

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**Anoikisz és autofágia módon elhaló retina pigment epitél
sejtek eltávolításának *in vitro* vizsgálata összefüggésben
az időskori makula degenerációval**

Szatmári-Tóth Mária

Témavezető: Prof. Dr. Petrovski Goran, PhD



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS SEJT- ÉS IMMUNBIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2016

**Anoikisz és autofágia módon elhaló retina pigment epitél
sejtek eltávolításának *in vitro* vizsgálata összefüggésben
az időskori makula degenerációval**

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

Írta: Szatmári-Tóth Mária okleveles molekuláris biológus

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

Témavezető: Prof. Dr. Petrovski Goran, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Szabó Gábor, az MTA doktora

tagok: Dr. Löw Péter, PhD

Dr. Szentandrassy Norbert, PhD

A doktori szigorlat időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Biokémiai és Molekuláris
Biológiai Intézet könyvtára, 2015. november 26. 13 óra

Az értekezés bírálói:

Dr. Csont Tamás, PhD

Dr. Csutak Adrienne, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Szabó Gábor, az MTA doktora

tagok: Prof. Dr. Vereb György, az MTA doktora

Dr. Csont Tamás, PhD

Dr. Csutak Adrienne, PhD

Dr. Löw Péter, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet,
„A” épület tanterme, 2016. október 28. 10.30 óra

1. BEVEZETÉS

1.1. A retina

Az emberi szem falát három fő réteg alkotja: a legkülső réteg (az átlátszatlan fehér ínhártya és az átlátszó szaruhártya), a középső vaszkularizált réteg (az elülső szivárványhártya, a közbenső sugártest és a hátsó érhártya), és a legbelső réteg (a retina). A szem hátsó kamrájában található meg a többrétegű, különböző sejttípusokat tartalmazó retina. A neuroretina és a legkülső retina pigment epitélium (RPE) rétegek együttesen alkotják a retinát. A fotoreceptoroknak két típusa különböztethető meg: a gyenge fényviszonyok melletti látásért felelős pálcikák és a nappali és a színlátásért felelős csapok. A retina kicsi, központi része a makula (sárgafolt), amely a centrális látásért, környezetünk finom részleteinek érzékeléséért felelős terület, mely szükséges a mindennapi feladatok elvégzéséhez úgy, mint az olvasáshoz vagy a vezetéshez.

1.2. A retina pigment epitélium (RPE)

Az erősen pigmentált, polarizált, hatszögletű morfológiát mutató RPE sejtek egyrétegű szövetet hoznak létre. Az RPE és az alatta lévő Bruch-membrán (speciális extracelluláris mátrix (ECM) struktúra) együttesen képezik a külső vér-retina gátat, amely jelentősen hozzájárul a szem immunprivilegizált állapotának fenntartásához, a retina homeosztázisához és a normális látáshoz is. Mindezek mellett az RPE alapvető szerepet tölt be a retina egészséges működésében és a fotoreceptorok homeosztázisában azáltal, hogy szabályozza a fotoreceptor lemezek fagocitózist, valamint a tápanyagok, például a glükóz, a retinol és a zsírsavak szállítását a vérből a fotoreceptorokhoz. Az RPE felelős a szórt fény elnyeléséért, a látás minőségének javulásáért azáltal, hogy pigmentált sejtréteget képezve befedi a szemgolyó belső falát, és nagy mennyiségű antioxidánst halmoz fel az oxidatív stressz elleni védelem érdekében. További funkciója, különböző faktorok szekretálása, például növekedési faktorok, a retina és a choriokapilláris szerkezeti integritásáért felelős faktorok (PEDF vagy VEGF), valamint immunszuppresszív faktorok, amelyek hozzájárulnak a szem egészséges immunológiai státuszának a fenntartásához.

1.3. *In vitro* RPE sejtmodellek

Az RPE funkcionális vizsgálatára az elmúlt évtized során, a felnőtt retina pigment epitélium-19 (ARPE-19) sejtek váltak a leggyakrabban használt immortalizált

sejtvonalá. Eredetileg egy 19 éves férfi donor szeméből izolálták. A sejttenyészetek jellemző egy sejtrétegű macskaköves epiteliális morfológiája 15-20. passzázs számáig figyelhető meg a sejttenyésztő flaskákban, további passzázsuk hosszúkás, poligonális sejtek heterogén keverékét eredményezi. Az immortalizált sejtvonalak könnyen fenntarthatók, viszont elveszíthetik az eredeti RPE sejtek néhány fontos tulajdonságát. A primer hRPE sejteket humán kadáver szemből izolálják, valamint kereskedelmi forgalomban is kaphatóak. A különböző laboratóriumok kutatói az RPE sejtek felnőtt humán szemből történő izolálására alapvetően ugyanazt a protokollt használják. Igazolták, hogy a primer hRPE sejtek polarizáltak és barrier tulajdonságokkal bíró sejtréteget alkotnak. Továbbá meg tudják őrizni az eredeti szövet jellegzetes tulajdonságait, viszonylag heterogén morfológiát és donor variabilitást mutatnak, ellentétben az immortalizált sejtvonalakkal. Általában a primer sejtek csak néhány passzázs számig expandálhatók.

Az utóbbi évek embrionális őssejt technológiájának fejlődése új lehetőségeket nyújtott az RPE sejtek létrehozására. Néhány évvel ezelőtt Skottman és munkatársai pluripotens humán embrionális őssejtvonalakból (hESC) történő funkcionális RPE-szerű sejtek differenciáltatására kidolgoztak egy protokollt, mely állati eredetű összetevőktől mentes. *In vitro* körülmények között kimutatták, hogy ezek a sejtek hatszögletű, macskakőszerű morfológiájú, magas pigmentációs rátájú, rendkívül polarizált epiteliális sejtréteget alkotnak. Megfigyelték, hogy a humán embrionális őssejtekből származtatott RPE-szerű sejtek funkcionális tulajdonságai alapján nagyon hasonlítanak a natív RPE sejtekhez.

1.4. Az időskori makula degeneráció (AMD)

Napjainkban az AMD az időskorú emberek körében a vakság egyik vezető oka, világszerte körülbelül 50 millió ember szenved ebben a betegségben. Jellemző tünetei közé tartozik a látásélesség drasztikus csökkenése, a kontrasztérzékenység defektusa, az egyenes vonalak torzulása, az abnormális sötétadaptáció, a látótérkiesés, valamint a színlátás károsodása. A központi látás elvesztése, az olvasás, a vezetés és az arcok felismerésének zavarához vezet az AMD esetében. A belső és a környezeti kockázati tényezők, többek között az öregedés, a genetikai tényezők, a dohányzás, az alacsony antioxidáns tartalmú, tápanyagszegény étrend, az elhízás, a magas vérnyomás, a hiperkoleszterinémia és az érelmeszesedés, együttesen járulnak hozzá a betegség kialakulásához.

Az AMD száraz és nedves típusba sorolható, ez a két fő forma tovább bontható korai és késői szakaszra. A száraz AMD a betegség gyakoribb, lassan előre haladó, krónikus formája, amelyet kisebb fokú látásromlás jellemez. Ezzel ellentétben, a nedves típus az összes AMD betegeknek csak mintegy 10-15%-ánál fordul elő, progressziója viszonylag gyors, akut látásvesztést okozhat.

1.5. Sejthalál típusok az AMD patogenezisében

1.5.1. Anoikisz sejthalál

Anoikisz sejthalálról akkor beszélhetünk, amikor a sejtek sejtdhéziója vagy az ECM-hez való kötődésük nem megfelelő. Az anoikisznak lényeges szerepe van a fejlődés és a szöveti homeosztázis biztosításában, továbbá fontos védelmi mechanizmusként szolgál a szervezet számára azért, hogy megakadályozza a letapadás-független sejtnövekedést és a nem megfelelő mátrixhoz történő kötődést. Az apoptózissal összhangban, az anoikisz sejthalál szintén lehet extrinsic útvonal által közvetített, sejtfelszíni halál receptorokkal kiváltott és a mitokondriumon keresztüli intrinsic útvonal által vezérelt is. Anoikisz sejthalál indukálható a fotoreceptorokban és az RPE sejtekben drusen felhalmozódással a Bruch-membrán és a RPE réteg közötti térben, amely a sejtdhézió csökkenését és az RPE sejtek Bruch-membránról történő leválását eredményezi. Nemrégiben, munkacsoportunk egy *in vitro* modellt írt le anoikisz sejthalál kiváltásra az ARPE-19 sejtvonalon, poly-HEMA-val fedett tenyésztő edényekben 24 órás tenyésztéssel a sejtek letapadásának blokkolása révén.

1.5.2. Autofágia és autofágia-asszociált sejthalál

Az autofágia az eukarióta sejtekben egy evolúciósan konzervált mechanizmus a citoszol összetevők lizoszomális degradációjára, és a bomlástermékek újrahasznosítására. Emlősökben három különböző típusú autofágiát írtak le: makroautofágia, chaperon-mediált autofágia és mikroautofágia. Munkánk során a makroautofágiás útvonalat (a továbbiakban autofágiaként említjük) vizsgáltuk.

A mammalian target of rapamycin (mTOR) az autofágia folyamatát negatívan szabályozza. A tápanyag-megvonás, illetve a rapamicin kezelés inaktíválja az mTORC1-et, megváltoztatja az ULK1 és az Atg13 foszforilációs állapotát, amely végül az ULK1 kináz-aktivitásának fokozásához vezet, és autofágiát vált ki. A folyamat

következő lépésében kialakul az izolációs membrán, az úgynevezett fagofór, amely expandálódik és magába zárja a degradálandó anyagot, kettős membrán vezikulát alkotva, melyet autofagoszómának neveznek. A fagofór expandálásához és az autofagoszómák éréséhez az Atg12-Atg5-Atg16 komplex és a mikrotubulus-asszociált protein 1 könnyű lánc 3 (LC3) konjugációs rendszer szükséges. Az LC3 citoszolikus formája, az LC3-I, kovalensen konjugálódik a foszfatidil-etanol-amin lipidhez (PE), ami az LC3-II kialakulásához vezet, mely kapcsolódik a fagofór membránhoz. A p62, más néven sequestosome 1 (SQSTM1) fehérje, kapocsként funkcionál az LC3 és az ubiquitilált fehérjék között, elősegíti az ubiquitilált szubsztrátok degradációját. Végül az autofagoszóma külső membránja fúzióval a lizoszómákkal, autofagolizoszómákat alkot, ahol a tartalma lebomlik. A degradáció után kapott molekulákat újra fel lehet használni fehérjék szintetizálásához.

Normál fiziológiai körülmények között a legtöbb eukarióta sejtben alacsony alapszinten előfordul az autofágia, és éhezéssel, endoplazmatikus retikulum stressz-induktorokkal (brefeldin A) valamint rapamicinnel indukálható. A mai napig számos autofágia inhibitor leírtak, ilyen például a 3-metil-adenin (3-MA), wortmannin, bafilomycin A1, klorokvin (CQ), NH_4Cl vagy pepsztatin A. Az autofágia aktiváció ellenőrzésére leggyakrabban használt módszer az LC3-I-II átalakulás kimutatása LC3 ellenes antitestekkel immunoblott segítségével. A teljes autofágiás folyamat dinamizmusát az autofágiás flux mutatja, amely nyomon követhető az LC3-II turnover alapján autofágia inhibitor, például CQ, jelenlétében és hiányában western blott analízis alkalmazásával. Ha az autofágia túl magas szinten fordul elő, sejthalált idézhet elő. Az autofágia és a sejthalál kapcsolatára vonatkozóan az irodalomban ellentmondás található. Az általunk vizsgált jelenséget az irodalmi adatok hasonlósága alapján autofágia-asszociált sejthalál kategóriába soroltuk.

1.6. Gyulladás az AMD patogenezisében

A retina immunprivilegizált szövetnek tekinthető. Ennek az immunprivilegiumnak a fenntartásáért több tényező és mechanizmus is felelős, mint például a vér-retina gát jelenléte, a nyirokkeringés hiánya, a sejt kötött és a szolubilis immunszuppresszív faktorokkal biztosított gátló szemészeti mikrokörnyezet, valamint a szem belüli szisztémás immunválaszok szabályozása.

A nedves típusú AMD a vér-retina gát károsodásával jellemezhető, melynek eredménye az érhártya neovaszkularizációja (CNV), mely elősegíti a makrofágok bejutását a

perifériás keringésből, az immunsejtek felhalmozódását és elősegíti egy erősen immunogén környezet kialakulását. Manapság egyre több tanulmány összpontosít az olyan megbízható AMD biomarkerek azonosítására, melyek segítenék a betegség korai diagnózisát. A mai napig azonban még nincs olyan elfogadott, specifikus marker, amely megfelelő lenne a kezdeti AMD detektálására.

1.7. Elhaló sejtek eltávolítása professzionális és nem-professzionális fagocitákkal

A humán felnőtt szervezetben több milliárd sejt hal meg naponta. Ezeknek az elhaló sejteknek a gyors eltávolítása a szöveti homeosztázis fenntartásához nélkülözhetetlen. Az apoptotikus sejtek eltávolítása általánosan négy fő lépésre osztható: 1) szolúbilis kemoattraktánsok, úgynevezett "találj meg" szignálok kibocsátása az elhaló sejtek által, mint például ATP, UTP, lizofoszfatidil-kolin, hogy a fagocitákat a sejthalál helyszínére toborozzák; 2) specifikus "egyél meg" szignálok, mint például a foszfatidil-serin (PS) felismerése az elhaló sejtek felszínén a fagociták receptorai által. Az apoptózis során a PS gyorsan áthelyeződik a plazmamembrán külső felszínére. A TAM tirozin-kináz receptor család tagjai úgy, mint a Tyro3, Axl, Mer nem közvetlenül, hanem hídképző molekulákat használva kötődnek az apoptotikus sejteken lévő PS-hez. A Gas6 egy ismert PS-kötő hídképző molekula, amely hozzájárul az apoptotikus sejtek eltávolításának fokozásához; 3) a celluláris törmelék fagociták általi bekebelezése. Az apoptotikus sejtek felvételéhez szükséges az aktin filamentumok átszerveződése, úgy nevezett „fagocitáló kapu” formálódása az elhaló sejt törmelékek körül, majd azok internalizálása, valamint a fagoszóma érési lépések sorozata. A fagoszóma lumen egyre savasabbá válik, ami egy savas lizoszómális struktúrával történő fúzióhoz és az elhaló sejtek hatékony lebomlásához vezet; 4) a fagociták által a sejttörmelékek bekebelezésére adott immunválasz. Az apoptotikus sejtek fagocitózisa immunológiailag csendes folyamat.

A nedves típusú AMD esetében az új erek burjánzása és áthatolása az Bruch-membránon hozzájárul a makrofágok és dendritikus sejtek (DC) bejutásához a szubretinális térbe. Ezek a professzionális fagociták képesek az apoptotikus sejteket eltávolítani onnan. Azonban a száraz AMD esetében a vér-retina gát sértetlen marad, ezért a professzionális fagociták nem tudják elérni az elhaló sejteket, ebben az esetben a nem-professzionális fagociták felelősek az elhaló RPE sejtek felvételéért.

1.8. Az AMD kezelése

A száraz típusú AMD-re jelenleg nincs jóváhagyott kezelés. Azonban az antioxidánsok és omega-zsírsavak előnyös hatása bizonyított a betegség patogenezisében. A táplálékkiegészítő-alapú kezelés, beleértve az antioxidáns C- és E-vitamint, a cinket, a karotinoidokat, a luteint, a zeaxantint, valamint az omega-3 zsírsavakat, összefüggésben áll a retinális szövetek védelmével és az AMD késői nedves formájának megelőzésével, illetve progressziójának késleltetésével.

A nedves típusú AMD esetben, lézer fotokoaguláció vagy fotodinamikus terápia (PDT) segíthet megakadályozni a CNV további proliferációját. Mindemellett egy másik mód is szolgál az új erek növekedésének blokkolására, az intravitreális injekció formájában adott anti-VEGF. A triamcinolone (TC) pedig egy hagyományos kortikoszteroid, amelyet intravitreális injekcióként használnak a nedves AMD kezelésére. A szemészeti gyakorlatban jelenleg kombinált terápiákat alkalmaznak, az elsődleges kezelések hatékonyságának növelésére. Továbbá „scaffold” transzplantáción alapuló szöveti sebészeti stratégiákat is kidolgoztak már, amelyek utánozzák a Bruch-membránt, és a sejtek megtapadására szolgálnak. A legújabb vizsgálatok pedig kimutatták, hogy számos miRNS döntő szerepet játszik az AMD-asszociált folyamatok szabályozásában, ami arra utal, hogy a miRNS-ek új AMD terápiás célpontok lehetnek. Ezen felül, a sejt-alapú transzplantációs terápia a sérült RPE sejtréteg *in vivo* pótlására, illetve regenerálására összpontosít, retina és írisz pigment epitélium sejtek, valamint őssejtek alkalmazásával.

2. CÉLKITŰZÉSEK

- Autofágia-asszociált sejthalál indukálás ARPE-19, hRPE és hESC-RPE sejtekben H_2O_2 kezeléssel (oxidatív stressz modell) és szérum megvonással.
- *In vitro* modell létrehozása autofágia detektálására H_2O_2 -kezelt ARPE-19, hRPE és hESC-RPE sejtekben.
- Anoikisz és autofágia-asszociált módon elhaló RPE sejtek nem-professzionális fagociták, makrofágok, dendritikus sejtek általi eltávolításának kvantifikálása, amely modellként szolgálhat az AMD patogenezisére.
- A TC kezelés hatásának vizsgálata a professzionális és nem-professzionális fagociták kapacitására az autofágia-asszociált elhaló RPE sejtek bekebelezése során.
- A MerTK receptor szerepének tanulmányozása a TC-fokozott anoikisz módon elhaló RPE sejtek professzionális és nem-professzionális fagocitákkal történő felvételére.
- A gyulladáskeltő citokin felszabadulás mértékének meghatározása anoikisz és autofágia-asszociált módon elhaló RPE sejtek makrofágok általi fagocitózisa alatt.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Etikai engedélyek

Minden humán sejt izolációs kísérleti protokollt eleget tett a Helsinki Deklarációban foglalt irányelveknek és jóváhagyta ezeket a Debreceni Egyetem (Magyarország) Regionális Orvosi Etikai Bizottsága (DEOEC RKEB / IKEB Prot. No. 2745 -2008 és 3093-2010), illetve a Kuopioi Egyetemi Kórház (Finnország) Orvosi Etikai Bizottsága (42/2014), az Orvosi Jogi Ügyek Nemzeti Hatósága (Finnország) (Dnro 1426/32/300/05) és a Pirkanmaa Kerületi Kórház (Finnország) Etikai Bizottsága (Skottman / R05116).

3.2. Sejtenyésztés

Prof. Stephen Moss, (UCL, London, Egyesült Királyság) volt szíves rendelkezésünkre bocsátani az ARPE-19 sejtvonalat. Ezeket a sejteket 10% FCS-t (Gibco), 200 mM L-glutamint (Sigma-Aldrich) és 1% antibiotikum-antimikotikum oldatot (Hyclone) tartalmazó DMEM tápfolyadékban (Sigma-Aldrich) tenyésztettük 37°C-on, 5% CO₂ mellett. Az ARPE-19 sejteket legfeljebb 10-15 passzázs számig használtuk fel minden kísérletnél. A primer hRPE sejteket ismert szemészeti betegségben nem szenvedett, felnőtt humán kadáver szemből izoláltuk (életkor: 64-92 év). A Johnen és munkatársai által leírt protokoll alapján izoláltuk és tenyésztettük a hRPE sejteket 10% FCS-sel (Gibco), 200 mM L-glutaminnal (Sigma-Aldrich) és 1% antibiotikum-antimikotikum oldattal (Hyclone) kiegészített DMEM Nutrient Mixture F12 tápfolyadékban (Sigma-Aldrich). A hRPE sejtekkel minden kísérletet legfeljebb 2-5 passzázsra végeztünk. A hESC sejtek RPE differenciálási és fenntartási folyamata a korábban leírtak alapján történt. A konfluens hESC-RPE sejteket kollagén IV-gyel (Sigma-Aldrich) bevont tenyésztő lemezekre növesztettük RPE általános mediumban.

A humán monocitákat egészséges véradóktól származó vérkészítményből (buffy coat) izoláltunk gradiens centrifugálással, Ficoll-Paque Plus (Amersham Biosciences) felhasználásával, majd a mágneses szeparáláshoz CD14 humán mikrogöngyöket (Miltenyi Biotec) alkalmaztunk. A humán makrofágokat 5 napig differenciáltattuk 5 ng/ml M-CSF (Pepro-Tech) segítségével, 10% humán AB szérum (Sigma-Aldrich), és 10000 U/ml penicillin-10 mg/ml sztreptomycin (Sigma-Aldrich) tartalmú IMDM (Gibco) tápfolyadékban, 37 °C-on, 5% CO₂ atmoszférán. Az éretlen dendritikus sejteket frissen izolált monocitákból származtak. 2×10^6 sejt/ml sűrűségben 6-lyukú sejtenyésztő

edénybe helyeztük a monocitákat, és 5 napig tenyésztettük szérummentes AIM V tápfolyadékban (Gibco), amely 80 ng/ml GMCSF-et (Pepro-Tech), és 100 ng/ml IL-4-et (Pepro-Tech) tartalmazott. A tápfolyadékot azonos mennyiségű GMCSF-fel és IL-4-gyel egészítettük ki a 0. és a 3. napon. A dendritikus sejtek érését pro-inflammatorikus citokin eleggyel (10 ng/ml TNF- α (Pepro-Tech), 5 ng/ml IL-1 β (Pepro-Tech), 20 ng/ml IL-6 (Pepro-Tech), 75 ng/ml GMCSF (Pepro-Tech), és 1 mg/ml PGE2-t (Sigma-Aldrich)) indukáltuk az 5. napon és a sejteket a 6. napon gyűjtöttük be.

3.3. Anoikisz és autofágia-asszociált sejthalál indukció

Anoikisz sejthalál indukáláshoz, az ECM-ről való leválás modellezése érdekében az ARPE-19, a primer hRPE, illetve a hESC-RPE sejteket 24 órára poly-HEMA-val (Sigma-Aldrich) bevont sejtenyésző edényekre helyeztük. Az autofágia-asszociált sejthalál kiváltáshoz a klonfuens (80-90%-os) sejtréteget alkotó ARPE-19 és hRPE sejteknél 2-4 óra, 0,4-1mM H₂O₂ (Sigma-Aldrich) kezelést alkalmaztunk szérummegvonással. A hESC-RPE sejtek esetében szérummegvonással és 2 óra, 1mM H₂O₂ együttes kezeléssel indukáltunk az autofágia-asszociált sejthalált.

3.4. Sejthalál analízis

Az anoikisz és az autofágia-asszociált sejthalált az ARPE-19, a primer hRPE és a hESC-RPE sejteknél Annexin-V-FITC Apoptosis Detection Kit (MBL) segítségével határoztuk meg, a gyártó ajánlásai szerint. Az Annexin-V (AnxV) és/vagy propidium jodid (PI) pozitív sejtek százalékos arányát a BD FACS Calibur vagy BD Accuri C6 áramlási citométerrel (BD Biosciences) detektáltuk és az adatok WinMDI 2.8. szoftverrel értékeltük ki.

3.5. Antitestek és immunoblott

Az összegyűjtött sejteket PBS-sel mostuk, jéghideg lízispufferben (50 mM Tris-HCl; 0,1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich), 1 mM EDTA-t (Sigma-Aldrich), 15 mM 2-merkapto-etanol (2-MEA) (Sigma-Aldrich), proteáz inhibitor (Sigma-Aldrich)), vagy M-PER lízis reagensben (Thermo Scientific) homogenizáltuk. Az oldhatatlan sejtes anyagot centrifugálással eltávolítottuk és a fehérje koncentrációt Bradford-reagenssel (Sigma-Aldrich) határoztuk meg. Ezt követően a lizátumot 5x Laemmli loading pufferrel összekevertük és 10 percig forraltuk. Egyenlő mennyiségű fehérjét választottunk szét SDS poliakrilamid gélen. A fehérjéket PVDF-membránra (Merck-

Millipore) transzferáltuk, és utána 5% sovány tejporral (AppliChem) 1 órán át blokkoltuk. Ezután a membránokat egy éjszakán át 4 °C-on anti-LC3 (1: 2000) patkány poliklonális antitesttel (Novus Biologicals), anti-p62 (1: 2000) egér monoklonális antitesttel (Santa Cruz Biotechnology) vagy anti-MerTk (1: 1000) egér monoklonális antitesttel (R&D Systems) inkubáltuk. Ezt HRP-konjugált megfelelő fajspecifikus szekunder antitestekkel (Sigma-Aldrich) szobahőmérsékleten, 1 órán át tartó jelölés követte. Egér monoklonális GAPDH (1: 5000) (Covalab), tubulin (1: 5000) (Sigma-Aldrich) vagy β -aktin (1: 5000) (Sigma-Aldrich) ellenes antitestet használtunk egy éjszakán át, 4°C-on loading kontrollként. Az immunoreaktív termékeket az Immobilon Western kemilumineszcens szubsztrát (Merck-Millipore) alkalmazásával tettük láthatóvá. A western blot denzitometriás elemzését Image J szoftver segítségével végeztük el.

3.6. Elektron mikroszkópia

A transzmissziós elektronmikroszkópos (TEM) elemzéshez a H₂O₂-kezelt (1mM, 2h) ARPE-19 sejteket 0,1 M nátrium-kakodilát-pufferrel (pH 7,4) és 2,5%-os glutáraldehid-oldattal fixáltuk 2 órán keresztül. Ezt követően a sejteket háromszor, 10 percig mostuk 0,1 M nátrium-kakodilát pufferrel, (pH 7,4) és 7,5% szacharózzal, majd poszt-fixálással folytattuk, 1% OsO₄ oldattal 1 óráig. Ezután a mintákat dehidratáltuk etanol gradienssel (70%-os etanolban (20 percig), 96%-os etanolban (20 percig), 100%-os etanol (kétszer, 20 percig), és Durcupan ACM-be ágyasztuk be. Az ultravékony metszeteket uranil-acetáttal és ólom-citráttal festettük meg. A metszeteket Philips CM-10 TEM segítségével (Philips Electronic Instruments) 80 kV-on vizsgáltuk.

3.7. LC3 pozitív sejtek kvantifikációja

A GFP-LC3 expressziós plazmidot Prof. Noboru Mizushima (Tokiói Orvosi és Fogorvosi Egyetem) volt szíves rendelkezésünkre bocsátani. ARPE-19 sejteket üveg fedőlemezre növesztettük és a GFP-LC3 expressziós plazmidot tranziensen transzfektáltuk a konfluens sejtekbe PEI reagens (Sigma-Aldrich) felhasználásával (PEI: DNS arány = 4: 1; 1 μ g DNS/lyuk). A transzfektált ARPE-19 sejteket elő-kezeltük CQ-nel (25 μ M, 1óra) (Sigma-Aldrich), majd H₂O₂-dal (1mM, 2óra) inkubáltuk szérummentes médiumban. A kezelések után a sejteket 4% PFA-val (Sigma-Aldrich) fixáltuk 10 percig, és DAPI-val (0,3 μ g/ml) (Sigma-Aldrich) festettük meg, hogy szemléltessük a sejtmagot. A fluoreszcens képek Axiovert-200 Zeiss mikroszkóppal

(Carl Zeiss MicroImaging GmbH) készültek. A GFP-LC3 pozitív sejteket manuálisan megszámoltuk a fluoreszcens képek alapján. Ezzel párhuzamosan, a GFP-LC3 pozitív sejtek százalékos arányát áramlási citometriával is meghatároztuk BD FACS Aria III (BD Biosciences) segítségével. Továbbá, a GFP-LC3 pozitív, AV-tartalmú, és a GFP-LC3 negatív ARPE-19 sejteket a GFP fluoreszcenciájuk alapján kiszortoltuk BD FACS Aria III segítségével. Az adatgyűjtést és elemzést BD FACS Diva 6.2 szoftverrel végeztünk.

Az AV-ok és a sejthalál egyidejű detektálásához az ARPE-19 sejteket tranziensen transzfektáltunk mCherry-LC3 plazmiddal, melyet Dr. Gian Maria Fimia (University of Salento) volt szíves rendelkezésünkre bocsátani, H₂O₂-dal (1mM, 2óra) kezeltük, majd Annexin V- FITC jelölést használtunk. A LC3-pozitív AV-okat tartalmazó sejteket és/vagy a felületükön PS-t kifejező sejtek mennyiségét BD FACS Calibur áramlási citométerrel határoztuk meg.

3.8. Fagocitózis mérés

A fagocitákat előkezeltük 1μM TC-nal (Sigma-Aldrich), 48 órával a fagocitózis mérés előtt. A fagocitaként funkcionáló élő RPE sejteket szérummentes tápfolyadékban 24 órával a fagocitózis előtt sejtenyésző edényre helyeztük. A fagocitákat CMTMR-rel (Molecular Probes, 16 órás inkubáció, 7.5μM koncentrációval), az anoikisz és az autofágia-asszociált elhaló RPE sejteket pedig CFDA-val (2óra 12,5mM) (Molecular Probes) festettük meg. A fagocitákat ko-inkubáltuk az anoikisz vagy az autofágia-asszociált elhaló RPE sejtekkel, 4, 8, 12 vagy 24 órán át 1: 3, 1: 2 vagy 1: 5 arányban 37°C-on, 5% CO₂ mellett; szérummentes IMDM tápfolyadékban. A ko-inkubálás után a fagocitáló sejtelegyet tripszines kezelést követően összegyűjtöttük, centrifugáltuk, majd kétszeri PBS-sel történő mosást követően fixáltuk 1% -os PFA-val. A fagocitózis hatékonyságát FACS Calibur BD áramlási citométerrel mértük meg, az adatok elemzéséhez pedig WinMDI 2.8. szoftvert használtunk.

A 3-MA (10mM, 24 óra) kezelés fagocitózisra kifejtett hatásának vizsgálatára, 3-MA-nel előkezelt, majd a H₂O₂-dal (1mM, 2 óra) kezelt ARPE-19 sejteket koinkubáltuk makrofágokkal. Ezen túlmenően, a GFP-LC3-pozitív vagy a negatív ARPE-19 sejteket szétválasztottuk és újra szuszpendáltuk IMDM tápfolyadékban. Ezeket a különválasztott sejteket adtuk hozzá makrofágokhoz, hogy meghatározzuk a fagocitózis mértékét. A fagocitózist gátló vizsgálatoknál a makrofágokat előinkubáltuk 10 μg/ml anti-MerTk ellenanyaggal (R&D Systems) 10 percig, az elhaló sejtekkel történő ko-inkubálás előtt.

A Gas6 fagocitózisra kifejtett hatásának vizsgálatára a makrofágokat 200 ng/ml Gas6-tal (R&D Systems) kezeltük 24 órával az elhaló sejtek hozzáadása előtt.

3.9. Time-lapse mikroszkópos elemzés

Az *in vitro* fagocitózis méréshez a makrofágokat 24-lyukú sejttenyésztő edénybe helyeztük, majd 16 órán keresztül jelöltük 7.5 μ M CMTMR-rel. A sejteket koinkubáltuk a CFDA-festett (12,5mM, 2 óra), vagy a GFP-LC3 transzfektált elhaló RPE sejtekkel 1:2 arányban. A ko-kultúrák time-lapse mikroszkópos vizsgálatához egy, inkubátorral felszerelt (Solent Scientific), motorizált és automatizált, nagysebességű Hamamatsu ORCA-R2 digitális kamerával (Hamamatsu Photonics) rendelkező Olympus IX-81 inverz mikroszkópot használtunk. A sejteket 24 óráig figyeltük meg, mely követés során a sejttenyésztő edény különböző lyukairól és minden színcsatornáról 5. perces frekvenciával készültek képfelvételek. A digitális képeket XCE-RT xCellence Real Time szoftver (Olympus) segítségével alakítottuk time-lapse mozgóképpé 24 képkocka/másodperc sebességgel.

3.10. siRNS-ek és a makrofágok elektroporációja

Az siRNS-konstruktok az Ambion (Life Technologies) cégtől származtak: targeting adenosin A3 receptor (ADORA3) [3'-CGUCUAUGCCUAUAAAAUAtt (sense) és az 5'-UAUUUUUAUAGGCAUAGACGtt (antiszensz)] Axl receptor tirozin-kináz [3'-GGAACUGCAUGCUGAAUGAtt (sense) és 5'-UCAUUCAGCAUGCAGUUCctg (antiszensz)], a C-mer proto-onkogén tirozin-kináz (MERTK) [3'-GAACUUACCUUACAUAGCUtt (sense) és az 5'-AGCUAUGUAAGGUAAGUUCaa (antiszensz)] és a thrombospondin-1 (THBS1) [3'-GGACUGCGUUGGUGAUGUAtt (sense) és az 5'-UACAUCACCAACGCAGUCCtt (antiszensz)]. Az élő ARPE-19 sejteket és a makrofágokat, három nappal az izolálásuk után, 24-lyukú lemezekre helyeztük és mostuk egyszer DMEM-mel, vagy IMDM-mel, majd egyszer PBS-sel. A sejteket újra szuszpendáltuk fenolvörös nélküli OptiMEM-ben (Invitrogen Life Technologies) 4×10^7 /ml koncentrációban. Az siRNS-t (3 μ M) küvettába helyeztük, 100 μ l sejtszuspenziót adtunk hozzá, és az elektromos impulzus előtt 3 percig a Genepulser Xcell (Bio-Rad) készülékben inkubáltuk. Úgynevezett négyszög impulzusokat használtunk, a makrofágokat 0.5 ms-ig 500V-tal, az élő ARPE-19 sejteket pedig 10 ms-ig 250V-tal elektroporáltuk. Közvetlenül az elektroporáció után a makrofágokat humán AB szérummal és M-CSF-fel és TC-vel kiegészített IMDM

tápfolyadékba, az ARPE-19 sejteket pedig FBS-sel kiegészített DMEM tápfolyadékba helyeztük.

3.11. Immunofluoreszcens festés és konfokális mikroszkópia

A makrofágokat üveg fedőlemezen, a korábban leírtak szerint tenyésztettük. A makrofágokat az anoikisz elhaló sejtekkel 4 óráig ko-inkubáltuk, majd mosást követően anti-MerTk antitesttel (R&D systems) 1 órán át, jégen jelöltük. Ezt követően fluorokrómmal konjugált anti-egér NL-493 (R&D Systems) másodlagos antitestet használtunk, majd mosást követően a mintákat 4%-os PFA-val 10 percig jégen fixáltuk. A mintákat Zeiss LSM 510, illetve Olympus FV1000 konfokális lézer-pásztázó mikroszkóppal vizsgáltuk, majd Fiji szoftverrel elemeztük.

3.12. IL-6 és IL-8 szekréció kimutatása ELISA módszerrel

Az anoikisz és az autofágia-asszociált módon elhaló RPE sejtek makrofágok általi fagocitózisa alatt felszabadult IL-6 és IL-8 pro-inflammatorikus citokinek koncentrációját az összegyűjtött sejtenyésző tápfolyadékból mértük humán IL-6 ELISA OptEIA™ és a humán IL-8 ELISA OptEIA™ kitek (BD Biosciences) alkalmazásával a gyártó ajánlása szerint.

3.13. Statisztikai analízis

Minden vizsgálatot legalább három, egymástól független módon ismételtünk meg, és minden mintából három technikai párhuzamost képeztünk. Az eredményeket átlag $\pm$ SD (szórás), vagy átlag $\pm$ SEM (átlag szórása) formában fejeztük ki. A csoportok többszörös összehasonlításához, a statisztikai szignifikanciát egyirányú ANOVA, majd Tukey-féle post-hoc teszttel számítottuk és értékeltük. A csoportok közötti statisztikailag szignifikáns különbséget a párosított Student-féle t-tesztel (két végű) határoztuk meg és a $p < 0,05$ értéket tekintettük szignifikánsnak.

4. EREDMÉNYEK

4.1. Szérummegvonás és H₂O₂ kettős kezelés hatására az ARPE-19 és a primer hRPE sejtek idő- és koncentráció-függő módon haltak el

Az ARPE-19 és a hRPE sejteket szérum hiányában növekvő időtartamú (2-4 óra) és koncentrációjú (0,4mM, 0,8mM, 1mM) H₂O₂-dal kezelve életképes, korai és késői apoptotikus, valamint nekrotikus sejtpopulációk keverékét mutattuk ki Annexin V-FITC/PI kettős festés segítségével, a sejtek idő- és koncentráció-függő elhalását figyeltük meg. A sejtek többsége PS externalizáció mellett halt el, különösen 2 óra, 1 mM H₂O₂ kezelés után. A kezeletlen kontrollhoz viszonyítva 2 óra, 1mM H₂O₂-kezelés után az életképes ARPE-19 sejtek aránya jelentősen lecsökkent, 91,4±1,7%-ról 28,6±14,2%-ra, és ezzel párhuzamosan a csak AnxV⁺ ARPE-19 sejtek aránya jelentősen megnőtt 2,1±2%-ról, 41±10,8%-ra. A primer hRPE sejtek esetében hasonló tendencia volt megfigyelhető. 2 óra, 1mM H₂O₂ kezelés eredményeként az életképes sejtek százalékos aránya 87,1±4,9%-ról 51,6±3,6%-ra változott, és a sejtek 17,7±12,7%-a vált AnxV⁺-vá, míg a kezeletlen kontroll csak 3,2±2,8% korai apoptotikus sejtet tartalmazott. Nekrotikus sejthalál pozitív kontrollként nátrium-azid kezelést (4 óra, 1mM) alkalmaztunk. Ez a kezelés többnyire csak PI pozitív sejteket eredményezett, az ARPE-19 sejteknél 67,92±3,32%-ot és a hRPE sejteknél 42,59±12,80%-ot. Ezt összehasonlítva a H₂O₂-kezeléssel, jelentős különbséget tapasztaltunk, a sejteknek csak 10-30%-a volt PI pozitív. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a sejtek többsége PS externalizációval hal el. Összességében a H₂O₂-kezelés az RPE sejtek különböző sejthalál módozatainak keverékét eredményezte a vizsgált idő alatt.

4.2. A szérummegvonás és a H₂O₂ kettős kezelés hatása a hESC-RPE sejtek morfológiájára és életképességére

A kezeletlen hESC-RPE sejteknél nagyfokú pigmentáció és macskaköves morfológia volt megfigyelhető fáziskontraszt-mikroszkóp segítségével. Szérummegvonás (2 óra) hatására azonban sérült az egyrétegű struktúra. A szérum jelenlétében alkalmazott H₂O₂ kezelés (2 óra, 1 mM) után duzzadt és felvált hESC-RPE sejteket mutattunk ki. A H₂O₂ (2 óra, 1 mM) és a szérummegvonás együttes használata megnövelte a felvált, elhalt sejt aggregátumok mennyiségét. Az életképes hESC-RPE sejtek százalékos aránya szérummegvonás és H₂O₂ együttes kezelés eredményeként a kezeletlen kontrollhoz képest jelentősen lecsökkent, 88,35±0,88%-ról 55,22±13,12%-ra. Ezzel párhuzamosan,

a csak AnxV pozitív hESC-RPE sejtek aránya a kezeletlen kontrollal összehasonlítva jelentősen megnövekedett az együttes kezelést követően, $9,85 \pm 1,13\%$ -ról $39,86 \pm 11,73\%$ -ra nőtt. A hESC-RPE sejtek kettős kezelésre adott válasza hasonló volt, mint amit az ARPE-19 sejteknél megfigyeltünk, mintegy 40% csak AnxV pozitív, PS externalizáló sejt volt kimutatható mindkét sejt típusnál.

4.3. ECM-ről való leválással indukált anoikisz sejthalál a hESC-RPE sejteknél

A hESC-RPE sejtek esetében anoikisz sejthalál indukcióhoz a munkacsoportunk által korábban leírt protokollt használtuk. A kezeletlen hESC-RPE sejtek reprezentatív fáziskontraszt felvétele konfluens, erősen pigmentált macskaköves egy sejtréteget mutatott. Ezzel ellentétben az anoikisz hESC-RPE sejteknél, úszó aggregált képződményeket figyeltünk meg. Az ECM-ről való leválás a kontrollhoz képest az életképes hESC-RPE sejtek arányának jelentős csökkenését eredményezte, ez $88,35 \pm 0,88\%$ -ról $64,36 \pm 1,84\%$ -ra változott. Ezzel párhuzamosan a csak AnxV pozitív anoikisz-indukált hESC-RPE sejtek arányának ($27,86 \pm 3,58\%$) szignifikáns növekedését detektáltuk, a kezeletlen kontroll esetében ez csupán $9,85 \pm 1,13\%$ volt. Továbbá, az anoikisz sejtek $7,10 \pm 3,30\%$ kettős pozitív, késői apoptotikus sejtet tartalmaztak, ezzel szemben a kontroll esetében csak $1,14 \pm 0,11\%$ kettős pozitív sejtet mértünk.

4.4. Idő- és koncentráció-függő autofágia indukció az ARPE-19 és hRPE sejtekben

LC3-II/LC3-I arány idő-és koncentráció-függő növekedését mutattuk ki az ARPE-19 és a hRPE sejtekben western blott analízissel, növekvő koncentrációban (0,4mM, 0,8mM, 1mM), és időközönként (2 óra, 4h) alkalmazott H_2O_2 kezelés eredményeként, szérumban hiányában a kezeletlen kontrollhoz képest. A hRPE sejtekben a legmagasabb autofágiás aktivitás 2 óra, 1mM H_2O_2 kezelés után volt megfigyelhető szérumban körülmények között. Az ARPE-19 sejteknél, ugyanezt a kezelést alkalmazva, szintén megnövekedett LC3-I-LC3-II átalakulást detektáltunk. Ezzel párhuzamosan az SQSTM1/p62 expressziós szintjét is megvizsgáltuk. Válaszul a szérumban megvonás és a H_2O_2 együttes kezelésre csökkenő p62 expressziós tendencia volt kimutatható az ARPE-19 sejtekben, összehasonlítva a kezeletlen kontrollal. Továbbá, a H_2O_2 kezelés (2 óra, 1 mM) eredményeként citoszolikus komponenseket tartalmazó kettős-membránnal határolt autofágiás vakuolumokat (AV) tudtunk detektálni TEM segítségével. Összefoglalva,

ezek az adatok arra utalnak, hogy a 2 órás, 1 mM H_2O_2 kezelés jelentős autofágia indukcióhoz vezethet ARPE-19 és hRPE sejtekben.

4.5. Autofágia indukció hESC-RPE sejtekben szérummegvonás és H_2O_2 kettős kezelés következtében

Szérummegvonás és H_2O_2 (2 óra, 1mM) együttes kezelés hatására vizsgáltuk a hESC-RPE sejtekben az autofágia aktivitást. Alap autofágiás aktivitás volt megfigyelhető a kezeletlen kontroll sejtek esetében, ami 2 óra szérummegvonás, valamint a szérum jelenlétében alkalmazott 2 óra, 1mM H_2O_2 kezelés eredményeként fokozódott. A szérum hiányában használt H_2O_2 (2 óra, 1mM) kezelés tovább növelte a LC3-II/LC3-I arányt. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy az autofágiás folyamat szérum megvonás és H_2O_2 (2 óra, 1mM) együttes kezelés következtében fokozódik az hESC-RPE sejtekben.

4.6. Emelkedett autofágiás flux ARPE-19 és hRPE sejtekben

Az LC3-II/LC3-I arányok között szignifikáns különbséget állapítottunk meg CQ (0,5 óra, 12,5 μM) hiányában és jelenlétében az ARPE-19 sejtekben H_2O_2 kezelés (2 óra, 1 mM) alatt, mind szérum hiányában, mind szérum jelenlétében, ami azt jelzi, hogy H_2O_2 -expozíció alatt nőtt az autofágiás flux. A hRPE sejtek esetében szérum jelenlétében a CQ előkezelés szintén LC3-II felhalmozódáshoz vezetett, az LC3-II/LC3-I arány szignifikánsan nőtt, bizonyítva az autofágiás flux emelkedését.

4.7. Autofágia-asszociált sejthalál indukció RPE sejtekben

Szérummegvonás és H_2O_2 (2 óra, 1mM) együttes kezelés hatására perinukleáris GFP-LC3 pozitív aggregátumok, illetve gyűrű alakú AV-ok felhalmozódását figyeltük meg. A CQ-előkezelt (1 óra, 25 μM), majd H_2O_2 -dal kezelt (2 óra, 1 mM) sejtek intenzívebb fluoreszcens pöttyöket és nagyobb GFP-LC3 pozitív AV-okat mutattak. A fluoreszcens képek alapján, manuálisan számlálva a sejtek 40,9 $\pm$ 8,4%-a tartalmazott GFP-LC3-pozitív vakuólumokat H_2O_2 (2 óra, 1mM) kezelés után szérummentes médiumban. Ezzel párhuzamosan, áramlási citometriás elemzés segítségével a sejtek fluoreszcenciája alapján 23,9 $\pm$ 1,2%-ot találtuk GFP-LC3-pozitívnak. Ezek az adatok is azt jelzik, hogy H_2O_2 -kezelés és szérum megvonás hatására autofágiás folyamat váltható ki az ARPE-19 sejtekben.

Az LC3-pozitív AV-okat és a PS-externalizációt egyidejűleg vizsgáltuk a H₂O₂-kezelt (2 óra, 1mM), mCherry-LC3 tranziensen transzfektált ARPE-19 sejtekben. FACS-analízis segítségével azt találtuk, hogy a kezeletlen sejtek 15,02%-a volt LC3⁺, ami H₂O₂ kezelés eredményeként 28.76%-ra emelkedett, mindeközben az AnxV⁺ sejtek száma 3,4%-ról 17,5%-ra nőtt. Továbbá kimutattuk, hogy az LC3⁺ sejtek 52,3%-a volt AnxV⁺; míg az AnxV⁺ sejtek 83,88%-a volt LC3⁺ is. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy H₂O₂ kezelés hatására autofágia-asszociált folyamatok aktiválódnak az elhaló ARPE-19 sejtek többségében.

4.8. Anoikisz módon elhaló sejtek hatékony eltávolítása makrofágok és nem-professionális RPE sejtek segítségével

Azt találtuk, hogy az anoikisz módon elhaló RPE sejteket 24 órás időintervallum alatt hatékonyan és egyre növekvő mértékben tudták bekebelezni mind a nem-professionális fagocitaként funkcionáló élő RPE sejtek, mind a makrofágok. Az anoikisz módon elhaló ARPE-19 sejtek élő ARPE-19 sejtek általi fagocitózis átlaga $3,16 \pm 0,91\%$ volt 4 óra ko-inkubációnál. Amikor az anoikisz módon elhaló ARPE-19 sejteket makrofágokkal inkubáltuk együtt, magasabb fagocitózis arányt figyeltük meg, 4 óra alatt ez $5,07 \pm 0,27\%$ volt. Az anoikisz módon elhaló primer hRPE sejteket a makrofágok még hatékonyabban vették fel, a fagocitáló kapacitás $12,56 \pm 2,38\%$ volt 4 óra ko-inkubáció után. A TC kezelés a legtöbb esetben növelte az elhaló sejtek eltávolításának hatékonyságát.

4.9. A makrofágok és az élő RPE sejtek képesek hatékonyan bekebelezni az autofágia-asszociált elhaló RPE sejteket

Az ARPE-19 sejtek és a makrofágok az autofágia-asszociált elhaló RPE sejteket növekvő kapacitással tudták bekebelezni 24 órás időintervallum alatt. Az ARPE-19 sejtek hatékonyan vették fel az autofágia-asszociált elhaló ARPE-19 sejteket, 8 óra ko-inkubálás esetében a fagocitózis átlaga $3,8 \pm 1,1\%$ volt. Hasonló fagocitózis rátát mértünk az autofágia-asszociált elhaló ARPE-19 sejtek és a makrofágok koinkubációját követően, 8 óránál $6,9 \pm 1,7\%$ -ot. Az autofágia-asszociált elhaló primer hRPE sejteket a makrofágok még hatékonyabban tudták eltávolítani, a fagocitáló kapacitás $21,2 \pm 3,3\%$ volt 8 óra ko-inkubáció után. 48 órával a fagocitózis vizsgálat előtt, a fagocitákat TC-vel kezeltük, ami a legtöbb esetben fokozta a bekebelező kapacitásukat.

4.10. A 3-MA gátló hatása az ARPE-19 sejtek autofágia-asszociált sejthalálára és következményes hatása a fagocitózisra

A H_2O_2 -kezelt (2 óra, 1mM) ARPE-19 sejtekben 3-MA (24 óra, 10mM) hatására az LC3-I LC3-II-vé történő átalakulás részleges blokkolását mutattuk ki western blott analízis segítségével, ezzel igazoltuk az autofágiás folyamat gátlását. Továbbá azt találtuk, hogy az élő sejtek száma szignifikánsan növekedett, míg az AnxV⁺ és PI⁺ és a dupla pozitív H_2O_2 -kezelt ARPE-19 sejtek száma szignifikánsan csökkent az inhibitoros kezelés következtében. A 3-MA előkezelés gátolta az autofágia-asszociált sejthalált az ARPE-19 sejtekben, továbbá szignifikánsan csökkentette az autofágia-asszociált elhaló sejtek fagocitózisának mértékét, 8 óra ko-inkubálást követően a kezeletlen makrofágok esetében $8,45 \pm 0,56\%$ -ról $3,24 \pm 0,52\%$ -ra, és a TC-vel kezelt makrofágoknál $10,49 \pm 1,01\%$ -ról $5,90 \pm 2,89\%$ -ra csökkent.

4.11. A GFP-LC3 pozitív autofágia-asszociált elhaló ARPE-19 sejtek makrofágokkal történő eltávolítása

A GFP-LC3 transzfektált, H_2O_2 -kezelt ARPE-19 sejteket 8 óráig makrofágokkal ko-inkubáltuk és áramlási citométerrel kvantifikáltuk a fagocitózis rátát, hogy megvizsgáljuk, vajon a fagocitált sejtek ténylegesen autofágia-asszociált (elhaló sejtek) és nem más típusú elhaló sejtek. A makrofágok képesek voltak, bekebelezni a H_2O_2 -kezelt, GFP-LC3 transzfektált ARPE-19 sejteket, a fagocitózis mértéke $9,3 \pm 3,7\%$ volt, ami összehasonlítható az élő festéssel, H_2O_2 -kezelt ARPE-19 sejtek makrofágok általi felvételével. Ezen túlmenően a FACS Aria III áramlási citométer segítségével kiszortolt GFP-LC3 pozitív és negatív ARPE-19 sejteket 8 órán át ko-inkubáltuk a makrofágokkal. Elhanyagolható mennyiségű GFP-LC3 negatív, nem autofágia-asszociált ARPE-19 sejtet kebeleztek be a makrofágok ($0,6 \pm 0,2\%$). Ezzel ellentétben, a GFP-LC3 pozitív RPE sejtek felvételének mértéke közel azonos ($13,7 \pm 3,3\%$) volt azzal, mint amit a nem szortolt autofágia-asszociált elhaló sejtek esetében mértünk, így bizonyítani tudtuk szerepüket a fagocitáló folyamatban. Sőt, TC előkezelés eredményeként a GFP-LC3 transzfektált, H_2O_2 -kezelt ARPE-19 sejtek eltávolítása szignifikánsan fokozódott.

4.12. Anoikisz és autofágia-asszociált módon elhaló hESC-RPE sejtek makrofágok általi bekebelezése

A makrofágok hatékonyan kebelezték be az anoikisz módon elhaló hESC-RPE sejteket: a fagocitózis ráta 4 óra ko-inkubáció után $32,40 \pm 3,45\%$ volt. Az autofágia-asszociált elhaló hESC-RPE sejtek makrofágokkal történő felvétele még hatékonyabb volt 8 óra ko-inkubációt követően: $50,72 \pm 2,98\%$. TC kezelés hatására mérsékelten fokozódott a makrofágok fagocitáló kapacitása az anoikisz elhaló hESC-RPE sejtek ($35,15 \pm 3,85\%$) és az autofágia-asszociált elhaló hESC-RPE sejtek ($58,70 \pm 8,68\%$) bekebelezése során.

4.13. A dendritikus sejtek *in vitro* körülmények között hatékonyan képesek felvenni az elhaló sejteket

Az anoikisz módon elhaló ARPE-19 sejteket alacsony mértékben kebelezték be mind az éretlen ($3,26 \pm 0,58\%$), mind az érett dendritikus sejtek ($2,88 \pm 1,14\%$) 4 óra ko-inkubáció alatt. Ezzel ellentétben, a dendritikus sejtek fagocitáló kapacitása az autofágia-asszociált módon elhaló ARPE-19 sejtek bekebelezése során sokkal magasabb volt, az éretlen dendritikus sejtek esetében ez $26,7 \pm 10,8\%$ volt 8 óra ko-inkubációt követően, és $21,4 \pm 6,4\%$ volt mikor gyulladásos citokin koktélt használtunk a dendritikus sejtek érésének stimulálására.

4.14. A TC-által felregulált gének csendesítésének hatása a fagocitózisra

TaqMan Low Density Array segítségével megállapítottuk, hogy TC kezelés hatására az elemzett 95 gén közül 55 génnek szignifikánsan megváltozott az expressziós szintje anoikisz ARPE-19 sejtek fagocitózisa során, az elhaló sejtek nélküli TC-kezelt makrofágokkal összehasonlítva. Ez után azt kívántuk bizonyítani, hogy az apopto-fagocita gének TC-indukált felregulációja közvetlen hatással van-e a makrofágok fagocitáló képességének fokozására. siRNS transzfekciós módszert használtunk a kiválasztott felregulált gének elcsendesítésére: ADORA3, THBS1, AXL, MERTK. A cél gének csendesítésének hatékonysága biológiai varianciát mutatott a különböző makrofág donorok között és az egyes élő ARPE-19 sejt repetíciók között is eltérések voltak. A makrofágokban a TAM család tagjainál mutatkozott a leggyengébb csendesítő hatás és a fagocitózis mértékében jelentős csökkenés csak a TC-kezelt MERTK és AXL knock-down makrofágok esetében volt kimutatható. A TC-kezelt élő ARPE-19 sejtek MERTK és AXL csendesítésének eredményeként az anoikisz ARPE-19 sejtek nem-professzionális fagociták általi bekebelezése szignifikánsan csökkent.

4.15. A MerTk receptornak döntő szerepe van a TC kezeléssel fokozott, anoikisz módon elhaló sejtek makrofágok által történő eltávolításában

TC hiányában a makrofágok fagocitáló kapacitását nem lehetett gátolni MerTk blokkoló antitesttel, míg a TC-kezelt makrofágokkal történő anoikisz módon elhaló ARPE-19 sejtek bekebelezését a blokkoló antitesttel lassítani lehetett. Immunofluoreszcens festés segítségével meghatároztuk a MerTk receptor eloszlását a makrofágok bekebelező kapujánál az anoikisz módon elhaló ARPE-19 sejtek felvétele során TC jelenlétében, illetve hiányában. A makrofágok és az anoikisz ARPE-19 sejtek határánál pontszerű MerTk jelet tudtunk kimutatni, amely szignifikánsan felhalmozódott az elhaló ARPE-19 sejtek és a TC-kezelt makrofágok kapcsolódási pontjai között. Továbbá western blott analízissel meghatároztuk a MerTk fehérje expressziós szintjét; mindkét kezeletlen sejttypusnál alacsony volt, viszont TC kezelés hatására sokkal több MerTk fejeződött ki a makrofágokban az anoikisz elhaló ARPE-19 sejtek bekebelezése során.

4.16. A MerTk gátlásának hatása a TC kezeléssel fokozott, elhaló RPE sejtek nem-professzionális fagociták által történő eltávolítására

TC hiányában a MerTk blokkoló antitest nem tudta gátolni az élő ARPE-19 sejtek fagocitáló kapacitását. Ezzel szemben a TC kezeléssel fokozott fagocitózis mértéke mind a fagocitáknál, mind az anoikisz ARPE-19 sejteknél alkalmazott blokkoló antitest hatására jelentősen csökkent. Immunofluoreszcens festéssel pontszerű MerTk struktúrákat detektáltunk a nem-professzionális fagociták és az anoikisz módon elhaló ARPE-19 sejtek határánál, amely jelentősen felhalmozódott a bekebelező kapuknál, a TC-kezelt fagociták és az elhaló sejtek között. Továbbá western blott analízissel meghatároztuk a MerTk fehérje expressziós szintjét; a TC kezeletlen sejteknél alacsony expressziót detektáltunk, míg a fagocitáló ARPE-19 sejtek TC kezelésének eredményeként a fagocitózis alatt megemelkedett a MerTk expressziója.

4.17. A MerTK receptor gátlásának és serkentésének hatása a makrofágokkal történő elhaló primer hRPE sejtek fagocitózisára

A TC kezelés (48 óra, 1 μ M) szignifikánsan növelte a makrofágok fagocitáló képességét az elhaló hRPE sejtek eltávolítása során, körülbelül 1,5-2-szer nagyobb fagocitáló ráta volt megfigyelhető 4 óra ko-inkubációt követően. A TC-kezelt makrofágokhoz MerTk blokkoló antitestet adva szignifikánsan csökkent az elhaló hRPE sejtek bekebelezése. Végül megvizsgáltuk, hogy a MerTk ligandja, a Gas6 hídképző molekula hatással van-e

az anoikisz módon elhaló ARPE-19 és hRPE sejtek fagocitózisára. TC kezelés nélkül a makrofágok fagocitáló képessége mérsékelten fokozódott Gas6 kezelést követően. Ezzel párhuzamosan a TC-kezelt makrofágok esetében jelentős, koncentráció-függő fagocitózis-fokozó hatást mutattunk ki, a MerTk szignifikánsan felregulálódott mind mRNS, mind fehérje szinten.

4.18. IL-6 és IL-8 szekréció az autofágia-asszociált módon elhaló RPE sejtek professzionális fagociták általi eltávolításakor

Elhanyagolható mennyiségű IL-6 és IL-8 szekréciót figyeltük meg a TC-kezelt és a kezeletlen makrofágok esetében. Az autofágia-asszociált módon elhaló ARPE-19 és hRPE sejtek szignifikánsan nagyobb mennyiségű IL-8 citokint szekretáltak, mint IL-6-ot. A makrofágok ko-inkubálása az autofágia-asszociált módon elhaló ARPE-19 vagy hRPE sejtekkel megnövekedett IL-6 és IL-8 koncentrációt eredményezett. A makrofág-elhaló sejt ko-inkubáció után, nagyobb mennyiségű kibocsájtott IL-8-at detektáltuk, mint IL-6-ot. Az ARPE-19 és hRPE sejtek TC-kezelt makrofágokkal történő fagocitózisa során csökkent IL-6 és IL-8 citokin szekréciót mértünk. Ezek az eredmények azt jelzik, hogy az autofágia-asszociált módon elhaló RPE sejtek makrofágok általi eltávolítása pro-inflammatórikus válaszhoz vezet *in vitro*.

4.19. Az anoikisz és az autofágia-asszociált módon elhaló hESC-RPE sejtek makrofágok általi bekebelezése IL-6 és IL-8 szekrécióhoz vezetett

A makrofág kontrollok, elhaló sejtek nélkül nem termeltek IL-6 citokint. Az anoikisz hESC-RPE sejtek makrofágok általi fagocitózisa jelentősen megnövekedett IL-6 szekrécióhoz ($836,33 \pm 252,27$ pg/ml) vezetett, amely TC kezelés eredményeként lecsökkent ($780,87 \pm 279,18$ pg/ml). Az autofágia-asszociált módon elhaló sejtek felvételekor szignifikánsan alacsonyabb szintű IL-6 felszabadulás ($324,37 \pm 67,43$ pg/ml) volt megfigyelhető, mint az anoikisz módon elhaló sejtek eltávolításakor. A makrofág kontrollok kis mennyiségű IL-8 citokint szekretáltak, TC-kezelés nélkül ($120,92 \pm 1,90$ pg/ml) és TC-kezelés mellett ($84,40 \pm 2,48$ pg/ml). Érdekes módon a makrofágok az anoikisz módon elhaló sejtek felvételére fokozott IL-8 termeléssel ($1057,33 \pm 416,56$ pg/ml) válaszoltak, ami szignifikánsan lecsökkent a TC-kezelés ($892,11 \pm 442,08$ pg/ml) következtében. Az autofágia-asszociált módon elhaló sejtek bekebelezése alatt kisebb mennyiségű IL-8 szabadult fel ($318,13 \pm 67,99$ pg/ml), mint az anoikisz módon elhaló sejtek fagocitózisakor.

5. MEGBESZÉLÉS

Az AMD egy komplex, neurodegeneratív betegség; előfordulása világszerte egyre növekszik, valószínűleg hamarosan jelentős globális közegészségügyi problémává fog válni. Leggyakoribb formája a száraz típusú AMD, melyre jelenleg nem létezik specifikus kezelés. A nedves típusú AMD esetében új erek nőnek keresztül a Bruch-membránon a subretinális pigment epitél térbe, ahol membránsérülést és vér- illetve folyadékszivárgást tudnak okozni. Jelenleg csak néhány lehetőség áll rendelkezésre a nedves AMD kezelésére. Szükség van új modellek létrehozására az AMD patogenezisének tanulmányozására, új terápiás megközelítések kidolgozásához.

Több útvonal is kapcsolódik az AMD progressziójához, például a sejthalál, a fagocitózis és a gyulladásos folyamatok. Különböző sejthalál típusok járulhatnak hozzá az AMD kialakulásához úgy, mint az apoptózis, az anoikisz, illetve az autofágia. A jelen tanulmányban célul tűztük ki egy *in vitro* modell létrehozását az ARPE-19, a primer hRPE és a hESC-RPE sejtek anoikisz és autofágia-asszociált sejthalálának kimutatására. Megvizsgáltuk, hogy a hESC-RPE sejtekben indukálható-e anoikisz sejthalál poly-HEMA-val fedett tenyésztőedényeken. Azt találtuk, hogy ezek a sejtek nem tapadtak le a poly-HEMA fedett felületre, úszó aggregátumokat képeztek, továbbá magas arányú AnxV pozitivitást (27%) figyeltünk meg ezekben a sejtekben.

Az RPE sejtek megnövekedett oxidatív károsodása szerepet játszik az AMD progressziójában. A leggyakrabban használt *in vitro* oxidatív stressz induktor a H_2O_2 . Az oxidatív stressz összefügg a magas autofágiás aktivitással. Az RPE sejtekben H_2O_2 -kezelést alkalmaztunk oxidatív stressz modellként, illetve autofágia és autofágia-asszociált sejthalál kiváltására és tanulmányozására. Növekvő koncentrációban (0,4-1mM) és idő-intervallumban (2-4 óra) használtunk H_2O_2 -kezelést az ARPE-19 és a hRPE sejtekben, hogy megkapjuk a leghatékonyabb kezelést az autofágia indukcióhoz. A H_2O_2 kezelést szérummegvonással kombináltuk, amely egy jól ismert autofágia induktor, és vizsgáltuk ennek a kettős-kezelésnek a hatását a sejthalál mértékére és az autofágia szintjére az RPE sejtekben. Ez a kettős-kezelés heterogén elhaló RPE sejtpopulációk kialakulását eredményezte. Azt találtuk, hogy a PS^+ , elhaló RPE sejtek aránya idő-és koncentráció-függő módon fokozódott H_2O_2 -kezelés hatására. 2h, 1mM H_2O_2 kezelést követően mutattuk ki a legnagyobb arányban a csak AnxV pozitív sejteket, az ARPE-19 sejtek $41 \pm 10,8\%$ -a, a hRPE sejtek $17,7 \pm 12,7\%$ -a és a hESC-RPE sejteknek mintegy 40%-a lett AnxV⁺.

Az RPE sejtekben H_2O_2 kezelés eredményeként kialakult autofágia indukció igazolására különböző módszereket használtunk. Western-blott analízissel mindhárom RPE sejttypusnál kimutattuk az LC3-II/LC3-I arány idő- és koncentráció-függő növekedését, különösen 2 óra, 1mM H_2O_2 kezelés alkalmazásakor. Továbbá az ARPE-19 sejtekben H_2O_2 kezelés hatására (2 óra, 1mM) szérummegvonás mellett szignifikánsan csökkent p62 szintet tudtuk detektálni western blott analízissel, valamint felhalmozódott autofagoszómákat TEM-mel, a GFP-LC3-pozitív sejtek számának növekedését fluoreszcens mikroszkóppal és magasabb GFP fluoreszcencia intenzitást a GFP-LC3 transzfektált sejteknél áramlási citometriával, a kezeletlen kontroll sejtekhez képest.

Az ARPE-19 és a hRPE sejtekben megvizsgáltuk a H_2O_2 kezelés (2 óra, 1 mM) alatti autofágiás folyamat dinamizmusát. Az autofágiás flux értékeléséhez megnéztük az LC3-II turnover-t CQ jelenlétében western blott segítségével. CQ kezelés hatására felhalmozódott az LC3-II, mely jelentősen megnövelte az LC3-II/LC3-I arányt, ezáltal bizonyítva az autofágiás flux fokozódását H_2O_2 -kezelés hatására. Következésképpen, az RPE sejtekben H_2O_2 -kezeléssel (2 óra, 1 mM) autofágia aktiválható, illetve ezeknek a megközelítéseknek a kombinációja az autofágia kimutatására szolgáló *in vitro* modell létrejöttéhez vezetett az RPE-sejtekben.

Továbbá megvizsgáltuk, hogy az $LC3^+$ RPE sejtek, hány százaléka $AnxV^+$ is és az $AnxV^+$ elhaló RPE sejtek közül mennyi mutat $LC3$ -pozitivitást H_2O_2 kezelés esetén. A szérum hiányában H_2O_2 -dal kezelt (2 óra, 1mM) ARPE-19 sejtekben egyidejűleg elemeztük az $LC3$ -pozitív AV-okat mCherry- $LC3$ plazmid transzfekció segítségével és a PS-externalizációt Annexin V-FITC jelöléssel áramlási citometriát használva. Eredményeink megerősítik, hogy szérummegvonás és H_2O_2 (2 óra, 1mM) kezelés által oxidatív stressz eredményeként az autofágia-asszociált folyamat kiváltható az elhaló ARPE-19 sejtek többségében.

Azt tapasztaltuk, hogy ARPE-19 sejtek és a makrofágok *in vitro* körülmények között hatékonyan és a ko-inkubálási idő növelésével fokozódó mértékben kebelezték be az autofágia-asszociált elhaló ARPE-19, primer hRPE és az hESC-RPE sejteket, ezen kívül a TC előkezelés fagocitózis kapacitást fokozó hatását is kimutattuk. A FACS elemzéssel párhuzamosan time-lapse mikroszkóppal is nyomon követtük az autofágia-asszociált elhaló RPE sejtek fagocitózisát. A makrofágok képesek voltak hatékonyan eltávolítani az anoikisz módon elhaló primer hRPE és a hESC-RPE sejteket; továbbá TC-előkezelés eredményeként mindkét esetben nőtt a fagocitózis ráta. Érdekes módon, a dendritikus sejtek sokkal több autofágia-asszociált elhaló ARPE-19 sejtet tudtak

bekebelezni, mint a nem-professzionális ARPE-19 sejtek vagy a makrofágok. Azonban az anoikisz módon elhaló ARPE-19 sejteket alacsony hatékonysággal vették fel a dendritikus sejtek.

Ezután megnéztük, hogyan változik a H_2O_2 -kezelt RPE sejtek sejthalálának mértéke és a makrofágok általi eltávolítása, ha 3-MA, PI3K inhibitorral blokkjuk az autofagoszóma kialakulását. Először is western blott analízissel alátámasztottuk az autofágiás folyamat részleges blokkolását 3-MA-kezelés eredményeként. Ezzel párhuzamosan az inhibitor hatására az életképes sejtek arányának szignifikáns növekedését és az $AnxV^+$ és a PI^+ H_2O_2 -kezelt ARPE-19 sejtek arányának szignifikáns csökkentését figyeltük meg, ami az autofágia-asszociált sejthalál blokkolását jelezte az ARPE-19 sejtekben. Végül, amikor ko-inkubáltuk a 3-MA előkezelt, majd H_2O_2 -kezelt APRE-19 sejteket a makrofágokkal, jelentősen csökkent az RPE sejtek fagocitózisának mértéke. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy az autofágia a sejtek felszínén olyan specifikus változásokhoz járul hozzá, amelyek ezen elhaló sejtek makrofágok általi felismeréséhez és bekebelezéséhez kapcsolódik.

Figyelembe véve, hogy a H_2O_2 -dal indukált sejthalál egy kevert sejtpopulációhoz vezet, ezt követően egy jól megalapozott, érzékeny, nagy áteresztőképességű áramlási citometria technikát alkalmaztunk a transzfektált, H_2O_2 kezelt ARPE-19 sejtek szortolására. A méretük, granularitásuk és fluoreszcens jelük alapján osztályozott GFP-LC3 pozitív és negatív szub-populációkat ko-inkubáltuk a makrofágokkal. Hasonló fagocitózis arány volt megfigyelhető a GFP-LC3 pozitív RPE sejtek és nem szortolt autofágia-asszociált módon elhaló sejtek makrofágokkal történő bekebelezése során, ezáltal igazoltuk a szerepüket a fagocitózis folyamatában. Jelen ismereteink szerint ez az első tanulmány, amely bemutatja a H_2O_2 -kezelt, GFP-LC3 pozitív szortolt ARPE-19 sejtek makrofágokkal történő fagocitózis rátáját nagy teljesítményű sejtszorter segítségével, valamint time-lapse mikroszkópia alkalmazásával láthatóvá teszi az eltávolítási folyamatot.

TLDA módszer segítségével vizsgáltuk a génexpressziós mintázat változását az anoikisz módon elhaló ARPE-19 sejtek TC-kezelt és kezeletlen makrofágokkal történő bekebelezése előtt és alatt. A következő gének elcsendesítéséhez siRNS transzfekciós módszert alkalmaztunk: ADORA3, THBS1, AXL, MERTK (TC kezelés hatására mindegyik felszabályozódott). Ezzel azt kívántuk meghatározni, hogy a felszabályozott apopto-fagocita gének közvetlen hatással vannak-e a professzionális fagociták fokozott eltávolítási hatékonyságára. Csak a MERTK és az AXL csendesítés tudta meggátolni a

TC-kezeléssel fokozott anoikisz ARPE-19 sejtek makrofágokkal történő bekebelezését. Ezzel párhuzamosan, MerTk ellenes blokkoló antitestekkel is megerősítettük a MerTk receptor központi szerepét ebben az eltávolítási folyamatban. Az anoikisz módon elhaló ARPE-19 sejtek TC-indukált nem professzionális fagocitózisa esetében is igazoltuk a MerTk receptor szerepét MerTk blokkoló antitest-kezeléssel, ugyanis a TC-fokozott fagocitózis mértéke jelentősen lecsökkent, mind a fagociták, mind az anoikisz ARPE-19 sejtek esetében. Ezen túlmenően, az anoikisz módon elhaló primer hRPE sejtek TC-kezelt makrofágok általi eltávolítása szignifikánsan csökkent a MerTk receptor blokkoló antitest alkalmazása eredményeként. Végül azt találtuk, hogy a MerTk ligand Gas6 kezelés jelentősen fokozta a TC-kezelt makrofágok fagocitáló kapacitását, koncentráció-függő módon. Jelen ismereteink szerint ez az első tanulmány, amely bizonyítja a MerTk jelentős szerepét az anoikisz módon elhaló RPE sejtek eltávolításának szabályozásában, nemcsak a TC-fokozott nem-professzionális fagociták, hanem a makrofágok által is.

Egyre több bizonyíték sugallja, hogy az AMD patogenezise immunológiai folyamatokkal szorosan összefügg. Ebben a tanulmányban kimutattuk, hogy az autofágia-asszociált módon elhaló ARPE-19 vagy hRPE sejtek makrofágokkal történő eltávolításakor felszabaduló IL-6 és IL-8 citokinek koncentrációja megnőtt, továbbá azt találtuk, hogy ezen interleukinek TC-kezelt makrofágok általi kibocsátása jelentősen csökkent a glükokortikoid TC gyulladáscsökkentő hatása miatt. Hasonló hatást észleltünk, amikor a makrofágok az autofágia-asszociált hESC-RPE elhaló sejteket bekebelezték be. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az autofágia-asszociált elhaló RPE sejtek eltávolítása pro-inflammatórikus választ válthat ki a humán makrofágokban *in vitro*.

Meglepő módon, az anoikisz elhaló hESC-RPE sejtek makrofágok általi fagocitózisa esetében, nagy mennyiségű IL-6 és IL-8 felszabadulást detektáltunk, amely válaszul a TC kezelésre lecsökkent. Ezen pro-inflammatórikus mediátorok szekréciója összefügghet az anoikisz módon elhaló sejtek nem megfelelő eltávolításával. Ezen túlmenően az a lehetőség sem zárható ki, hogy a poly-HEMA-fedett sejttenyésztő edényeken történő 24 órás tenyésztés eredményeként a másodlagos nekrotikus sejtpopuláció kis aránya is hozzájárulhatott ezen pro-inflammatórikus citokinek kibocsátásához.

6. TÁRGYSZAVAK

anoikisz; autofágia; AXL; fagocitózis; gyulladás; időskori makula degeneráció;
makrofág; MERTK; RPE; triamcinolon

7. ÖSSZEFOGLALÁS

Az elhaló RPE sejtek eltávolítása elengedhetetlen a retina homeosztázisának fenntartásához. Ezeknek az elhaló sejteknek a fagocitákkal történő nem megfelelő eltávolítása, a törmelékek felhalmozódását és az AMD progresszióját eredményezhetik. Azt feltételezzük, hogy az AMD patomechanizmusában nem csak az RPE sejtek intracelluláris fehérjéinek eltávolítása esszenciális, hanem az autofágia-asszociált elhaló sejtek fagocitákkal történő eltávolítása is. Munkánk során az autofágia-asszociált és az anoikisz módon elhaló RPE sejtek fagociták általi bekebelezését vizsgáltuk.

Szérummegvonás és H_2O_2 kettős kezelés hatására növekvő PS^+ , elhaló RPE sejt ráta volt megfigyelhető. Autofágia indukciót detektáltunk 2h, 1mM H_2O_2 kezelés után TEM, LC3/p62 expresszió és GFP-LC3 transzfekciós vizsgálatokkal, valamint CQ-kezeléssel igazoltuk a H_2O_2 -expozíció alatti autofágiás flux növekedését. Autofágia-asszociált sejthalált indukáltunk az ARPE-19, hRPE és a hESC-RPE sejtekben. Továbbá, anoikisz sejthalált váltottunk ki a hESC-RPE sejtekben ECM leválással.

Az *in vitro* fagocitózis vizsgálatok során azt találtuk, hogy az autofágia-asszociált és az anoikisz módon elhaló sejteket időfüggő módon, hatékonyan és növekvő mértékben tudták bekebelezni a makrofágok, a dendritikus sejtek és az élő RPE sejtek. A 3-MA-val történő autofágia gátlás a makrofágok fagocitáló kapacitásának csökkenéséhez vezetett az autofágia-asszociált elhaló sejtek bekebelezésekor, míg a szortolt GFP-LC3 pozitív sejtpopulációk és a TC kezelés fokozta azt. A TC-kezelés fagocitózis-fokozó hatását igazolni tudtuk a nem-professzionális és a professzionális fagocitáknál az anoikisz módon elhaló RPE sejtek eltávolításakor a MerTK szignalizációs útvonalon keresztül. Géncsendesítéssel és blokkoló antitestekkel bizonyítottuk, hogy a MerTK kulcsszerepet tölt be a makrofágokban az elhaló sejtek bekebelezésekor. A TC-kezelt makrofágok fagocitáló hatékonysága módon növekedett Gas6 kezelés hatására a MerTK receptoron keresztül. Az autofágia-asszociált elhaló RPE sejtek makrofágok általi eltávolítása pro-inflammatórikus választ váltott ki.

Eredményeink azt jelzik, hogy az anoikisz és az autofágia-asszociált elhaló RPE sejtek fagocitózisa modellként felhasználható az AMD *in vitro* tanulmányozására, és az AMD kezelésére szolgáló jövőbeni farmakológiai szerek vizsgálatára. A hESC-RPE sejthalál modellek alkalmasak lehetnek feltárni ezen sejtek összejt terápiás felhasználásának *in vivo* potenciálját és immunológiai következményeit. A MerTK receptorok specifikus agonistái fagocitózis-fokozó szerepet tölthetnek be a retinában, és jövőbeni célpontokként szolgálhatnak az AMD-terápiában.

8. PUBLIKÁCIÓK



DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR



Nyilvántartási szám: DEENK/210/2016.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Szatmári-Tóth Mária
Neptun kód: BNF50W
Doktori Iskola: Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Szatmári-Tóth, M.**, Kristóf, E., Veréb, Z., Akhtar, S., Facskó, A., Fésüs, L., Kauppinen, A., Kaarniranta, K., Petrovski, G.: Clearance of autophagy-associated dying retinal pigment epithelial cells - a possible source for inflammation in age-related macular degeneration. *Cell Death Dis. [Accepted by Publisher]*, 2016.
IF: 5.378 (2015)
2. Albert, R., Kristóf, E., Zahuczky, G., **Szatmári-Tóth, M.**, Veréb, Z., Oláh, B., Moe, M. C., Facskó, A., Fésüs, L., Petrovski, G.: Triamcinolone regulated apopto-phagocytic gene expression patterns in the clearance of dying retinal pigment epithelial cells. A key role of Mertk in the enhanced phagocytosis. *Biochim. Biophys. Acta-Gen. Subj.* 1850 (2), 435-446, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.10.026>
IF: 5.083



Cím: 4032 Debrecen, Egyetem tér 1. □ Postacím: 4010 Debrecen, Pf. 39. □ Tel.: (52) 410-443
E-mail: publikaciok@lib.unideb.hu □ Honlap: www.lib.unideb.hu



További közlemények

3. Szabó, D. J., **Szatmári-Tóth, M.**, Doró, Z., Nagymihály, R., Josifovska, N., Facskó, A., Petrovski, G.: Cell death, clearance and inflammation: molecular crossroads and gene polymorphisms in the pathogenesis of age-related macular degeneration.
J. Biochem. Pharmacol. Res. 2 (3), 132-143, 2014.

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 10,461

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 10,461

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

Debrecen, 2016.08.08.



9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsősorban a témavezetőmnek, Prof. Dr. Petrovski Goran-nak szeretném kifejezni őszinte hálámat a PhD tanulmányaim alatt nyújtott folyamatos támogatásért, motivációért, valamint az értékes szakmai megbeszélésekért. Köszönettel tartozom a lehetőségért, hogy a munkacsoportjában tanulhattam és dolgozhattam.

Különösen hálás vagyok Prof. Dr. Fésüs Lászlónak, a Biokémia és Molekuláris Biológia Intézet előző vezetőjének, értékes javaslataiért, konstruktív tanácsaiért, a lehetőségért, hogy ebben kiváló kutatói légkört biztosító intézetben dolgozhattam.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Tózsér Józsefnek, a Biokémia és Molekuláris Biológia Intézet jelenlegi vezetőjének a lehetőségért, hogy ebben az intézetben dolgozhattam.

Hálás vagyok kollaborációs partnereinknek, Prof. Dr. Kai Kaarniranta-nak, Dr. Anu Kauppinen-nek, Dr. Heli Skottman-nak, Dr. Tanja Ilmarinen-nek, Dr. Alexandra Mikhailova-nak és Prof. Dr. Saeed Akhtar-nak kiváló munkájukért és értékes javaslataikért.

Köszönetem szeretném kifejezni az Őssejt és Szemészeti Kutatócsoport minden jelen és múltbéli tagjának a barátságos munkahelyi légkörtért. Külön köszönettel tartozom Dr. Veréb Zoltánnak, Dr. Albert Rékának, Doró Zoltánnak és Oláh Brigittának segítségükért, hogy megosztották velem a tudásukat és tapasztalataikat. Hálás köszönet illeti Mező Irént a kitűnő asszisztenciáért és segítségért.

Továbbá, szeretnék köszönetet mondani az Apoptózis Kutatócsoport minden tagjának. Különösen hálás vagyok Dr. Kristóf Endrének, hogy konstruktív tanácsaival, szakmai megbeszélésekkel folyamatosan segített engem és Dr. Demény Máténak ötleteiért, javaslataiért a cikkeim írásához.

Hálásan köszönöm kedves kollégáimnak és drága barátaimnak, Dr. Szabó Dórának, Dr. Luna Djirackor-nak, Botó Pálnak, Simó Emíliának, Klusóczki Ágnesnek, Jambrovics Károlynak, Sivadó Évának kedvességüket és lelki támogatásukat.

A legnagyobb köszönettel és hálával, szeretett családomnak és drága barátaimnak tartozom, akik folyamatosan bátorítottak és átsegítettek a nehéz időkön.

Legmélyebb hálámat drága férjemnek, Szatmári Lacinak szeretném kifejezni, aki végtelen szeretetével, megértésével és türelmével mindig támogatott engem.