

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

Makrofág polarizációs szignálok által indukált transzkripciós és poszt-transzkripciós szintű represszió mechanizmusai

Czimmerer Zsolt

Témavezető: Prof. Dr. Nagy László



DEBRECENI EGYETEM
Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola

Debrecen, 2018

Makrofág polarizációs szignálok által indukált transzkripció és poszt-transzkripció szintű represszió mechanizmusai

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

Írta: **Czimmerer Zsolt**
okleveles Molekuláris Biológus

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Sejt- és Immunbiológia
doktori iskolája
keretében

Témavezető: Prof. Dr. Nagy László, az MTA rendes tagja

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Szabó Gábor, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Boros Imre, az MTA doktora
Prof. Dr. Matkó János, az MTA doktora

A doktori szigorlat helyszíne és időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK,
Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet, 2017. május 23. 11 óra

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Eckardt Treuter, PhD
Dr. Bay Péter, az MTA doktora

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Balla József, az MTA doktora
tagok: Dr. Bay Péter, az MTA doktora
Prof. Dr. Geiszt Miklós, az MTA doktora
Prof. Dr. Nagy Péter, az MTA doktora
Prof. Dr. Eckardt Treuter, PhD

Az értekezés védésének helyszíne és időpontja: Debreceni Egyetem,
ÁOK, Belgyógyászati Intézet, „A” épület, tanterem
2018. április 19. 13 óra

1. Bevezetés

1.1. A makrofágok szövet és molekuláris mikrokörnyezettől függő heterogenitása

A makrofágok a baktériumok, károsodott sejttermelékek és apoptotikus sejtek fagocitózissal történő eltávolítása által jelentős szerepet töltenek be a fertőzések elleni védekezésben, valamint a szövetkárosodást és gyulladást követő regenerációban. Emellett antigéneket prezentálnak, citokineket és egyéb biológiailag aktív molekulákat termelnek, szabályozzák a T-sejt aktivációt, befolyásolva ezáltal a szöveti homeosztázis fenntartását és az immunválaszt. Végül a gyulladást követő regenerációban és a sebgyógyulásban is fontos szereppel bírnak.

A makrofágok eredete és a molekuláris mikrokörnyezete egyaránt jelentős mértékben befolyásolják a fenotípusos és funkcionális sajátosságait. A felnőttekben található szöveti makrofágok nagyrészt embrionális eredetűek, a szikzacskóban, vagy az embrionális májban található előalakokból származnak. Azonban csontvelői eredetű monocyták is részt vehetnek a szöveti makrofág populációk pótlásában (pl. a bélben), valamint szöveti károsodást, fertőzést és gyulladást követően a károsodás helyére vándorolhatnak. Továbbá monocyták vándorlása atherogenikus, metabolikus és neoplasztikus szignálok hatására is megtörténhet szabályozva az angiogenezist, a tumorok növekedését és a fibrózis kialakulását.

A szöveti és monocyta eredetű makrofágok fenotípusos és funkcionális plaszticitása főként a különböző makrofág polarizációs szignálokkal (pl. patogén eredetű molekulák, citokinek és lipidek) szembeni dinamikus és részben reverzibilis válaszkészségüknek köszönhető. A makrofág polarizáció két funkcionális végpontja a Th1-típusú citokin $INF\gamma$ által kiváltott klasszikus (vagy M1), valamint a Th2-típusú citokin IL-4 által kiváltott alternatív (vagy M2) makrofág polarizáció. A két makrofág polarizációs végpont teljesen különböző molekuláris mintázattal és funkcionális sajátosságokkal jellemezhető. Azonban az újabb vizsgálatok azt mutatják, hogy a komplex molekuláris mikrokörnyezet képes a makrofág polarizációs állapotok széles spektrumát kiváltani az M1/M2 végpontok közt, valamint a makrofágok képesek polarizációs állapotuk finomhangolására a különböző kórképek előrehaladása során megváltozó mikrokörnyezet hatására.

1.2. Az $INF\gamma$ és LPS indukált klasszikus makrofág polarizáció során aktiválódó génkifejeződési program

A Th1-típusú citokin $INF\gamma$ és a Gram-negatív baktériumok sejtfalában található LPS egyaránt a makrofágok klasszikus polarizációját váltja ki. Az $INF\gamma$ az IFNGR1 és IFNGR2 láncokból felépülő sejt felszíni $INF\gamma$ receptorhoz kötődik, amely a Jak1 és Jak2 adaptor fehérjéken keresztül aktiválja a STAT1, IRF-1 és IRF-8 transzkripció faktorokat. Az $INF\gamma$ aktivált transzkripció faktorok képesek a klasszikus makrofág polarizáció génkifejeződési programjának bekapcsolására, támogatva a gyulladást választ, valamint a kórokozók eltávolítását. Az $INF\gamma$ indukálja a CXCL9, CXCL10 és CXCL11 kemokinek kifejeződését, melyek a CXCR3 receptorukhoz kötődve felelősek a Th1-típusú T sejtek, a $CD8^+$ T-sejtek és az NK-sejtek érpályából történő

kilépésének irányításáért. Az $\text{INF}\gamma$ kezelt makrofágok IL-12-t is termelnek, amely részt vesz a naiv T-sejtek, Th1-típusú CD4^+ T-sejteké történő differenciációjának kiváltásában. Továbbá, a T-sejtek és az NK sejtek IL-12-vel történő stimulációja megnövekedett TNF α és IFN γ produkcióhoz vezet, valamint fokozza az NK sejtek és CD8^+ T-sejtek citotoxikus aktivitását. Az IFN γ szintén fokozza az iNOS gén kifejeződését és a NO termelést, ezáltal eredményezve a klasszikusan polarizált makrofágok megnövekedett antibakteriális aktivitását. Az $\text{INF}\gamma$ indukált SOCS3 szintén részt vesz a klasszikus makrofág polarizációban azáltal, hogy csökkenti a sejtek IL-4-gyel szembeni válaszkészségét és gátolja az alternatív makrofág polarizációt.

Gram-negatív baktériumok sejtfalából származó LPS szintén hatékony a klasszikus makrofág polarizáció kiváltásában. Az LPS TLR4 ligandként hat és MyD88 és/vagy Tirap függő módon aktiválja az NF κ B és AP-1 transzkripciós faktor komplexeket, valamint az IRF transzkripciós faktorokat. Az LPS által kiváltott klasszikus makrofág polarizáció a gyulladáshoz vezető citokinek (IL-1 β , IL-6, IL-12, TNF α és IFN β), kemokinek (CCL2, CXCL10 és CXCL11), valamint az antigén prezentáló molekulák megnövekedett kifejeződésével jár együtt, amely a leukociták véráramból történő kilépését és a Th1-típusú gyulladás kialakulását eredményezi.

Összességében tehát a klasszikus makrofág polarizációra jellemző a gyulladáshoz vezető citokinek fokozott kifejeződése, reaktív nitrogén és oxigén szabadgyökök termelése, a Th1-típusú gyulladáshoz vezető válasz kiváltása, valamint fokozott baktériumölő képesség.

1.3. Az IL-4 és IL-13 által aktivált génkifejeződési program az alternatív makrofág polarizáció során

A Th2-típusú immunválasz során keletkező IL-4 és IL-13 citokinek alternatív makrofág aktivációt indukálnak. Ezen citokinek fő forrásai a CD4^+ Th2-típusú T sejtek, bazofil és eozinofil granulociták, valamint a makrofágok önmaguk. Az IL-4 és IL-13 részben különböző receptor komplexeket aktiválnak. Mindkét citokin kötődik az IL-4R α 1- γ c és IL-4R α 1-IL-13R α 1 heterodimerekhez, míg az IL-13 képes az IL-13R α 2 lánchoz is kötődni. Az IL-4 és a receptorai közötti kölcsönhatás a Jak1 és Jak3 aktivált STAT6 foszforilációhoz, dimerizációjához és magi transzlokációjához vezet. A foszforilált STAT6 dimerek a sejtmagban elindítják az alternatív makrofág polarizációra specifikus transzkripciós programot. Emellett, további IL-4/STAT6 szignál út vonal által indukált transzkripciós faktorok között az IRF4, KLF4, c-Myc és PPAR γ szintén részt vesznek az alternatív makrofág polarizáció transzkripciós szintű szabályozásában. Bár az IL-4/STAT6 szignál út vonal komponensei azonosak az emberben és az egérben, de az IL-4 indukált alternatív makrofág polarizáció markerei faj-specifikus különbségeket mutatnak. A Ym1, Fizz1 és Arg1 gének kifejeződése az egér, míg a MAOA és CD180 gének kifejeződése a humán makrofágokban emelkedik meg IL-4 kezelést követően. Ezzel szemben a TGM2, MRC1 és PPAR γ gének kifejeződését az IL-4 egyaránt fokozza az egér és humán makrofágokban. A génkifejeződésben tapasztalható különbségek ellenére az IL-4 és IL-13 által indukált alternatív makrofág polarizáció emberben és egérben egyaránt antiinflammatorikus hatással bír.

1.4. Az *in vivo* makrofág polarizáció

Bár a klasszikusan és alternatívan aktivált makrofágokhoz köthető génkifejeződési mintázatok és funkcionális sajátosságok jól karakterizáltak *in vitro* és *ex vivo*, de *in vivo* a mikrokörnyezeti szignálok hatása a makrofágok fenotípusos és funkcionális sajátosságaira jelentősen komplexebb és kevésbé ismert. A klasszikus és alternatív makrofág polarizációs állapotok egyaránt kapcsolhatók különböző makrofág funkciókhoz *in vivo* számos fiziológiás és patológiás állapotban. Míg az alternatív makrofág polarizáció nélkülözhetetlen szerepet játszik a parazitafertőzések elleni védekezésben és a Th2-típusú gyulladásban, addig a klasszikus makrofág polarizáció szorosan kapcsolódik a Th1-típusú gyulladásához és a mikrobák elleni védekezéshez. Azonban számos tanulmány kimutatta, hogy az alternatív és klasszikus makrofág polarizáció átfedő hatással rendelkezik ezekben a folyamatokban. Például, a klasszikusan polarizált makrofágok által termelt reaktív nitrogén gyökök parazita ellenes aktivitással is rendelkezhetnek, vagy az alternatívan polarizált makrofágok fokozzák a gyulladásos citokinek termelését *Neisseria meningitidis* fertőzést követően. Továbbá, a gyulladásos (M1-szerű) és a regeneratív (M2-szerű) makrofágok különböző kinetikával is részt vehetnek egy adott patológiás folyamatban, mint ahogy ez az izomkárosodás és regeneráció során megfigyelhető. Mindazonáltal, a legtöbb *in vivo* fiziológiás és patológiás folyamat egy komplex immunológiai környezettel jellemezhető. A különböző patológiás folyamatokban, köztük tumorok kialakulása során és a különböző bakteriális fertőzések esetén, az eltérő molekuláris mikrokörnyezet a makrofág polarizációs stádiumok széles spektrumát alakíthatja ki, amely befolyásolja a betegség progresszióját és a terápiás válasz készséget. Ezért a makrofág biológiában jelenleg az egyik legnagyobb kihívás a különböző makrofág polarizációs szignálok potenciális kölcsönhatásainak és immunológiai következményeinek azonosítása.

1.5. A sejtípus specifikus transzkripció szabályozás epigenomikai háttere

Az elmúlt egy évtizedben az újgenerációs szekvenálás alapú technológiák elősegítették az epigenetikai kód és a genomi szabályozó elemek, így a promóterek és enhanszerek, közötti kapcsolat jobb megértését különböző sejtípusokban. Ezek a vizsgálatok lehetőséget teremtettek a sejtípus specifikus enhanszer készletek azonosítására, valamint ezek külső, vagy belső szignálokra adott válaszainak tanulmányozására.

Általánosságban elmondható, hogy az enhanszerek a szabályozott fehérjét kódoló, vagy nem-kódoló génektől mindkét irányban, vagy akár a önmagában gént kódoló genomi régióban is elhelyezkedhetnek, és hozzájárulnak a transzkripció szabályozáshoz a gének promótereivel szorosan együttműködve. A promóterek és enhanszerek különböző hiszton módosításokkal jelöltek. A promóter régiók magas szintű H3K4 tri-metilációja, valamint alacsony H3K4 di- és mono-metilációja figyelhető meg. Ezzel szemben az enhanszer régiókban jelentős a H3K4 mono- és di-metiláció, azonban alacsony szintű a H3K4 tri-metiláció. Az alacsony H3K4 tri-metilációval és magas H3K4 mono-metilációval jelölt enhanszerek úgynevezett

"lineage determining" transzkripciós faktorokat (LDTF-eket) kötnek, amelyek a sejttípus specifikus enhanszer repertoár kialakításáért felelősek. Ezek a genomi régiók jelentős kötőfelületet szolgáltatnak az intracelluláris, vagy extracelluláris szignálok által aktivált úgynevezett szignál szabályozott transzkripciós faktoroknak (SRTF-eknek), amelyek szorosan együttműködnek az LDTF-ekkel.

Az enhanszerek aktuális aktivitása és a transzkripciót aktiváló képességük nagymértékben függ a velük kölcsönhatásba lépő korepresszorok és a koaktivátorok arányától, a hiszton módosítások mintázatától, valamint a promóter-enhanszer kölcsönhatásoktól. Továbbá, újabban leírták, hogy az RNS Polimeráz II kötött aktív enhanszereken nascens RNS átíródása figyelhető meg különböző sejttípusokban. A különböző szignálok dinamikusan szabályozzák ezeknek az úgynevezett enhanszer RNS-eknek (eRNS-eknek) a kifejeződését. Valamint az eRNS-ek kifejeződése jó korrelációt mutat a szomszédos gének transzkripciójával, amely azt jelzi, hogy az eRNS-ek jó markerei lehetnek az enhanszer aktivitásnak. Annak ellenére, hogy az eRNS-ek funkciója jelenleg nem teljesen ismert a génkifejeződést szabályozásában, több kutatási eredmény mutatja, hogy részt vesznek a promóter és az enhanszer régiók közti kölcsönhatás létrehozásában elősegítve ezzel a gének kifejeződését.

1.6. A makrofág polarizációs szignálok transzkripciót szabályozó képességének molekuláris alapjai

A makrofágok transzkriptomjában bekövetkező gyors és drámai változások elengedhetetlenek a hirtelen változó környezethez történő gyors alkalmazkodáshoz a fertőzéseket és a szövetkárosodást követően. Továbbá, normál körülmények közt minden makrofág altípus jelentősen specializált funkcióval rendelkezik, amely a funkcióhoz kapcsolódó gének kifejeződését igényli. A makrofágok transzkriptomját és a mikrokörnyezet változásaira adott dinamikus válaszukat különböző epigenetikai szabályozó mechanizmusok, köztük a DNS metiláció, a hiszton fehérjék poszt-transzlációs módosításai és a genom 3 dimenziós szerveződése együttesen határozzák meg. A H3K4m1 és H3K4m3 specifikus kromatin immunprecipitációt követő szekvenálás segítségével 35-45 ezer magas H3K4 mono-metilációt és alacsony trimetilációt mutató enhanszert azonosítottak egér makrofágokban. Ezekben a régiókban számos LDTF kötő motívum feldúsulása megfigyelhető, amely szintén az LDTF-ek fontos szerepére utal a makrofág specifikus enhanszerek kialakulása során. Számos kísérletes bizonyíték alátámasztja, hogy a makrofágokban az LDTF-ek közül a PU.1 transzkripciós faktor a legfontosabb szereplő az enhanszerek kialakulása során. Továbbá, más LDTF-ek, köztük a CEBP α és az IRF8 teljes genom szintű kötődése jelentős átfedést mutat a PU.1 transzkripciós faktóréval és ezek egymással szoros együttműködésben jelölik ki a makrofág specifikus enhanszereket.

A változó molekuláris mikrokörnyezet a makrofágokban különböző SRTF-ek, köztük az NFkB, AP-1, STAT6, STAT1 és a magreceptorok aktiválódásához vezet. Az aktivált SRTF-ek a célgénjeik promótereikhez és enhanszereikhez történő kötődésüket követően elindítják az adott mikrokörnyezeti szignál által kiváltott makrofág polarizáció specifikus a génkifejeződési programot. Az SRTF-ek kötődésével párhuzamosan megnövekedett p300 koaktivátor kötés, H3K27Ac aktív hiszton

marker feldúsulás és emelkedett eRNS kifejeződés figyelhető meg az aktivált gének közelében elhelyezkedő enhanszereken, amelyek ezen enhanszer csoportok SRTF-ek általi aktivációját mutatják.

Továbbá, a makrofág polarizációs szignálok jelentős számú gén kifejeződését gátolják, de a polarizációs szignálok által aktivált transzkripciós faktorok transzkripciót gátló aktivitása kevésbé ismert. Azonban az újgenerációs szekvenáláson alapuló módszerek lehetőséget teremtettek a közvetlen transzkripciós faktorok által kiváltott génkifejeződés gátlás vizsgálatára is különböző sejtekben, köztük a makrofágokban és emlő tumor sejtekben. Újabban szintén leírták, hogy a makrofágok LPS-sel történő aktivációja számos enhanszeren eredményezi az eRNS kifejeződés csökkenését. Ezek a TLR4 szignál útvonal által gátolt enhanszereken az NFkB transzkripciós faktor komplex p65 alegységének kisebb mértékű kötődése volt megfigyelhető, de a transzkripció gátlásának pontos mechanizmusa jelenleg nem ismert.

1.7. A mikroRNS-ek szintézise és hatásmechanizmusa

A mikroRNS-ek (miRNS-ek) egyszálú 18-23 nukleotid hosszúságú kis nem –kódozó RNAs molekulák, melyek a növényekben és az állatokban poszt-transzkripciós regulátorként hatnak. A miRNS-eket kódoló régiók a fehérje-kódoló gének intronjaiban és exonjaiban, valamint intergenikus régiókban egyaránt elhelyezkedhetnek. Érdekes módon az emlős miRNS-ek körülbelül 50%-a miRNS transzkripciós egységekbe szerveződik, amelyekről egy több miRNS-t kódoló primer policisztronikus transzkriptum íródik át. A primer miRNS (pri-miRNS) molekulákat általában az RNS Polimeráz II írja át. A pri-miRNS-ek általában egy kilobázisnál hosszabbak és egy, vagy több miRNS-t kódoló hurok struktúrát tartalmaznak. Ezek a pri-miRNS-ek egy többlépcsős érési folyamaton mennek keresztül a citoplazmában és a sejtmagban. Az első lépésben a pri-miRNS keresztülmegy egy hasítási lépésben a sejtmagban, amelyet az RNáz III-típusú endonukleáz Drosha-t tartalmazó Mikroporcesszor komplex katalizál. Az így keletkezett pre-miRNS az Exportin 5 fehérje segítségével a sejtmagból a citoplazmába kerül. A pre-miRNS érése a citoplazmában tovább folytatódik, amelyben az Dicer RNáz III-típusú endonukleáz vesz részt egy 20-22 nukleotid hosszúságú miRNS/miRNS* duplexet eredményezve. Végül a miRNS/miRNS* duplex egyik szála beépül az Argonaute fehérjéket tartalmazó RISC komplexbe.

A miRNS-ek fontos szerepet játszanak a génkifejeződés poszt-transzkripciós szintjén történő finomhangolásában a növényekben és állatokban egyaránt. A miRNS-ek és mRNS-ek közötti kölcsönhatás molekuláris alapját a teljes (növényekben), vagy részleges (állatokban) szekvencia komplementaritás adja. Általánosságban a metazoákban teljes komplementaritás szükséges a miRNS-ek 5' végén lévő 2-8 nukleotidok és a mRNS-ek 3' nem-transzlálódó régiói közt a stabil miRNS:mRNS kölcsönhatás létrejöttéhez. A miRNS-ek a fehérjeszintézis gátlását a transláció iniciáció és a poszt-iniciáció szintjén egyaránt kiválthatják. A translációs gátlás mellett, a miRNS-ek képesek a mRNS-ek stabilitását is befolyásolni, ezáltal csökkentve a mRNS szintjét akár több száz közvetlen célgénnek.

1.8. A miRNS-ek a makrofág polarizáció és funkció fontos szabályozói

A legutóbbi egy évtizedben számos tanulmány kimutatta, hogy a makrofág polarizációs szignálok által szabályozott miRNS-ek módosítják a mieloid sejtek fenotípusos és funkcionális tulajdonságait *in vitro* és *in vivo*. A különböző gyulladáso szignálok és bakteriális patogének egyaránt szabályozzák a makrofágok és dendritikus sejtek által kifejezett miRNS-ek mintázatát. Ezek a miRNS-ek részt vesznek a gyulladás szabályozásában és makrofágok baktériumölő képességének kialakításában. A legrészletesebben tanulmányozott gyulladás által indukált miRNS a miR-155, amely összetett szereppel bír a makrofágokban. Egyrészt gátol számos antiinflammatorikus fehérjét és az alternatív makrofág polarizációt, másrészt megakadályozza a kontrollálatlan gyulladás kialakulását is az LPS által aktivált jelátviteli útvonal egyes tagjainak gátlásán keresztül. Egy másik LPS indukált miRNS a miR-147 szintén gátolja a TLR ligandok által kiváltott citokin kifejeződést és a gyulladáso választ az egér makrofágokban. A miR-223 kifejeződés LPS általi gátlása közvetlenül szabályozza a STAT3 transzkripcióso faktor kifejeződését és fokozza a makrofágok IL-6 és IL-1 β termelését.

A gyulladáso szignálokhoz hasonlóan az alternatív makrofág polarizációso szignálok, köztük a Th2-típusú IL-4 és IL-13 citokinek, valamint a fonálféreg fertőzések egyaránt befolyásolják a makrofágokban egyes miRNS-ek kifejeződését, bár a makrofág fenotípusának és funkciójának szabályozásában betöltött szerepük kevésbé ismert. A miR-125b és a miR-378-3p kifejeződése egyaránt indukálódik a fonálféreg fertőzés által kiváltott *in vivo* és az IL-4 citokin által kiváltott *in vitro* makrofág polarizáció során, valamint a megemelkedett miR-378-3p kifejeződés hozzájárul az alternatíván aktivált makrofágok osztódásának megfelelő szabályozásához *in vivo*. Szintén kimutatták, hogy az IL-4/IL-13 indukált miR-193b, miR-124 és miR-511 szintén részt vesz az alternatív makrofág polarizációso fenotípus kialakulásában. Végül újabban több *in vivo* tanulmány kimutatta, hogy a miRNS-ek jelentős szerepet töltenek be a tumor-asszociált makrofágok funkciójának szabályozásában.

2. Célküztzés

1. Az IL-4/STAT6 jelátviteli útvonal által kiváltott transzkripcióso szintü gátlás vizsgálata egér makrofágokban.

- Az IL-4/STAT6 jelátviteli útvonal által gátolt gének azonosítása.
- Az IL-4 által aktivált és gátolt STAT6 transzkripcióso faktor kötött enhanszerek azonosítása.
- Az IL-4/STAT6 jelátviteli útvonal által kiváltott közvetlen transzkripcióso szintü gátlás karakterizálása.
- Az IL-4 előkezelés gyulladáso válaszra gyakorolt részleges gátló hatásának tanulmányozása.

2. Az IL-4 által szabályozott miRNS-ek és funkciójuk vizsgálata az egér és humán alternatív makrofág polarizáció során.

- Az IL-4 által szabályozott miRNS-ek azonosítása az egér alternatív makrofág polarizáció során.
 - A kiválasztott IL-4 által szabályozott miRNS-ek kifejeződésének vizsgálata egér *in vivo* alternatív makrofág polarizációs modellben.
 - A kiválasztott IL-4 által szabályozott miRNS-ek kifejeződésének tanulmányozása humán makrofágokban.
 - A kiválasztott miRNS-ek IL-4 függő szabályozásának háttérében álló molekuláris mechanizmusok felderítése egér és humán makrofágokban.
 - Egy kiválasztott miRNS alternatív makrofág polarizációban betöltött lehetséges szerepének meghatározása.
3. A gyulladásos szignálokra érzékeny miRNS-ek transzkripció szintű szabályozásának feltérképezése egér makrofágokban.
- Az LPS kezelt makrofágokban transzkripció szinten szabályozott miRNS-ek azonosítása.
 - A gyulladásos folyamatok által szabályozott pri-miRNS-ekhez kapcsolat enhancerek azonosítása és karakterizálása.
 - A DNS hurok kialakulás vizsgálata a pri-miR-155 transzkripció starthelye és a távoli enhanszerei közt LPS kezelt egér makrofágban.

3. Anyagok és módszerek

Csontvelő eredetű makrofágok differenciáltatása

A csontvelő izolálása 8-12 hetes hím egerekből történt. Az izolált csontvelőből a makrofágok differenciáltatása 6 napig történt L929 felülülő jelenlétében. Az alternatív makrofág polarizációhoz IL-4 jelenlétében differenciáltattuk a frissen izolált csontvelői sejteket és/vagy a 6-odik napon kezeltük IL-4-el a csontvelő eredetű makrofágokat a jelzett ideig. A differenciált csontvelő eredetű makrofágokat LPS-sel és/vagy ATP-vel kezeltük a jelzett ideig.

Humán monocyta izolálás

CD14+ humán monocytákat egészséges donorokból származó vérelemezek mentes "buffy coat-ból" izoláltuk Ficoll grádiens centrifugálást és anti CD14 konjugált mikrogöngyökkel történő mágneses szeparálást követően. A monocytákat sejttenyésztő edényekbe helyeztük 10% FBS és penicillin/streptomycin tartalmú RPMI 1640 tápfolyadékba. A makrofág differenciációhoz és alternatív makrofág aktivációhoz a frissen kihelyezett monocytákat IL-4-el (100 ng/ml) kezeltük. A sejteket a kezelést követően 12 és 72 órával gyűjtöttük be.

RNS szekvenálás

Az RNS szekvenáláshoz a cDNS könyvtárat 1 µg totál RNS-ből készítettük a TruSeq RNA Sample Preparation Kit használatával a gyártó által megadott protokoll alapján. A könyvtárak minősége és molaritása Agilent BioAnalyzer DNA1000 chip

alkalmazásával lett ellenőrizve. A "paired read" 100 bázispáros szekvenálás Illumina HiScan SQ készülékkel történt.

Kis RNS szekvenálás

A kis RNS szekvenáláshoz a könyvtárak 1 µg totál RNS-ből készültek a TruSeq Small RNA Sample Preparation Kit használatával a gyártó által megadott protokoll alapján. A könyvtárak ellenőrzése Agilent BioAnalyzer DNA1000 chip alkalmazásával történt. A "single read" 50 bázispáros szekvenálás Illumina HiScan SQ készülékkel történt.

ATAC szekvenálás

25 ezer sejt/ml-es sejt szuszpenziót készítettünk és sejtmagokat izoláltunk ATAC lízis puffer segítségével. Az így izolált sejtmagok tagmentálása a Nextera DNA Library Preparation Kit alkalmazásával történt. A tagmentálást követően DNS tisztítás, majd a tagmentált DNS amplifikációja történt meg. Az amplifikált könyvtárak minőségellenőrzése egy újabb DNS tisztítást követően Agilent BioAnalyzer alkalmazásával történt. A könyvtárak szekvenálása Illumina HiSeq 2500 készülékkel történt.

GRO szekvenálás

A könyvtárak a NEB Next Small RNA Library Preparation Kit használatával készültek.

ChIP szekvenálás

A könyvtárak az Ovation Ultralow Library Systems és TruSeq Library Systems Kit-ek használatával készültek a gyártó által megadott protokoll alapján. A következő antitesteket használtuk: IgG (Millipore, 12-370), H3K27Ac (ab4729), P300 (sc-585), PU.1 (sc-352), JunB (sc-46x), IRF8 (sc-32528x), STAT6 (sc-981), C/EBPα (sc-61X), HDAC1 (ab7028), HDAC2 (ab7029), HDAC3 (ab4729), RNAPII-pS5 (ab5131) and RNAPII-pS2 (ab5095), p65 (sc-372).

3C szekvenálás

Az első emésztést és ligálást követően a 3C DNS állományt fenol/kloroform/izoamil-alkohol (25:24:1) elegyével tisztítottuk. A második restriktációs emésztést DpnII enzimmal végeztük 16 órán keresztül gyártó által megadott protokoll alapján. A második ligálás 16 °C-on 6 órán keresztül végeztük 200 U T4 DNS ligáz alkalmazásával. A DNS tisztítást megint fenol/kloroform/izoamil-alkohol (25:24:1) elegyével és QIAquick géltisztító oszlop alkalmazásával végeztük. A csali specifikus inverz PCR során a primerek Illumina adapterekkel és Barcode szekvenciákkal voltak összekapcsolva. Az ampliton könyvtárak minőségi és mennyiségi ellenőrzése Agilent Bioanalyzer segítségével történt. Az ampliton könyvtárak szekvenálása Illumina HiSeq 2500 készülékkel történt.

LDH kiszabadulás

Az LDH aktivitást IL-4 előkezelt és kezeletlen vad típusú és STAT6 hiányos egér makrofágok felülcsúszójából mértük LPS/ATP együttes kezelést követően LDH UV teszt segítségével a Cobas c 501 készüléken.

IL-1 β termelés

Az IL-1 β termelés mérése a vizsgált mintákból ELISA módszerrel történt gyártó által megadott protokoll alapján.

Western blot

A fehérjék elválasztása SDS-PAGE gélelektroforézissel történt, a blottolás pedig nitrocellulóz membránra. Az alkalmazott antitestek: Pro-IL-1 β (AF401-NA), ASC (sc22514-R), pro-caspase-1 (AG-20B-0042), NLRP3 (AG-20B-0014) és β -actin.

Kaspáz-1 aktivitás és propidium jodid festés alapú sejthalál vizsgálat

A Kaspáz-1 aktivitás vizsgálata és a PI festés alapú piroptózis vizsgálat lézer pásztázó citométer (LSC) használatával történt.

Sejtszám analízis

A 96 lyukú sejtenyésző edényben a letapadt makrofágokat Triton-X-100 reagenssel permeabilizáltuk, majd propidium jodid festékekkel festettük őket és Synergy HT microplate reader készülékkel mértük a propidium jodid pozitivitást. A sejtszámot referencia görbe alapján határoztuk meg.

Sejtéletképesség vizsgálat

A sejtéletképesség vizsgálat resazurin alapú festéssel történt a gyártó által megadott protokoll alapján.

Sejtciklus analízis

A sejtciklus eloszlás vizsgálata a Raw264.7 sejtek fixálását és propidium jodiddal történő festését követően lézer pásztázó citométer (LSC) használatával történt.

Apoptózis vizsgálata

Az apoptózis vizsgálata a transzfectált Raw264.7 sejtek propidium jodiddal és Annexin V-tel történő jelölést követően lézer pásztázó citométer (LSC) használatával történt.

4. Eredmények

4.1. Az IL-4/STAT6 szignálút vonal által szabályozott direkt transzkripció gátlás korlátozza gyulladásoz válasz készség az alternatíván polarizált makrofágokban

4.1.1. Az IL-4/STAT6 szignálút vonal által gátolt génkifejeződés a transzkripció szintjén

Ebben a tanulmányban újgenerációs szekvenálás alapú módszereket kombináltunk az IL-4/STAT6 szignálút vonal által közvetített transzkripció szabályozási mechanizmusok jobb megértése végett egér makrofágokat modellként használva. Négy IL-4 indukált génklasztert azonosítottunk, melyekben az IL-4 által kiváltott változások szintje és kinetikája eltérő volt. Továbbá nagyszámú gén IL-4 kezelés általi gátlását figyeltük meg. Az IL-4 génkifejeződést aktiváló és gátló hatása teljesen elmaradt a STAT6 transzkripció faktor hiányos egér makrofágokban. Az IL-4 aktivált és gátolt géneket kódoló genomi régiókon rövid IL-4 kezelés hatására az RNS Polimeráz II kötődés, a H3K27Ac feldúsulás és a naszcens RNS kifejeződés hasonló mintázatot mutatott, mint a mRNS kifejeződés. Összességében eredményeink azt mutatják, hogy az IL-4/STAT6 szignálút vonal egyaránt képes géneket közvetlenül gátolni és aktiválni a transzkripció szintjén az egér makrofágok alternatív polarizációja során.

4.1.2. A STAT6 kötődés egyaránt megfigyelhető az IL-4 aktivált és gátolt genomi szabályozó régiókban

IL-4 aktivált STAT6 transzkripció faktor kötődést azonosítottunk 20119 genomi régióban az IL-4 kezelt egér makrofágokban. Az IL-4 által szabályozott transzkripció iniciáció specifikus RNS Polimeráz II-pS5 kötődés alapján az RNS Polimeráz II-pS5 pozitív STAT6 kötött genomi régiók között három csoportot az "aktivátor", a "neutrális" és a "represszor" STAT6 kötődést mutató klasztereket tudunk megkülönböztetni. A transzkripció elongáció specifikus RNS Polimeráz II-pS2 kötődés, a H3K27Ac feldúsulás és az eRNS kifejeződés IL-4 függő szabályozása az RNS Polimeráz II-pS5 mintázatával nagyfokú hasonlóságot mutatott mindhárom STAT6 klaszterben. Érdekes módon a "represszor" STAT6 kötött genomi régiók az IL-4 gátolt, míg az "aktivátor" STAT6 kötött genomi régiók az IL-4 aktivált gének közelében voltak megtalálhatóak. Összességében ezek az eredmények azt mutatják, hogy szoros kapcsolat van azonos genomi egységen belül a genomi szabályozó elemek aktivitásának STAT6 általi szabályozása és a szomszédos gének kifejeződése között.

4.1.3. A STAT6 kötés jellegzetességei különbségei a gátolt és az aktivált enhanszereken

Az azonosított STAT6 kötött genomi régiók nagy része intergenikus régiókban és intronokban volt megfigyelhető mindhárom STAT6 klaszter esetén. Emellett az aktív enhanszer marker H3K4m1 feldúsulása a STAT6 kötött genomi régiók 98%-ában megfigyelhető volt, bár IL-4 hatására a feldúsulása nem mutatott jelentős különbséget

egyik csoportban sem. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a STAT6 elsődlegesen enhanszerekhez kötődik.

Érdekes módon, a STAT6 csúcsok magassága tipikusan alacsonyabb volt a "represszor" és "neutrális" STAT6 kötött genomi régiókon az "aktivátor" régiókhoz viszonyítva. Továbbá, a *de novo* STAT6 kötő motívumok száma szintén alulreprezentált volt a "represszor" és "neutrális" STAT6 kötött genomi régiókban az "aktivátor" STAT6 kötött enhanszerekhez viszonyítva. Figyelembe véve, hogy a STAT6 jelenléte szükséges a represszióhoz, ezek az eredmények azt sugallják, hogy a gátolt helyekhez a STAT6 közvetlen DNS kötés nélkül, vagy egy eddig nem ismert kötő motívumon keresztül kötődik.

4.1.4. A STAT6 által gátolt enhanszer aktivitás csökkent kromatin hozzáférhetőséggel és kisebb LDTF kötéssel jellemezhető

A kromatin hozzáférhetősége meghatározza az enhanszer aktivitást számos sejttípusban. Továbbá, a makrofág specifikus LDTF-ek, köztük a PU.1, JUNB, C/EBP α és az IRF8 kötése jelentős az aktív enhanszereken, valamint a kötőhelyeik szignifikáns feldúsulása figyelhető meg a STAT6 kötött genomi régiókban mindhárom klaszter esetén.

Rövid távú IL-4 kezelést követően megnövekedett kromatin hozzáférhetőség volt megfigyelhető az "aktivátor" STAT6 kötött enhanszereken, míg a kromatin nyitottság csökkenése jellemezte a "represszor" STAT6 kötött helyeket.

A STAT6 kötött régiók jelentős részén megfigyelhető volt az LDTF-ek kötődése is mindhárom STAT6 kötött enhanszer csoportban a JUNB-t kivéve, amely a STAT6 kötött régiókkal közepes mértékű átfedést mutatott. Érdekes módon, a PU.1, JUNB és C/EBP α kötődés szignifikánsan csökkent, míg az IRF8 nem változott a "represszor" STAT6 kötött genomi régiókban egy órás IL-4 kezelésnek kitett egér makrofágokban. Ezzel szemben mind a négy vizsgált LDTF kötődése szignifikánsan nőtt az aktivált STAT6 kötött enhanszereken az IL-4 kezelést követően. A fenti eredmények azt mutatják, hogy a STAT6 által szabályozott transzkripciós aktiváció és gátlás egyaránt együtt jár a kromatin hozzáférhetőségének, valamint az LDTF-ek kötődésének megváltozásával az alternatívan polarizált makrofágokban.

4.1.5. A p300 és a klasszikus HDAC1-3 kofaktorok arányának változása az IL-4/STAT6 jelátviteli útvonal által gátolt enhanszereken

Az enhanszerek hiszton acetilációs állapota és ezáltal az aktivitása szigorúan szabályozott a hiszton acetil-transzferázok, mint a p300, valamint a klasszikus hiszton deacetilázok, mint a HDAC1, 2 és 3, által. A STAT6 kötött genomi régiók jelentős része már vagy alapállapotban köt, vagy pedig IL-4 által indukált módon köti a p300 és a klasszikus HDAC kofaktorokat. A p300 kötés az "aktivátor" STAT6 kötött enhanszereken szignifikánsan nő, míg "represszor" STAT6 kötött genomi régiókban szignifikánsan csökkent az egy órás IL-4 kezelést követően. Nem várt módon a klasszikus HDAC kötődés szignifikánsan nőtt az aktivátor" STAT6 kötött genomi régiókban az IL-4 kezelést követően. Ezzel szemben, bár a "represszor" STAT6 kötött

enhanszereken megfigyelhető volt már alapállapotban is az HDAC-ek kötődése, de az HDAC kötést az IL-4 kezelés nem befolyásolta jelentősen. Összességében ezek az eredmények azt mutatják, hogy a STAT6 gátolt genomi régiók alapállapotban p300-at és klasszikus HDAC-eket egyaránt kötnek, de a p300 kötés IL-4 hatására csökken eltolva ezzel az egyensúlyt az HDAC-ek irányába.

4.1.6. Az HDAC3 jelenléte elengedhetetlen az IL-4/STAT6 szignál útvonal által kiváltott transzkripciós gátláshoz a gének egy csoportjánál

A STAT transzkripciós faktorok és a klasszikus HDAC-ek között számos sejttypusban írtak le közvetlen kölcsönhatást, amely befolyásolja a STAT-ok által szabályozott génátíródást. Továbbá ismert, hogy a HDAC3 részt vesz az alternatív makrofág polarizáció szabályozásában *in vitro* és *in vivo*. Jelen munkánkban azonosítottuk az IL-4 által gátolt gének egy alcsoportját (371/1628), melyek gátlása HDAC3 hiányos makrofágokban zavart szenved az IL-4 kezelést követően. Érdekes módon 325 STAT6 gátolt enhanszer volt megfigyelhető az IL-4/HDAC3 gátolt génekkel egy funkcionális genomi egységben. Ezek az enhanszerek bár kötöttek HDAC3-at, de a kötődést esetükben sem befolyásolta az IL-4 kezelés.

Ismert, hogy a HDAC3 az egyik kulcs komponense az NCoR/SMRT korepresszor komplexeknek. Ennek megfelelően az IL-4/STAT6/HDAC3 gátolt genomi régiókon a SMRT és NCoR fehérjék kötődése is megfigyelhető volt a kezelt makrofágokban. További vizsgálataink megmutatták, hogy a transzkripció gátlása az általunk kiválasztott négy IL-4/STAT6/HDAC3 gátolt gén esetében részlegesen NCoR függő volt. Összességében az eredményeink azt mutatják, hogy az IL-4/STAT6 jelátviteli útvonal által szabályozott gátlás a gének egy részénél az NCoR/HDAC3 komplex közreműködésével valósul meg.

4.1.7. Az IL-4/STAT6 jelátviteli útvonal által kiváltott transzkripciós gátlás befolyásolta LPS indukált gyulladáshoz kapcsolódó jelátviteli útvonalak, köztük az NLR és a TLR útvonalak génjeinek szignifikáns feldúsulása figyelhető meg. Emellett a fenti gyulladáshoz köthető gének gátolt kifejeződése figyelhető meg 24 óra IL-4 kezelést követően is annak ellenére, hogy a gátolt enhanszereiken a STAT6 kötés erre az időpontra már megszűnt. Ezek az eredmények felvetik annak a lehetőségét, hogy az IL-4 képes befolyásolni a makrofágok gyulladáshoz válaszát a gyulladáshoz köthető gének gátlásán keresztül a STAT6 kötés megszűnését követően is.

Az IL-4 által gátolt gének között a gyulladáshoz kapcsolódó jelátviteli útvonalak, köztük az NLR és a TLR útvonalak génjeinek szignifikáns feldúsulása figyelhető meg. Emellett a fenti gyulladáshoz köthető gének gátolt kifejeződése figyelhető meg 24 óra IL-4 kezelést követően is annak ellenére, hogy a gátolt enhanszereiken a STAT6 kötés erre az időpontra már megszűnt. Ezek az eredmények felvetik annak a lehetőségét, hogy az IL-4 képes befolyásolni a makrofágok gyulladáshoz válaszát a gyulladáshoz köthető gének gátlásán keresztül a STAT6 kötés megszűnését követően is.

Az IL-4/STAT6 módosított gyulladáshoz kapcsolódó jelátviteli útvonalakhoz IL-4 előkezelés LPS aktivált eger makrofágokat használtunk. Érdekes módon 520 gén az 1350 LPS aktivált gén közül, köztük az NLRP és TLR jelátviteli útvonalak több tagja, IL-4 előkezelés által csökkentett gyulladáshoz válaszadási képességet mutatott. Az RNS Polimeráz II-pS2 kötődés ezen gének esetén az RNS szinteknél megfigyelt mintázathoz hasonló mintázatot mutatott jelzve, hogy az IL-4 előkezelés LPS aktivált gének kifejeződését módosító hatása elsősorban a transzkripció szintjén történik. Végül az általunk

kiválasztott gyulladásozó gének qPCR alapú vizsgálata kimutatta, hogy az IL-4 előkezelés által csökkentett gyulladásozó érzékenyséé teljes mértékben STAT6 függő folyamat. Eredményein felvetik a lehetőségét, hogy az IL-4/STAT6 útvoal közvetlenül befolyásolja a makrofágok gyulladásozó válaszáát az LPS aktivált gyulladásozó gének kifejeződési program egyes komponenseinek gátlásán keresztül.

4.1.8. Egyes enhanszerek gyulladásozó válaszkészségének IL-4/STAT6 szignálútvoal által történoé gátlása

Az IL-4 előkezelést követően gyengébb LPS függő aktivációt mutató génekkel azonos funkcionális genomis egységben 961 olyan enhanszer volt azonosítható, melyeken az IL-4 aktivált STAT6 és az LPS aktivált p65 kötés egyaránt megfigyelhető volt. Ezek közül 641 enhanszeren az LPS kezelést követően fokozott RNS Polimeráz II kötédoés volt kimutatható. Érdekes módon, ezen LPS aktivált genomis régiók 70 %-a (448/641) szignifikánsan kisebb mértékű RNS Polimeráz II kötédoést mutatót alap és LPS aktivált állapotokban egyaránt az IL-4 előkezelést követően. A p65 kötédoés alapján ezeket az IL-4 gátolt enhanszereket két, az IL-4 előkezelésre inszenzitív és az IL-4 által csökkentett p65 kötédoést mutató alcsoportokra lehetett osztani. Végül az IL-4 gátolt enhanszer aktivitás és p65 kötédoés egyaránt teljes STAT6 függést mutatót a kiválasztott enhanszereken. Összességében ezek az adatok azt mutatják, hogy az IL-4/STAT6 jelátviteli útvoal aktivációja, egy specifikus LPS által indukálható enhanszer csoport közvetlen gátlásán keresztül, a makrofágok csökkent gyulladásozó válaszkészségéhez vezet.

4.1.9. Az IL-4 által csökkentett gyulladásozó válasz kisebb mértékű inflammaszóma aktivációt, csökkent IL-1 β termelődést és pyroptózist eredményez

Az IL-4 és az LPS kezelésre ellentétes szabályozást mutató gének legtöbb esetben különböző gyulladásozó folyamatokhoz kapcsolódnak, köztük az NLR és a TLR jelátviteli útvoalokhoz. Jól ismert, hogy az NLRP receptorok központi szerepet töltenek be az inflammaszóma aktivációban, amely IL-1 β termelődéshez és egy inflammaszóma aktivációhoz kapcsolódoó sejtelhaláshoz az úgynevezett pyroptózishoz vezet. Az Nlrp3 génehez hasonlóan az Il1b géen alapszintű és LPS indukált kifejeződoés is közvetlenül gátolt a transzkripció szintjén az IL-4/STAT6 jelátviteli útvoal által. Emellett az LPS által fokozott NLRP3 és a pro-IL-1 β fehérje termelődés is csökkent az IL-4/STAT6 útvoal előzetes aktivációjának következtében, míg egyéb inflammaszóma komponensek fehérje szintű kifejeződoését sem az IL-4, sem az LPS nem befolyásolta. Ahogy várható volt, az LPS és ATP kezelés által kiváltott Kaszpáz 1 aktiválódás, IL-1 β szekréció és pyroptózis egyaránt STAT6 függő módon csökkent az IL-4 előkezelte sejtekben. Végül a gyulladás indukált Nlrp3 és Il1b kifejeződoés hasonló mintázatot mutatót az alternatív makrofág polarizáció *in vivo* modelljében. Összességében ezek az adatok azt mutatják, hogy az *in vitro* és *in vivo* alternatív makrofág polarizáció képes módosítani a makrofágok későbbi gyulladásozó válaszáát, köztük az inflammaszóma aktivációt, IL-1 β szekréciót

és pyroptózis az Nlrp3 és Il1b gének közvetlen IL-4/STAT6 jelátviteli útvonal által kiváltott gátlásán keresztül.

4.2. Az IL-4/STAT6 jelátviteli útvonal által szabályozott mikroRNS kifejeződési mintázata humán és egér alternatívan polarizált makrofágokban és a miR-342-3p makrofágok életképességére gyakorolt hatása

4.2.1. Az IL-4/STAT6 jelátviteli útvonal által szabályozott miRNS-ek azonosítása az egér alternatív makrofág polarizáció során

Kis RNS szekvenálás alkalmazásával 162 IL-4 szabályozott (76 aktivált és 81 gátolt) miRNS-t azonosítottunk a vad típusú alternatívan aktivált makrofágokban. Bár az IL-4 által szabályozott miRNS kifejeződés nagy része (151 a 157-ből) teljes mértékben STAT6 függőnek bizonyult, néhány miRNS szignifikáns IL-4 indukált változást mutatott a STAT6 hiányos makrofágokban is. Érdekes módon az általunk kiválasztott három IL-4/STAT6 jelátviteli útvonal által szabályozott miRNS, az IL-4 által aktivált miR-342-3p, valamint a gátolt miR-125a-5p és 99b, hasonló módon szabályozódtak *Brugia malayi* fonálféreg fertőzés indukált *in vivo* egér alternatív makrofág polarizációs modellben is. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a makrofág miRNome intenzíven szabályozódik az IL-4/STAT6 jelátviteli útvonal által az *in vitro* és *in vivo* egér alternatív makrofág polarizáció során.

4.2.2. A miR-342-3p és az EVL gén konzervált és közvetlen STAT6 függő szabályozása az egér és humán makrofágokban

A miR-342-3p-t kódoló genomi régió az EVL gén harmadik intronjában található, valamint a miR-342-3p és az EVL koordinált szabályozódást mutat számos tumorban. Mind a miR-342-3p, mind a gazdagénjének kifejeződése fokozódott IL-4 hatására a humán és egér makrofágokban. Továbbá direkt STAT6 kötés volt kimutatható az Evl/EVL gének szabályozó régióiban a humán és egér makrofágokban IL-4 kezelést követően. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a miR-342-3p és a gazdagénjének kifejeződése koordináltan aktiválódik közvetlenül az IL-4 aktivált STAT6 transzkripciós faktor DNS kötésén keresztül.

4.2.3. A miR-342-3p a makrofág életképességét csökkenti és apoptózis indukál

A lokális makrofág populáció osztódását az IL-4 által kiváltott Th2 típusú gyulladás fokozza *in vivo*. A miR-342-3p kifejeződése kórosan alacsony különböző tumor típusokban, köztük a vastagbél és emlő daganatokban. Emellett a miR-342-3p túlzott kifejeződése képes apoptózis kiváltani és leállítani a tumor sejtek osztódását. Az általunk alkalmazott kombinált transzkriptomikai, bioinformatikai és funkcionális megközelítés kimutatta, hogy a miR-342-3p fokozott kifejeződése a RAW264.7 makrofágok apoptotikus elhalását váltotta ki egy anti-apoptotikus génhálózat

kifejeződésének gátlásán keresztül, ezáltal csökkentve az életképes makrofág számot. Továbbá, közvetlen kölcsönhatás volt kimutatható a miR-342-3p és az anti-apoptotikus Bcl2l1 között. Összességében ezek az eredmények felvetik a lehetőségét, hogy a miR-342-3p az IL-4 által kiváltott helyi makrofág proliferáció negatív szabályozójaként fejtsse ki a hatását.

4.3. Gyulladásra érzékeny makrofág miRNS-ek szabályozásának háttérében álló transzkripciós mechanizmusok felderítése újgenerációs szekvenálás alapú technikák kombinálásával

4.3.1. A gyulladásra érzékeny miRNS kifejeződés transzkripciós alapjainak felderítése makrofágban

17 szignifikánsan szabályozott érett miRNS-t (4 gátolt és 13 aktivált) azonosítottunk egér makrofágban 3 óra LPS kezelést követően. 15 LPS által szabályozott miRNS, köztük a miR-155, miR-147 és miR-223 a primer miRNS transzkripció szintjén is szabályozott volt. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a gyulladásra érzékeny miRNS-ek nagy része a transzkripció szintjén szabályozott a makrofágban.

4.3.2. A gyulladásra érzékeny pri-miRNS-ek transzkripciós start pontjai általános aktív promóter markerekkel jelöltek és RNS Polimeráz II-t kötnek

Jól ismert, hogy a fehérjéket kódoló gének promóter régiói specifikus epigenetikai markerekkel köztük H3K27Ac-val és H3K4m3-val jelöltek, valamint RNS Polimeráz II-t kötnek. Az aktív promóter marker H3K4m3-t és az RNS Polimeráz II kötődést pri-miRNS promóter régiók azonosításához szintén használták már. Amint várható volt, a gyulladás által szabályozott pri-miRNS-ek promóter régióin szintén megfigyelhetők voltak a H3K27Ac és H3K4m3 markerek és az RNS Polimeráz II kötődés. Az LPS kezelés fokozta a H3K27Ac-t és az RNS Polimeráz II kötődést a gyulladás aktivált pri-miRNS-ek promóter régióin. Ezzel szemben a gyulladás által gátolt pri-miRNS-ek promóter régióin a H3K27Ac feldúsulás és az RNS Polimeráz II kötődés csökkenése volt megfigyelhető a H3K4m3 feldúsulás megváltozása nélkül. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy az LPS-re érzékeny miRNS gének hasonló epigenetikai sajátosságokkal rendelkeznek, mint a fehérje kódoló gének és átírásuk is az RNS Polimeráz II segítségével történik.

4.3.3. Az LPS által szabályozott pri-miRNS-ek egy gyulladás érzékeny enhanszer hálózattal állnak kapcsolatban

A fehérjét kódoló génekhez kapcsolt enhanszerek H3K4m1 és H3K4m2 poszt-transzlációs hiszton módosításokkal jelöltek és eRNS íródik át róluk. Továbbá több sejt típusban és szövetben ismert, hogy az enhanszerek a pri-miRNS-ek kifejeződését is szabályozzák. Ezek az enhanszerek is jellemezhetők az általános enhanszer sajátosságokkal, köztük a H3K4m1 feldúsulással és az eRNS kifejeződéssel. Amint várható volt, az LPS érzékeny pri-miRNS gének genomi környezetében szintén

azonosíthatóak voltak H3K4m1 és eRNS pozitív enhanszer régiók. A globális analízisünk 11 LPS gátolt és 33 LPS aktivált enhanszer régiót azonosított a gyulladás által regulált pri-miRNS-ekkel egy genomi egységben mutatva, hogy az LPS érzékeny pri-miRNS gének kifejeződésének szabályozásában szintén részt vehetnek enhanszerek. Emellett az eRNS-ek kifejeződése a pri-miRNS-ek kifejeződéséhez hasonló LPS függő kinetikát mutatott. Ezek a megfigyelések konzisztensek a mRNS-ek kifejeződésének szabályozásában részt vevő enhanszerek vizsgálatánál tapasztaltakkal, azaz az enhanszerek részt vehetnek a gyulladásra érzékeny pri-miRNS-ek transzkripció szintjén történő szabályozásában a mRNS-ekkel analóg módon.

4.3.4. A genom szerveződés és a gyulladás által aktivált pri-miR-155 kifejeződés közötti kapcsolat

A pri-miR-155 génjéhez kapcsolódó LPS érzékeny enhanszerek a transzkripció start helytől jelentős távolságra találhatóak (-54-tól -116 Kb-ig).

3C szekvenálás technikát alkalmazva konstitutív és LPS indukált kölcsönhatásokat egyaránt kimutattunk a pri-miR-155-öt kódoló genomi egységen belül. Permanens kölcsönhatás volt megfigyelhető a transzkripció start hely és a -116 Kb-nál található enhanszer között. Valamint azonosítható volt több LPS indukált kölcsönhatás a -116 Kb enhanszer és más LPS aktivált enhanszerek közt a pri-miR-155 génjéhez tartozó genomi egységen belül. Összességében ezek az eredmények azt mutatják, hogy (i) az azonosított gyulladás aktivált enhanszerek kölcsönhatnak egymással és a pri-miR-155 gén transzkripció start helyével, valamint (ii) a pri-miR-155 génjét kódoló genomi régió keresztül megy egy gyulladás által kiváltott újraszerveződés az eger makrofágokban.

5. Diskusszió

A makrofágok funkcionális diverzitását és plaszticitását normál fiziológiás és patológiás körülmények közt egyaránt jelentősen befolyásolják a mikrokörnyezeti szignálok, gyulladásos mediátorok, citokinek és lipid molekulák. Azonban jelenleg számos kérdés megválaszolatlan a makrofág polarizációs szignálok által aktivált transzkripció és poszt-transzkripció szintű szabályozó mechanizmusokkal kapcsolatban. Egyrészt, jelentős számú gén kifejeződése gátolt a makrofág polarizációs szignálok által, de a gátlás pontos mechanizmusai nem ismertek. Másrészt bár a makrofág polarizációs szignálokra érzékeny miRNS-ek biológiai funkciói széles körben tanulmányozottak, de a kifejeződésük transzkripció szintjén történő szabályozása kevésbé ismert.

A szisztematikus, genom szintű vizsgálataink kimutatták, hogy az alternatív makrofág polarizációs szignál IL-4 jelentős számú gén kifejeződését gátolja a transzkripció szintjén, valamint az IL-4 aktivált STAT6 transzkripció faktor köti a gátolt gének közelében elhelyezkedő szabályozó elemeket. Ezek a szabályozó régiókon a STAT6 kötés együtt jár a csökkent kromatin hozzáférhetőséggel, kisebb LDTF, p300 és RNS Polimeráz II kötéssel, valamint alacsonyabb eRNS kifejeződéssel. Ezek az

eredmények azt mutatják, hogy az IL-4 aktivált STAT6 képes transzkripcionális represszorként is hatni a makrofágokban. Továbbá azt találtuk, hogy az IL-4/STAT6 szignálútvonal által kiváltott transzkripció gátlás csökkenti a makrofágok gyulladási válaszkészségét, köztük az NLRP3 inflammaszóma aktivációt, IL-1 β termelődést és pirptózt. Összességében ezek az eredmények egy kétirányú interakciót mutatnak az alternatív makrofág polarizáció és a gyulladási szignálok között, amely befolyásolja a makrofágok válaszkészségét és érzékenységét a különböző mikrobiális, stressz és sérülés eredetű endogén szignálokkal szemben.

Szintén megfigyeltük az intronikus miR-342-3p-nek és a gazdagénjének az IL-4/STAT6 szignálútvonal által kiváltott közvetlen indukcióját egér és humán makrofágokban. Megmutattuk, hogy a miR-342-3p képes csökkenteni a makrofágok életképességét az apoptotikus sejtelhalás kiváltása következtében. Továbbá, transzkriptomikai, bioinformatikai és funkcionális vizsgálómódszerek kombinálásával sikerült azonosítanunk egy miR-342-3p által gátolt anti-apoptotikus génhálózatot. Ezek az eredmények felvetik a lehetőségét, hogy az IL-4/STAT6 jelátviteli útvonal által aktivált miR-342-3p részt vesz az IL-4 által kiváltott makrofág polarizáció kontrolljában.

Végül az LPS kezelésre válaszoló miRNS-ek, köztük a miR-155, miR-147 és miR-223 transzkripciói szintű szabályozását vizsgáltuk egér makrofágokban egy integrált újgenerációs szekvenáláson alapuló megközelítést alkalmazva. Kimutattuk, hogy a miR-155 kifejeződés LPS függő transzkripciói aktiválása az azonos genomi régióban lévő enhancerek és a pri-miR-155 transzkripciói starthelye közötti intenzív kommunikáción alapul.

6. Összefoglalás

A komplex molekuláris mikrokörnyezet jelentősen befolyásolja a makrofágok funkcionális és fenotípusos sajátosságait különböző fiziológiás és patológiás körülmények között. A különböző polarizációs szignálok, citokinek és patogén eredetű molekulák különböző szignál specifikus gének kifejeződési programok bekapcsolásához vezetnek a szignálok hatására aktiválódó transzkripciói faktorok következtében. Munkánk során kimutattuk, hogy az IL-4/STAT6 jelátviteli útvonal jelentős számú gén transzkripcióját gátolja az egér alternatív makrofág aktiváció során. Emellett igazoltuk, hogy ez a mechanizmus képes módosítani az alternatíván aktivált makrofágok gyulladási válaszkészségét csökkentve az LPS indukált inflammaszóma aktivációt, IL-1 β termelődést és pirptózt.

A miRNS-ek által indukált poszt-transzkripcionális gátlás szintén részt vesz a makrofág polarizáció és funkció szabályozásában. Munkánk során azonosítottuk az IL-4/STAT6 jelátviteli útvonal által aktivált miR-342-3p pro-apoptotikus hatását, amely potenciálisan részt vehet az IL-4 indukált makrofág proliferáció negatív visszacsatolásos kontrolljában.

Végül karakterizáltuk a gyulladási szignálokra válaszoló miRNS-ek transzkripciói szintű szabályozását az egér makrofágokban újgenerációs teljes genom szintű vizsgálatok kombinálásával, amely kimutatta a gyulladási szignálok által szabályozott enhancerek szerepét a miRNS-ek kifejeződésének kontrolljában.

Egyúttal egy hasznos eszközt adott a miRNS-ek transzkripció szintű szabályozásának vizsgálatához egyéb sejtes rendszerekben.

7. A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**
H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/28/2018.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Czimmerer Zsolt
Neptun kód: J06DZW
Doktori Iskola: Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10038295

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Czimmerer, Z., Horváth, A., Dániel, B., Nagy, G., Cuaranta-Monroy, I., Kiss, M., Kolostyák, Z., Pólska, 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: 5.018 (2016)
2. Czimmerer, Z., Dániel, B., Horváth, A., Ruckerl, D., Nagy, G., Kiss, M., Peloquin, M., Budai, M. M., Cuaranta-Monroy, I., Simándi, Z., Steiner, L., Nagy, B., Pólska, S., Bankó, C., Bacsó, Z., Schulman, I. G., Sauer, S., Deleuze, J. F., Allen, J. E., Benkő, S., Nagy, L.: The Transcription Factor STAT6 Mediates Direct Repression of Inflammatory Enhancers and Limits Activation of Alternatively Polarized Macrophages. *Immunity* 48 (1), 75-90, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2017.12.010>
IF: 22.845 (2016)
3. Czimmerer, Z., Varga, T., Kiss, M., Vázquez, C. O., Doan-Xuan, Q. M., Ruckerl, D., Tattikota, S. G., Yan, X., Nagy, Z. S., Dániel, B., Pólska, S., Horváth, A., Nagy, G., Varallyay, É., Poy, M. N., Allen, J. E., Bacsó, Z., Abreu-Goodger, C., Nagy, L.: The IL-4/STAT6 signaling axis establishes a conserved microRNA signature in human and mouse macrophages regulating cell survival via miR-342-3p. *Genome Med.* 8 (1), 1-22, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/s13073-016-0315-y>
IF: 7.071



8. További közlemények



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**
H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

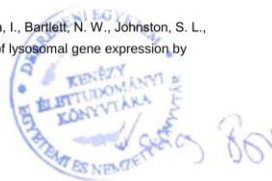
További közlemények

4. Czimmerer, Z., Nagy, Z. S., Nagy, G., Horváth, A., Silye-Cseh, T., Kriston, Á., Jonás, D., Sauer, S., Steiner, L., Dániel, B., Deleuze, J. F., Nagy, L.: Extensive and functional overlap of the STAT6 and RXR cisomes in the active enhancer repertoire of human CD14+ monocyte derived differentiating macrophages.
Mol. Cell. Endocrinol. [Epub ahead of print], 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2017.07.034>
IF: 3.754 (2016)
5. Fejes, Z., Pólska, S., Czimmerer, Z., Káplár, M., Penyige, A., Gál Szabó, G., Bekéné Debreceni, I., Kunapuli, S. P., Kappelmayer, J., Nagy, B.: Hyperglycemia suppresses microRNA expression in platelets to increase P2RY12 and SELP levels in type 2 diabetes mellitus.
Thromb. Haemost. 117 (3), 529-542, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1160/TH16-04-0322>
IF: 5.627 (2016)
6. Kiss, M., Czimmerer, Z., Nagy, G., Bieniasz-Krzywiéc, P., Ehling, M., Pap, A., Pólska, 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: 9.661 (2016)
7. Gyöngyösi, A., Dócs, O., Czimmerer, Z., Orosz, L., Horváth, A., Török, O., Méhes, G., Nagy, L., Bálint, B. L.: Measuring expression levels of small regulatory RNA molecules from body fluids and formalin-fixed, paraffin-embedded samples.
Methods Mol. Biol. 1182, 105-119, 2014.
DOI: http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-1062-5_10





8. Dániel, B., Nagy, G., Hah, N., Horváth, A., Czimmerer, Z., Pólska, S., Gyuris, T., Keirse, J., Gysemans, C., Van Ginderachter, J. A., Bálint, B. L., Evans, R. M., Barta, E., Nagy, L.: The active enhancer network operated by liganded RXR supports angiogenic activity in macrophages.
Genes Dev. 28 (14), 1562-1577, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1101/gad.242685.114>
IF: 10.798
9. Czimmerer, Z., Hulvely, J., Simándi, Z., Varallyay, É., Havelda, Z., Szabó, E., Varga, A., Dezső, B., Balogh, M., Horváth, A., Domokos, B., Török, Z., Nagy, L., Bálint, B. L.: A versatile method to design stem-loop primer-based quantitative PCR assays for detecting small regulatory RNA molecules.
PLoS One. 8 (1), 1-10, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0055168>
IF: 3.534
10. Nagy, Z., Czimmerer, Z., Nagy, L.: Nuclear receptor mediated mechanisms of macrophage cholesterol metabolism.
Mol. Cell. Endocrinol. 368 (1-2), 85-98, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2012.04.003>
IF: 4.241
11. Nagy, Z., Czimmerer, Z., Szántó, A., Nagy, L.: Pro-inflammatory cytokines negatively regulate PPAR γ mediated gene expression in both human and murine macrophages via multiple mechanisms.
Immunobiology. 218 (11), 1336-1344, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.imbio.2013.06.011>
IF: 3.18
12. Brignull, L. M., Czimmerer, Z., Saidi, H., Dániel, B., Villela, I., Bartlett, N. W., Johnston, S. L., Meira, L. B., Nagy, L., Nohturfft, A.: Reprogramming of lysosomal gene expression by interleukin-4 and Stat6.
BMC Genomics. 14 (1), 1-20, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-14-853>
IF: 4.041





13. Kiss, M., Czimmerer, Z., Nagy, L.: The role of lipid-activated nuclear receptors in shaping macrophage and dendritic cell function: from physiology to pathology.
J. Allergy Clin. Immunol. 132 (2), 264-286, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2013.05.044>
IF: 11.248
14. Czimmerer, Z., Varga, T., Póliska, S., Németh, I., Szántó, A., Nagy, L.: Identification of novel markers of alternative activation and potential endogenous PPARgamma ligand production mechanisms in human IL-4 stimulated differentiating macrophages.
Immunobiology. 217 (12), 1301-1314, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.imbio.2012.08.270>
IF: 2.814
15. Varga, T., Czimmerer, Z., Nagy, L.: PPARs are a unique set of fatty acid regulated transcription factors controlling both lipid metabolism and inflammation.
Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis. 1812 (8), 1007-1022, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.02.014>
IF: 5.387
16. Oberoi, J., Fairall, L., Watson, P. J., Yang, J. C., Czimmerer, Z., Kampmann, T., Goult, B. T., Greenwood, J. A., Gooch, J. T., Kallenberger, B. C., Nagy, L., Neuhaus, D., Schwabe, J. W. R.: Structural basis for the assembly of the SMRT/NCoR core transcriptional repression machinery.
Nat. Struct. Mol. Biol. 18 (2), 177-184, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/nsmb.1983>
IF: 12.712
17. Mikó, E., Margitai, Z., Czimmerer, Z., Várkonyi, I., Dezső, B., Lányi, Á., Bacsó, Z., Scholtz, B.: miR-126 inhibits proliferation of small cell lung cancer cells by targeting SLC7A5.
FEBS Lett. 585 (8), 1191-1196, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2011.03.039>
IF: 3.538





18. Mikó, E., Czimmerer, Z., Csánky, E., Boros, G., Buslig, J., Dezső, B., Scholtz, B.: Differentially expressed microRNAs in small cell lung cancer.
Exp. Lung Res. 35 (8), 646-664, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3109/01902140902822312>
IF: 1.177
19. Röszer, T., Jenei, Z., Gáll, T., Nagy, O., Czimmerer, Z., Serfőző, Z., Elekes, K., Bánfalvi, G.: A possible stimulatory effect of FMRFamide on neural nitric oxide production in the central nervous system of *Helix lucorum* L.
Brain. Behav. Evol. 63 (1), 23-33, 2004.
IF: 1.954
20. Röszer, T., Czimmerer, Z., Szentmiklósi, J. A., Bánfalvi, G.: Nitric oxide synthesis is blocked in the enteral nervous system during dormant periods of the snail *Helix lucorum* L.
Cell Tissue Res. 316, 255-262, 2004.
IF: 2.67
21. Röszer, T., Jenei, Z., Serfőző, Z., Czimmerer, Z., Bánfalvi, G.: Structural diversity of NADPH diaphorase-reactive enteral networks in Stylommatophora (Gastropoda, Pulmonata).
Invertebr. Biol. 123 (2), 128-135, 2004.
IF: 0.754

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 122,024

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapján szolgáló közleményekre):
34,934

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, 2018.01.26.

