

37. OTDK BIOLÓGIA SZEKCIÓ

AZ IL-4 ÉS A HIPOXIÁS MIKROKÖRNYEZET EGYÜTTES HATÁSA A MAKROFÁGOK TRANSZKRIPCIÓS ÉS EPIGENETIKAI PROGRAMJÁRA

Készítette: Poscher Anna Zsófia

Biológus MSc, II. évfolyam

Küldő intézmény:

Szegedi Tudományegyetem, Természettudományi és Informatikai Kar,
Mikrobiológiai Tanszék

Szakdolgozó hely:

Szegedi Biológiai Kutatóközpont,
Genetikai Intézet, Makrofág Polarizáció Csoport

Témavezető: Dr. Czimmerer Zsolt

Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Genetikai Intézet

Belső konzulens: Prof. Dr. Gácsér Attila

Szeged

2024

1. Tartalmi összefoglaló

A makrofágok a veleszületett immunitás sejtes elemeinek egy rendkívül diverz, heterogén csoportját alkotják. Különböző mikrokörnyezeti szignálok hatására eltérő fenotípusos állapotokat mutatnak, amelynek két végpontja az interferon gamma (IFN- γ)/ lipopoliszacharid (LPS) által indukált klasszikus, és az interleukin-4 (IL-4) által indukált alternatív makrofág polarizáció. Az alternatív polarizáció számos hipoxiás mikrokörnyezettel együtt járó kórképben megfigyelhető (például daganatokban, fibrotikus folyamatokban, és allergiás légúti gyulladásban). Ennek ellenére a hipoxia alternatív makrofág polarizációra gyakorolt hatása és ennek funkcionális következményei kevésbé ismertek.

Munkánk során új generációs szekvenálás (NGS) alapú módszerekkel vizsgáltuk, hogy a hipoxiás környezet és az IL-4 egyidejű jelenléte hogyan befolyásolja a makrofágok polarizációs programját transzkripciós és epigenetikai szinten egér csontvelőből származó makrofágokban (BMDM).

RNS-szekvenálási adatok alapján azonosítottunk 377 gént, amelyek kifejeződését a hipoxiás mikrokörnyezet és az IL-4 szinergisztikusan indukálta. Ezen gének többnyire az alternatív makrofág polarizációra jellemző metabolikus útvonalakban, illetve az immunválasz negatív szabályozásában vesznek részt.

Ezen génkifejeződési mintázat hátterében álló lehetséges epigenetikai változásokat ATAC-, illetve ChIP-szekvenálási adatok alapján vizsgáltuk. 6685 olyan kromatin régiót azonosítottunk, amelyek hipoxiás mikrokörnyezetben, IL-4 jelenlétében nyitott állapotban vannak és a szinergisztikusan indukált génekhez annotálhatók. Ezeken a helyeken megvizsgáltuk az RNS polimeráz II kötődésének változását, amely alapján a szinergisztikusan indukált génekhez annotálható nyitott kromatin régiók négy csoportja különíthető el.

Eredményeink arra engednek következtetni, hogy az IL-4-aktivált alternatív makrofág polarizációs program hipoxiás mikrokörnyezetben is végbemegy és ezen környezeti szignálok együttesen olyan gének kifejeződését fokozzák, amelyeknek szerepe lehet a makrofágok funkciójának módosulásában. Továbbá ennek a folyamatnak a hátterében részben szinergisztikus kromatin nyitás és fokozódó enhanszer aktiváció állhat.

Kulcsszavak: makrofág, IL-4, hipoxia, szinergisztikus génaktiváció, epigenetikai szabályozás

2. Tartalomjegyzék

1. Tartalmi összefoglaló.....	1
2. Tartalomjegyzék.....	2
3. Rövidítések jegyzéke.....	4
4. Szakirodalmi áttekintés	6
4.1 A makrofágok eredete és funkciója.....	6
4.2 Makrofág populációk heterogenitása	6
4.2.1 A klasszikus és alternatív makrofág polarizáció általános jellemzői	7
4.2.2 A makrofágok transzkripció heterogenitásának és plaszticitásának szerepe különböző patológias folyamatokban	8
4.3 Transzkripció szabályozás epigenetikai alapjai	9
4.4 Interleukin-4 által aktivált szignálút vonal és transzkripció program szerepe az alternatív makrofág polarizációban.....	10
4.5 A hipoxia jellemzői és hatása különböző patológias folyamatokban	11
4.5.1 A mikrokörnyezet oxigénszintjének hatása az intracelluláris szignalizációra	12
4.5.2 HIF-1 szabályozó szerepe a makrofágok metabolizmusában és immunfunkciójában	12
4.6 Immunmetabolizmus.....	13
5. Célkitűzés	15
6. Anyagok és módszerek	16
6.1 Kísérleti elrendezés.....	16
6.2 RNS-szekvenálás	16
6.3 ATAC-szekvenálás (Assay for Transposase-Accessible Chromatin sequencing).....	17
6.4 ChIP-szekvenálás (Chromatin Immunoprecipitation sequencing).....	18
6.5 Statisztika.....	18
6.6 Ábrák	19
7. Eredmények.....	19
7.1 A hipoxiás mikrokörnyezet és az IL-4 által aktivált szignálút vonalak kölcsönhatásának vizsgálata a teljes transzkriptóm szintjén	19

7.1.1 A hipoxiás mikrokörnyezet IL-4 válaszkészségét befolyásoló komplex hatása egér csontvelői eredetű makrofágokban	19
7.2 A hipoxiás mikrokörnyezet és IL-4 indukálta szinergisztikus génaktiváció hátterében álló epigenetikai szabályozó mechanizmusok felderítése	26
7.2.1 A kromatin hozzáférhetőségének és RNS polimeráz II kötődésének változása a szinergisztikusan indukált gének környezetében	26
7.2.2 RNS polimeráz II kötődésének változása a IL-4 stimulusnak hipoxiás mikrokörnyezetben kitett makrofágokban azonosított nyitott genomi régiókon.....	27
7.2.3 RNS polimeráz II kötődésének változása a szinergisztikusan nyíló régiókon	29
8. Összefoglalás.....	31
9. Irodalomjegyzék	34
10. Köszönetnyilvánítás.....	37
11. Nyilatkozat.....	38

3. Rövidítések jegyzéke

Arg1	argináz-1
AP-1	aktivátor protein 1
ATAC	Assay for Transposase-Accessible Chromatin
ATM	zsírszöveti makrofágok (adipose-tissue macrophage)
BMDM	egér csontvelőből származó makrofág (bone-marrow-derived macrophage)
C/EBP	CCAAT/enhanszer-kötő fehérje (CCAAT/enhancer-binding protein)
Ch13	kitináz-3-szerű fehérje 3 (chitinase-3-like protein 3)
ChIP	Kromatin-immunprecipitáció
COPD	krónikus obstruktív tüdőbetegség (chronic obstructive pulmonary disease)
DAVID	Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery
FcγR	Fc gamma receptor
GAPDH	glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz
GLUT1	glükóz transzporter 1
HIF	hipoxia indukált faktor
HK2	hexokináz 2
HOMER	Hypergeometric Optimization of Motif Enrichment
IFN-γ	interferon gamma
IGV	integratív genomikai megjelelítő (integrative genomics viewer)
IL-4	interleukin-4
IRF	interferon reguláló faktor (interferon regulatory factor)
JAK	Janus kináz
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (Gének és genomok kiotói enciklopédiája)
KLF-15	Krüppel-féle faktor 15
LDHA	laktát dehidrogenáz A
LDL	alacsony sűrűségű lipoprotein (low density lipoprotein)
LDTF	sejttípus-specifikus transzkripció faktorok (lineage-determining transcription factors)
LPS	lipopoliszacharid
M-CSF	makrofág kolónia-stimuláló faktor

MACS2	kromatin-immunprecipitációs szekvenálás modell alapú analízise (Model-based Analysis of ChIP-Seq)
MAPK	mitogén-aktivált proteinkináz szignalizáció (mitogen-activated kinase signaling)
MHC II	fő hisztokompatibilitási komplex II
Mrc1	mannóz receptor c-type 1
NGS	új generációs szekvenálás
NK	természetes-ölősejtek (natural killer)
NO	nitrogén-monoxid
PCA	főkomponens-analízis (principal component analysis)
Pd-1	programozott sejthalál fehérje 1 (programmed cell death protein 1)
PDGF	trombocitából származó növekedési faktor (platelet-derived growth factor)
PDK1	piruvát dehidrogenáz kináz 1
Retnla	rezisztin-szerű molekula (resistin-like molecule alpha)
RPKM	leolvasások normalizált értéke szekvenálási mélységre és génhosszra (Reads Per Kilobase Million)
SDTF	szignál-dependens transzkripció faktor (signal-dependent transcription factors)
STAT6	szignál transzducer és transzkripció aktivátor 6
TAM	tumor asszociált makrofágok
TGF- β	transzformáló növekedési faktor- β
TLR	Toll-szerű receptor (Toll-like receptor)
TNF	tumor nekrosis faktor
VEGFA	vaszkuláris endoteliális növekedési faktor A

4. Szakirodalmi áttekintés

4.1 A makrofágok eredete és funkciója

A makrofágok az emlősök minden szövetében megtalálható immunsejtek, amelyek fontos szerepet játszanak a szöveti homeosztázis fenntartásában. A veleszületett immunitás részeként részt vesznek a patogének fagocitálásában és eliminációjában, illetve a gyulladásos folyamatok modulációján keresztül az immunválasz szabályozásában. Emellett a makrofágok a T-sejtek aktivációjában is közreműködnek antigén prezentáció révén, ezáltal elősegítve a patogén specifikus adaptív immunválasz kialakulását^{1,2}.

Eredetüket és funkciójukat tekintve egy rendkívül heterogén sejtcsoport. A szöveti rezidens makrofágok – Kupffer sejtek, mikrogliák, alveoláris makrofágok - prekursorai az embrionális fejlődés különböző szakaszaiban keletkező hematopoietikus őssejtek. A prekursor őssejtekből differenciálódó makrofágok az egyedfejlődés prenatális szakaszában vándorolnak a fejlődő szövetekbe és adaptívan alkalmazkodva a szövet-specifikus környezethez hozzájárulnak a homeosztázis fenntartásához, továbbá különböző immunfunkciók ellátásához. Populációik önfenntartóak, a cirkuláló monocita prekursorok közreműködése nélkül is képesek fennmaradni^{3,4}.

Az egyedfejlődés posztnatális szakaszában a csontvelő veszi át a vérképző szerv szerepét a magzati májtól. Az itt fejlődő pluripotens, majd multipotens progenitorokból származó monociták a vérkeringésbe kerülve a vérerek integritásának fenntartásában vesznek részt. Továbbá gyulladásos folyamatok, patogén fertőzés esetén különböző növekedési faktorok, kemokinek hatására képesek a szövetekbe vándorolva makrofágokká differenciálódni. A szövetekben, kiegészítve a rezidens makrofág populációt, részt vesznek az immunválasz kialakításában és szabályozásában⁴⁻⁶.

4.2 Makrofág populációk heterogenitása

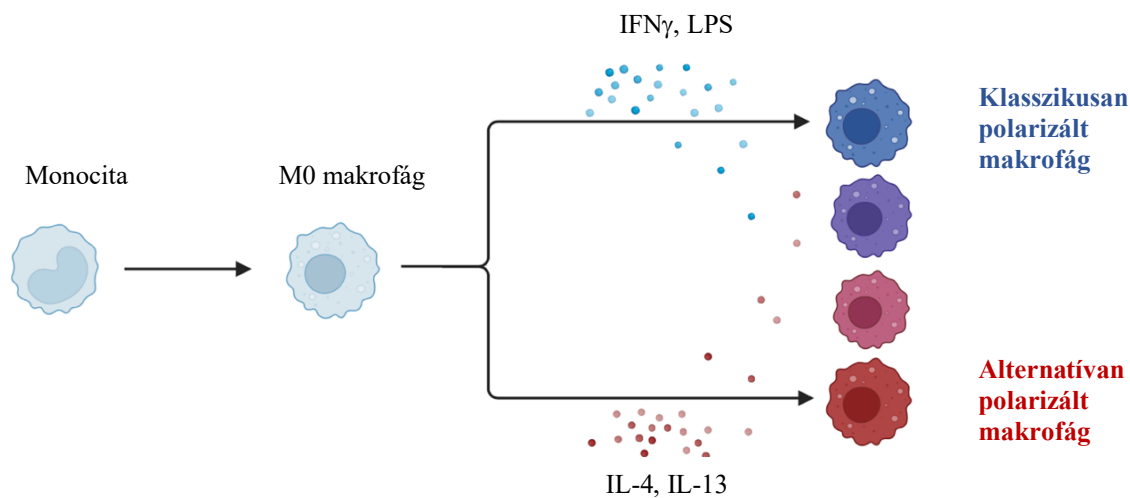
A makrofágok dinamikusan változó génexpressziós programjuk révén képesek alkalmazkodni az aktuális mikrokörnyezeti körülményekhez. Egereken végzett kísérletek bizonyítják, hogy mind a monocita eredetű, mind a szöveti rezidens makrofágok esetén lokális mikrokörnyezet függő a génkifejeződési mintázat kialakítása. Ez mintázat a sejtek molekuláris mikrokörnyezetének változásával, valamint a sejtek más szövetekbe történő vándorlásával módosulhat⁷.

A makrofág populációk heterogenitásának mértékét tovább növeli, hogy különböző fertőzések következtében, tumorokban, vagy krónikus gyulladásos megbetegedésekben a

makrofágok mikrokörnyezete jelentősen megváltozik. A makrofágok környezetében jelen lévő patogén eredetű molekulák, a környezetükben jelen lévő immun és nem immunsejtekből felszabaduló citokinek és metabolitok együttes hatása alakítja ki az adott patológiás állapotra jellemző makrofág fenotípust és funkciót. A különböző patológiás állapotokra jellemző molekuláris mikrokörnyezet eredményeként és a különböző feladataik ellátása érdekében a makrofágok számos különböző - akár egymással ellentétes - funkcionális állapotot/fenotípust képesek kialakítani. Mindezek hatására pro-inflammatórikus és anti-inflammatórikus folyamatokban, valamint immunogén és tolerogén válasz kialakításában egyaránt rész tudnak venni^{8,9}.

4.2.1 A klasszikus és alternatív makrofág polarizáció általános jellemzői

A makrofágok aktivációja során különböző mikrokörnyezeti szignálok együttes hatása érvényesül, aminek következtében eltérő polarizációs állapotban lévő, különböző funkcionális és fiziológiai sajátságokkal rendelkező sejtek jönnek létre. Ennek a polarizációs spektrumnak két végpontján a klasszikusan aktivált, illetve alternatívan polarizált makrofágok találhatók (1.ábra)¹⁰.



1. ábra: A makrofág polarizáció folyamatának sematikus ábrája. Az ábrát Mosser és Edwards illusztrációi alapján készítettem¹⁵. Rövidítések: IFN γ - interferon γ , LPS - lipopoliszacharid, IL-4 – interleukin-4, IL-13 – interleukin-13.

A klasszikusan polarizált makrofágok a patogének elleni sejt-közvetített immunválasz résztvevői. T sejtek és természetes-ölősejtek (natural killer-NK) által termelt citokinek, illetve bakteriális sejtalkomponensek hatására alakulnak ki. Ilyen szignálok a tumor nekrozis faktor (TNF), az interferon γ (IFN γ), illetve a lipopoliszacharid (LPS) amelyek a mikrobák és a tumorsejtek elleni védekezésben hatékony, pro-inflammatórikus citokineket - IL-1 β , IL-6, IL-23 - termelő makrofág populációt hoznak létre^{11–13}.

Az alternatívan polarizált makrofágok főként az immunválasz szabályozásában és a szöveti homeosztázis helyreállításában vesznek részt. A szöveti sérülés vagy extracelluláris parazita fertőzés következtében aktiválódó bazofil granulociták és a hízósejtek által termelt IL-4 hatására aktiválódnak. Emellett a Th2-típusú gyulladás is indukálhat alternatív polarizációt IL-13 és IL-4 citokinek által. Ezek a sejtek *in vitro* körülmények között mérsékeltébb antigén prezentáló kapacitással rendelkeznek és alacsony szinten szekretálnak pro-inflammatórikus citokineket. Szerepük főként a sebgyógyulás és szöveti regeneráció elősegítése extracelluláris mátrix komponensek szekréciója, illetve a gyulladásos folyamatok negatív szabályozása által¹⁴⁻¹⁶.

4.2.2 A makrofágok transzkripciós heterogenitásának és plaszticitásának szerepe különböző patológiás folyamatokban

A makrofágok azon képessége, hogy a különböző molekuláris mikrokörnyezeti szignálok eltérő transzkripciós programokat aktiválnak, valamint a mikrokörnyezetük változására a transzkripciós programjuk megváltoztatásával képesek reagálni meghatározhatja számos kórfolyamat kimenetelét¹⁷. Egér tumor modellekben kimutatták például, hogy a tumoros mikrokörnyezet specifikusan módosítja a daganatos szövetben jelen lévő mononukleáris fagocita sejteket. Ezáltal a tumor asszociált makrofágok (TAM) heterogén populációját jön létre, amely jelentősen befolyásolja a tumorelles immunválaszt, a betegség prognózisát, valamint a különböző tumorterápiák hatékonyságát¹⁸.

A monocita eredetű és szöveti rezidens makrofágok az érlelmeszedés folyamatában is fontos szerepet játszanak. A betegség kialakulásának kezdetén formálódó – az artériák falára lerakódott lipoproteinekből álló - plakkok környezetében gyulladás alakul ki. Számos makrofág alpopuláció figyelhető meg ezek környezetében, amelyek részt vesznek a felhalmozódott lipoproteinek eliminációjában és a gyulladásos folyamat szabályozásában. A plakkokban nagy mennyiségben megtalálható alacsony sűrűségű lipoprotein (low density lipoprotein-LDL) képes pro-inflammatórikus fenotípusú makrofágok polarizációját indukálni. Továbbá a lipidek intenzív fagocitózisának következtében magas zsír tartalmú habos sejtek (foam cells) jönnek létre, amelyek csökkent migrációs képességgel rendelkeznek és a zsírsav metabolizmusuk zavart szenved. Az ezen folyamatok következtében fokozódó apoptózis és csökkent hatékonyságú efferocitózis krónikus gyulladást eredményez. Ezzel szemben a plakkok környezetében jelen lévő alternatívan polarizált makrofágok kevésbé hajlamosak a habos sejt

képzésre, magasabb fagocitikus aktivitással rendelkeznek és intenzív kollagén termelésük által részt vesznek a szöveti regenerációban^{19,20}.

Túlsúly esetén a zsírszövetben található adipocita sejtek proliferációjának és lipid akkumulációjának következtében számos olyan kórfolyamat indukálódik, amelyek immunsejtek rekrutálnak a szövetekbe és enyhe, krónikus gyulladás alakul ki a szervezetben. Az adipociták gyulladás indukált programozott sejthalála makrofágokat vonz a gyulladás helyszínére, amelyek pro-inflammatorikus citokineket termelnek, szemben az egészséges egyedek zsírszövetében jelen lévő anti-inflammatorikus citokin termelő zsírszöveti makrofágokkal²¹.

A krónikus allergiás légúti gyulladások patogenezisében is fontos résztvevők a szöveti rezidens és monocita eredetű makrofágok. Pro-inflammatorikus citokinek és kemokinek termelése által hozzájárulhatnak a légutak krónikus gyulladásának kialakulásához és fenntartásához. Az alternatívan polarizált makrofágok anti-inflammatorikus citokinek, illetve szöveti regenerációt elősegítő faktorok termelése által részt vesznek a gyulladás szabályozásában. Azonban ennek a fenotípusnak a sajátossága, hogy növekedési faktorok – transzformáló növekedési faktor- β (TGF- β), trombocitából származó növekedési faktor (PDGF) – termelésével a légutak simaizomzatának megvastagodását és kollagén felhalmozódását okozhatják. Ennek következtében pedig korlátozódik a légáramlás a tüdőben²².

4.3 Transzkripció szabályozás epigenetikai alapjai

A makrofágok génkifejeződési profiljának kialakításában fontos szerepet játszik az epigenetikai programjuk, ami egy több szinten megvalósuló, összetett folyamat. A transzkripció aktivitás alapvető feltétele a különböző transzkripció faktorok és regulátor fehérjék számára hozzáférhető kromatin szerkezet, ami a DNS feltekeredését moduláló nukleoszómák módosítása révén szabályozható²³. Ennek során a nukleoszómákat alkotó hiszton fehérjék N-terminálisának poszt-transzlációs módosítása történik. Ilyen folyamatok például az acetiláció, foszforiláció, metiláció, ubikvitináció. Ezen módosítások a DNS - hiszton kapcsolat szabályozása révén, illetve további kromatin átrendező képességgel rendelkező fehérjék toborzásával járulnak hozzá a génexpresszió szabályozásához^{24,25}.

Ilyen fehérjék a sejttípus-specifikus transzkripció faktorok (lineage-determining transcription factors – LDTF) is, amelyek a differenciációs folyamat során részt vesznek a sejtek identitásának kialakításában. A PU.1, a CCAAT/enhancer-kötő fehérje (CCAAT/enhancer-binding protein - C/EBP), az aktivátor protein 1 (AP-1), illetve különböző interferon reguláló

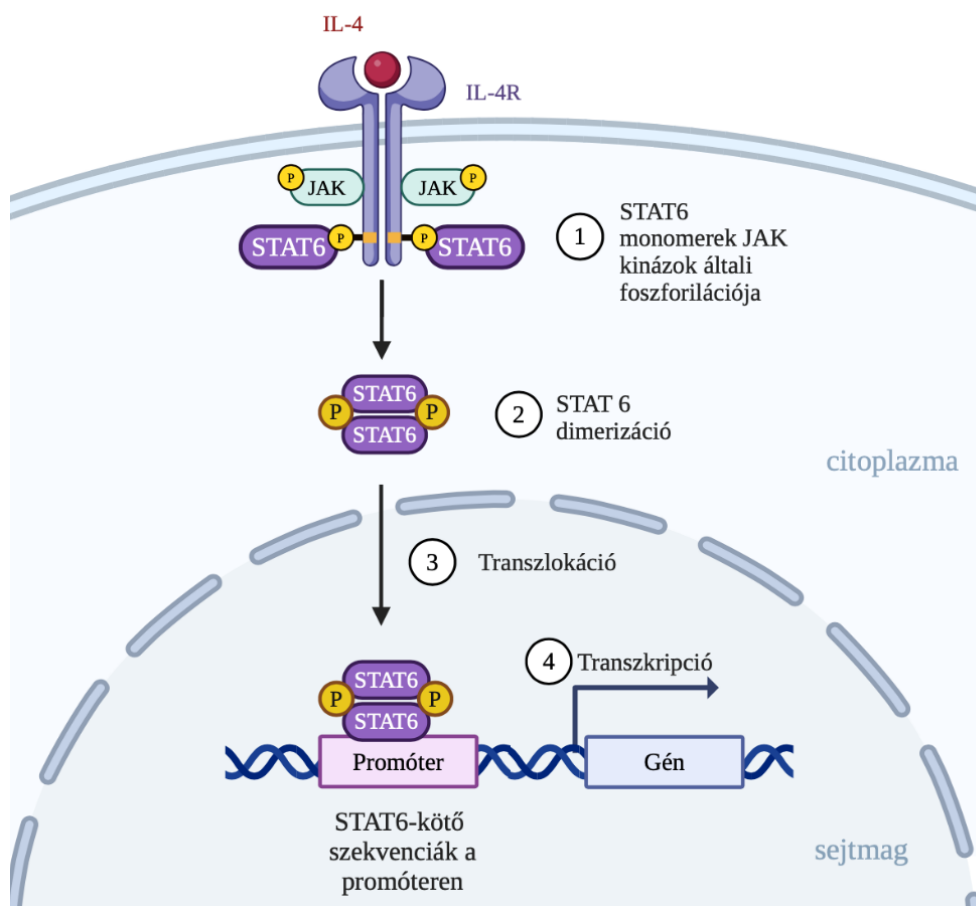
faktorok (interferon regulatory factor – IRF) ilyen mester transzkripciós faktorok, amelyek más szabályozó fehérjékkel együttműködve fontos szerepet játszanak a makrofág specifikus transzkripciós program fenntartásában. Kromatin átrendező képességük révén hozzájárulnak a DNS-en található disztális szabályozó elemek, az enhanszer régiók szabaddá tételéhez, így kötőhelyet biztosítva a szignál-dependens transzkripciós faktorok számára (signal-dependent transcription factors – SDTF). A SDTF-ok a mikrokörnyezeti stimuláció által kiváltott szignalizáció közvetítőiként járulnak hozzá a génkifejeződés epigenetikai szabályozásához. Ilyen szignál közvetítő transzkripciós faktorok a különböző sejtfelszíni receptorok, - Toll-szerű receptorok (Toll-like receptor - TLR), TNF receptorok -, által aktivált NF- κ B és AP-1 transzkripciós faktor család tagjai, illetve a citokin receptorok - IL-4 receptor, IFN γ receptor - által aktivált különböző STAT transzkripciós faktorok^{26–28}.

4.4 Interleukin-4 által aktivált szignálút vonal és transzkripciós program szerepe az alternatív makrofág polarizációban

Az IL-4 citokinek a mieloid sejtek felszínén található transzmembrán receptoraihoz kötődve indukálják a szignál transzducer és transzkripciós aktivátor 6 (STAT6) Janus kinázok (JAK) által történő foszforilációját²⁹. Az így kialakuló STAT6 homodimer a sejtmagba történő transzlokációt követően a DNS-hez kötődve részt vesz az alternatív makrofág polarizációra jellemző specifikus génkifejeződés szabályozásában, mind transzkripciós, mind epigenetikai szinten. Az IL-4 által aktivált STAT6 transzkripciós faktor egyaránt képes az általa kötött genomi szabályozó elemek direkt aktivációjára és gátlására különböző kofaktorok, köztük a p300 hiszton acetil-transzferáz enzim kötődésének szabályozásán keresztül³⁰ (2.ábra). Mindemellett, az IL-4/STAT6 szignálút vonal számos további transzkripciós faktor – EGR2, PPAR γ , IRF4 és KLF4 - kifejeződésének fokozásával/aktiválásával szintén hozzájárul az alternatív makrofág polarizációs állapot kialakulásához^{31–34}.

Az IL-4 által aktivált/indukált transzkripciós faktor hálózat egyaránt szabályozza a makrofágok metabolizmusát és immunválaszt moduláló funkcióját. Az IL-4 aktivált alternatív makrofág polarizációra a klasszikus aktivációval ellentétben alacsonyabb glikolitikus aktivitás és intenzívebb oxidatív foszforiláció jellemző.

Az oxidatív metabolizmus szoros kapcsolatban áll ezen immunsejtek anti-inflammatorikus funkciójával, emellett megnövekedett argináz 1 aktivitással rendelkeznek, amely enzim fokozott kollagén termeléssel járul hozzá az alternatívan polarizált makrofágok szöveti regenerációban betöltött funkciójának ellátásához^{35,36}.



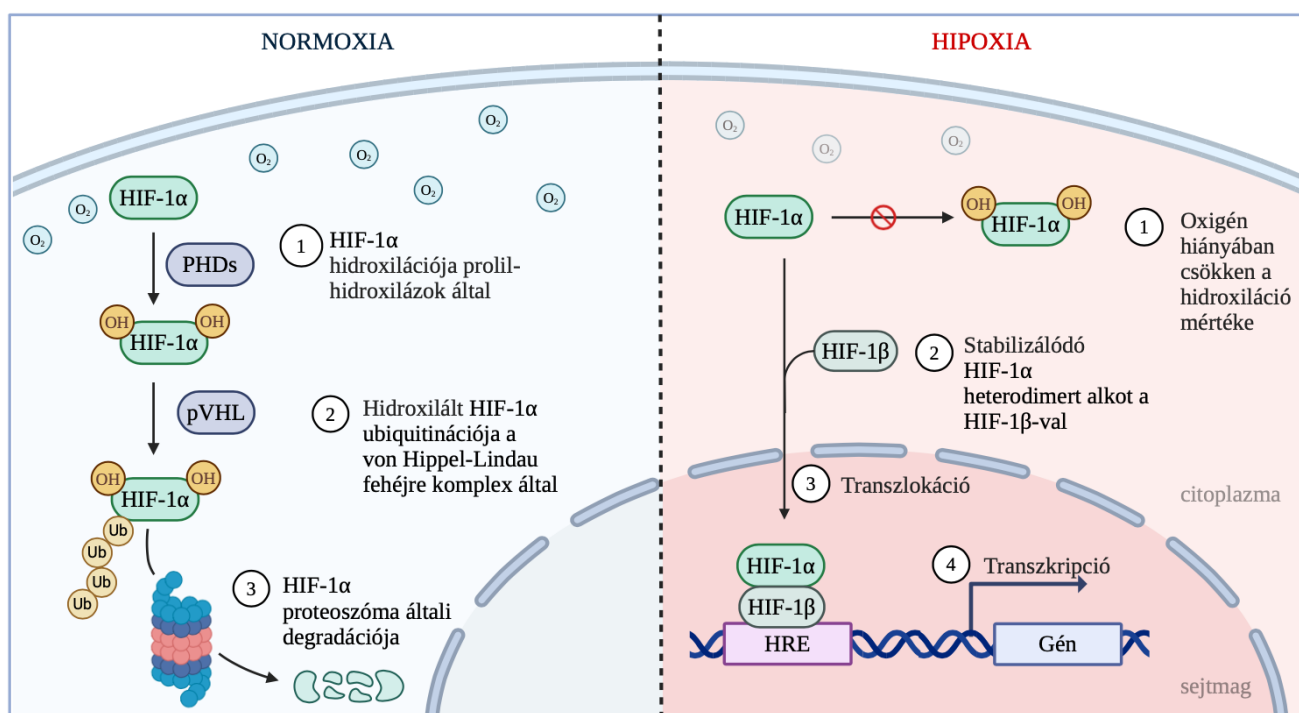
2. ábra: Az IL-4 által indukált jelátviteli útvonalak. Az IL-4 transzmembrán receptorhoz való kötődése indukálja a STAT6 dimerizációt, ami a sejtmagba transzlokálódva transzkripciós faktorként szabályozza a génkifejeződést. Rövidítések: IL-4 – interleukin-4, JAK – Janus kináz, STAT6 - szignál transzducer és transzkripciós aktivátor 6.

4.5 A hipoxia jellemzői és hatása különböző patológiás folyamatokban

Az oxigén elengedhetetlenül fontos minden sejt működéséhez. A szöveti homeosztázis fenntartásához szükséges optimális oxigén mennyiség emlősök esetén szervenként, szövetenként eltérő. Amennyiben a szervezet egy adott részén nem áll rendelkezésre a sejtek normál, fiziológiás működéséhez elegendő oxigén hipoxiáról beszélünk. Ez a csökkent oxigén koncentráció számos kórfolyamat esetében megfigyelhető, mint a gyulladásos folyamatok, daganatok, kardiovaszkuláris betegségek, légzőszervi rendellenességek. Ahhoz, hogy az immunsejtek hipoxiás körülmények között is megfelelően el tudják látni funkciójukat az anaerob energianyerési folyamatok irányába tolódik el metabolizmusuk³⁷.

4.5.1 A mikrokörnyezet oxigénszintjének hatása az intracelluláris szignalizációra

Az oxigénhiányos környezethez történő adaptáció hátterében főként a hipoxia indukált faktor áll (hypoxia-inducible factor – HIF). A HIF transzkripciós faktorok aktív formája egy konstitutívan termelődő β alegységből és egy oxigénszint függő stabilitással rendelkező α alegységből álló heterodimer. Emlős sejtekben a HIF- α alegységnek három izoformája van jelen, ezek a HIF-1 α , HIF-2 α és a HIF-3 α , amelyek célgén specificitása sejttípus függő³⁸. A HIF transzkripciós faktorok aktivációját számos extra-, illetve intracelluláris szignál képes indukálni. Oxigénszint-függő szabályozás esetén normoxiás körülmények között hidroxilálódik a HIF- α alegység prolin hidroxilázok által, így a von-Hippel-Lindau fehérje komplex képes felismerni és ubiquitin ligáz aktivitása révén proteoszóma általi degradációra kijelölni. Csökkent oxigénszint mellett azonban az alacsonyabb mértékű hidroxiláció következtében stabilizálódik a HIF α . A stabilizálódott α a β alegységgel heterodimert alkotva a sejtmagba transzlokálódik, ahol a hipoxiás körülményekhez történő adaptációban részt vevő gének kifejeződését szabályozza³⁹ (3.ábra).



3. ábra: A hipoxia indukált faktor-1 oxigénszint függő szabályozása. Az ábrát Halligan és mtsai leírása alapján készítettem³⁹. Rövidítések: HIF-1 α - hipoxia indukált faktor α , PHDs – prolin-hidroxilázok, pVHL – von Hippel-Lindau fehérje, HRE – hipoxia válasz elem (hypoxia response element).

4.5.2 HIF-1 szabályozó szerepe a makrofágok metabolizmusában és immunfunkciójában

A makrofágok oxigénhiányos környezethez való alkalmazkodása során az energiatermelés átkapcsol a mitokondriális oxidatív foszforilációról a glikolízisre. Ennek a

folyamatnak a részeként a HIF-1 transzkripciós faktorok képesek fokozni az immunsejtek megnövekedett glükózigényéhez szükséges glükóz transzporterek - GLUT1, GLUT3 - transzkripcióját⁴⁰. Továbbá számos glikolízisben résztvevő enzim és intermediér termelődésének szabályozásában is részt vesznek, mint a hexokináz 2 (HK2), gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz (GAPDH)⁴¹. A metabolikus átprogramozás során gátlás alá kerül a Szent-Györgyi-Krebs-ciklus, ami biztosítaná az oxidatív foszforilációhoz szükséges elektronokat. A hipoxia indukált faktorok a glikolízis során keletkező piruvátot átalakító enzimek szabályozásával járulnak hozzá ehhez a folyamathoz. Képesek növelni a laktát dehidrogenáz A (LDHA) szintjét, amely enzim a piruvát laktáttá történő átalakítását katalizálja, továbbá fokozzák a piruvát dehidrogenáz kináz 1 (PDK1) termelését. A PDK1 enzim gátolja a piruvát dehidrogenáz komplex kialakulását, amely enzim felelős azért, hogy a piruvátot acetyl-coenzim-A-vá alakítsa⁴². Emellett a HIF-1 mikroRNS-ek indukcióján keresztül képes gátolni az oxidatív foszforilációhoz köthető komponensek aktivitását, mint az elektron transzport lánc részét képező I. komplex, vagy a Szent-Györgyi-Krebs-ciklusban résztvevő akonitáz enzim⁴³.

A hipoxia indukált faktorok a metabolikus adaptáció befolyásolásán túl közvetlenül is részt vesznek a makrofágok immunfunkcióinak modulálásában. A HIF-1 α megnövekedett aktivitása képes fokozni gyulladásos folyamatokban résztvevő citokinek - IFN γ , IL-12 - szekrécióját, illetve befolyásolja a fagocitózis hatékonyságát a folyamatban résztvevő receptor molekulák – Fc gamma receptor (Fc γ R), komplement receptorok - indukciója által. Emellett a hipoxia indukált jelátviteli útvonalak képesek fokozni a makrofágok antigén prezentáló kapacitását, amely folyamatnak a T- és B-sejtek aktivációján keresztül fontos szerepe van az adaptív immunválasz szabályozásában⁴⁴.

4.6 Immunmetabolizmus

A makrofágok mikrokörnyezeti körülményekhez történő adaptációja során módosuló metabolikus profil nem csak az energiatermelési folyamatok szempontjából fontos. Az utóbbi évtizedben fokozott figyelem irányult az immunsejtek által termelt metabolitok immunválaszban betöltött funkciójára.

A glikolízisben résztvevő enzimek fontos szerepet játszanak a makrofágok polarizációjának és funkciójának szabályozásában. A hexokinázok a glükóz glikolízisbe való csatornázását végzik. Ezek az enzimek a LPS által indukált inflammaszóma aktiváción keresztül képesek szabályozni gyulladásos citokinek szekrécióját⁴⁵. A GAPDH a gliceraldehid-3-foszfát 1,3-biszfosfogliceráttá történő átalakítását katalizáló enzim. A

szénhidrát anyagcserében betöltött funkciója mellett képes a tumor nekrosis faktort kódoló hírvivő RNS-hez kötődve glikolízis intenzitás függő módon szabályozni a gyulladásos citokin kifejeződését⁴⁶.

Az anaerob körülmények között piruvátból - LDHA enzim segítségével - keletkező laktát a makrofágok anyagcseréjének szabályozásán keresztül képes gyulladásos modulátorként hatni. LPS stimuláció hatására a makrofágok metabolizmusa átvált anaerob glikolízisre. A laktát a Szent-Györgyi-Krebs-ciklus fő szénforrásaként funkcionál, szubsztrátként szolgál az acetyl-CoA termelésben, amely molekula kulcsfontosságú a hiszton H3K27 acetilációban. Ezáltal képes transzkripció szinten gátolni a makrofágok pro-inflammatorikus funkcióját⁴⁷.

A szénhidrát anyagcsere mellett az aminosav metabolizmus is befolyásolja a makrofágok polarizációjára. Az arginin egy nem esszenciális aminosav, amelynek átalakítását klasszikusan a nitrogén-monoxid szintáz enzimek végzik. Ennek a során nitrogén-monoxid (NO) keletkezik, amely szolubilis molekula szerepet játszik mind a veleszületett, mind az adaptív immunválasz szabályozásában és a makrofág polarizáció modulálásában. A megnövekedett NO szint pro-inflammatorikus citokineket termelő, magasabb fagocitikus aktivitással rendelkező makrofágokat eredményez. Emellett képes szabályozni a fő hisztokompatibilitási komplex II (major histocompatibility complex II – MHC II) molekulák termelését, amelyek szerepet játszanak az antigén prezentációban. Továbbá a magas NO szint hozzájárul a klasszikusan aktivált makrofágokra jellemző metabolikus profil kialakításához is⁴⁸.

Az alternatívan polarizált makrofágokban indukálódik az argináz 1 enzim termelése. Ez a biokatalizátor felelős az arginin alternatív katabolizmusáért, amely során ornitin, illetve urea keletkezik, ezzel egyidőben csökkentve a sejtek nitrogén-monoxid termelését. A makrofágok által termelt argináz 1 és az aktivitása révén keletkező metabolitok szövet specifikus módon szerepet játszhatnak a sebgyógyulásban, gyulladásos és fibrotikus folyamatok szabályozásában, illetve extracelluláris paraziták elleni védelemben⁴⁹.

5. Célkitűzés

A változó mikrokörnyezeti feltételekhez történő adaptáció során a makrofágok fenotípusa plasztikusan változhat különböző szignálok hatására. Számos olyan kórállapot ismert, ahol az IL-4 általi makrofág aktiváció hipoxiás körülmények között megy végbe. Krónikus gyulladásal jellemzett betegségek esetén, mint az allergiás asztma, krónikus obstruktív tüdőbetegség (chronic obstructive pulmonary disease – COPD), továbbá az érlelmeszesedés során keletkező plakkok környezetében és a rapid módon növekvő tumorok szövetében is megfigyelhető ez a jelenség⁵⁰⁻⁵². Az alternatívan polarizált makrofágok fontos szerepet töltenek be mind a veleszületett, mind az adaptív immunválasz szabályozásában, azonban a hipoxiás mikrokörnyezet képes lehet olyan módon megváltoztatni a génkifejeződési profiljukat, ami módosult effektor funkcióval és ennek következtében negatív prognózissal járhat ezen megbetegedések esetén.

Munkánk célja a hipoxiás mikrokörnyezet IL-4 indukálta alternatív makrofág polarizációs programra gyakorolt hatásának feltérképezése volt a génkifejeződés szabályozásának szintjén. Ehhez egér csontvelői eredetű makrofágokat (bone-marrow-derived macrophages - BMDMs) alkalmaztunk és a génexpressziós, valamint epigenetikai változásokat új generációs szekvenálás alapú módszerekkel vizsgáltuk.

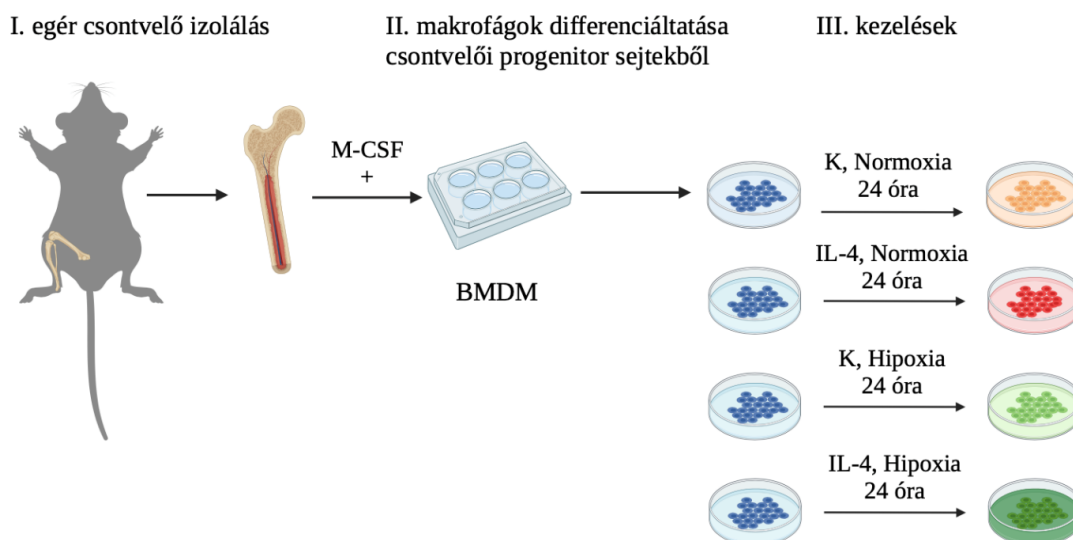
- (i.) A teljes transzkriptóm szintjén bekövetkező változásokat RNS-szekvenálás alkalmazásával vizsgáltuk. Célunk az volt, hogy megvizsgáljuk mely gének kifejeződését befolyásolja szignifikánsan ez a két szignál, illetve, hogy megfigyelhető-e szinergizmus a hipoxia és az IL-4 hatása között. A vizsgálatunk további részeként azt szeretnénk volna meghatározni, hogy milyen jelátviteli útvonalakban vesznek részt az általunk azonosított IL-4 és hipoxia által szinergisztikusan indukált gének.
- (ii.) ATAC- és ChIP-szekvenálás alkalmazásával tanulmányozni kívántuk, hogy ezen génkifejeződési mintázat hátterében milyen epigenetikai folyamatok állnak. Ennek során célunk volt annak vizsgálata, hogy hogyan változik meg a kromatin hozzáférhetősége és az RNS-polimeráz II kötődése a szinergisztikusan indukált gének szabályozó régióinak környezetében.

6. Anyagok és módszerek

A kísérletes munkát – makrofág sejtek differenciálása, kezelések; RNS, ChIP és ATAC szekvenálás - munkacsoportunk korábbi (Domokos Apolka) és jelenlegi (Dr. Varga Zsófia) tagjai végezték. Munkám során az így létrejött NGS alapú adatsorok bioinformatikai analízisét végeztem. Mindezek miatt ebben a fejezetben a munkám megértéséhez alapvetően szükséges kísérleti elrendezés bemutatásán kívül az általam végzett bioinformatikai analíziseket mutatom be.

6.1 Kísérleti elrendezés

A kísérletek során felhasznált makrofág sejtek C57BL/6 egerek csontvelőjéből származtak. A csontvelő izolálását követően a progenitor sejtek differenciálása makrofág kolónia-stimuláló faktor (M-CSF) jelenlétében 6 napig történt. Majd ezen makrofágok további tenyésztése 24 órán keresztül IL-4 (20 ng/ml) jelenlétében vagy hiányában, normoxiás (21% O₂) vagy hipoxiás (1% O₂) körülmények között 37 °C-on történt (4.ábra).

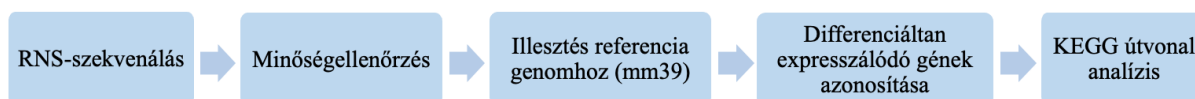


4. ábra: Az általunk alkalmazott kísérleti rendszer sematikus ábrája. Rövidítések: M-CSF – makrofág kolónia stimuláló faktor (macrophage colony-stimulating factor), BMDM – egér csontvelő eredetű makrofág (bone marrow-derived macrophage), K – kontroll.

6.2 RNS-szekvenálás

Az RNS-szekvenálási adatok analízise során először a szekvenálási leolvasások minőségét⁵³ ellenőriztük a FastQC szoftver (verzió: 0.11.9) (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) segítségével, majd illesztettük őket az mm39 (GRCm39) referencia genomhoz. Az illesztés során a HISAT2 szoftvert alkalmaztunk (verzió: 2.2.1)⁵⁴. Az egyes génekhez tartozó leolvasások számának

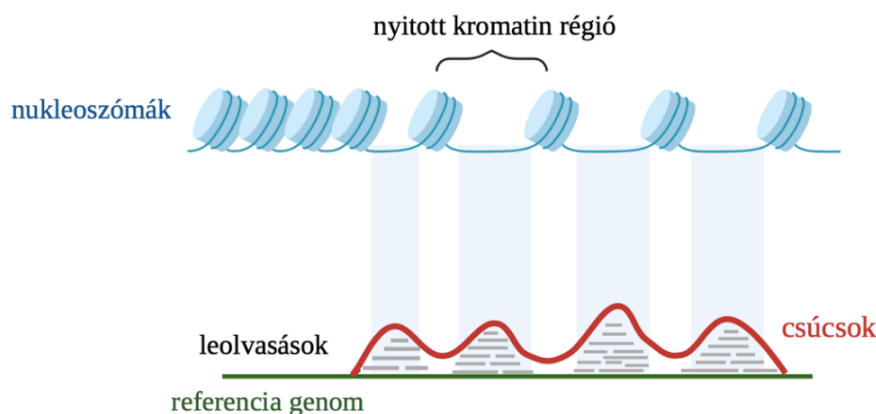
meghatározását a featureCounts bioinformatikai eszköz segítségével végeztük (verzió: 2.0.3)⁵⁵. Ezt követően a DESeq2 programot használtunk a differenciáltan expresszáldó gének meghatározásához (verzió: 1.40.2)⁵⁶. Majd a szinergisztikusan indukálódó gének funkciójának meghatározásához a DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) online annotációs eszközt használtuk⁵³ (5.ábra).



5. ábra: RNS-szekvenálási adatok analízisének lépései.

6.3 ATAC-szekvenálás (Assay for Transposase-Accessible Chromatin sequencing)

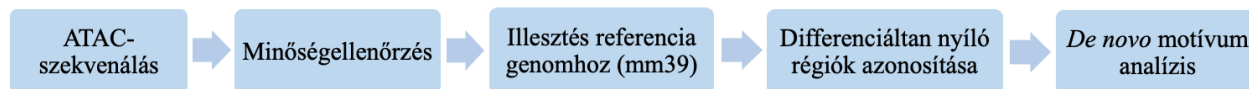
A szekvenálási adatok analízisének első lépéseként elvégeztük a leolvasások minőségének ellenőrzését a FastQC szoftverrel, majd a Burrows-Wheeler Aligner (BWA) eszköz segítségével illesztettük őket az mm39 referencia genomhoz (verzió: 0.7.17)⁵⁷. Ezután a Model-based Analysis of ChIP-Seq (MACS2) szoftverrel azonosítottuk azokat a kromatin régiókat, ahová a Tn5 transzpozáz be tudott épülni (verzió: 2.2.7.1)⁵⁸. Ennek során a program meghatározza mely genomi pozíciókban szignifikáns a szekvenálási leolvasások feldúsulása a háttérzajhoz képest. Az így kapott csúcsok reprezentálják a nyitott kromatin régiókat (6.ábra).



6. ábra: A nyitott kromatin régiókat reprezentáló szekvenálási csúcsok.

Ezután a csúcsokhoz tartozó leolvasások kvantifikálását, normalizálását és ez alapján a differenciáltan nyíló régiók meghatározását a DiffBind programmal végeztük (verzió: 3.12.0)⁵⁹. Az így kapott normalizált RPKM (Reads Per Kilobase Million – leolvasások szekvenálási mélységre és génhosszra normalizált értéke) értékeket alapján leolvasás eloszlási ábrákat készítettünk a deeptools szoftver csomag computeMatrix és plotHeatmap funkcióinak segítségével (verzió: 3.5.1)⁶⁰. A transzkripció faktor kötő motívumok feldúsulását a korábban

azonosított genomi régiókon a HOMER (Hypergeometric Optimization of Motif Enrichment) szoftverrel vizsgáltuk (verzió: 4.11.1)⁶¹ (7.ábra).



7. ábra: ATAC-szekvenálási adatok analízisének lépései.

6.4 ChIP-szekvenálás (Chromatin Immunoprecipitation sequencing)

A ChIP-szekvenálási adatok analízise során a minőségellenőrzési lépést követően (FastQC szoftverrel) illesztettük a leolvasásokat a BWA program segítségével az mm39 referencia genomhoz. Majd a MACS2 program segítségével azonosítottuk azokat a csúcsokat, amelyeken történt RNS polimeráz II kötődés (8.ábra). Illetve a DiffBind programmal elvégeztük a csúcsokhoz tartozó szekvenálási leolvasások kvantifikálását és normalizálását. Majd az így kapott RPKM értékeket alapján leolvasás eloszlási ábrákat készítettünk a deeptools szoftver csomag computeMatrix és plotHeatmap funkcióinak segítségével. A példagének lókuszában detektálható ChIP- és ATAC-szekvenálási leolvasások sűrűség eloszlását integratív genomikai megjelenítővel (IGV) ábráztuk⁶². Az ehhez szükséges adatok a deeptools csomagba tartozó bamCoverage funkcióval lettek kiszámolva.



8. ábra: ChIP-szekvenálási adatok analízisének lépései.

6.5 Statisztika

Az RNS-szekvenálási adatokon végzett analízis során a differenciáltan expresszáldó gének azonosítása a DESeq2 csomag segítségével történt, ami Wald-tesztet alkalmaz a különböző kezelések közötti génexpressziós változás szignifikanciájának meghatározásához. Az így kapott p-értékek korrekcióját Benjamini-Hochberg-teszttel végzi a szoftver⁵⁶. Az ábrákon feltüntetett szignifikancia szintek ez alapján a korrigált p-érték alapján lettek meghatározva a következő határértékek alapján: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. A szinergisztikusan indukált gének meghatározásánál a következő szűrést alkalmaztuk: korrigált p-érték < 0.05 és $\log_2$ fold change > 0 a kontrollhoz képest IL-4 normoxiában, a kontroll hipoxiához képest IL-4 hipoxiában, illetve IL-4 normoxiához képest IL-4 hipoxiában.

Az ATAC-szekvenálási adatokon végzett analízis során a differenciáltan nyíló genomi régiók azonosítása a DiffBind Bioconductor csomaggal történt, ami a DESeq2 által alkalmazott statisztikai analízist alkalmazza. A szignifikánsan nyíló régiók meghatározásánál a következő

szűrést alkalmaztuk: $p\text{-érték} < 0.1$, $\text{fold change} > 0$ a kontrollhoz képest IL-4 normoxiában, a kontroll hipoxiához képest IL-4 hipoxiában, illetve IL-4 normoxiához képest IL-4 hipoxiában.

A négy klaszterbe tartozó genomi régiókon történő RNS polimeráz II kötődés változását varianciaanalízissel (ANOVA) vizsgáltuk, majd az egyes kezelések közötti különbségek szignifikanciáját Tukey-teszt segítségével határoztuk meg. Az ábrákon feltüntetett szignifikancia szintek ábrázolása a következő határértékek szerint történt: $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$.

6.6 Ábrák

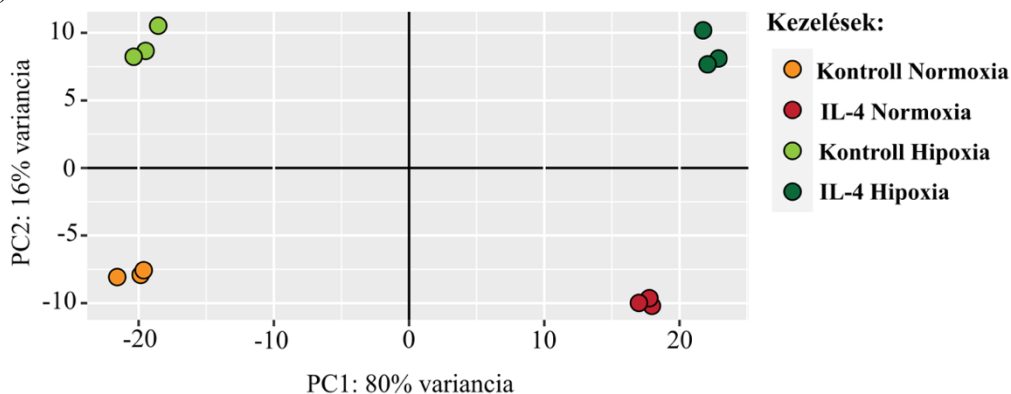
A szakirodalmi áttekintésben felhasznált ábrákat a Biorender segítségével készítettem. (<https://www.biorender.com>)

7. Eredmények

7.1 A hipoxiás mikrokörnyezet és az IL-4 által aktivált szignálútvonalak kölcsönhatásának vizsgálata a teljes transzkriptóm szintjén

7.1.1 A hipoxiás mikrokörnyezet IL-4 válaszkészségét befolyásoló komplex hatása egér csontvelői eredetű makrofágokban

Az egér BMDM-ek génkifejeződési mintázatában IL-4 hatására, illetve hipoxiás mikrokörnyezetben bekövetkező transzkripciós szintű változásokat RNS-szekvenálás alkalmazásával vizsgáltuk. A mérésekhez minden kezelés esetén három biológiai párhuzamost alkalmaztunk. Ahhoz, hogy megvizsgáljuk az egyes ismétlések közötti, illetve a különböző kezelést kapott minták közötti eltéréseket főkomponens-analízist (Principal Component Analysis - PCA) futtatunk le a DESeq2 szoftver által normalizált génexpressziós értékeken (9.ábra).



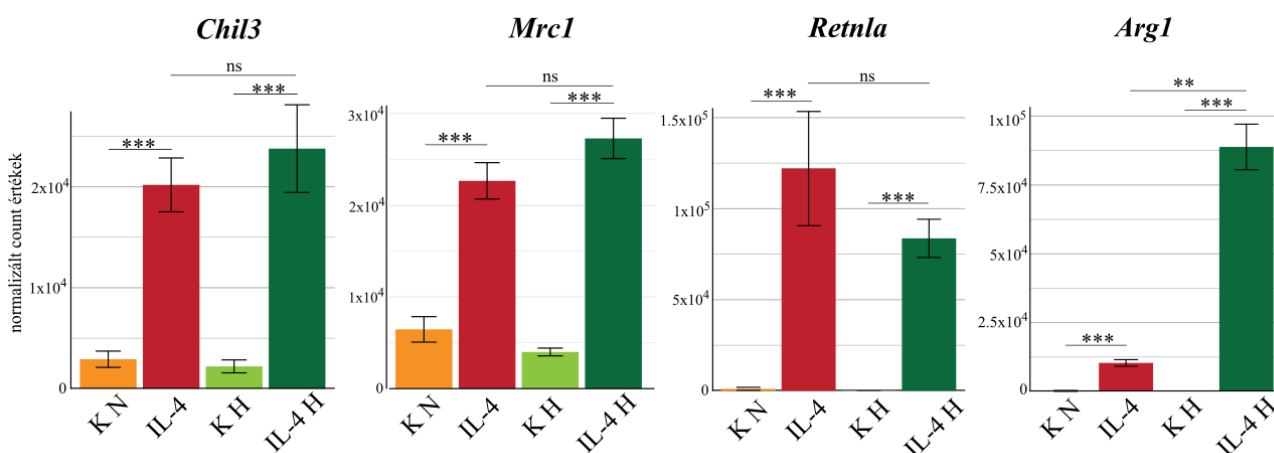
9.ábra: A különböző kezelést kapott sejtenyészetek génkifejeződési profiljának főkomponens-analízise. Az ábrán látható mind a négy kondícióhoz tartozó három technikai ismétlés varianciája.

Az analízis alapján az egyes biológiai párhuzamosok közt kis eltérések tapasztalhatók, amelyből a kísérlet kivitelezésének és a mintáinknak a megfelelő minőségére következtethetünk. Érdekes módon, mind az IL-4, mind a hipoxiás mikrokörnyezet jelentős változást idézett elő az általunk vizsgált makrofág sejtek génkifejeződési profiljában, valamint a hipoxiás mikrokörnyezetben történő IL-4 stimuláció hátságra kialakuló génkifejeződési mintázat jelentősen eltér a normoxiás körülmények között megfigyelhető IL-4 választól. Mindezen eredmények azt mutatják, hogy a hipoxiás körülmények jelentősen befolyásolják a makrofágok IL-4 által indukált alternatív polarizációját.

Ezt követően néhány fontosabb IL-4 által indukált gén expressziós szintjének vizsgálatával kívántuk validálni, hogy az alternatív makrofág polarizáció folyamata a kísérleti rendszerünkben a vártak megfelelően végbement. Az általunk kiválasztott IL-4 célgének közé

tartozott a specifikusan rágcslók makrofágjaiban kifejeződő alternatív polarizációs marker a kitináz-3-szerű fehérje 3 molekulát kódoló gén (chitinase-3-like protein 3 – *Chil3*). Továbbá a c-típusú lektinek csoportjába tartozó mannóz receptort (mannose receptor c-type 1 – *Mrc1* által kódolt fehérje), a rezisztin-szerű molekulát (resistin-like molecule alpha – *Retnla*), valamint az argináz 1 enzimet kódoló gének^{63,64}.

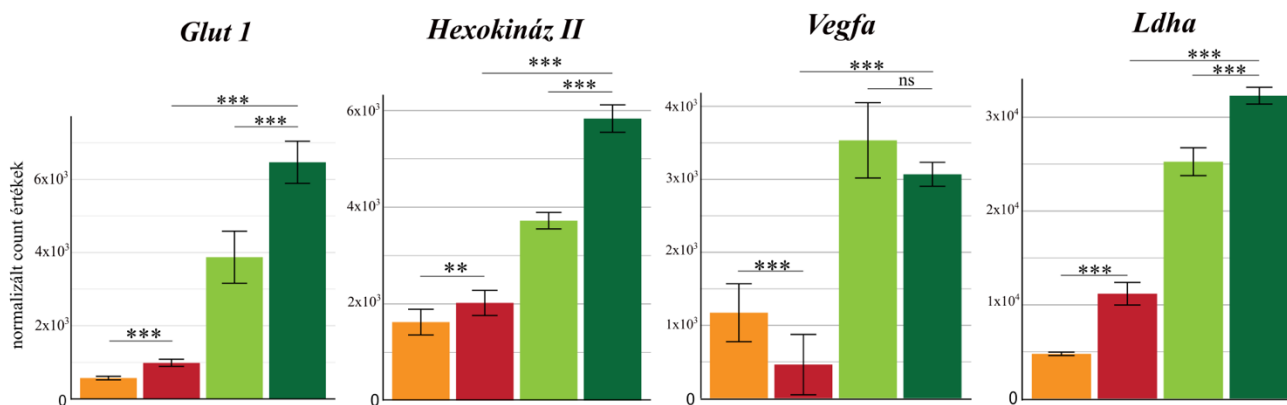
Amint a 10. ábrán látható, az általunk vizsgált IL-4 célgének mindegyikéről elmondható, hogy a kontrollhoz képest a citokin kezelés, mind normoxiás, mind hipoxiás körülmények között fokozta a kifejeződésüket.



10.Ábra: IL-4 marker gének expressziós szintje a négy kondícióban. Statisztika: Wald-teszt, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Rövidítések: K N – kontroll normoxia, IL-4 N – IL-4 normoxia, K H – kontroll hipoxia, IL-4 H – IL-4 hipoxia.

Mivel a makrofágok szuboptimális oxigénszinthez való alkalmazkodásának középpontjában a hipoxia indukált faktor áll, ezért HIF-1 célgének expressziós szintjének vizsgálata alapján ellenőriztük, hogy ez a szignalizációs útvonal aktív a kísérleti modellünkben. A HK2, az LDHA és a GLUT1 olyan enzimek, amelyek a hipoxiás válasszal összefüggésben bekövetkező metabolikus átprogramozásban játszanak szerepet^{39,40,65}. Emellett a vaszkuláris endoteliális növekedési faktor A (*Vegfa*) is egy központi hipoxia célgén, amelyről átíródo fehérje proangiogenikus hatásának köszönhetően hozzájárul a gyulladásban sérült szövetek regenerációjához⁶⁶.

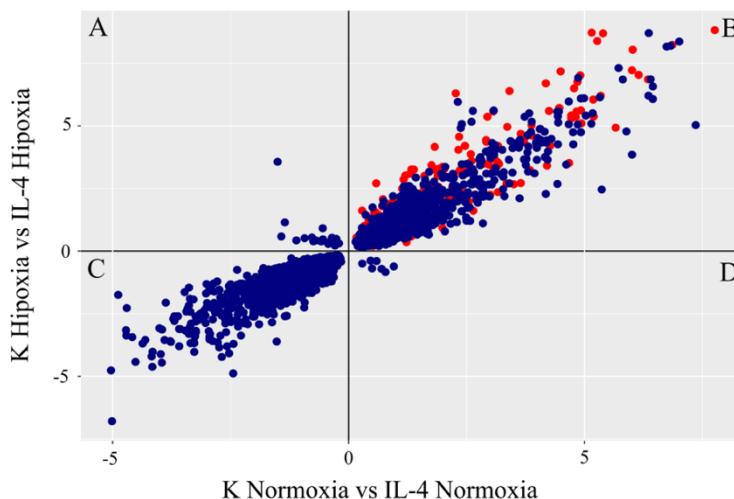
Az általunk vizsgált hipoxiás válaszban résztvevő gének hipoxia általi indukciója szignifikáns emelkedést mutatott IL-4 jelenlétében is (11. ábra). Mindezekből arra következtethetünk, hogy az IL-4-re és a hipoxiás mikrokörnyezetre adott válasz is az elvártak megfelelően végbement a kísérleti rendszerünkben.



11. ábra: Hipoxia marker gének expressziós szintje a négy kondícióban. Statisztika: Wald-teszt, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Rövidítések: K N – kontroll normoxia, IL-4 N – IL-4 normoxia, K H – kontroll hipoxia, IL-4 H – IL-4 hipoxia.

Ezt követően azonosítottuk azokat a géneket, amelyek a kísérleti rendszerünkben különböző kezelések hatására differenciált kifejeződést mutattak. 3600 olyan gént azonosítottunk, amelyeknek expressziós szintje a kontrollhoz képest IL-4 hatására normoxiában és hipoxiában is szignifikánsan (korrigált p -érték < 0.05) változott. Ezeket a géneket a továbbiakban az alapján csoportosítottuk, hogy hogyan változik meg a kifejeződésük IL-4 kezelés hatására normoxiában, illetve hipoxiás körülmények között (12. ábra). A differenciáltan expresszálódó gének két nagyobb csoportja különíthető el. 1943 gént azonosítottunk, amelyek kifejeződését az IL-4 mind normoxiában, mind hipoxiában indukálja. Illetve 1630 gén esetében gátolta az expressziót oxigénhiányos és normoxiás körülmények között is. Továbbá 27 olyan gént azonosítottunk, amelyeknek a IL-4 általi szabályozása a normoxiás és hipoxiás mikrokörnyezetben ellentétesnek bizonyult (12/B. ábra).

12/A



12/B

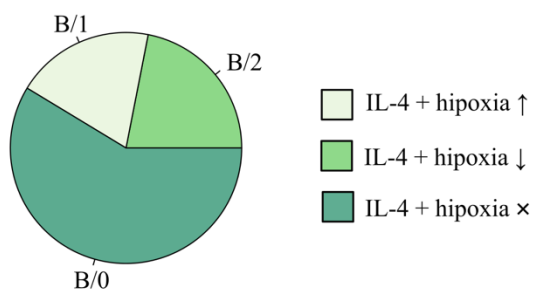
Csoport	Kontroll N vs IL-4 N	Kontroll H vs IL-4 H	IL-4 N vs IL-4 H	n
A	↓	↑	s+ns	20
B/0	↑	↑	ns	1140
B/1	↑	↑	↑	377
B/2	↑	↑	↓	426
C/0	↓	↓	ns	1196
C/1	↓	↓	↑	218
C/2	↓	↓	↓	216
D	↑	↓	s+ns	7

12. ábra: Differenciálisan expresszáldó gének kifejeződésének változása IL-4 hatására normoxiában és hipoxiában. 12/A) A pirossal jelölt gének, amelyek szinergisztikusan indukáltak. 12/B) A különböző csoportokhoz tartozó gének számát összefoglaló táblázat. Rövidítések: IL-4 N – IL-4 normoxia, IL-4 H – IL-4 hipoxia.

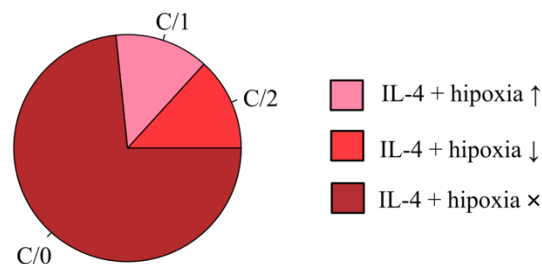
Az IL-4 hatására indukálódó géneket tovább csoportosítottuk aszerint, hogy a hipoxiás mikrokörnyezet hogyan módosítja a génexpressziót fokozó hatását (13/A. ábra). Az IL-4 indukált gének 59%-ának expressziós szintjét nem befolyásolta szignifikánsan hipoxia. 22% esetében gátolja az IL-4 génkifejeződést aktiváló hatását. Illetve az IL-4 által indukált gének 19%-ának kifejeződését a hipoxia tovább fokozta.

A továbbiakban IL-4 génkifejeződést gátló hatását vizsgáltuk (13/B. ábra). Ezen gének 74%-ának esetében a hipoxiás mikrokörnyezet nem befolyásolja szignifikánsan IL-4 génkifejeződést gátló hatását. Továbbá 13-13% azon gének aránya, amelyek esetében az IL-4 általi gátló hatást a hipoxiás mikrokörnyezet tovább erősíti, illetve csökkenti.

13/A



13/B

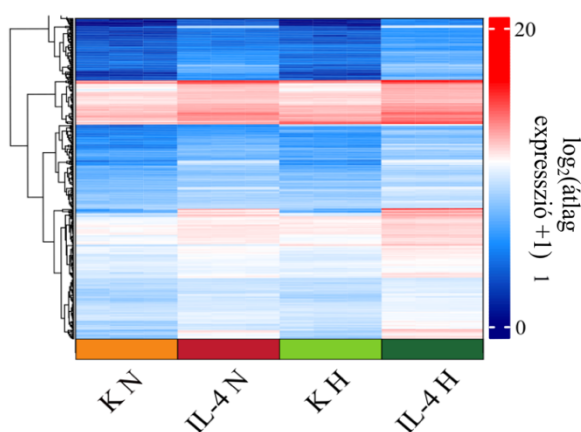


13. ábra: Az IL-4 által szabályozott gének csoportosítása. 13/A) IL-4 indukált gének. 13/B) IL-4 által represszált gének.

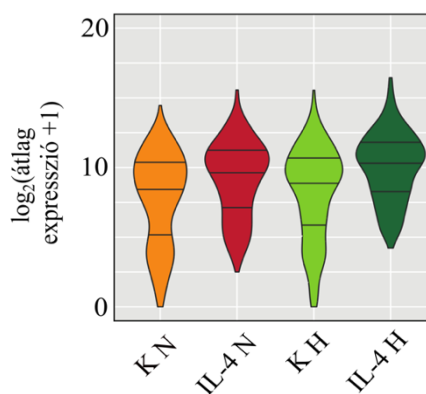
7.1.2 Szinergisztikusan indukált gének

A továbbiakban arra a géncsoportra koncentráltunk, melynek IL-4 általi indukcióját a hipoxiás mikrokörnyezet szignifikáns mértékben tovább fokozta. Ezt a B/1 csoportba tartozó 377 gént tekintettük szinergisztikusan indukáltnak (12.ábra). Először megvizsgáltuk, hogyan változik ezen gének expressziós szintje az általunk alkalmazott különböző kísérleti kondíciókban (14.ábra). A 14/A ábrán látható, hogy kontroll körülmények között eltérő alap kifejeződési szintet mutató gének hipoxiás körülmények között fokozottabb expressziót mutatnak IL-4 kezelés hatására, mint normoxiában. A 14/B ábrán ezen géncsoport normalizált expressziós értékeinek megoszlása látható, ami szintén alátámasztja a szinergisztikus génindukciót ezen csoport esetében.

14/A

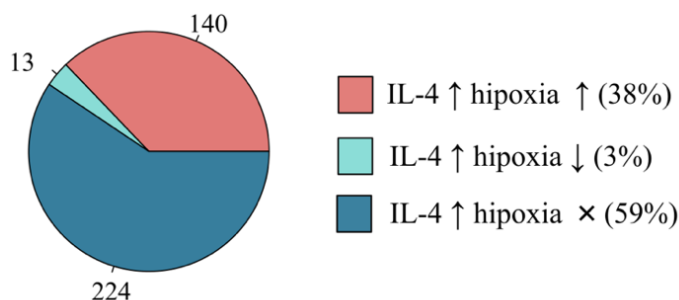


14/B



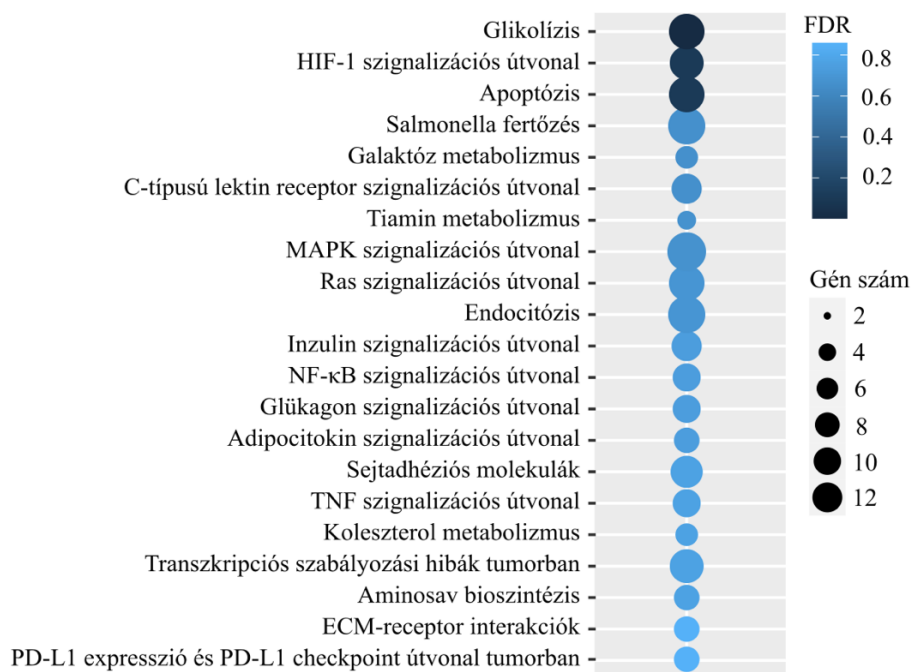
14. ábra: Szinergisztikusan indukálódó gének expressziós szintjének változása a kísérleti rendszerünkben. 14/A) Normalizált expressziós értékek változása a különböző kondíciókban hőtésképen. 14/B) Normalizált expressziós értékek változása a különböző kezelések hatására. Rövidítések: K N – kontroll normoxia, IL-4 N – IL-4 normoxia, K H – kontroll hipoxia, IL-4 H – IL-4 hipoxia.

Ezután megvizsgáltuk, hogy ezen csoport génjeinek kifejeződésére milyen hatással van önmagában az IL-4 kezelés, illetve a hipoxiás mikrokörnyezet (15.ábra). A szinergisztikusan indukált gének 59%-ának expressziós szintjét az IL-4 szignifikánsan növeli, azonban a hipoxia nem módosítja. 38% esetén megfigyelhető mind a hipoxia, mind az IL-4 indukáló hatása, illetve 3% olyan szinergisztikusan indukálódó gént azonosítottunk, melyek expresszióját az IL-4 fokozza, azonban a hipoxia önmagában gátolja.



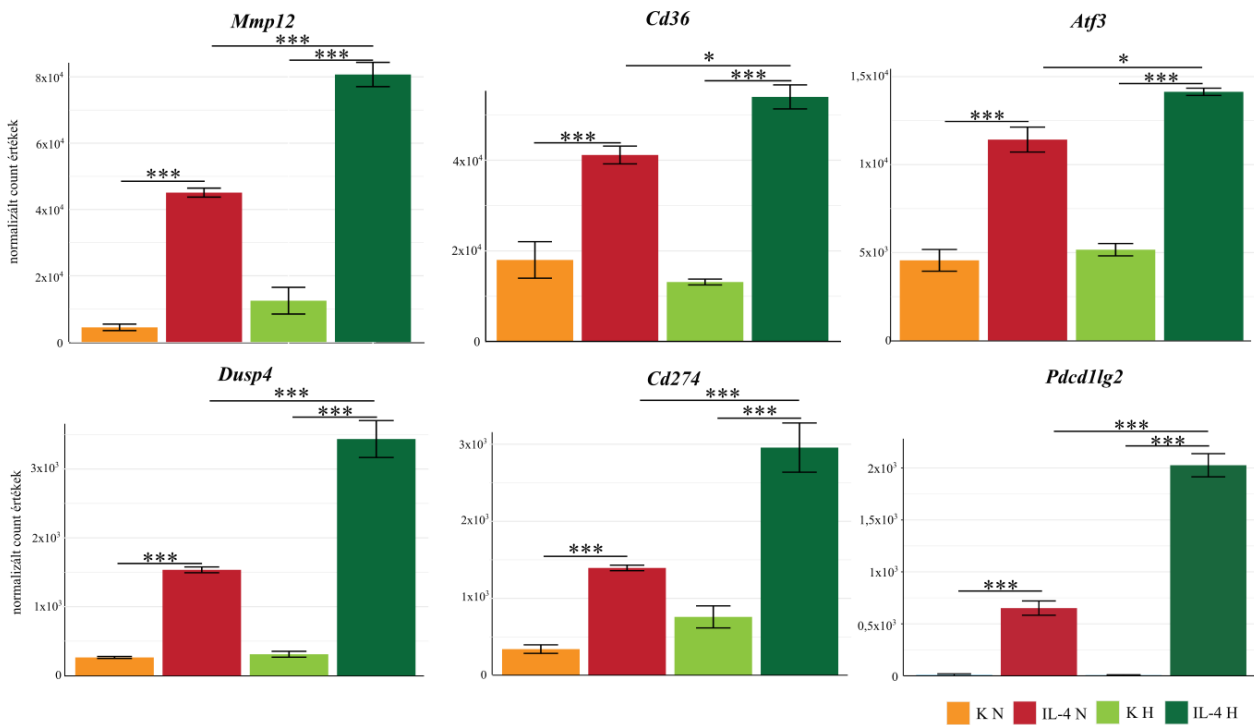
15. ábra: IL-4 / hipoxiás mikrokörnyezet hatása a szinergisztikusan indukálódó génekre.

Ezután megvizsgáltuk, hogy milyen jelátviteli útvonalakban vesznek részt a szinergisztikus aktivációt mutató gének (16.ábra). Ennek során a KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes – Gének és genomok kiotói enciklopédiája) adatbázist használtuk fel⁶⁷. Eredményeink alapján megállapítható, hogy az IL-4 és hipoxia által együttesen indukált gének jelentős része különböző anyagcsere útvonalakban vesz részt, illetve a veleszületett és adaptív immunválasz szabályozásában játszanak szerepet.



16. ábra: KEGG jelátviteli útvonalak.

A korábban bemutatott IL-4 és hipoxia marker gének közül több metabolikus enzimet kódoló is indukálódott szinergisztikusan a kísérleti rendszerünkben, mint a *Glut1*, *Ldha*, *Hk2*, *Arg1*. A 17. ábrán látható néhány további szinergisztikusan indukált gén expressziós szintjének változása, amelyek fontos szerepet játszhatnak a makrofágok funkciójának kialakításában. Ezek az extracelluláris mátrix komponensek emésztésében szerepet játszó *Mmp12*, a makrofágok koleszterol felvételét mediáló *Cd36*, illetve az immunválasz szabályozásában résztvevő fehérjéket kódoló *Atf3*, *Dusp4*, *Cd274*, *Pdcd1lg2* gének^{68–71}.

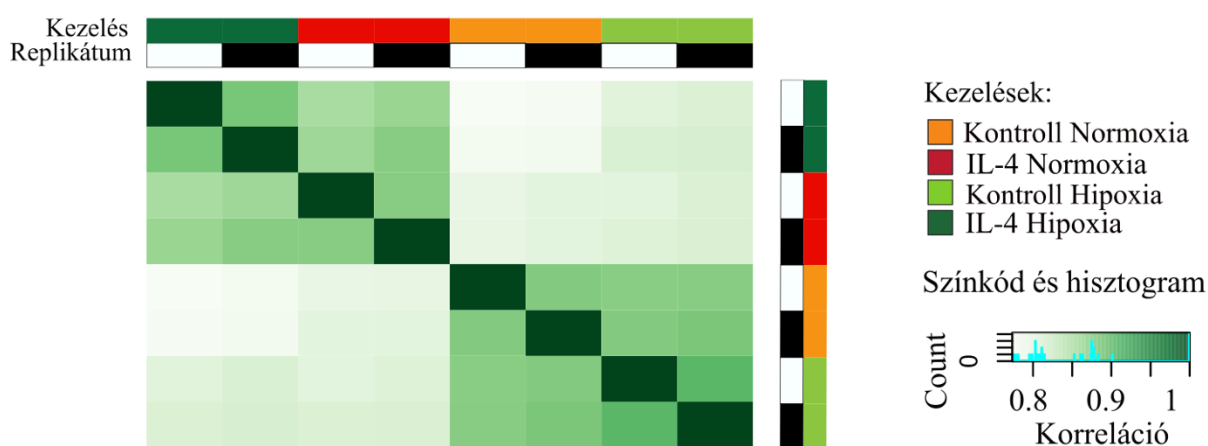


17. ábra: A metabolizmushoz és az immunválasz szabályozásához köthető gének expressziós szintjének változása. Statisztika: Wald-teszt, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Rövidítések: K N – kontroll normoxia, IL-4 N – IL-4 normoxia, K H – kontroll hipoxia, IL-4 H – IL-4 hipoxia

7.2 A hipoxiás mikrokörnyezet és IL-4 indukálta szinergisztikus génaktiváció háttérben álló epigenetikai szabályozó mechanizmusok felderítése

7.2.1 A kromatin hozzáférhetőségének és RNS polimeráz II kötődésének változása a szinergisztikusan indukált gének környezetében

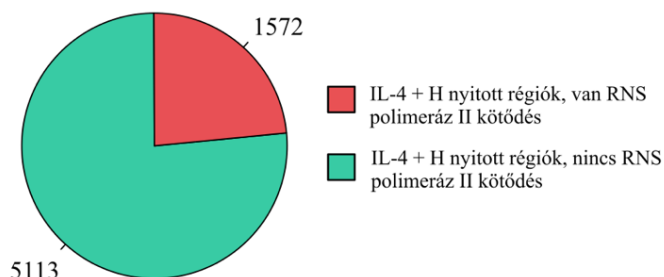
Az IL-4 és a hipoxiás mikrokörnyezet befolyását a kromatin hozzáférhetőségére ATAC-szekvenálási adatok alapján vizsgáltuk. A mérések során minden kezelés esetén kettő biológiai ismétlést alkalmaztunk. Ahhoz, hogy megvizsgáljuk az egyes ismétlések közötti, illetve a különböző minták közötti eltéréseket korrelációs analízist végeztünk a DiffBind szoftver által normalizált értékeken (18. ábra). Az analízisünk alapján biológiai ismétlések jól korrelálnak egymással. Tovább megállapítható, hogy az IL-4 kezelésnek jóval kifejezettebb hatása van a kromatin hozzáférhetőségére, mint a hipoxiának.



18. ábra: Korrelációs hő térkép.

Ezután azonosítani kívántuk az ATAC-szekvenálás eredményei alapján azokat a nyitott kromatin szerkezettel rendelkező szabályozó régiókat, amelyek potenciálisan részt vehetnek a szinergisztikusan aktivált gének szabályozásában. 6685 olyan genomi régiót találtunk, amelyek IL-4 kezelés hatására hipoxiás körülmények között nyitott állapotban vannak és a korábban azonosított szinergisztikusan indukált génekhez annotálhatók. Mivel az RNS polimeráz II kötődése jól korrelál az adott szabályozó régió transzkripciós aktivitási állapotával, ezért RNS polimeráz II-specifikus ChIP-szekvenálás segítségével vizsgáltuk a 6685 nyitott genomi régió IL-4 kezelés és hipoxiás mikrokörnyezet által kiváltott transzkripciós aktivitás változást. 1572 olyan genomi régiót azonosítottunk, ahol detektálható RNS polimeráz II kötődés és átfednek az IL-4 expozíciónak hipoxiában kitett makrofágokban korábban azonosított nyitott régiókkal (19/A ábra).

19/A



19/B

Motívum	TF
1.)	PU.1
log p-érték: -178.1 motívum feldúsulás (%): 44,78 háttér (%): 23,3	
2.)	AP-1
log p-érték: -80.81 motívum feldúsulás (%): 26,72 háttér (%): 14,59	
3.)	PU.1-IRF
log p-érték: -69.60 motívum feldúsulás (%): 15,46 háttér (%): 6,96	
4.)	CEBP
log p-érték: -63.18 motívum feldúsulás (%): 15,84 háttér (%): 7,55	
5.)	KLF15
log p-érték: -34.81 motívum feldúsulás (%): 5,98 háttér (%): 2,34	

19.Ábra: Enhanszer aktiváció vizsgálata a nyitott kromatin régiókon. 19/A) hipoxiás körülmények között nyitott kromatin régiókon megvalósuló RNS polimeráz II kötődés aránya. 19/B) transzkripciós faktor kötő motívumok feldúsulása az RNS polimeráz II kötött régiókon. Rövidítések: IL-4+H – IL + hipoxia, AP-1 – aktivátor protein 1, CEBP – CCAAT/enhanszer-kötő fehérje, KLF-15 – Krüppel-féle faktor 15.

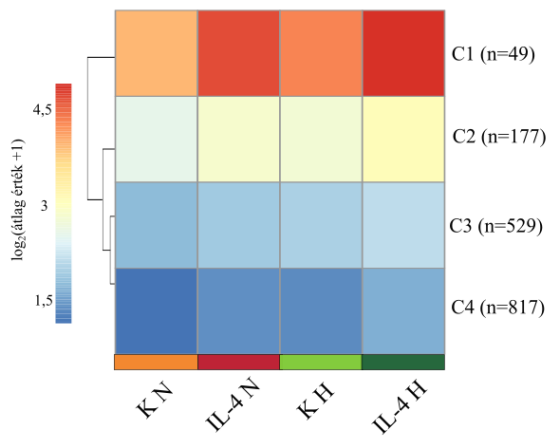
Továbbá megvizsgáltuk, hogy milyen transzkripciós faktor kötő motívumok dúsulnak fel ezen az 1572 régió (19/B ábra). Az azonosított transzkripciós faktorok közül a PU.1, az aktivátor protein 1 (AP-1) és a CCAAT/enhanszer-kötő fehérje (CCAAT/enhancer-binding protein - C/EBP) mester transzkripciós faktorok, amelyek más szabályozó fehérjékkel együttműködve fontos szerepet töltenek be a mieloid sejtek differenciációjában és a makrofág specifikus génszabályozás fenntartásában⁷². A PU.1 interferon reguláló faktorokkal (interferon regulatory factor – IRF) együttműködve részt vesz a gyulladásos válasz szabályozásában⁷³. A Krüppel-féle faktor 15 (KLF-15) képes gátolni a makrofágok - oxidált alacsony denzitású lipoprotein receptor 1 (oxidized low-density lipoprotein receptor – 1) által mediált - LDL felvételét, ezáltal csökkenteni az érlelmeszesedést jellemző plakkok környezetében a habos sejt képzés mértékét⁷⁴.

7.2.2 RNS polimeráz II kötődésének változása a IL-4 stimulusnak hipoxiás mikrokörnyezetben kitett makrofágokban azonosított nyitott genomi régiókon

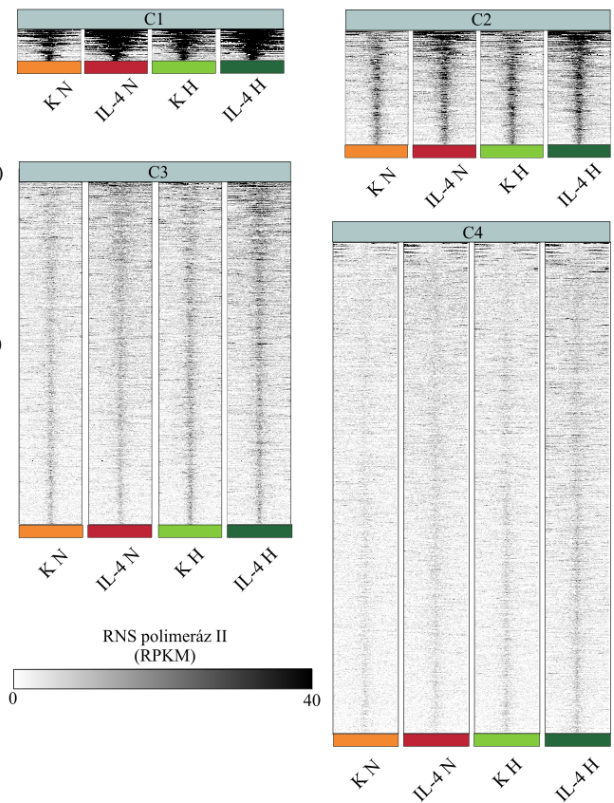
A továbbiakban csoportosítottuk ezt az 1572 régiót aszerint, hogy hogyan változik rajtuk az RNS polimeráz II kötődése. Ez alapján négy csoport különíthető el, amelyek mindegyikében fokozódó RNS polimeráz II kötődés figyelhető meg hipoxiás körülmények

között IL-4 kezelt mintákban a kontrollhoz képest (20/A. ábra). Az egyes csoportokba tartozó régiókon megvizsgáltuk a ChIP-szekvenálási "read-ek" megoszlásának változását a különböző kondíciókban és kimutattuk, hogy fokozott RNS polimeráz II kötődés figyelhető meg az alap kifejeződéshez képest (20/B. ábra). Illetve a normalizált leolvasási értékek átlagának változását vizsgálva is kimutatható a szinergisztikus polimeráz kötődés indukció (20/C. ábra). Mindezen eredményeink azt mutatják, hogy az azonosított 1572 genomi szabályozó régió, valamint ezeknek az IL-4 és hipoxia által történő szinergisztikus aktivációja, ténylegesen hozzájárul az RNS-szekvenáláson alapuló vizsgálataink során megfigyelt szinergisztikusan indukált mRNS kifejeződési mintázathoz.

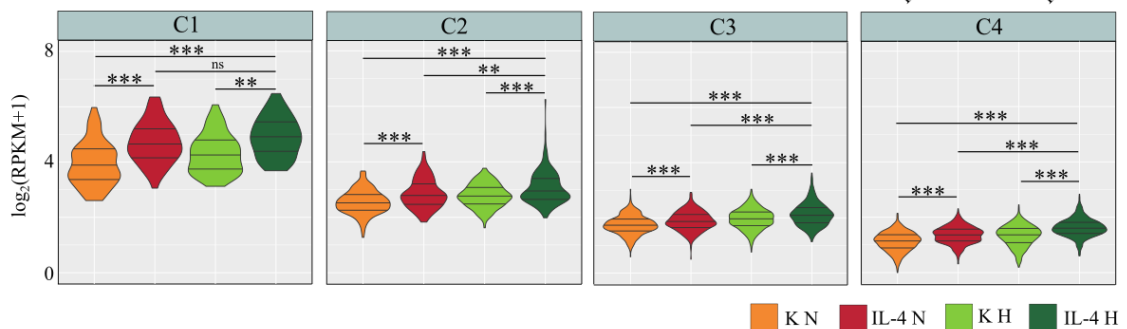
20/A



20/B



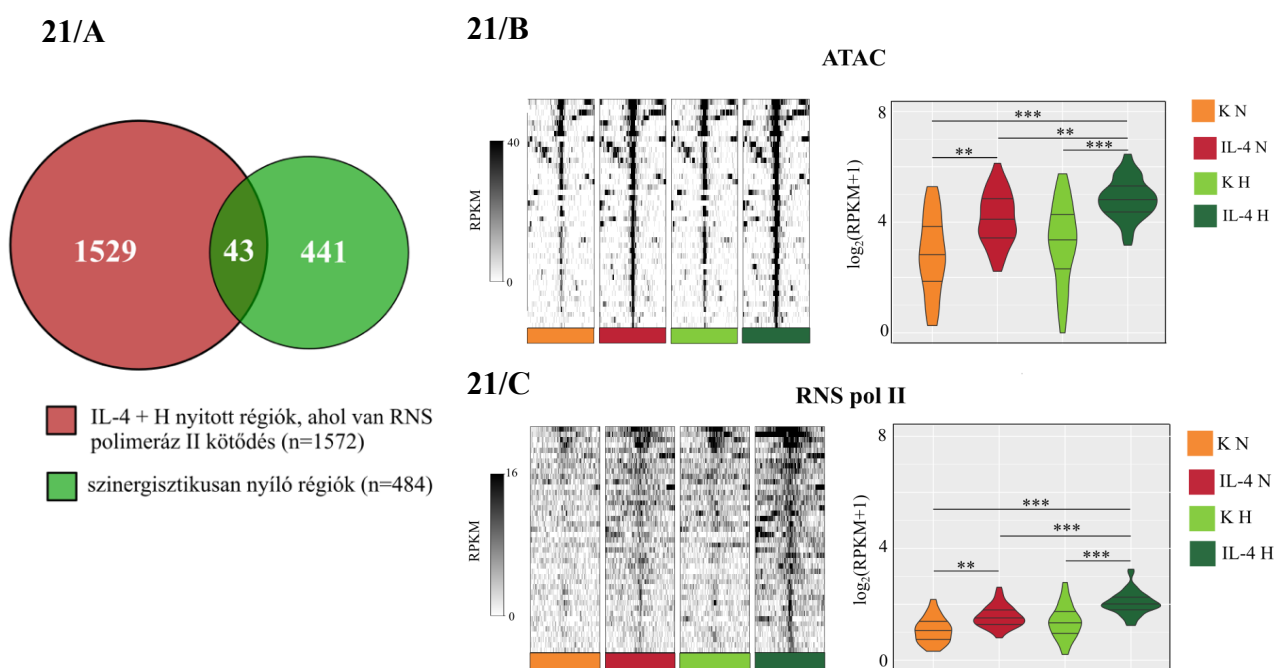
20/C



20. Ábra: Szinergisztikusan indukált génekhez annotálható nyitott kromatin régiókon történő RNS polimeráz II kötődés változásának vizsgálata. Statisztika: ANOVA, Tukey-teszt, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Rövidítések: K N – kontroll normoxia, IL-4 N – IL-4 normoxia, K H – kontroll hipoxia, IL-4 H – IL-4 hipoxia.

7.2.3 RNS polimeráz II kötődésének változása a szinergisztikusan nyíló régiókon

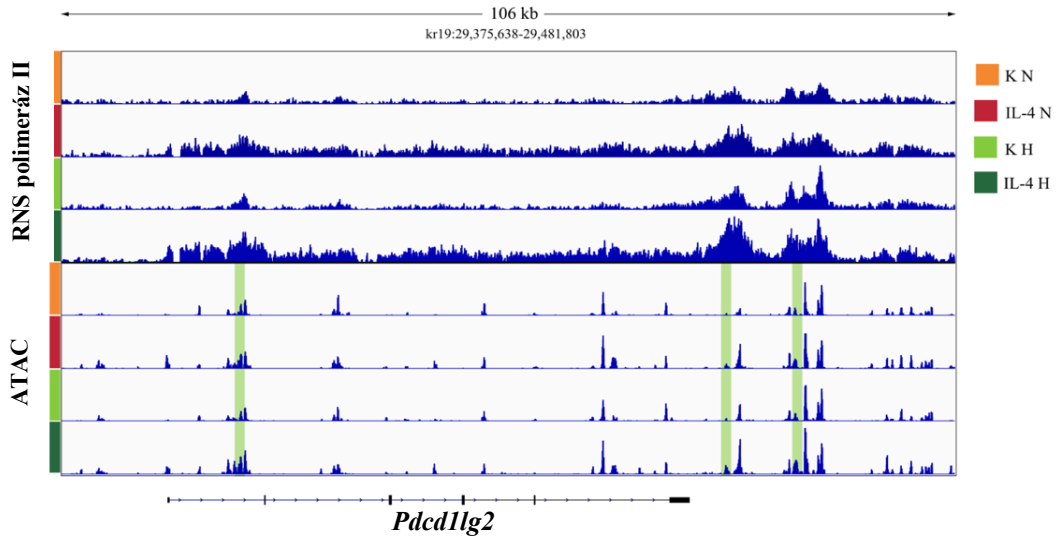
Ezt követően arra voltunk kíváncsiak, hogy a szinergisztikusan indukált RNS polimeráz II kötődés együtt jár-e hipoxia és/vagy IL-4 által kiváltott kromatin nyitottságban megfigyelhető változásokkal. 484 régiót azonosítottunk, ahol a hipoxia szignifikánsan (p érték <0.1) fokozta az IL-4 kromatint nyitó hatását. Ezek közül 43 régió fed át azokkal az IL-4 - hipoxiában nyitott régiókkal, melyeken fokozott RNS polimeráz II kötődést mutattunk ki (21. ábra). Ezeken a régiókon az IL-4 és hipoxia indukálta szinergisztikus RNS polimeráz II kötődés szinergisztikusan indukált kromatin nyitással jár együtt (21/B-C ábra). A fennmaradó 1529 régió esetében, a szinergisztikusan indukált RNS polimeráz II kötődés nem jár szinergisztikusan fokozott kromatin hozzáférhetőséggel.



21. Ábra: Az RNS polimeráz II kötött és szinergisztikusan nyíló régiók közötti átfedések. 21/B Kromatin hozzáférhetőségének változása leolvasás eloszlási, illetve átlag normalizált expressziós értékek alapján. 21/C Szinergisztikusan nyíló régiókon az RNS polimeráz II kötődése. Statisztika: ANOVA, Tukey-teszt, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$. Rövidítés: IL-4 + H – IL-4 hipoxia.

A továbbiakban két, a kísérleti rendszerünkben szinergisztikusan indukálódó gén lókuszában vizsgáltuk az ATAC- és ChIP-szekvenálási leolvasások lefedettségét IGV segítségével. A *Pdcd1lg2* gén – amely a negatív immunszabályozásban szerepet játszó PD-L2 fehérjét kódolja – az RNS-szekvenálási adatok alapján szinergisztikusan indukálódik a kísérleti rendszerünkben. Ahhoz, hogy megvizsgáljuk ennek a folyamatnak a háttérben álló epigenetikai változásokat a *Pdcd1lg2* lókuszt tanulmányoztuk. ATAC-szekvenálási eredményeink azt mutatják, hogy a kromatin hozzáférhetősége fokozódik a gén környezetében található számos enhanszer

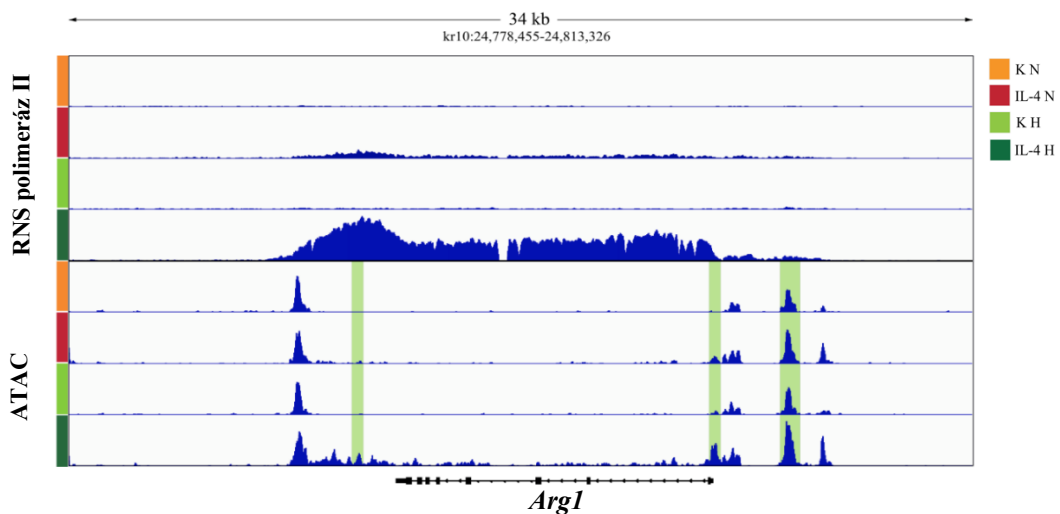
régiójában hipoxiás körülmények között a normoxiás IL-4 kezeléshez képest. Továbbá az RNS polimeráz II kötődés is hasonló tendenciát mutat ezen régiók környezetében (22. ábra).



22. Ábra: A *Pcd11g2* gén lókuszában bekövetkező fokozott kromatin nyitás és enhanszer aktiváció.

Rövidítések: K N – kontroll normoxia, IL-4 N – IL-4 normoxia, K H – kontroll hipoxia, IL-4 H – IL-4

Az Argináz 1 az alternatívan polarizált makrofágokban magas szinten termelt fehérje. Az *Arg1* gén szinergisztikus aktivációját a korábbiakban kimutattuk a kísérleti rendszerünkben. ATAC-szekvenálási eredményeink azt mutatják, hogy a kromatin hozzáférhetősége fokozódik a gén környezetében található számos enhanszer régiójában IL-4 kezelés hatására hipoxiás körülmények között a normoxiás kezeléshez képest. Továbbá az RNS polimeráz II kötődés is hasonló tendenciát mutat ezen régiók környezetében (23. ábra). Összességében eredményeink azt mutatják, hogy mind a *Pcd11g2*, mind az *Arg1* gének IL-4 kezelés és hipoxiás mikrokörnyezet hatására megfigyelhető szinergisztikus indukciója együtt jár a kromatin szerkezet átalakulásával és fokozott RNS polimeráz II kötődéssel.



23. Ábra: *Arg1* gén lókuszában bekövetkező fokozott kromatin nyitás és enhanszer aktiváció.

Rövidítések: K N – kontroll normoxia, IL-4 N – IL-4 normoxia, K H – kontroll hipoxia, IL-4 H – IL-4 hipoxia.

8. Összefoglalás

A makrofágok rendkívül sokszínű funkcionalitással rendelkező immunsejtek. A mikrokörnyezetben jelenlévő egyes molekulákra és ezek különböző kombinációira gyorsan képesek reagálni a transzkripciós programjuk megváltoztatásával. Ez az adaptációs képesség rendkívül fontos, hogy a változó körülményekhez képesek legyenek folyamatosan alkalmazkodni. A makrofágok aktivációja során megtörténik a mikrokörnyezeti körülményeknek megfelelő polarizációjuk, amely eltérő fenotípussal rendelkező makrofág populációkat eredményezhet. Ennek a spektrumnak két végpontja ismert. Az LPS/IFN γ által indukált klasszikusan polarizált, illetve az IL-4/IL-13 által indukált alternatívan polarizált fenotípus. A makrofágok azon képessége, hogy transzkripciós programjuk megváltoztatásával váltani képesek a különböző polarizációs állapotok között meghatározhatja számos kórfolyamat kimenetelét^{17,75}.

Az alternatív makrofág polarizáció számos esetben hipoxiás körülmények között megy végbe, ami módosíthatja a fenotípusukat, funkcióikat. Ilyen patológiás folyamatok például az allergiás asztma, az érlemeszesedés, illetve a daganatok⁵⁰⁻⁵². Azonban hipoxia hatása az IL-4 indukált polarizáció transzkriptómjára kevésbé ismert.

Kutatásunk fókuszában az állt, hogy megvizsgáljuk hogyan hat az egér csontvelő eredetű makrofágok génkifejeződésére az alternatív polarizációs szignál, illetve a hipoxiás mikrokörnyezet együttes jelenléte. Ennek felderítése érdekében új generációs szekvenálás alapú módszerekkel vizsgáltuk a transzkripciós és epigenetikai programban bekövetkező változásokat.

RNS-szekvenálási eredményeink alapján 3600 differenciáltan expresszáldó gént azonosítottunk, amelyek többségében az IL-4 génkifejeződésre gyakorolt hatását a hipoxiás mikrokörnyezet nem befolyásolta szignifikánsan. Az alternatív polarizációs szignál által indukált gének csoportját vizsgálva azonosítottunk 377 olyan gént, melyek IL-4 válaszkészségét a hipoxiás mikrokörnyezet tovább fokozta. Ezen szinergisztikusan indukált gének közel 60%-ának kifejeződését a hipoxia önmagában nem befolyásolja. Ezek közül az egyik az aktivált transzkripciós faktor 3 (*Atf3*) gén, amelyről átíró fehérje transzkripciós modulátorként szerepet játszik pro-inflammatórikus citokinek kifejeződésének gátlásában⁷¹.

A kísérleti rendszerünkben szinergisztikusan indukálódó gén a mátrix metallopeptidáz 12 (*Mmp12*) fontos szerepet játszik a COPD súlyosabb prognózisában, mivel a tüdőben található makrofágok magas *Mmp12* expressziója hozzájárulhat a légutak egyik komponensének az elasztinnak a lebontásához, ezáltal pedig a betegség súlyosbodásához⁶⁹.

A szinergisztikusan indukálódó gének útvonal analízise alapján azonosítottunk olyan géneket, amelyek a szénhidrát anyagcserében, és főként a glikolízisben szerepet játszó fehérjéket kódolják. A glikolízis intenzitása a makrofágok hipoxiás mikrokörnyezethez való adaptációjának részeként fokozódó metabolikus útvonal. Emellett a koleszterol metabolizmusban szerepet játszó géneket is azonosítottunk, mint a *Cd36*, amelyről átíródó fehérje a makrofágok oxidált LDL felvételét elősegítő scavenger receptor⁶⁸. Az intenzív koleszterol lebontás következtében a makrofágokból habos sejtek képződhetnek, amelyek az érlelmeszesedés folyamatában játszanak szerepet. Febbrario és munkatársai egér makrofágokon végzett kísérleteikkel kimutatták, hogy a *Cd36* gén kiütése alacsonyabb mértékű habos sejt képződést eredményez *in vitro*, emiatt pedig egy fontos terápiás target gén lehet az érlelmeszesedés kezelésében⁷⁶. Emellett számos immunregulációban résztvevő gént azonosítottunk, amelyek IL-4 válaszkészségét a hipoxiás mikrokörnyezet tovább fokozta. A mitogén-aktivált proteinkináz szignalizáció (mitogen-activated kinase signaling – MAPK) modulálásában résztvevő kettős specificitású foszfatázok (dual-specificity phosphatase - Dusp) – képesek tumorigenezist elősegítő makrofág populációkat létrehozni⁷⁷. Ezen fehérjéket kódoló gének közül a *Dusp4* indukálódott szinergisztikusan a kísérleti rendszerünkben. Továbbá azonosítottunk olyan szinergisztikusan indukálódó géneket, amelyek az immunválasz negatív szabályozásában szerepet játszó PD-L1 szignalizációs útvonalban vesznek részt. Mint a *Cd274*, ami a programozott sejthalál fehérje 1 (programmed cell death protein 1 – PD-1) receptor ligandját, a PD-L1 fehérjét kódolja. Amely molekula a T-sejtek PD-1 receptorához kötődve képes gátolni az aktivitásukat⁷⁰. Ezen fehérje termelése által a makrofágok hozzájárulhatnak a tolerogén válasz kialakításához, amely azonban a daganatos elváltozások súlyosbodását eredményezheti.

A kromatin hozzáférhetőségének és az RNS polimeráz II kötődésének változását a kísérleti rendszerünkben ATAC-, illetve ChIP-szekvenálási adatok alapján vizsgáltuk. Ennek során azonosítottunk 1572 régiót, amelyek IL-4 kezelés hatására hipoxiás körülmények között nyitott állapotban vannak, szinergisztikusan indukált génekhez annotálhatók és kimutatható rajtuk az RNS polimeráz II kötődés változása. Ezeken a régiókon a 4 mester transzkripció faktor kötő motívum feldúsulását azonosítottuk. A PU.1, AP-1, C/EBP és az IRF egymással és más szabályozó fehérjékkel együttműködve képesek kapcsolódni a DNS-en található felismerő motívumokhoz és előkészíteni a szignál-függő transzkripció faktorok kötődését, mint az IL-4 által indukált jelátviteli folyamatokban résztvevő STAT6⁷³.

A hipoxiás mikrokörnyezet IL-4 indukált kromatin nyitásra gyakorolt hatását is tanulmányoztuk. 484 régiót azonosítottunk, ahol az általunk vizsgált két szignál egymás hatását

erősítve járult hozzá a kromatin hozzáférhetőségéhez. Ezek közül 43 régió fed át azokkal az IL-4 - hipoxiában nyitott régiókkal, melyeken fokozott RNS polimeráz II kötődést mutattunk ki. Ennek háttérében állhat az, hogy számos olyan IL-4 + hipoxia által indukált gén van, amelyek szinergisztikus indukciójához nem szükséges szinergisztikus kromatin nyitás. Illetve van több olyan kromatin régió, ahol megtörténik a nyitás, de nincs szinergisztikus génindukció.

Eredményeink arra engednek következtetni, hogy a hipoxiás mikrokörnyezet képes módosítani az IL-4 indukált alternatív polarizációs programot a transzkripció szintjén. Ezen két szignál kölcsönhatása képes számos szénhidrátanyagcserében, illetve immunregulációban szerepet játszó gén kifejeződését indukálni, amely folyamat háttérében részben fokozódó RNS polimeráz II kötődés áll. Mindazonáltal további vizsgálatok szükségesek annak megállapításához, hogy ezen szignálok kölcsönhatása milyen szerepet játszik a makrofágok fenotípusának kialakításában különböző alternatív makrofág polarizációval és hipoxiás szöveti mikrokörnyezettel együtt járó kórképekben.

9. Irodalomjegyzék

1. Marti Â N-Orozco, N. *Macrophages Present Exogenous Antigens by Class I Major Histocompatibility Complex Molecules via a Secretory Pathway as a Consequence of Interferon- γ Activation.* (2001).
2. Okabe, Y. & Medzhitov, R. Tissue biology perspective on macrophages. *Nature Immunology* vol. 17 9–17 Preprint at <https://doi.org/10.1038/ni.3320> (2016).
3. Sreejit, G., Fleetwood, A. J., Murphy, A. J. & Nagareddy, P. R. Origins and diversity of macrophages in health and disease. *Clinical and Translational Immunology* vol. 9 Preprint at <https://doi.org/10.1002/cti2.1222> (2020).
4. Wynn, T. A., Chawla, A. & Pollard, J. W. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature* vol. 496 445–455 Preprint at <https://doi.org/10.1038/nature12034> (2013).
5. Pollard, J. W. Trophic macrophages in development and disease. *Nature Reviews Immunology* vol. 9 259–270 Preprint at <https://doi.org/10.1038/nri2528> (2009).
6. Gordon, S., Plüddemann, A. & Martinez Estrada, F. Macrophage heterogeneity in tissues: Phenotypic diversity and functions. *Immunol Rev* **262**, 36–55 (2014).
7. Lavin, Y. *et al.* Tissue-resident macrophage enhancer landscapes are shaped by the local microenvironment. *Cell* **159**, 1312–1326 (2014).
8. Sica, A., Erreni, M., Allavena, P. & Porta, C. Macrophage polarization in pathology. *Cellular and Molecular Life Sciences* vol. 72 4111–4126 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s00018-015-1995-y> (2015).
9. Stout, R. D. & Suttles, J. Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments. *J Leukoc Biol* **76**, 509–513 (2004).
10. Murray, P. J. *et al.* Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines. *Immunity* vol. 41 14–20 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.06.008> (2014).
11. Tang, X., Metzger, D., Leeman, S. & Amar, S. *LPS-Induced TNF-Factor (LITAF)-Deficient Mice Express Reduced LPS-Induced Cytokine: Evidence for LITAF-Dependent LPS Signaling Pathways.* www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0605988103 (2006).
12. Stein, M., Keshav, S., Harris, N. & Gordon, S. *Interleukin 4 Potently Enhances Murine Macrophage Mannose Receptor Activity: A Marker of Alternative Immunologic Macrophage Activation.* <http://rupress.org/jem/article-pdf/176/1/287/1673208/287.pdf> (1992).
13. Nathan, C. F., Murray, H. W., Wlebe, I. E. & Rubin, B. Y. *IDENTIFICATION OF INTERFERON-3, AS THE LYMPHOKINE THAT ACTIVATES HUMAN MACROPHAGE OXIDATIVE METABOLISM AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY**. <http://rupress.org/jem/article-pdf/158/3/670/1664323/670.pdf> (1983).
14. Edwards, J. P., Zhang, X., Frauwirth, K. A. & Mosser, D. M. Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations. *J Leukoc Biol* **80**, 1298–1307 (2006).
15. Mosser, D. M. & Edwards, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Reviews Immunology* vol. 8 958–969 Preprint at <https://doi.org/10.1038/nri2448> (2008).
16. Anthony, R. M. *et al.* Memory TH2 cells induce alternatively activated macrophages to mediate protection against nematode parasites. *Nat Med* **12**, 955–960 (2006).
17. Liu, S. X., Gustafson, H. H., Jackson, D. L., Pun, S. H. & Trapnell, C. Trajectory analysis quantifies transcriptional plasticity during macrophage polarization. *Sci Rep* **10**, (2020).
18. Cornice, J. *et al.* NF- κ B: Governing Macrophages in Cancer. *Genes (Basel)* **15**, 197 (2024).
19. Moore, K. J., Sheedy, F. J. & Fisher, E. A. Macrophages in atherosclerosis: A dynamic balance. *Nature Reviews Immunology* vol. 13 709–721 Preprint at <https://doi.org/10.1038/nri3520> (2013).
20. Chinetti-Gbaguidi, G. *et al.* Human atherosclerotic plaque alternative macrophages display low cholesterol handling but high phagocytosis because of distinct activities of the PPAR γ and LXRA pathways. *Circ Res* **108**, 985–995 (2011).
21. Schultze, J. L., Schmieder, A. & Goerdts, S. Macrophage activation in human diseases. *Semin Immunol* **27**, 249–256 (2015).
22. Britt, R. D., Ruwanpathirana, A., Ford, M. L. & Lewis, B. W. Macrophages Orchestrate Airway Inflammation, Remodeling, and Resolution in Asthma. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 24 Preprint at <https://doi.org/10.3390/ijms241310451> (2023).
23. Kuznetsova, T., Prange, K. H. M., Glass, C. K. & de Winther, M. P. J. Transcriptional and epigenetic regulation of macrophages in atherosclerosis. *Nature Reviews Cardiology* vol. 17 216–228 Preprint at <https://doi.org/10.1038/s41569-019-0265-3> (2020).
24. Crusio, W. E., Dong, H. & Radeke, H. H. *Histone Mutations and Cancer. Advances in Experimental Medicine and Biology. Advances in Experimental Medicine and Biology* <http://www.springer.com/series/5584> (2021).
25. Kouzarides, T. Chromatin Modifications and Their Function. *Cell* vol. 128 693–705 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.02.005> (2007).

26. Kuznetsova, T., Prange, K. H. M., Glass, C. K. & de Winther, M. P. J. Transcriptional and epigenetic regulation of macrophages in atherosclerosis. *Nature Reviews Cardiology* vol. 17 216–228 Preprint at <https://doi.org/10.1038/s41569-019-0265-3> (2020).
27. Glass, C. K. & Natoli, G. Molecular control of activation and priming in macrophages. *Nature Immunology* vol. 17 26–33 Preprint at <https://doi.org/10.1038/ni.3306> (2016).
28. Heinz, S. *et al.* Simple Combinations of Lineage-Determining Transcription Factors Prime cis-Regulatory Elements Required for Macrophage and B Cell Identities. *Mol Cell* **38**, 576–589 (2010).
29. Heller, N. M. *et al.* *IMMUNOLOG Y Type I IL-4Rs Selectively Activate IRS-2 to Induce Target Gene Expression in Macrophages*. www.SCIENCESIGNALING.org (2008).
30. Czimmerer, Z. *et al.* The Transcription Factor STAT6 Mediates Direct Repression of Inflammatory Enhancers and Limits Activation of Alternatively Polarized Macrophages. *Immunity* **48**, 75–90.e6 (2018).
31. Daniel, B. *et al.* The transcription factor EGR2 is the molecular linchpin connecting STAT6 activation to the late, stable epigenomic program of alternative macrophage polarization. *Genes Dev* **34**, 1474–1492 (2020).
32. Odegaard, J. I. *et al.* Macrophage-specific PPAR γ controls alternative activation and improves insulin resistance. *Nature* **447**, 1116–1120 (2007).
33. Satoh, T. *et al.* The Jmjd3-Irf4 axis regulates M2 macrophage polarization and host responses against helminth infection. *Nat Immunol* **11**, 936–944 (2010).
34. Liao, X. *et al.* Krüppel-like factor 4 regulates macrophage polarization. *Journal of Clinical Investigation* **121**, 2736–2749 (2011).
35. Mills, E. L. & O'Neill, L. A. Reprogramming mitochondrial metabolism in macrophages as an anti-inflammatory signal. *Eur J Immunol* **46**, 13–21 (2016).
36. Vats, D. *et al.* Oxidative metabolism and PGC-1 β attenuate macrophage-mediated inflammation. *Cell Metab* **4**, 13–24 (2006).
37. Riboldi, E. *et al.* Hypoxia-mediated regulation of macrophage functions in pathophysiology. *Int Immunol* **25**, 67–75 (2013).
38. Hu, C.-J., Sataur, A., Wang, L., Chen, H. & Simon, M. C. The N-Terminal Transactivation Domain Confers Target Gene Specificity of Hypoxia-inducible Factors HIF-1 and HIF-2 □ D. *Mol Biol Cell* **18**, 4528–4542 (2007).
39. Halligan, D. N., Murphy, S. J. E. & Taylor, C. T. The hypoxia-inducible factor (HIF) couples immunity with metabolism. *Seminars in Immunology* vol. 28 469–477 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.smim.2016.09.004> (2016).
40. Ebert, B. L., Firth, J. D. & Ratcliffe, P. J. Hypoxia and mitochondrial inhibitors regulate expression of glucose transporter-1 via distinct cis-acting sequences. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 29083–29089 (1995).
41. Nicholas C. Denko. Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour. *Nat Rev Cancer* 705–713 (2008).
42. Kim, J. W., Tchernyshyov, I., Semenza, G. L. & Dang, C. V. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: A metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab* **3**, 177–185 (2006).
43. Chan, S. Y. *et al.* MicroRNA-210 Controls Mitochondrial Metabolism during Hypoxia by Repressing the Iron-Sulfur Cluster Assembly Proteins ISCU1/2. *Cell Metab* **10**, 273–284 (2009).
44. Acosta-Iborra, B. *et al.* Macrophage Oxygen Sensing Modulates Antigen Presentation and Phagocytic Functions Involving IFN- γ Production through the HIF-1 α Transcription Factor. *The Journal of Immunology* **182**, 3155–3164 (2009).
45. Wolf, A. J. *et al.* Hexokinase Is an Innate Immune Receptor for the Detection of Bacterial Peptidoglycan. *Cell* **166**, 624–636 (2016).
46. Millet, P., Vachharajani, V., McPhail, L., Yoza, B. & McCall, C. E. GAPDH Binding to TNF- α mRNA Contributes to Posttranscriptional Repression in Monocytes: A Novel Mechanism of Communication between Inflammation and Metabolism. *The Journal of Immunology* **196**, 2541–2551 (2016).
47. Shi, W., Cassmann, T. J., Bhagwate, A. V., Hitosugi, T. & Ip, W. K. E. Lactic acid induces transcriptional repression of macrophage inflammatory response via histone acetylation. *Cell Rep* **43**, (2024).
48. Somasundaram, V. *et al.* Inducible nitric oxide synthase-derived extracellular nitric oxide flux regulates proinflammatory responses at the single cell level. *Redox Biol* **28**, (2020).
49. Rodriguez, P. C., Ochoa, A. C. & Al-Khami, A. A. Arginine metabolism in myeloid cells shapes innate and adaptive immunity. *Frontiers in Immunology* vol. 8 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00093> (2017).
50. Byers, D. E. & Holtzman, M. J. Alternatively activated macrophages and airway disease. *Chest* vol. 140 768–774 Preprint at <https://doi.org/10.1378/chest.10-2132> (2011).

51. Chinetti-Gbaguidi, G. *et al.* Human atherosclerotic plaque alternative macrophages display low cholesterol handling but high phagocytosis because of distinct activities of the PPAR γ and LXR α pathways. *Circ Res* **108**, 985–995 (2011).
52. Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P. & Sica, A. *Macrophage Polarization: Tumor-Associated Macrophages as a Paradigm for Polarized M2 Mononuclear Phagocytes*. *TRENDS in Immunology* vol. 23 [http://immunology.trends.com/1471-4906/02/\\$-see-frontmatter](http://immunology.trends.com/1471-4906/02/$-see-frontmatter) (2002).
53. Dennis, G. *et al.* DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome Biology* vol. 4 <http://genomebiology.com/2003/4/5/P3><http://genomebiology.com/2003/4/9/R60> (2003).
54. Kim, D., Langmead, B. & Salzberg, S. L. HISAT: A fast spliced aligner with low memory requirements. *Nat Methods* **12**, 357–360 (2015).
55. Liao, Y., Smyth, G. K. & Shi, W. FeatureCounts: An efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics* **30**, 923–930 (2014).
56. Love, M. I., Huber, W. & Anders, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* **15**, (2014).
57. Li, H. & Durbin, R. Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* **26**, 589–595 (2010).
58. Zhang, Y. *et al.* Model-based analysis of ChIP-Seq (MACS). *Genome Biol* **9**, (2008).
59. Stark, R. & Brown, G. DiffBind: Differential Binding Analysis of ChIP-Seq Peak Data.
60. Ramírez, F. *et al.* deepTools2: a next generation web server for deep-sequencing data analysis. *Nucleic Acids Res* **44**, W160–W165 (2016).
61. Heinz, S. *et al.* Simple Combinations of Lineage-Determining Transcription Factors Prime cis-Regulatory Elements Required for Macrophage and B Cell Identities. *Mol Cell* **38**, 576–589 (2010).
62. Robinson, J. T. *et al.* Integrative Genomics Viewer. *Nature Publishing Group* <http://maq.sourceforge.net/> (2011) doi:10.1038/nbt0111-24.
63. Kang, Q., Li, L., Pang, Y., Zhu, W. & Meng, L. An update on Ym1 and its immunoregulatory role in diseases. *Frontiers in Immunology* vol. 13 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.891220> (2022).
64. Roszer, T. Understanding the mysterious M2 macrophage through activation markers and effector mechanisms. *Mediators of Inflammation* vol. 2015 Preprint at <https://doi.org/10.1155/2015/816460> (2015).
65. Ivashkiv, L. B. The hypoxia–lactate axis tempers inflammation. *Nat Rev Immunol* **20**, 85–86 (2020).
66. Xiong, M., Elson, G., Legarda, D., Leibovich, S. J. & Leibovich, S. J. *Production of Vascular Endothelial Growth Factor by Murine Macrophages Regulation by Hypoxia, Lactate, and the Inducible Nitric Oxide Synthase Pathway*. *American Journal of Pathology* vol. 153 (1998).
67. Kanehisa, M. & Goto, S. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Research* vol. 28 <http://www.genome.ad.jp/kegg/> (2000).
68. Febbraio, M. *et al.* A Null Mutation in Murine CD36 Reveals an Important Role in Fatty Acid and Lipoprotein Metabolism*. <http://www.jbc.org> (1999).
69. Lagente, V., Le Quement, C. & Boichot, E. Macrophage metalloelastase (MMP-12) as a target for inflammatory respiratory diseases. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* vol. 13 287–295 Preprint at <https://doi.org/10.1517/14728220902751632> (2009).
70. Latchman, Y. E. *et al.* PD-L1-Deficient Mice Show That PD-L1 on T Cells, Antigen-Presenting Cells, and Host Tissues Negatively Regulates T Cells. www.iacuc.org (2004).
71. De Nardo, D. *et al.* High-density lipoprotein mediates anti-inflammatory reprogramming of macrophages via the transcriptional regulator ATF3. *Nat Immunol* **15**, 152–160 (2014).
72. Natoli, G. Maintaining cell identity through global control of genomic organization. *Immunity* vol. 33 12–24 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.07.006> (2010).
73. Glass, C. K. & Natoli, G. Molecular control of activation and priming in macrophages. *Nature Immunology* vol. 17 26–33 Preprint at <https://doi.org/10.1038/ni.3306> (2016).
74. Zheng-Kun Songa, Li Zhao & De-Shen Liu. Macrophage KLF15 prevents foam cell formation and atherosclerosis via transcriptional suppression of OLR-1. *J Mol Cell Cardiol* doi:<https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2023.11.006>.
75. Stout, R. D. & Suttles, J. Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments. *J Leukoc Biol* **76**, 509–513 (2004).
76. Febbraio, M. *et al.* Targeted disruption of the class B, scavenger receptor CD36 protects against atherosclerotic lesion development in mice. *Journal of Clinical Investigation* **105**, 1049–1056 (2000).
77. Patysheva, M. R., Prostakishina, E. A., Budnitskaya, A. A., Bragina, O. D. & Kzhyshkowska, J. G. Dual-Specificity Phosphatases in Regulation of Tumor-Associated Macrophage Activity. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 24 Preprint at <https://doi.org/10.3390/ijms242417542> (2023).

10. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Czimmerer Zsoltnak, hogy lehetőséget biztosított munkám sikeres elvégzéséhez és hogy szakértelmével, útmutatásával hozzájárult dolgozatom elkészítéséhez. Továbbá szeretném megköszönni Dr. Varga Zsófiának és Váradi Eszter Annának, akikhez szintén fordulhattam, ha tanácsra volt szükségem.

Mindemellett szeretném megköszönni a Makrofág Polarizáció Csoport többi tagjának, Benyhe-Kis Bernadettnek és Izsán Antalnak, akikhez nyugodtan fordulhattam segítségért.

11. Nyilatkozat

TÉTELES SZERZŐI HOZZÁJÁRULÁS

Alulírott Poscher Anna Zsófia nyilatkozom, hogy a 37. OTDK-ra benyújtott „Az IL-4 és a hipoxiás mikrokörnyezet együttes hatása a makrofágok transzkripció és epigenetikai programjára” című pályamunkámban leírtak esetében az alábbi munkafolyamatok elvégzésében vettem részt:

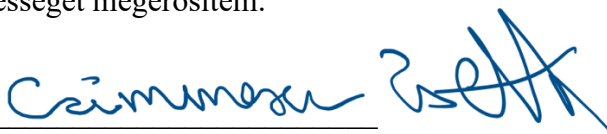
Részfeladat	A részvétel mértéke (ötfokozatú skálán jellemezve)
<i>RNS-szekvenálási leolvasások minőségének ellenőrzése, illesztés referencia genomra, leolvasások kvantifikálása, differenciáltan expresszáldó gének azonosítása, útvonal analízis</i>	5
<i>ATAC-szekvenálási leolvasások minőségének ellenőrzése, illesztés referencia genomra, csúcsok azonosítása, differenciáltan nyíló régiók azonosítása</i>	5
<i>ChIP-szekvenálási leolvasások minőségének ellenőrzése, illesztés referencia genomra, csúcsok azonosítása</i>	5
<i>De novo motívum analízis, példagének lokuszának vizsgálata</i>	5
<i>Adatok statisztikai feldolgozása</i>	5

Kelt: Szeged, 2024. 04. 12.



Pályamunkát benyújtó hallgató (név)
aláírása

A nyilatkozatban foglaltak helyességét megerősítem:



Témavezető (név, munkahely)
aláírása