehetséges közvetlen célpontjaként. Az alacsonyabb DEG-ekhez kapcsolódó zárt DAR-ok arra utalnak, hogy az EGR2 valószínűleg transzkripció aktivátorként funkcionál.

Ezután CUT&RUN kísérleteket végeztünk a H3K4me3-ra és a BRD4-re, mint az aktív enhanszerek és promóterek markereire. A H3K4me3 jel eloszlását elemezve az 500 bp-os downstream régióban az EGR2-függő gének TSS-hez viszonyítva, megfigyeltük, hogy a H3K4me3 szintek megfelelnek a génexpresszió különbségeinek, megerősítve azt az elképzelést, hogy az EGR2 elsősorban a kromatin szerkezetét befolyásolja és a célgéneket aktiválja. A BRD4 hasonló mintázatot mutatott a promotereknél és az enhanszereknél, tovább erősítve az EGR2 feltételezett, epigenetikai szabályozóként jelentős szerepét.

További funkció fokozódásra irányuló kísérleteket végeztünk ESC-eredetű myeloid progenitorokon DOX-indukálható EGR2 genetikai konstrukcióval. Ebben a rendszerben az RT-qPCR analízis megerősítette az *Egr2* mRNS fokozott expresszióját DOX-kezelés hatására, továbbá jelentősen megemelkedett a CD11c és SIGLECF AM marker mRNS- és fehérjeszintje. Megvizsgáltuk a potenciális direkt célgéneket (*Kazald1*, *Clec7a*, *Atp6v0d2*, *Rhoc*) és a hozzájuk kapcsolódó enhanszerek transzkripció változásait is, amelyek az EGR2 magasabb expresszióját követően ugyancsak emelkedő tendenciát mutattak. Ezek a kísérletek arra a következtetésre vezettek, hogy az azonosított DAR-ok enhanszerként működnek és aktivitásuk az EGR2-től függ.

Ezután funkcionális szempontból elemeztük az EGR2-függő DEG-eket. Az EGR2 hiányában az alapvető makrofág marker gének mRNS szintje csak részben változott. Azonban a megváltozott AM specifikus gének közel fele, köztük az *Epcam*, a *Krt79*, a *Cldn1* és a *Kazald1* proximális EGR2 célpont.

Ezután a KEGG adatbázist használtuk a DEG-lista által érintett biológiai útvonalak előrejelzésére. Az EGR2 hiányával összefüggő transzkripciós változások a kórokozó felismeréssel, a ROS képződéssel, a fagolizozómák savasodásával és az éréssel kapcsolatosak. E gének közül több egy olyan transzkripciós hálózat része, amely a kórokozók eliminációjának szabályozásában vesz részt.

### **Az EGR2 hiánya a zimoszán fagocitózisának elégtelenségét eredményezi**

Eredményeink alapján részletesen megvizsgáltunk néhány kritikus sejtfunciót. Az EGR2-hiányos AM-okban a *Clec7a*-hoz kapcsolt enhanszer BRD4-jelei és eRNS-szintjei jelentősen csökkentek, csakúgy, mint a gén promoterénél a H3K4me3 jel. A *Clec7a* a Dectin-1 receptort kódolja, amely egy jól ismert PRR olyan gombás sejtfa komponensek számára, mint a zimoszán, nélkülözhetetlen az AM-ok gombaellenes válaszában. A Dectin-1 fehérje expresszióját mind a kontroll, mind az EGR2-null AM-ek felületén áramlási citometriával értékeltük BAL-al izolált sejteken. Az mRNS szintjét tükrözve a Dectin-1 fehérjeszintje lényegesen alacsonyabb volt az *Egr2<sup>fl/fl</sup>* AM-okban.

E fehérje aktivitásának funkcionális értékelése érdekében megvizsgáltuk a zimoszán felvételét kontroll és *Egr2<sup>fl/fl</sup>* AM-okban *ex vivo* pHrodo-konjugált zimoszán alkalmazásával. 3 óra elteltével szignifikáns csökkenést figyeltünk meg a fagocitáló EGR2-null AM-ok arányában a WT AM-okhoz képest, fagocitáló kapacitásuk körülbelül 70%-ra csökkent.

Ezenkívül konfokális mikroszkóppal követtük nyomon a felvétel dinamikáját. Megszámoltuk az internalizált részecskék számát 0, 20, 60 és 120 perccel a kezelés után. Az eredmények azt mutatták, hogy az *Egr2<sup>fl/fl</sup>* AM-okban az internalizált részecskék átlagos száma

csökkent a kontrollhoz képest 20 percnél, sőt 120 percnél is. Az *Egr2<sup>fl/fl</sup>* AM-ok fagocitáló kapacitása nem érte el a WT AM-ekét, a KO sejtek kevesebb részecskét internalizáltak.

### **Az EGR2 befolyásolja a zimosánra adott kezdeti transzkripciós választ *in situ***

A zimosán felvétele gyulladásos választ vált ki. Ennek korai fázisát vizsgáltuk *in vivo* kontroll és EGR2 KO egerekben 300 µg zimosán intranazálisan alkalmazásával, majd elemeztük az indukált változásokat a beadást követő 6. és 24. órában. A CD45+ és az F4/80+ AM populációkat a kontroll és a zimosán kezelt csoportokból szeparáltuk. RNS-seq alkalmazásával 1755 gént azonosítottunk az EGR2 KO AM-okban a kontrollal összevetve, amelyek reagáltak a zimosánra, EGR2-től független a zimosán-reszponzív gének többsége (n=6047). Ez azt jelzi, hogy az EGR2 határozott és szelektív szerepet játszik *in situ* gyulladásos válaszban eltérést mutató gének korai szabályozásában.

Az 1755 EGR2-függő és zimosánra reagáló gént tíz klaszterbe rendeztük időfüggő expressziós mintáik szerint, azután újraintegráltuk a korábban azonosított zárt DAR-okkal. Azonosítottuk a zimosánra reagáló és EGR2-dependens alacsonyabban kifejeződő DEG-eket, és ezeket a géneket a DEG-ek TSS-jétől több mint 100 kbp-ra elhelyezkedő zárt DAR-okhoz kapcsoltuk. Ezen gének expresszióját szignifikánsan befolyásolta az, de nem stimulálta fiziológias körülmények között. Ez a megfigyelés azt jelzi, hogy az EGR2 kettős szerepet játszik az AM epigenom kialakításában, és módosít különböző jelfüggő transzkripciós válaszokat anélkül, hogy befolyásolná a gén alapexpresszióját, epigenomikus könyvjelzőként működik.

Elemeztük a TLR, TGF-β, Jak-Stat, foszfatidil-inozit (PI) és arachidonsav (ARA) jelátviteli útvonalakra génkészleteit, hogy pontosan meghatározzuk a kanonikus gyulladásos válaszhoz kapcsolódó EGR2-függő változásokat. Az összes útvonal tartalmazott DEG-eket, az érintett gének eltérő arányokat és expressziós mintákat mutattak a csoportokban. Az elsősorban fokozottan kifejeződő gének a TGF-β, TLR és Jak-Stat útvonalakhoz kapcsolódnak. A PI

jelátviteli útvonalhoz kötött DEG-ek jelentősen alacsonyabbak voltak, beleértve a foszforilációs kaszkádok összetevőit kódoló géneket is. Ezenkívül az *Lta4h*-t proximális, valószínű közvetlen célgénként azonosítottuk.

Tekintettel arra, hogy a transzkripció változások szignifikánsan befolyásolták a citokineket és lipidmediátor-szintetizáló enzimeket kódoló géneket, a citokinprofil ELISA-alapú módszer segítségével mértük BAL folyadékából, valamint az ARA metabolizmussal kapcsolatos lipid mediátorokat tömegspektrometriával identifikáltuk a teljes tüdő homogenizátumból. Ezek a módszerek jelentős csökkenést mutattak az IL-4 fehérje szintjében 6 órával a zimosán kezelés után, és a CCL17, CXCL11 és CSF1 szintjében 24 órás kezelés után. Míg az IL-4-et a Th-sejtek választják ki, az emelkedett szintű citokinek specifikusan makrofágokból származnak. A CXCL11 indukciója különösen figyelemre méltó, mivel ez a citokin nem indukálódik, ha az EGR2 jelen van. Az ARA-eredetű lipid mediátorok közül az RvE1 nem volt kimutatható az EGR2-hiányos egerek tüdejében. Ez a lipid mediátor, amelyet a leukotrién A4 hidroláz (LTA4H) enzim termel, döntő szerepet játszik a gyulladás feloldásában.

A gyulladásos folyamatot tovább vizsgáltuk paraffinba ágyazott, H&E-festett tüdőminták szövettani elemzésével 24 és 72 órás kezelés után. A PMN-ek azonos mértékű infiltrációját figyeltük meg mind a WT, mind az *Egr2<sup>fl/fl</sup>* egerekben 24 órával az expozíció után, azonban az *Egr2<sup>fl/fl</sup>* tüdőben nagyobb arányban voltak jelen a makrofágszerű mononukleáris sejtek nagy, szabálytalan magokkal. Ezenkívül 72 óra elteltével az *Egr2<sup>fl/fl</sup>* egerek tüdejében lévő alveolusok feloldatlanok maradtak, kezdődő fibrózisra utaló eltérést mutattak.

### **Csökkent eliminációs kapacitás az *Aspergillus fumigatus*ra az EGR2 hiányában**

Végül kiterjesztettük kutatásunkat patofiziológiailag releváns *ex vivo* és *in vivo* *Aspergillus fumigatus* fertőzési modellekké. Az AM-okat AF spórával kezeltük 1 órán át, lehetővé téve az AM-ok számára, hogy internalizálják a részecskéket. A spórákat kimostuk,

majd további 6 órás inkubáció után lizáltuk a sejttenyészeteket, és megmértük a minták telepkepző képességét. A CFU-k szignifikáns csökkenését figyeltük meg 1 óra elteltével, és szignifikáns növekedést 7 órával az EGR2-null AM-okban. Továbbá az internalizált és inaktivált *AF* spórák aránya alacsonyabb volt az *Egr2<sup>fl/fl</sup>* sejtekben. Time-lapse mikroszkóppal követtük az *AF* spórák internalizációját követő morfológiai változásokat. Megállapítottuk, hogy az EGR2 hiány a hifát tartalmazó AM-ok nagyobb arányát és a hifák növekedésének korábbi kezdetét eredményezte a kontroll sejtekhez képest.

Vizsgáltuk az *AF* in vivo hatásait is. Klinikailag nem figyeltek meg szignifikáns különbségeket a kontroll egerekben a fertőzést követően, az *Egr2<sup>fl/fl</sup>* egerek azonban fogyni kezdtek, ami súlyos gyulladásra utal. A szövettani elemzés elhúzódó gyulladási tendenciát mutatott korai progresszív tüdőfibrózissal az EGR2 KO tüdőben. Ezzel szemben a kontroll tüdőben a gyulladás regrediált fibrózis nélkül.

Az *AF* opportunista kórokozó, és súlyos *AF* fertőzések immunhiányos betegeknél fordulnak elő. Ennek modellezésére szolgál a cyclophosphamid (CP) által kiváltott immunszuppresszió melletti *AF* fertőzés vizsgálata, ami gyors *aspergilloma*-képződéshez vezet a tüdőben. Áramlási citometriával mértük fel a különböző immunsejtek számának változását a tüdőben a fertőzést követő 1. napon. A CP kezelés a B- és CD4+ T-sejtek számának szignifikáns csökkenését, valamint az AM-ek és CD8+ T-sejtek enyhe, bár nem szignifikáns csökkenését eredményezte mind a kontroll, mind az EGR2-hiányos egerek tüdejében, összehasonlítva a nem immunhiányos egyedekkel. A monociták és neutrofilek számának csökkenése csak a kontroll állatokban volt észlelhető.

Ezután a tüdőből izolált BALF-ot egy nappal az *AF* fertőzés után vizsgáltuk. Nem figyeltünk meg szignifikáns változást az összfehérje szintjében a különböző körülmények között. Immunszuppresszió esetén azonban ELISA-val mérve szignifikánsan magasabb LDH-



aktivitást, valamint a gyulladáshoz kapcsolódó citokinek (TNF $\alpha$ , IL-6) és a profibrotikus markerek (CXCL9, CXCL11, CXCL13) koncentrációjának emelkedését tapasztaltuk EGR2 KO.

Az ezen tüdőkből származó szövettani metszeteken nagyobb, *AF* hifákat tartalmazó *aspergillómákat* és nekrotizáló gyulladást igazoltunk, melyeket túlnyomórészt nagy makrofágszerű mononukleáris sejtek jellemeztek pleomorf magokkal, illetve apoptotikus sejtekkel az EGR2 KO mintákban. Emellett a KO egerek tüdeje nagy orsó alakú, aktivált fibroblaszt morfológiájú sejteket tartalmazott. Masson festéssel ezeken a területeken durva kollagén lerakódásokat mutattunk ki, ami jelentős fibrózisra utal.

Ezek az eredmények együttesen további *in vivo* bizonyítékot szolgálnak az EGR2 szerepére az AM-ek gombaellenes aktivitásában, bár fontos megjegyezni, hogy a megfigyelt eredmények összetett, több sejt típusra kiterjedő fenotípust tükröznek.

# DISZKUSSZIÓ

## Az EGR2 az alternatív makrofág polarizáció késői szabályozója

Az makrofágok polarizációját szabályozó hierarchikus transzkripciós program megértése elengedhetetlen a sejttípus-specifikáció ismereteinek bővítéséhez és a célzott terápiák kidolgozásához. Tanulmányunkban az EGR2-t az IL-4 által közvetített és STAT6-függő alternatív polarizációs program kulcsfontosságú komponenseként azonosítottuk. Az EGR2 összekapcsolja a korai, tranziens eseményeket a későbbi, stabilabb eseményekkel, kritikus hierarchikus kapcsolatokat létesítve a különböző transzkripciós faktorok között. A genomaktivitás feltérképezését a P300 és a H3K27ac aktív enhanszer markerek segítségével a makrofágok polarizációja során felhasználtuk az IL-4 által aktivált STAT6 azonnali és hosszú távú hatásainak tanulmányozására. Ez a stratégia vezetett az EGR2 felfedezéséhez, egy erőteljes transzkripciós szabályozóhoz, amely korábban fel nem ismert funkciókkal rendelkezik myeloid sejtekben. Míg az *Egr2*-ről IL-4-indukált génként számoltak be makrofágokban a transzkriptomszintű elemzések során, specifikus szerepe tisztázatlan maradt. Modellünkben az IL-4 szelektíven indukálja az *Egr2*-t a család tagjai közül.

A szövetspecifikus makrofág RNS-seq adatok újraelemzése azt mutatta, hogy az *Egr2* tudóre korlátozott expressziós mintázatot mutat. A bazofil eredetű IL-13 AM funkcióban betöltött szerepére vonatkozó megállapításokkal kombinálva ez felveti az EGR2 *in vivo* szerepét.

## Az EGR2 funkciója, mint segéd vagy másodlagos LDTF alveoláris makrofágokban

Az AM identitást az általános makrofág LDTF-ek, például a PU.1 és a C/EBP $\beta$ , határozzák meg. Az EGR2 azonban különleges funkciója miatt kitűnik: az érett AM marker géneknek csak egy korlátozott részhalmazát aktiválja közvetlenül, például a SiglecF-et, míg másokat változatlanul hagy. Az EGR2 hiány csak részlegesen csökkentette a differenciálódástól függő génexpressziót. Így az EGR2 inkább kiegészítő vagy másodlagos

LDTF-ként működik, más faktorokkal együttműködve az AM identitás és funkció bizonyos aspektusainak meghatározásában.

### **Az EGR2 hatásának kettős mechanizmusa**

Az EGR2 kritikus szerepet játszik az emberi monociták makrofágokká történő terminális differenciálódási szakaszában, mint azt számos tanulmány igazolta. A közelmúltban végzett kutatások megerősítették az EGR2 szükségességét AM-okban, amelyet mi tovább vizsgáltunk, megmutatva annak valószínű integrációját az AM epigenomba, mint közvetlen DNS-hez kötött transzkripciós aktivátor és epigenomikus marker. Erre utal az EGR-motívum feldúsulása azokban a kromatin régiókban, amelyek EGR2 hiányában záródnak, míg azokban, amelyek nyílnak, nem látható ilyen feldúsulás. Ez azt jelzi, hogy az EGR2 nem valószínű, hogy represszorként működik a közvetlen DNS-kötés révén, de ilyen hatásai lehetnek a fehérje kölcsönhatások vagy indirekt útvonalak révén.

Az EGR2 közvetlenül szabályozza a Dectin-1-et, amely a gombaellenes válasz és a fagocitózis kulcsszereplője, ezáltal pozicionálja az EGR2-t a gombafelismerésben és -tisztulásban részt vevő klinikailag fontos útvonalak előtt, emellett szerepet játszik a zimozánra adott gyulladási válaszban is.

Ezen túlmenően, az EGR2 „csendes könyvjelzőként” különálló ingereket és funkciókat kapcsol össze, amelyek meghatározott körülményeknek való kitettség során manifesztálódnak.

### **Az EGR2 hiány hatása a tüdő patofiziológiájára**

Kutatómunkánk klinikai jelentősége sokrétű. Az EGR2 egy evolúciósan konzervált transzkripciós szabályozó az AM-okban. Az általa szabályozott génhálózat különösen fontos a tüdő megfelelő gomba ellenes védekezéséhez. A Dectin-1-ben előforduló egynukleotidos polimorfizmusokat (SNP-k) összefüggésbe hozták az *aspergillózissal* és más gombás

fertőzésekkel emberi populációkban. Adataink alátámasztják az EGR2 szerepét a specifikus kórokozók elleni szelektív válaszokban.

Ezenkívül a tüdőszövet szövettani elemzése mind egyensúlyi állapotban, mind zimozán, mind AF kezelés után megfelel a megfigyelt transzkripciós és fenotípusos változásoknak. Az EGR2 myeloid-specifikus hiánya az interalveoláris terekben megnövekedett sejtszámot eredményez, néhány mononukleáris sejt nagyobb méretű és szabálytalan magstruktúrákat mutat, ami valószínűleg rosszul differenciált AM-okra utal. A morfológiai változások kifejezettebbek a kórokozó által aktivált gyulladásos sejtekben az EGR2 hiányos tüdőben. Ezenkívül elhúzódó gyulladás és fibrózis figyelhető meg zimozán vagy AF-indukálta gyulladás során. Ezek a fibrózisminták morfológiailag hasonlóak az emberekben előforduló "organizáló pneumoniával járó bronchiolitis obliterans"-hoz (BOOP).

Ciklofoszamid alapú immunszuppressziós modellt alkalmazva, amely modellezi az invazív *Aspergillo*sisban szenvedő betegek immunhiányos állapotát, további bizonyítékot szolgáltatunk a fokozott *aspergilloma* képződésre és a tüdő fibrózisának fokozódására.

Érdekes módon az EGR2 hiányos egerek tüdejében a gyulladást feloldó lipidmediátor RvE1 csökkenését figyeltük meg, ami összefüggésben lehet az EGR2 hiányos AM-ok LTA4H szintjének csökkenésével. Az RvE1 szerepet játszik a makrofágok fagocitózisának elősegítésében a zimozán által kiváltott gyulladás feloldása során, és védelmet nyújt az asztmában és az allergiás légúti gyulladásban.

## ÖSSZEFOGLALÓ

Kutatásunk bizonyítja, hogy az EGR2 az alternatív makrofág polarizáció és az alveoláris makrofágok génexpressziójának kulcs epigenomikus és transzkripciós modulátora fiziológias és gyulladásos körülmények között. Mint közvetlen transzkripciós szabályozó és úgynevezett “csendes genomi könyvjelző” szabályozza a sejtspecifikus génexpressziót és funkciókat, illetve a gombaellenes választ.

Összefoglalva, eredményeink által igazoltuk, hogy (1) az EGR2 az alternatív makrofág polarizáció késői stádiumú szabályozójaként működik csontvelői eredetű makrofágokban, illetve (2) valószínű DNS-kötött transzkripciós aktivátorként modulálja az alveoláris makrofágok specifikus génkifejeződését. (3) Proximális nexus szabályozója egyes terminális stádiumban érintett érési marker gén, illetve számos fagocitózishoz kötődő gén expressziójának. (4) Igazoltuk az EGR2 jelentős szerepét a Dectin-1 dependens zimosán és *Aspergillus fumigatus* fagocitózisban, valamint (5) a zimosán által indukált gyulladásos események szabályozásában. A myeloid specifikus EGR2, mint epigenomikus könyvjelző modulálja profibrotikus citokinek (pl. CXCL11) és lipid mediátorok (pl. RvE1) termelését, hiányában ezek kifejeződése és szintézise csökken vagy megszűnik. (6) Az *Aspergillus fumigatus* fertőzés során az EGR2 myeloid specifikus hiánya az *Aspergillus fumigatus* fertőzés során a patogén eliminálási hatékonyságának csökkenésében és gyulladás oldódásának romlásában nyilvánul meg.

# KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném kifejezni köszönetemet mindazoknak, akik támogattak PhD tanulmányaim során:

Mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Nagy László Professzor Úrnak támogatásáért és útmutatásáért.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Tózsér Józsefnek, a Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet vezetőjének.

Köszönettel tartozom korábbi oktatóimnak, Dr. Simándi Zoltánnak és Dr. Czimmerer Zsoltnak, akik megtanítottak a tudományos munka és gondolkodás alapjaira.

Külön köszönettel tartozom a Magreceptor Kutató Laboratóriumban dolgozó korábbi és jelenlegi kollégáimnak együttműködésükért, kiemelten Dr. Bojesuk Dórának, aki a bioinformatikai elemzéseket végezte.

Köszönettel tartozom további munkatársaimnak, kiemelten Dr. Máthéné Dr. Szigeti Zsuzsának és Baksa Viktoriának, akik segítettek az *in vivo* kísérletekben.

Emellett köszönetet szeretnék mondani Béládi Mártának, Silye-Cseh Tímeának és Kerékgyártóné Nagy Anikónak a technikai segítségért.

Köszönöm családom szeretetét, türelmét és megértését a kutatással töltött idő alatt.

Végezetül szeretném kifejezni köszönetemet valamennyi résztvevőnek, aki hozzájárult a munka létrejöttéhez.

# PUBLIKÁCIÓK LISTÁJA



**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/535/2024.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

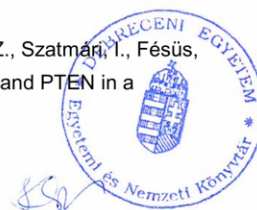
Jelölt: Kolostyák Zsuzsanna  
Doktori Iskola: Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola  
MTMT azonosító: 10075231

## A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Kolostyák, Z.**, Bojcsuk, D., Baksa, V., Máthéné Szigeti, Z., Bene, K., Czimmerer, Z., Botó, P., Fadel, L., Póliska, S., Halász, L., Tzerpos, P., Berger, W. K., Villabona-Rueda, A., Varga, Z., Kovács, T., Patsalos, A., Pap, A., Vámosi, G., Bai, P., Dezső, B., Spite, M., D'Alessio, F. R., Szatmári, I., Nagy, L.: EGR2 is an epigenomic regulator of phagocytosis and antifungal immunity in alveolar macrophages.  
*9 (17)*, 1-21, 2024.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1172/jci.insight.164009>  
IF: 6.3 (2023)
2. Dániel, B., Czimmerer, Z., Halász, L., Botó, P., **Kolostyák, Z.**, Póliska, S., Berger, W. K., Tzerpos, P., Nagy, G., Horváth, A., Hajas, G., Silye-Cseh, T., Nagy, A., Sauer, S., Francois-Deleuze, J., Szatmári, I., Bácsi, A., Nagy, L.: The transcription factor EGR2 is the molecular linchpin connecting STAT6 activation to the late, stable epigenomic program of alternative macrophage polarization.  
*Genes Dev. 34 (21-22)*, 1474-1492, 2020.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1101/gad.343038.120>  
IF: 11.361

## További közlemények

3. Jambrovics, K., Botó, P., Pap, A., Sarang, Z., **Kolostyák, Z.**, Czimmerer, Z., Szatmári, I., Fésüs, L., Uray, I. P., Balajthy, Z.: Transglutaminase 2 associated with PI3K and PTEN in a membrane-bound signalosome platform blunts cell death.  
*Cell Death Dis. 14 (3)*, 1-10, 2023.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/s41419-023-05748-6>  
IF: 8.1





4. Czimmerer, Z., Halász, L., Dániel, B., Varga, Z., Bene, K., Domokos, A., Hoeksema, M., Shen, Z., Berger, W. K., Silye-Cseh, T., Jambrovics, K., **Kolostyák, Z.**, Fenyvesi, F., Váradi, J., Póliska, S., Hajas, G., Szatmári, I., Glass, C. K., Bácsi, A., Nagy, L.: The epigenetic state of IL-4-polarized macrophages enables inflammatory cistromic expansion and extended synergistic response to TLR ligands.  
*Immunity*. 55 (11), 2006-2026, 2022.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2022.10.004>  
IF: 32.4
5. Fadel, L., Rehá, B., Volkó, J., Bojcsuk, D., **Kolostyák, Z.**, Nagy, G., Müller, G., Simándi, Z., Hegedűs, É., Szabó, G., Tóth, K., Nagy, L., Vámosi, G.: Agonist binding directs dynamic competition among nuclear receptors for heterodimerization with retinoid X receptor.  
*J. Biol. Chem.* 295 (29), 10045-10061, 2020.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.RA119.011614>  
IF: 5.157
6. Simándi, Z., Pájer, K., Károlyi, K., Sieler, T., Jiang, L. L., **Kolostyák, Z.**, Sári, Z., Fekecs, Z., Pap, A., Patsalos, A., Contreras, G. A., Rehá, B., Papp, Z., Guo, X., Horváth, A., Kiss, G., Keresztessy, Z., Vámosi, G., Hickman, J., Xu, H., Dormann, D., Hortobágyi, T., Antal, M., Nógrádi, A., Nagy, L.: Arginine Methyltransferase PRMT8 Provides Cellular Stress Tolerance in Aging Motoneurons.  
*J. Neurosci.* 38 (35), 7683-7700, 2018.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3389-17.2018>  
IF: 6.074
7. Czimmerer, Z., Horváth, A., Dániel, B., Nagy, G., Cuaranta-Monroy, I., Kiss, M., **Kolostyák, Z.**, Póliska, S., Steiner, L., Giannakis, N., Varga, T., Nagy, L.: Dynamic transcriptional control of macrophage miRNA signature via inflammation responsive enhancers revealed using a combination of next generation sequencing-based approaches.  
*Biochim. Biophys. Acta. Gene Regul. Mech.* 1861 (1), 14-28, 2018.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagr.2017.11.003>  
IF: 4.599
8. Dániel, B., Nagy, G., Czimmerer, Z., Horváth, A., Hammers, D. W., Cuaranta-Monroy, I., Póliska, S., Tzerpos, P., **Kolostyák, Z.**, Hays, T. T., Patsalos, A., Houtman, R., Sauer, S., Francois-Deleuze, J., Rastinejad, F., Bálint, B. L., Sweeney, H. L., Nagy, L.: The Nuclear Receptor PPAR[gamma] Controls Progressive Macrophage Polarization as a Ligand-Insensitive Epigenomic Ratchet of Transcriptional Memory.  
*Immunity*. 49 (4), 615-626, 2018.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2018.09.005>  
IF: 21.522







9. Kiss, M., Czimmerer, Z., Nagy, G., Bieniasz-Krzywiec, P., Ehling, M., Pap, A., Póliska, S., Botó, P., Tzerpos, P., Horváth, A., **Kolostyák, Z.**, Dániel, B., Szatmári, I., Mazzone, M., Nagy, L.: Retinoid X receptor suppresses a metastasis-promoting transcriptional program in myeloid cells via a ligand-insensitive mechanism.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114 (40), 10725-10730, 2017.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1700785114>  
IF: 9.504
10. Cuaranta-Monroy, I., Simándi, Z., **Kolostyák, Z.**, Doan-Xuan, Q. M., Póliska, S., Horváth, A., Nagy, G., Bacsó, Z., Nagy, L.: Highly efficient differentiation of embryonic stem cells into adipocytes by ascorbic acid.  
*Stem Cell Res.* 13 (1), 88-97, 2014.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scr.2014.04.015>  
IF: 3.693

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 108,71**

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 17,661**

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, 2024.10.29.

