

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**Az apoptotikus és nekrotikus sejtek makrofágok általi
eltakarításának és a transzglutamináz 2 vázizom nekrozist
követő regenerációban betöltött szerepének vizsgálata**

Budai Zsófia

Témavezető: Dr. Sarang Zsolt



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS SEJT- ÉS IMMUNBIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2020

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	5
1 BEVEZETÉS.....	8
1.1 A sejthalál típusai	8
1.1.1 Apoptózis	8
1.1.2 Nekrózis	11
1.1.3 Szekunder nekrózis / késői apoptózis	11
1.1.4 Egyéb sejthalál típusok	11
1.2 Az elhalt sejtek fagocitózisának mechanizmusa	12
1.2.1 A fagociták migrációja az elhalt sejtek irányába	13
1.2.2 Az elhalt sejtek felismerése	14
1.2.3 Az elhalt sejtek internalizációja és a közben aktiválódó jelátviteli útvonalak....	17
1.2.4 Az apoptotikus sejtek és makrofágok általi fagocitózisuk immunszabályozó funkciói.....	20
1.3 Elhalt sejtek eltakarítása szövetregeneráció során	27
1.3.1 Vázizom regeneráció, mint a szöveti regeneráció vizsgálatához használatos modell	28
1.3.2 A transzglutamináz 2 szerepe a sebgyógyulásban és az elhalt sejtek eltakarításában	36
2 CÉLKITŰZÉS	39
2.1 Az apoptotikus és nekrotikus sejtek makrofágok általi felvételének összehasonlítása	39
2.2 Az Nme1 NDPK szerepének meghatározása az apoptotikus sejtek makrofágok általi felvételében	40
2.3 A transzglutamináz 2 szerepének meghatározása a sérülést követő vázizom regeneráció során	40
3 ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	42
3.1 Reagensek.....	42
3.2 Kísérleti állatok	42
3.3 Sejtizolálás és tenyésztés.....	42

3.3.1	BMDM-ek differenciációja, kezelése és siRNA transzfekciója	42
3.3.2	Raw 267.4 makrofág sejtvonala tenyésztése	43
3.3.3	Timocita izolálás, sejthalál indukció és PS blokkolás	43
3.3.4	Izom eredetű leukociták izolálása	44
3.4	Elhalt timociták annexin V és PI festése	44
3.5	Transzmissziós elektronmikroszkópia	44
3.6	<i>In vitro</i> fagocitózis vizsgálat	45
3.7	Áramlási citometria	46
3.8	Lézer pásztázó citometria	46
3.9	Konfokális mikroszkópia	46
3.10	RNS izolálás, reverz transzkripció PCR és RT-qPCR	47
3.11	SDS-PAGE és Western blot	47
3.12	Izomsérülés modellezése CTX injekcióval	48
3.13	A regenerálódó izom hisztológiai vizsgálata	48
3.13.1	Hematoxin-eozin festett metszetek készítése	48
3.13.2	A laminin és a sejtmagok immunhisztokémiai festése	48
3.14	Az izomban jelen lévő immunsejtek kvantifikálása áramlási citometriával	48
3.15	Statisztikai analízis	49
4	EREDMÉNYEK	50
4.1	Az apoptotikus és nekrotikus sejtek makrofágok általi felvételének összehasonlítása	50
4.1.1	Az apoptotikus és nekrotikus sejtek felvétele egyaránt PS, MerTK, Tim-4, integrin β 3 és TG2 függő	50
4.1.2	Különböző magreceptorok aktivációja növeli az apoptotikus és nekrotikus sejtek felvételének hatékonyságát	53
4.1.3	A MerTK, TG2, C1qb, MFG-E8, SREBP1 és RAR α magreceptor célgén expressziója azonos mértékben megemelkedett Raw 264.7 makrofágokban apoptotikus és nekrotikus timociták felvételét követően	55
4.1.4	Az apoptotikus és nekrotikus timociták azonos hatékonysággal kerülnek bekebelezésre és versengenek egymással a BMDM-ek általi felvételért <i>in vitro</i> fagocitózis során	57
4.1.5	A makrofágok használhatják ugyanazt a fagocita portált egy apoptotikus és egy nekrotikus sejt bekebelezéséhez	59
4.2	Az Nme1 NDPK szerepének meghatározása az apoptotikus sejtek makrofágok általi felvételében	62

4.2.1	Az NM23-M1/Nme1 szerepet játszik az apoptotikus sejtek BMDM-ek általi fagocitózisában	62
4.3	A transzglutamináz 2 szerepének meghatározása a sérülést követő vázizom regeneráció során	65
4.3.1	A TG2 hiányos izomrostok keresztmetszeti területe mind a kontroll, mind a CTX injektált izmokban kisebb, mint a vad típusúaké.....	65
4.3.2	A regenerálódó izomban jelen lévő makrofágok és neutrofilek arányára nincs hatással a TG2 hiánya.....	67
4.3.3	TG2 hiányában az izomba infiltrálódó leukociták csökkent szinten expresszálják a TNF α , IL1, IL6, TGF β 1 citokineket és a Gdf3 növekedési faktort	69
5	MEGBESZÉLÉS	71
6	ÖSSZEFOGLALÁS	79
7	SUMMARY	81
8	IRODALOMJEGYZÉK	83
9	PUBLIKÁCIÓK, KONFERENCIÁK	99
10	KULCSSZAVAK	103
11	KEYWORDS	103
12	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	104

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

9CRA	9-cis retinsav (9 <u>c</u> is <u>r</u> etinoic <u>a</u> cid)
A2AR	adenozin A2A receptor (adenosine <u>A2A</u> receptor)
A3R	adenozin A3 receptor (adenosine <u>A3</u> receptor)
ABCA1	ATP kötő kazetta transzporter A1 (<u>A</u> TP- <u>b</u> inding <u>c</u> assette transporter <u>A1</u>)
AIF	apoptózis indukáló faktor (apoptosis <u>i</u> nducing <u>f</u> actor)
AMP	adenozin-monofoszfát (<u>a</u> denosine <u>m</u> onophosphate)
AMPK α 1	AMP aktivált protein kináz alfa 1 (<u>A</u> MP- <u>a</u> ctivated protein <u>k</u> inase <u>a</u> lpha <u>1</u>)
Apaf-1	apoptotikus proteáz aktiváló faktor 1 (apoptotic protease <u>a</u> ctivating <u>f</u> actor <u>1</u>)
ASC	apoptózis-asszociált "folt" fehérje (apoptosis associated <u>s</u> peck protein)
ATP	adenozin-trifoszfátot (<u>a</u> denosine <u>t</u> riphosphate)
ATRA	all-transz retinsav (<u>a</u> ll <u>t</u> rans <u>r</u> etinoic <u>a</u> cid)
Bai1	agy specifikus angiogenezis inhibitor 1 (<u>b</u> rain- <u>s</u> pecific <u>a</u> ngiogenesis <u>i</u> nhibitor <u>1</u>)
Bak	Bcl-2 antagonista/"ölő" (<u>B</u> cl-2 <u>a</u> ntagonist/ <u>k</u> iller)
Bax	Bcl-2-asszociált X (<u>B</u> cl-2- <u>a</u> ssociated <u>X</u>)
Bcl2	B-sejtes limfóma 2 (<u>B</u> - <u>c</u> ell <u>l</u> ymphoma <u>2</u>)
BID	BH3 kölcsönható domén halál agonista (<u>B</u> H3 <u>i</u> nteracting- <u>d</u> omain death agonist)
BMDM	csontvelői eredetű makrofág (<u>b</u> one- <u>m</u> arrow- <u>d</u> erived <u>m</u> acrophage)
C1q	komplement komponens 1q (<u>c</u> omplement component <u>1q</u>)
CAD	kaspáz aktivált DNáz (<u>c</u> aspase- <u>a</u> ctivated <u>D</u> Nase)
CCR2	CCL2 kemokin receptor (<u>C</u> CL2 <u>c</u> hemokine <u>r</u> eceptor)
CD	differenciációs antigén (<u>c</u> luster of <u>d</u> ifferentiation)
CFDA-SE	karboxifluorescein-diacetát-szukcinimidil-észter (<u>c</u> arboxyfluorescein <u>d</u> iacetate <u>s</u> uccinimidyl <u>e</u> ster)
CMTMR	5-(és-6)-(((4-klorometil)benzoi)amino)tetrametilrodamin (5-(and-6)-(((4- <u>c</u> hloro <u>m</u> ethyl)benzoyl)amino)tetra <u>m</u> ethyl <u>r</u> hodamine)
CTX	kardiotoxin (<u>c</u> ardio <u>t</u> oxin)
CX3CL1	fraktalkin (<u>C</u> X3C motif chemokine <u>l</u> igand <u>1</u> /fractalkine)
CX3CR1	CX3C kemokin receptor 1 (<u>C</u> X3C chemokine <u>r</u> eceptor <u>1</u>)
CSA	keresztmetszeti terület (<u>c</u> ross <u>s</u> ectional <u>a</u> rea)
DAMP	sérülés-asszociált molekuláris mintázat (<u>d</u> amage <u>a</u> ssociated <u>m</u> olecular <u>p</u> attern)
DD	halál domén (<u>d</u> eath <u>d</u> omain)
DISC	halálindukáló szignál komplex (<u>d</u> eath- <u>i</u> nducing <u>s</u> ignaling <u>c</u> omplex)
DMSO	dimetil-szulfoxid (<u>d</u> imethyl <u>s</u> ulfoxide)
ECM	extracelluláris mátrix (<u>e</u> xtra <u>c</u> ellular <u>m</u> atrix)
FADD	Fas fehérjéhez halál doménen keresztül kapcsolódó fehérje (<u>F</u> as- <u>a</u> ssociated via <u>d</u> eath <u>d</u> omain)
FAP	fibro-adipogén progenitorok (<u>f</u> ibro- <u>a</u> dipogenic <u>p</u> rogenitors)
FasL	Fas ligand (<u>F</u> as <u>l</u> igand)
FasR	Fas receptor (<u>F</u> as <u>r</u> eceptor)

Gas6	növekedés leállítás specifikus fehérje 6 (growth arrest-specific 6)
GDF3	növekedési differenciációs faktor 3 (growth differentiation factor 3)
GPR56	G fehérjéhez kapcsolt receptor 56 (G protein-coupled receptor 56)
GR	glükokortikoid receptor (glucocorticoid receptor)
GTP	guanozin-trifoszfáttal (guanosine triphosphate)
Gulp1	foszfotirozin kötő domént tartalmazó bekebelezési adaptor fehérje 1 (PTB domain-containing engulfment adapter protein 1)
H ₂ O ₂	hidrogén-peroxid (hydrogen peroxide)
HE	hematoxilin-eozin (haematoxylin-eosin)
HIF-1 α	hipoxia-indukálható faktor-1 alfa (hypoxia-inducible factor-1 alpha)
hMDM	humán monocita eredetű makrofág (human monocyte-derived macrophage)
HMGB1	nagy mobilitású csoport 1 (high mobility group box 1)
HtrA2	magas hőmérséklet igényű fehérje A2 (high temperature requirement protein A2)
IAP	apoptózis inhibitor fehérjék (inhibitors of apoptosis)
ICAM	intercelluláris adhézios molekula (intercellular adhesion molecule)
IFN	interferon (interferon)
I κ B	kappa B inhibitor (inhibitor of kappa B)
IL	interleukin (interleukin)
IRF	interferon szabályozó faktor (interferon regulatory factor)
ITAM	immunreceptor tirozin alapú aktivációs motívum (immunoreceptor tyrosine-based activation motif)
LPC	lizofoszfátidilkolin (lysophosphatidylcholine)
LPS	lipopoliszacharid (lipopolysaccharide)
LXR	máj X receptor (liver X receptor)
Ly6C	limfocita antigén 6 komplex (lymphocyte antigen 6 complex)
M-CSF	makrofág kolóniastimuláló faktor (macrophage colony-stimulating factor)
MEGF10	többszörös EGF-szerű domén 10 (multiple EGF-like domains 10)
MerTK	Mer tirozin kináz (Mer tyrosine kinase)
MFG-E8	tejzsír globulin-EGF faktor 8 (milk fat globule-EGF factor 8)
MFGM	tejzsír globulus membrán (milk fat globule membrane)
MLKL	kevert vonalú kináz domén szerű pszeudokináz (mixed lineage kinase domain like pseudokinase)
MNK	mitogén-aktivált protein kináz (mitogen-activated protein kinase)
MRF	miogén szabályozó faktorok (myogenic regulatory factors)
mTORC	emlős rapamicin target komplex (mammalian target of rapamycin complex)
NADPH	nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát redukált formája (reduced form of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)
NDPK	nukleozid-difoszfát-kináz (nucleoside-diphosphate kinase)
NF- κ B	nukleáris faktor kappa B (nuclear factor-kappa B)
NO	nitrogén-monoxid (nitrogen monoxide)
PAMP	patogén-asszociált molekuláris mintázat (pathogen associated molecular pattern)
P2Y2	P2Y purinerg receptor 2 (P2Y purinoceptor 2)

PI	propídium-jodid (propidium iodide)
PI3K	foszfatidil-inozitol-3-kináz (phosphoinositide 3-kinase)
PPAR	peroxiszóma proliferátor-aktivált receptor (peroxisome proliferator-activated receptor)
PPP	pentóz-foszfát útvonal (pentose phosphate pathway)
PS	foszfatidilszerin (phosphatidylserine)
Rac1	Ras-szerű C3 botulinum toxin szubsztrát 1 (Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1)
RAGE	fejlett glikozilációs végtermék receptor (receptor for advanced glycation end products)
RALDH	retinaldehid-dehidrogenáz (retinaldehyde dehydrogenase)
RAR	retinsav receptor (retinoic acid receptor)
RGD	arginin-glicin-aszpartát (Arginine-Glycine-Aspartate)
RIG-I	retinsav-indukálható gén I (retinoic-acid inducible gene I)
RIPK	receptor-kölcsönható protein kináz (receptor-interacting protein kinase)
ROS	reaktív oxigén gyökök (reactive oxygen species)
RT-qPCR	valós idejű kvantitatív PCR (real time quantitative pcr)
RXR	retinoid X receptor (retinoid X receptor)
S1P	szfingozin-1-foszfát (sphingosine-1-phosphate)
S1PR	szfingozin-1-foszfát receptor (sphingosine-1-phosphate receptor)
SCARF1	F1 scavenger receptor (scavenger receptor class F member 1)
SIRP α	szignál regulatorikus fehérje alfa (signal regulatory protein alpha)
SLE	szisztémás lupus erythematosus (systemic lupus erythematosus)
Smac	második mitokondrium eredetű kaspáz aktivátor (second mitochondria-derived activator of caspases)
SREBP1	szterolszabályozó elemet kötő fehérje 1 (sterol regulatory element-binding protein 1)
STAT6	szignál transzducer és transzkripció aktivátor 6 (signal transducer and activator of transcription 6)
TA	tibialis anterior
TAM	Tyro3, Axl, Mer tirozin kinázok (Tyro3, Axl, Mer tyrosine kinases)
tBID	csenkolt BID-et (truncated form of BID)
TG2	transzglutamináz 2 (transglutaminase 2)
TGF β	transzformáló növekedési faktor béta (transforming growth factor beta)
Tim-4	T-sejt immunglobulin mucin receptor 4 (T-cell immunoglobulin mucin receptor 4)
TLR	patogén mintázatfelismerő receptor (toll-like receptor)
TNFR1	TNF receptor 1 (TNF receptor 1)
TNF α	tumor nekrozis faktor alfa (tumor necrosis factor alpha)
TRADD	TNFR1-hez halál doménon keresztül kapcsolódó fehérje (TNFR1-associated via death domain)
T _{reg}	regulatorikus T sejt (regulatory T cell)
TSP-1	trombospondin-1 (thrombospondin-1)
UTP	uridin-trifoszfátot (uridine-triphosphate)

1 BEVEZETÉS

1.1 A sejthalál típusai

1.1.1 Apoptózis

Szervezetünkben milliányi sejt hal el és termelődik újra nap mint nap. A feleslegessé vált, előregedett, vagy meghibásodott sejtek általában programozott módon pusztulnak el (Renehan és mtsai, 2001). A programozott sejthalál egyik típusa az apoptózis, mely során a sejt megszakítja a kapcsolatot a környező sejtekkel és az extracelluláris mátrixal (ECM), összezsugorodik, kromatinállománya kondenzálódik és feldarabolódik, de mindeközben megmarad a plazmamembrán integritása (Kerr és mtsai, 1972). Az apoptózist kiváltó stimulusok kétféle útvonalat aktiválhatnak: a belső (mitokondriális) vagy a külső (sejthalál receptorokon keresztüli) apoptózis útvonalakat (1. ábra).

1.1.1.1 Az apoptózis belső útvonala

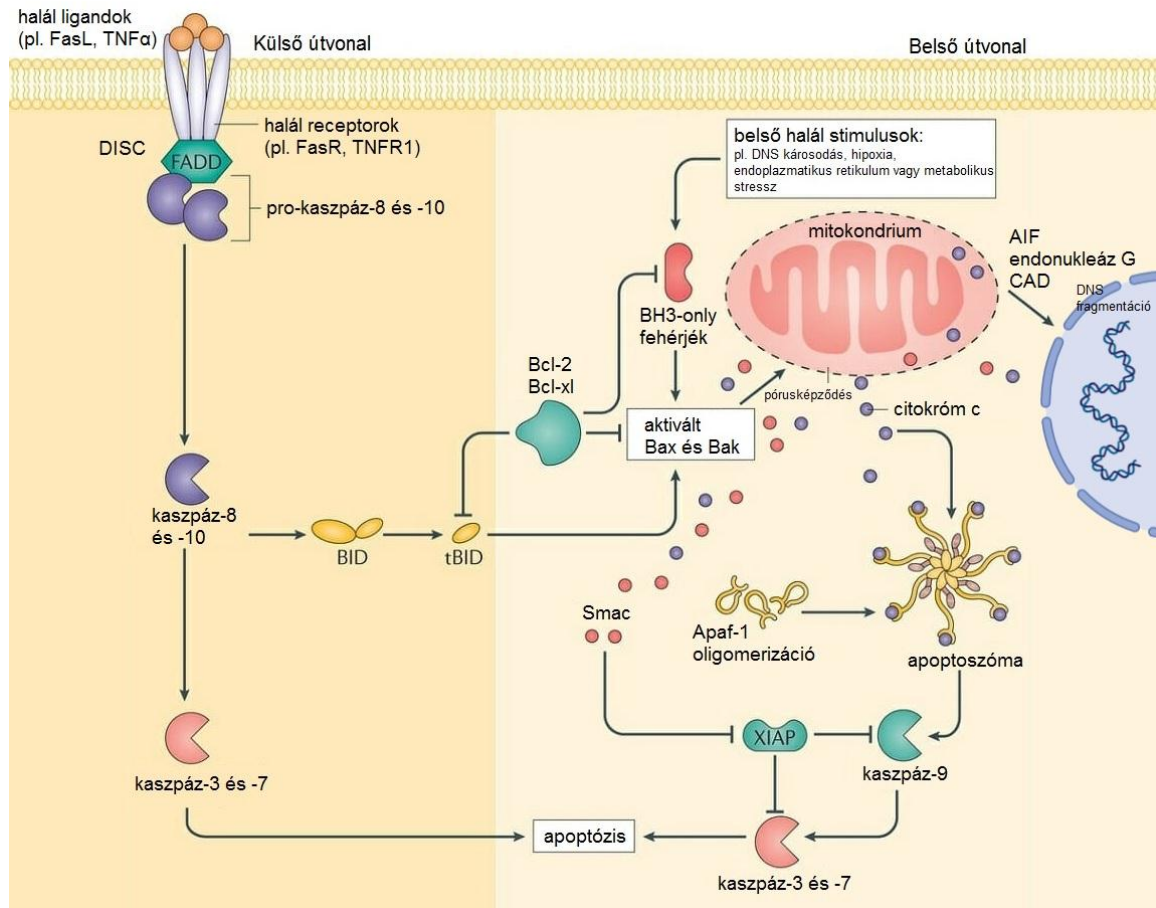
Az apoptózis belső útvonalát olyan nem receptor-mediált, mikrokörnyezetben bekövetkező zavarok okozta stimulusok aktiválhatják, mint a növekedési faktorok hiánya, DNS károsodás (pl. sugárzás hatására), endoplazmatikus retikulum stressz, virális infekciók, hipoxia vagy a reaktív oxigén gyökök (ROS) túlzott jelenléte. Ezek a külső mitokondriális membrán permeabilizációjához vezetnek (Tait és mtsai, 2010), melyet a B-sejtes limfóma 2 (Bcl-2) fehérjecsald pro-apoptotikus (pl. Bax, Bak, Bad, Bim) és anti-apoptotikus (pl. Bcl-2, Bcl-xl) tagjai szabályoznak (Czabotar és mtsai, 2014). A Bcl-2-asszociált X (Bax) és a Bcl-2 antagonistá/"ölő" (Bak) fehérjék vesznek részt a mitokondrium külső membránjában lezajló pórusképződésben (Moldoveanu és mtsai, 2014), melynek hatására megváltozik a mitokondriális transzmembrán potenciál és különböző apoptotikus effektorok jutnak ki a citoplazmába a mitokondrium membránok közötti régiójából. Ezeket a kijutó fehérjéket két nagy csoportba sorolhatjuk. Az első tagjai az effektor kaszpázok aktivációjához vezetnek. Ide tartoznak az apoptózis inhibitor fehérjék (IAP) gátlását végző második mitokondrium eredetű kaszpáz aktivátor (Smac) fehérje (Verhagen és mtsai, 2000; Du és mtsai, 2000), a magas hőmérséklet igényű fehérje A2 (HtrA2) szerin proteáz, valamint a citokróm c. Ez utóbbi az apoptotikus proteáz aktiváló faktor 1 (Apaf-1) és pro-kaspáz-9 molekulákkal kapcsolódva apoptoszóma kialakulásához, ezáltal a kaszpáz 9 aktiválódásához vezet (Li és mtsai, 1997).

Az aktivált kaszpáz 9 katalizálja a pro-kaspáz 3 és 7 effektor kaszpázok proteolitikus aktivációját (Julien és mtsai, 2017). Az effektor vagy más néven végrehajtó kaszpázok felelősek az apoptózis során bekövetkező morfológiai és biokémiai változásokért, beleértve a foszfatidilszerin (PS) sejt felszíni kifejeződését (Naito és mtsai, 1997), a DNS fragmentációt (Nagata, 2005) és az apoptotikus testek képződését (Sebbagh és mtsai, 2001). A mitokondriumból kijutó másik nagy fehérje csoport tagjai, mint pl. az apoptózis indukáló faktor (AIF), az endonukleáz G és a kaszpáz aktivált DNáz (CAD) a sejtmagba transzlokálódnak, ahol a DNS fragmentációját és a kromatin kondenzációt segítik elő (Nagata, 2005).

1.1.1.2 Az apoptózis külső útvonala

Az apoptózis külső szignálútvonala az extracelluláris mikro környezet zavarainak következtében vagy halálreceptorokon és a hozzájuk kapcsolódó ligandokon keresztül, vagy az ún. függőségi receptorokon keresztül indul be, melyek akkor aktiválódnak, amikor specifikus ligandjuk szintje egy bizonyos határérték alá csökken (Gibert és mtsai, 2015). A sejthalál receptorok, köztük a Fas receptor (FasR) és a TNF receptor 1 (TNFR1) transzmembrán fehérjék, melyek intracelluláris régiója ún. halál domén (DD) motívumokat tartalmaz. A receptorok specifikus ligandjainak, mint pl. a Fas ligand (FasL) és a tumor nekrosis faktor alfa (TNF α) kötődése után aggregálódnak, ennek hatására konformációváltozás megy végbe az intracelluláris régiójukban, lehetővé téve pl. a Fas fehérjéhez halál doménon keresztül kapcsolódó fehérje (FADD) (Chinnaiyan és mtsai, 1995) vagy a TNFR1-hez halál doménon keresztül kapcsolódó fehérje (TRADD) (Brenner és mtsai, 2015) kötődését a receptorok halál doménjeihez. Ez végül egy dinamikus multiprotein komplex, a halálindukáló szignál komplex (DISC) kialakulásához vezet, mely lehetővé teszi a pro-kaspáz-8 (néhány esetben a pro-kaspáz-10) autoproteolitikus aktivációját (Kallenberger és mtsai, 2014), amely különböző effektor kaszpázok (pl. kaszpáz-3, -7) proteolitikus aktivációját végzi. Néhány esetben (pl. timocitáknál) a kaszpáz-8 általi végrehajtó kaszpáz aktiváció elegendő a sejthalál lezajlásához, azonban más sejtekben még szükség van a BH3 kölcsönható domén halál agonista (BID) fehérje kaszpáz-8 általi hasítására, így létrehozva a csonkolt BID-et (tBID), mely a mitokondrium külső membránjába transzlokálódik és Bax/Bak függő mitokondriális külső membrán permeabilitáshoz vezet, így aktiválja a kaszpáz-9 függő apoptózist (Barnhart és mtsai, 2003; Gross és mtsai, 1999). A függőségi receptorok fiziológias körülmények között a sejtek

túlélését, osztódását és differenciációját támogatják. A ligandjuk hiányában általuk mediált apoptózis útvonalak kevésbé ismertek, de általában kaspáz aktivációval járnak (Mehlen és mtsai, 2014).



1. ábra: Az apoptózis útvonalai Egy egészséges sejtben a Bcl-2 fehérjecsalád anti-apoptotikus tagjai gátolják a pro-apoptotikus Bak és Bax aktivitását. Stressz hatására aktiválódnak a BH3 only fehérjék, melyek elnyomják az anti-apoptotikus fehérjék hatását, így aktiválják a Bak és Bax fehérjéket. Ez utóbbi oligomerizálódik és beágyazódik a külső mitokondriális membránba, így permeabilizálva azt, és lehetővé téve többek között a Smac, az AIF, az endonukleáz G, a CAD és a citokróm c felszabadulását. A Smac apoptózis inhibitor fehérjéket gátol, így hozzájárul a kaspáz aktivációhoz. Az AIF, az endonukleáz G és a CAD a sejtmagba transzlokálódnak és a kromatin kondenzációhoz, valamint a DNS fragmentációhoz járulnak hozzá. A citokróm c hatására létrejön az apoptoszóma, mely a kaspáz-9, ezáltal a kaspáz kaszkád aktivációjához vezet. A külső apoptózis útvonal a halál ligandok halál receptorokhoz való kötődése által indukálódik. Ennek hatására adaptor fehérjék gyűlnek a halál receptor intracelluláris halál doménjéhez, mely a kaspáz-8 hasításához és aktivációjához vezet. Az aktív kaspáz-8 képes direkt úton aktiválni a kaspáz-3 és kaspáz-7 effektor kaspázokat, illetve beindíthatja a belső apoptózis útvonalat is a BID fehérje hasítása által, mely hasított formájában aktiválja a Bak és Bax pro-apoptotikus fehérjéket. Az ábra (Ichim és Tait, 2016) alapján lett módosítva.

1.1.2 Nekrózis

A szabályozott sejthalál energiaigényes folyamat. Amennyiben egy sejtet olyan erős sejtkárosító hatás ér, mely hatására már nem képes aktiválni az aktív sejthalál folyamatokat, akkor programozatlan, patológiás úton hal el, melyet nekrózissnak nevezünk. Ilyen hatások lehetnek fizikai (pl. magas nyomás, szélsőséges hőmérsékleti vagy ozmotikus hatások), kémiai (pl. extrém pH változások), vagy mechanikai (pl. nyíróerők) tényezők. Az apoptózissal ellentétben a nekrotikus sejtek nem képesek megtartani membrán integritásukat (Buja és mtsai, 1993), így felpuffadnak, intracelluláris tartalmuk elkezd kiszivárogni az őket körülvevő szöveti környezetbe, ahol autoantigénként hatva lokális gyulladást idéz elő (Li és mtsai, 2001; Scaffidi és mtsai, 2002; Fadok és mtsai, 2001). Az apoptózishoz hasonlóan itt is megjelenik a sejtmembrán külső oldalán a PS molekula (Hirt és Leist, 2003; Li és mtsai, 2015).

1.1.3 Szekunder nekrózis / késői apoptózis

Ha az apoptotikus sejtek eltakarítása a szövetből nem történik megfelelően, ezek a sejtek is elveszíthetik membrán integritásukat, így másodlagos (szekunder) nekrotikus, más néven késői apoptotikus sejtekké válnak (Cejna és mtsai, 1994). A felhalmozódó másodlagosan nekrotikus sejtek lokális gyulladást idéznek elő, mely hosszú távon autoimmun betegségek kialakulásához vezethet (Potter és mtsai, 2003; Gaippl és mtsai, 2006). Az elhalt sejtek eliminációs zavarával összefüggésbe hozható humán megbetegedések közé tartoznak a szisztémás lupus erythematosus (SLE), a reumatoid arthritisz, bizonyos pulmonáris kórképek (krónikus obstruktív légúti betegség, cisztikus fibrózis, asztma), kardiovaszkuláris megbetegedések (érelmeszesedés), és egyes neurológiai zavarok is (Alzheimer-kór, Parkinson-kór) (Hochreiter-Hufford és Ravichandran, 2013).

1.1.4 Egyéb sejthalál típusok

A sejthalál típusok besorolása egyre összetettebbé válik, ahogy egyre többet tudunk meg a mechanizmusokról. Így az aktív sejthalál típusok között megkülönböztetjük pl. programozott nekrózist, azaz nekroptózist, melyhez a primer nekrozissal ellentétben specifikus jelátviteli útvonalak aktiválódása szükséges. Nekroptózis során egy sejt felszíni receptoron keresztül (pl. TNFR1, DR6) történő kaspáz független szignalizáció hatására a receptor-kölcsönható protein kináz 1 és 3 (RIPK1, RIPK3) nekroptoszómát alkotnak, mely a

kevert vonalú kináz domén szerű pszeudokináz (MLKL) foszforilációjához és oligomerizációjához vezet. Az oligomerizálódott MLKL a plazmamembránba inzertálódva pórusokat képez, melyeken keresztül a sejt belsejéből sérülés-asszociált molekuláris mintázathoz (DAMP) tartozó molekulák jutnak ki, gyulladáshoz vezető környezetet eredményezve (Galluzzi és Kroemer, 2008; Strlic és mtsai, 2016).

A nekrozis egy másik aktív formája a piroptózis, mely általában patogén invázió hatására bekövetkező gyulladási kaspáz aktiváció eredményeképp jön létre (Galluzzi és mtsai, 2018). A patogén-asszociált molekuláris mintázat (PAMP) felismerését követően egy piroptoszómának (más néven inflammaszóma) nevezett fehérje komplex alakul ki, mely nagyrészt apoptózis-asszociált "folt" fehérjéből (ASC) és pro-kaspáz 1-ből áll. A kaspáz-1 piroptoszómán keresztüli aktiválódását követően ebben az esetben a gasdermin D hasítása vezet a pórusképződéshez és az interleukin 1 β (IL1 β), valamint az IL18 pro-inflammatorikus citokinek felszabadulásához (Shi és mtsai, 2017).

Ezekon kívül számos más szabályozott sejthalál formát különböztetünk meg, mint pl. az autofágia függő sejthalál, lizoszóma függő sejthalál, NETózis, entózis, parthanatosz vagy a ferroptózis.

1.2 Az elhalt sejtek fagocitózisának mechanizmusa

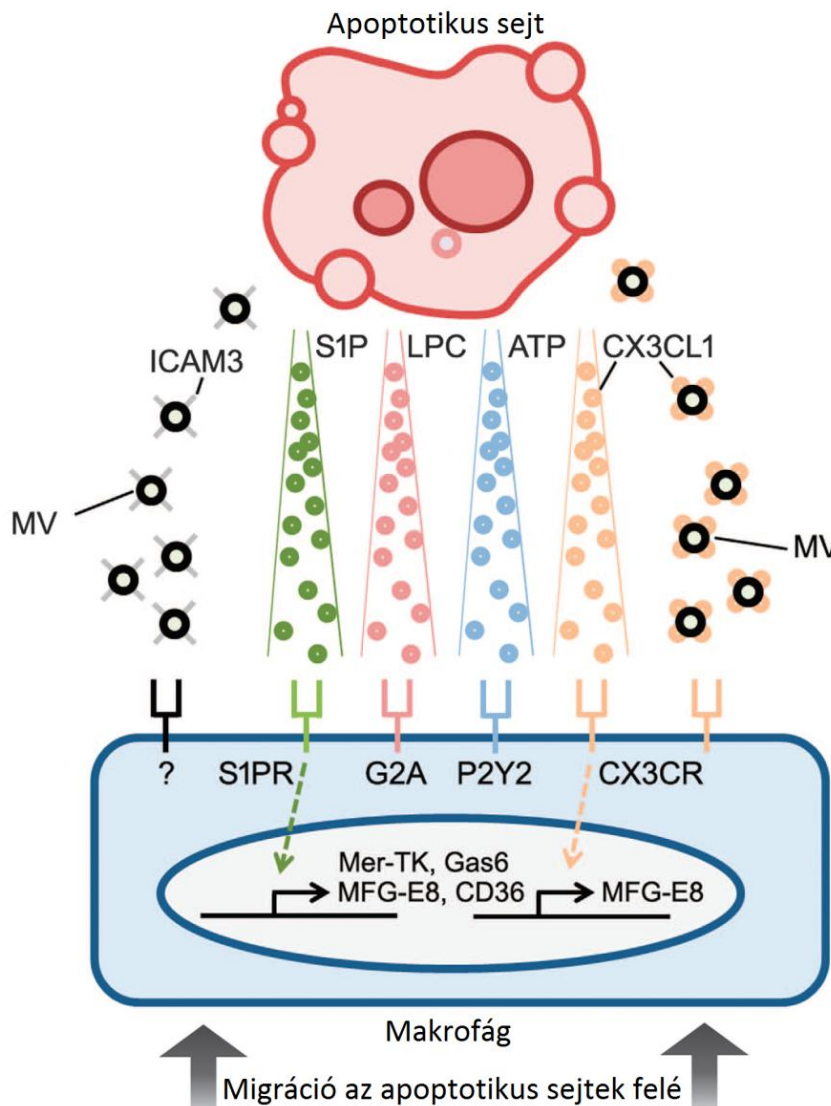
Az elhalt sejtek felvételét az immunrendszer professzionális fagocita sejtjei (makrofágok, neutrofil granulociták, dendritikus sejtek) mellett nem professzionális, általában szomszédos sejtek (fibroblasztok, endotheliális sejtek) is végezhetik. A legtöbb szövetben szervezetünk professzionális fagocita sejtjei közül elsősorban a makrofágok felelősek az elhalt, vagy feleslegessé vált sejtek eltakarításáért. A sejt és a környezete közötti kommunikáció a plazmamembránon keresztül történik. A sejtek különböző sejt felszíni molekulák kifejezésével folyamatosan tájékoztatják környezetüket saját állapotukról. Az egészséges sejtek "ne egyél meg" (Don't eat me) szignálokat fejeznek ki, míg az eliminációra szoruló (pl. apoptózissal elhalt) sejteken megfigyelhetjük a "ne egyél meg" jelek eltűnését, valamint "találj meg" (Find me) és "egyél meg" (Eat me) szignálok megjelenését, melyek segítik a fagocita sejtek migrációját a célsejtek felé, valamint a szignált kibocsátó, elhaló sejtek felismerését és internalizációját. A makrofág receptorok széles repertoárja teszi lehetővé az apoptotikus sejtek felismerését, megragadását és bekebelezését. Az elhalt sejtek fagocitózisának teljes mechanizmusa az alábbi négy lépésre bontható (Hochreiter-Hufford és Ravichandran, 2013; Underhill és Goodridge, 2012): a fagociták migrációja az elhalt sejtek

irányába, az elhalt sejtek felismerése, internalizációja és a bekebelezést követő immunmoduláció.

1.2.1 A fagociták migrációja az elhalt sejtek irányába

Az elhalt sejtek hatékony eltakarításának érdekében első lépésként az apoptotikus sejtek különböző szolubilis molekulákat bocsátanak ki, melyek kemoattraktánsként hatva odavonzzák magukhoz a makrofágokat (2. ábra). Ilyen ún. "találj meg" jelek a nukleotidok (ATP, UTP), lizofoszfátidilkolin (LPC), fraktalkin (CX3CL1), és a szfingozin-1-foszfát (S1P) (Chekeni és Ravichandran, 2011). Az apoptotikus sejtekből kaszpáz-3 függően, pannexin 1 csatornákon keresztül szabadulnak fel a nukleotidok (Chekeni és mtsai, 2010), beleértve az adenzin-trifoszfátot (ATP) és az uridin-trifoszfátot (UTP), melyeket a fagocita sejtek a purinerg receptoraikon keresztül (pl. P2Y purinerg receptor 2 [P2Y2]) érzékelnek (Elliott és mtsai, 2009). Az apoptotikus sejtekben a kaszpáz-3 aktiváció révén hasított és így aktiválódott kalcium független foszfolipáz A2 alakítja a foszfatidilkolint LPC-vé (Lauber és mtsai, 2003), mely az ATP kötő kazetta transzporter A1 (ABCA1) segítségével jut ki az apoptotikus sejtéből (Peter és mtsai, 2012) és a makrofágokon a G2A G-fehérjéhez kapcsolt receptoron keresztül hatva indukálja a migrációt (Peter és mtsai, 2008). A fraktalkin membrán kötött fehérjeként termelődik és az apoptotikus sejtekből proteolitikus hasítás révén távozik (Truman és mtsai, 2008). A szekretált fraktalkin a CX3C kemokin receptor 1-en (CX3CR1) keresztül szabályozza a makrofágok mozgását. Az S1P szfingozinból keletkezik szfingozin-kináz közreműködésével és szintén kaszpáz-3 függő módon szekretálódik az elhaló sejtekből, majd a makrofágokon lévő S1P receptorokhoz (S1PR) kötődik (Gude és mtsai, 2008), így elindítva a makrofágok vándorlását az apoptotikus sejtek felé. Az apoptotikus sejtekből és a fagocitákból származó extracelluláris vezikulák is befolyásolhatják a fagociták működését fagocitózis során. Az apoptotikus sejtekből felszabaduló ún. mikrovezikulák CX3CL1 (Tsai és mtsai, 2014) és intercelluláris adhézións molekula 3 (ICAM3) (Torr és mtsai, 2012) segítségével szintén odavonzzák a makrofágokat a sejthalál helyére. A "találj meg" jeleknek egyéb funkciója is lehet a fagocitózis során. A CX3CL-ről kimutatták, hogy serkenti a tejsír globulin-EGF faktor 8 (MFG-E8) expresszióját hasüregi makrofágokban (Miksa és mtsai, 2007), míg az S1P anti-apoptotikus mediátorként viselkedik, azaz gátolja a makrofágok apoptózisát (Weigert és mtsai, 2006) és feltehetőleg a környező sejtek károsodását. Ezen kívül az S1P serkenti az eritropoetin-eritropoetin receptor jelátviteli útvonal aktiválódását, mely a peroxiszóma proliferátor-aktivált receptor γ (PPAR γ)

transzkripciós faktoron keresztül felerősíti különböző fagocita receptorok és fagocitózis-asszociált molekulák (MerTK, CD36, Gas6, MFG-E8) géneexpresszióját (Luo és mtsai, 2016).

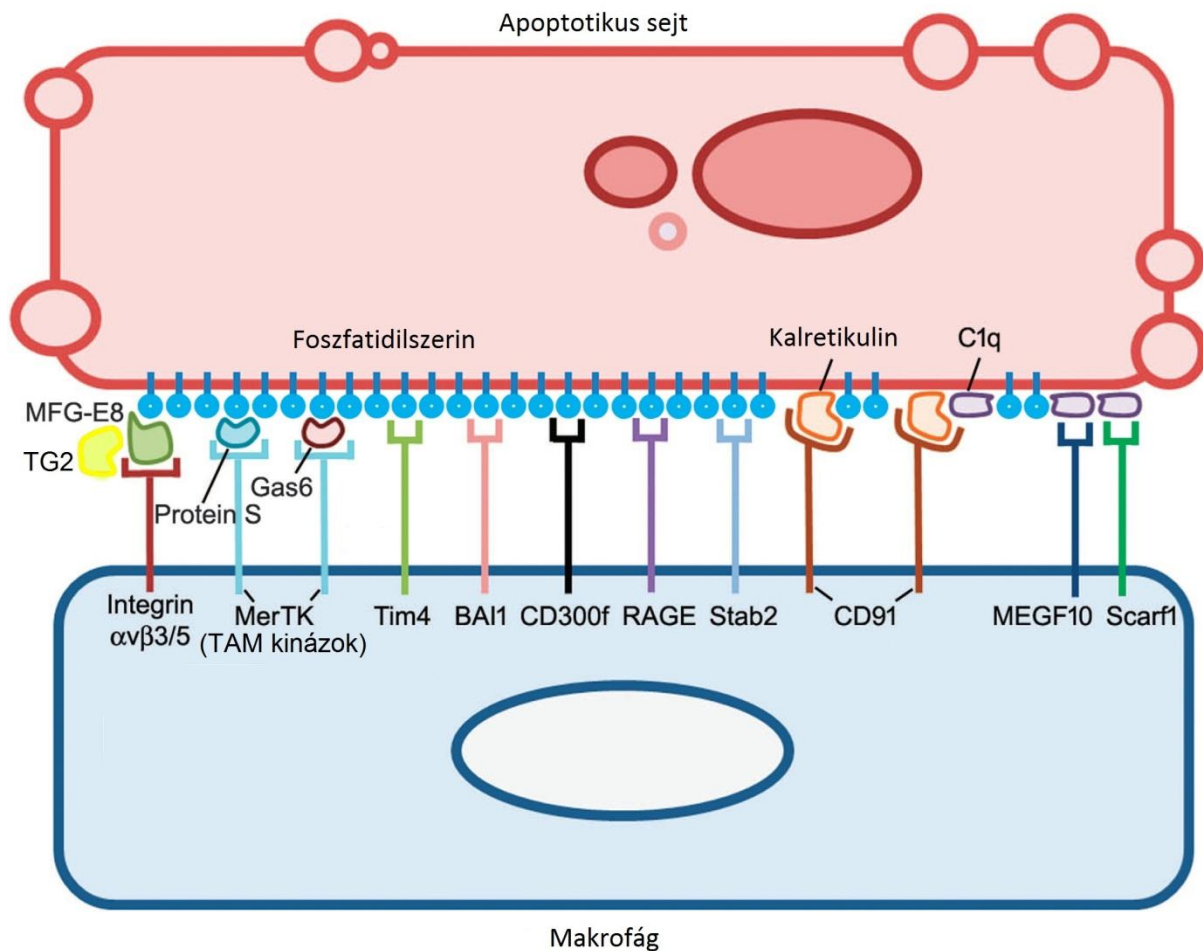


2. ábra: Az apoptotikus sejtek által kibocsátott "találj meg" jelek A S1P, LPC, ATP, CX3CL1 "találj meg" jelként funkcionáló molekulák és az apoptotikus sejtekből származó mikrovezikulák (MV), valamint ezek fagocita felszínen lévő receptorai (S1PR, G2A, P2Y2, CX3CR) segítik a fagociták apoptotikus sejtek irányába történő mozgását. Az ábra (Park és Kim, 2017) alapján lett módosítva.

1.2.2 Az elhalt sejtek felismerése

Miután a fagociták odavándoroltak a sejthalál helyére a célsejtek azonosítása az "egyél meg" jeleken keresztül történik (3. ábra). Ezek olyan, a sejtfelszínen végbemenő változásokat foglalnak magukba, mint a glikolizációs mintázat és ICAM epitópok megváltozása, illetve a normál esetben a sejtmembrán belső felszínén jelen lévő PS vagy az endoplazmatikus retikulum membránból származó kalretikulín externalizációja. Fontos kiemelni, hogy a fagocitózis folyamatának beindulásához nem csak a küszöbértéket meghaladó mennyiségben jelen lévő "egyél meg" jelek jelenléte (Borisenko és mtsai, 2003), hanem az egészséges sejteken megtalálható "ne egyél meg" jelek módosulása vagy eltűnése

is szükséges (Elward és Gasque, 2003). Számos fagocita receptor a PS-t ismeri fel, mint az elhalt sejtek legfőbb sejtfelszíni "egyél meg" jelét. Többek között ide tartoznak a direkt PS receptorok, mint pl. a T-sejt immunglobulin mucin receptor 4 (Tim-4) (Miyanishi és mtsai, 2007), stabilin-2, és az agy-specifikus angiogenezis inhibitor 1 (Bai1). A differenciációs antigén 300 (CD300) család fehérjéi, így a CD300b és a CD300f, valamint a fejlett glikozilációs végtermék receptor (RAGE) is az apoptotikus sejtek eltakarításában részt vevő PS receptorokként lettek azonosítva (Murakami és mtsai, 2014; Choi és mtsai, 2011; He és mtsai, 2011). Ezen kívül léteznek indirekt PS receptorok, pl. Mer tirozin kináz (MerTK), integrin $\alpha_v\beta_3$ és koreceptora a transzglutamináz 2 (TG2), melyek különböző hídképző fehérjéken keresztül kötik a PS-t (Poon és mtsai, 2014). Ezek a hídképző fehérjék egyrészt kötődnek az elhalt sejtek felszínén lévő PS-hez, másrészt a fagociták felszínén lévő receptorokhoz, ezáltal hidat képeznek köztük. Az egyik ilyen molekula az MFG-E8, mely az $\alpha_v\beta_3$ vagy az $\alpha_v\beta_5$ integrineket köti össze a PS-el (Hanayama és mtsai, 2002). Hasonló szerepet töltenek be a növekedés leállítás specifikus fehérje 6 (Gas6) és protein S molekulák, melyek a TAM (Tyro3, Axl, Mer) tirozin kináz receptor család tagjaival kapcsolják össze a PS-t (Anderson és mtsai, 2003). További potenciális összekötő molekulák a komplement komponens 1q (C1q), mely a komplement rendszer egyik eleme és szintén a PS-hez kötődik az apoptotikus sejtek felszínén, valamint a trombospondin-1 (TSP-1), mely CD36 receptorhoz kötődve segíti elő az elhalt sejtek megkötését (Paidassi és mtsai, 2008; Savill és mtsai, 1992). A fagociták különböző receptorokkal (pl. kalretikulin-asszociált CD91) ismerhetik fel a C1q-t (Ogden és mtsai, 2001). A C1q az apoptotikus sejtfelszínen lévő Annexin A2 és A5 molekulákat is összekapcsolhatja a makrofágok kalretikulin-asszociált CD91 vagy F1 scavenger receptoraival (SCARF1) (Gardai és mtsai, 2005; Szondy és mtsai, 2017). Ezen kívül a makrofágok C1q általi aktivációja befolyásolja a MerTK és Gas6 expresszióját is (Galvan és mtsai, 2012). A PS metabolizmus származékai szintén hozzájárulhatnak az apoptotikus sejtek felismeréséhez. Néhány fagocita receptor, mint pl. a CD36, CD14 (Devitt és mtsai, 1998) és CD68 scavenger receptorok, módosított lipideket, így pl. oxidált PS-t képesek felismerni (Greenberg és mtsai, 2006). A CD36 integrinekkal együttműködve, TSP-1 függő módon segíti az apoptotikus sejtek internalizációját (Fadok és mtsai, 1998b).



3. ábra: Az apoptotikus sejtek felismerésében szerepet játszó makrofág receptorok Az apoptotikus sejtek által a sejtfelszínen kifejezett “egyél meg” jeleket (pl. PS, kalretikulin) a makrofágok különböző receptoraikkal ismerik fel. A PS felismerése történhet direkt PS receptorokkal (Tim fehérje család tagjai, BAI1, Stabilin-2, CD300f, RAGE), vagy indirekt módon, hidképző molekulákon (MFG-E8, Gas6, protein S, C1q) keresztül. A PS-hez kötődött MFG-E8-at az integrin $\alpha_v\beta_{3/5}$, a Gas6-ot és a protein S-t pedig a MerTK (TAM kinázok) ismeri fel. A C1q hidképző molekula receptora az MEGF10 és a Scarf1. A kalretikulin az apoptotikus sejtek felszínén PS-hez vagy C1q-hoz kötődik, és a CD91 ismeri fel. Az ábra (Park és Kim, 2017) alapján lett módosítva.

A nekrotikus sejtek eltakarítása kevésbé kutatott terület, azonban az már bizonyított, hogy a nekrotikus sejtek felszínén is megjelenik a PS (Lecoeur és mtsai, 2001; Krysko és mtsai, 2004), így a nekrotikus sejtek felismerése is történhet PS függő mechanizmusokkal (Hirt és Leist, 2003; Brouckaert és mtsai, 2004). Egyes, az apoptotikus sejtek felvételében is szerepet játszó fagocita receptorok és egyéb molekulák szerepét már bizonyították a nekrotikus sejtfelvételnél. Így pl. a CD14, a trombospondin-CD36- $\alpha_v\beta_3$ komplex és a C1q komplement komponens is hozzájárulnak a nekrotikus sejtek felvételéhez (Bottcher és mtsai, 2006).

Néhány esetben egészséges sejtek is számottevő mennyiségű PS-t fejeznek ki a felszínükön. Ilyen az aktivált B és T sejtek esete. A fagocitózist elkerülendő ezek a sejtek "ne egyél meg" jeleket is kifejeznek felszínükön. A CD31 az egyik ilyen molekula, mely homotipikus (saját-saját) interakciót kialakítva képes elkerülni a bekebelezést (Brown és mtsai, 2002). A CD47 egy másik ilyen "ne egyél meg" molekula az élő sejtek felszínén. A CD47 a fagocita felszínén lévő szignál regulatorikus fehérje alfa (SIRP α) receptorhoz kötődik (Tsai és Discher, 2008), mely hatására tirozin foszfatázok (SHP-1, SHP-2) aktiválódnak, beindítva egy defoszforilációs kaszkádot és a miozin II gátlását, így megakadályozva a fagocitózishoz szükséges sejtmozgást.

1.2.3 Az elhalt sejtek internalizációja és a közben aktiválódó jelátviteli útvonalak

Az immunrendszer különböző célpontjainak, mint pl. az apoptotikus sejtek vagy az opsonizált patogének fagocitózisa bár különböző receptorok közreműködésével kezdődik, de a komplex jelátviteli útvonalak mind a citoskeletális aktin hálózat átalakításával, fagoszóma képződéssel, záródással és éréssel végződnek. Az apoptotikus sejtek "egyél meg" jelei és a makrofágok sejtfelszíni receptorai közötti interakció következtében különféle jelátviteli útvonalak aktiválódnak. A Tim-4 önállóan nem közvetít fagocitózist elindító jelátviteli útvonalat (Park és mtsai, 2009), így csak más fehérjékkel együttműködve vesz részt az apoptotikus sejtek internalizációjában. A Tim-4 partnereként a MerTK és az integrin β 1 működnek, melyek továbbítják a jeleket a Tim-4-en keresztül történő PS felismerést követően (Nishi és mtsai, 2014; Flannagan és mtsai, 2014). A Bai1 a G-fehérjéhez kapcsolt receptorcsaládba tartozik, melyek 7 transzmembrán doménnel rendelkeznek. A Bai1 a PS kötést követően a DOCK180/ELMO1 komplexel kapcsolatba lépve aktiválja a Ras-szerű C3 botulinum toxin szubsztrát 1-et (Rac1). A CD300f a foszfatidil-inozitol-3-kináz (PI3K) útvonalon keresztül, az F-aktint szabályozó Rac1/Cdc42 GTPázok aktiválásával szabályozza az apoptotikus sejtek bekebelezését (Tian és mtsai, 2014). A CD300b az immunreceptor tirozin alapú aktivációs motívum (ITAM) doménjén keresztül létesít kapcsolatot a DAP12 fehérjével, így aktiválja a PI3K/Akt jelátviteli útvonalat (Murakami és mtsai, 2014).

Az apoptotikus sejtek felvételében szerepet játszó receptorok három evolúciósan konzervált jelátviteli útvonalat aktiválnak, melyek aktiválják a Rac kis G fehérjét, mely a citoskeletális aktin újraszerveződését és a fagocitózishoz szükséges lamellipodium képződést segíti elő (Kinchin és mtsai, 2005; Park és Kim, 2017).

Ezek az útvonalak a CED-1, -6 és -7 útvonal, a CED-2, -5 és -12 útvonal, valamint az ABI-1 és ABL-1 útvonal (4. ábra), melyek mivel *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) fonálféreg modellben kerültek felfedezésre, így az ott jelen lévő fehérjék alapján lettek elnevezve (Wu és Horvitz, 1998a; Wu és Horvitz, 1998b; Reddien és Horvitz, 2000; Liu és Hengartner, 1998). A CED-1, 6 és 7 útvonalon keresztül továbbítja a jelet pl. a Stabilin-2 (Park és mtsai, 2008b), a CED-2, 5 és 12 útvonalat használja pl. a Bai1 és az integrin $\alpha_5\beta_5$ (Park és mtsai, 2007; Albert és mtsai, 2000).

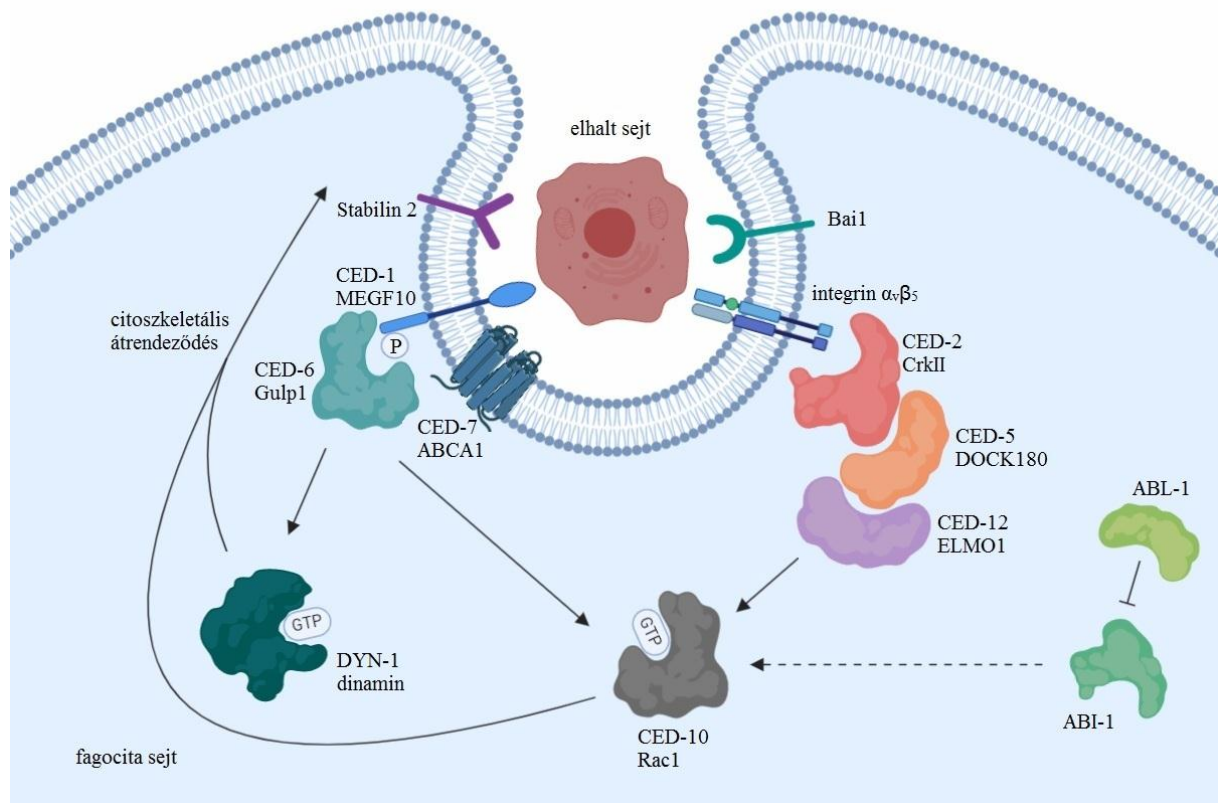
Az első útvonalban szereplő CED-1 emlős homológjai, a többszörös EGF-szerű domén 10 (MEGF10) és a Jedi/MEGF12, fagocita receptorként funkcionálnak az apoptotikus sejtek eltakarítása során (Wu és mtsai, 2009; Scheib és mtsai, 2012). A CED-7 emlős ortológjai az ABCA1 és ABCA7 fehérjék, melyek az ATP kötő kazettát tartalmazó transzporter család tagjaiként számos anyag plazmamembránon keresztül zajló transzportját végzik. Emellett szerepet játszanak az apoptotikus sejtek eltakarításában is, de ennek pontos mechanizmusa még ismeretlen (Jehle és mtsai, 2006; Hamon és mtsai, 2000). Mindenesetre azt feltételezik, hogy a CED-7 a CED-1-en keresztül vesz részt a szignalizációban (Venegas és Zhou, 2007). A jelátvitel következő lépésében a CED-1/MEGF10 citoplazmatikus régiójához a CED-6, illetve emlős ortológja, a foszfortirozin kötő domént tartalmazó bekebelezési adaptor fehérje 1 (Gulp1) kapcsolódik foszfortirozin kötő doménje segítségével (Liu és Hengartner, 1998). A CED-6/Gulp1 valószínűleg a DYN-1-et, illetve emlős homológját a dinamint aktiválja (Yu és mtsai, 2006), mely hatására beindul a citoskeletális átrendeződés (Hamon és mtsai, 2006; Sullivan és mtsai, 2014). A Gulp1 jelátviteli útvonal a Rac1-nél (a CED-10 ortológja) fut össze a többi útvonallal (Kinchen és mtsai, 2005). A Gulp1 és a Rac1 közötti intermedierek egyelőre ismeretlenek.

A második útvonalban szereplő CED-2, -5 és -12 emlős homológjai a CrkII, a DOCK180 és az ELMO1. A CrkII kapcsolatba lép a DOCK180 guanin nukleotid cserélő faktórral, mely ennek hatására serkenti a Rac1 aktivációját (Albert és mtsai, 2000). Az ELMO1 a DOCK180-hoz kapcsolódva szintén segíti a Rac1 aktiválódását (Gumienny és mtsai, 2001; Wu és mtsai, 2001).

A harmadik jelátviteli út során az ABI-1 a Rac1 aktivitás szabályozásán keresztül, vagy attól független úton is segítheti az apoptotikus sejtek eltakarítását. Az ABL-1 az ABI-1-hez kötődve a fagocitózis negatív szabályozójaként vesz részt a folyamatban (Hurwitz és mtsai, 2009). A harmadik jelátviteli út emlős megfelelője egyelőre még felfedezésre vár.

A dinamín (DYN-1) atipikus GTPáz részt vesz az apoptotikus sejtek (Yu és mtsai, 2006), a zimozán, valamint az immunglobulin G és a komplement komponens 3b_i által

opszonizált részecskék felvételében is, annak ellenére, hogy mindezek különböző fagocita receptorok segítségével kerülnek felismerésre (Gold és mtsai, 1999). A DYN-1 szerepe a bekebelezési fázisban mutatkozik meg, mikor a részecskéket gyorsan bekeríti és internalizálja a fagocita sejt. A DYN-1 a membrán kitüremkedések kialakulásához és az álláb képződéshez (Yu és mtsai, 2006; Gold és mtsai, 1999), valamint a sejtben belül a fagoszóma leválásához járul hozzá (Marie-Anais és mtsai, 2016).



4. ábra: Az elhalt sejtek internalizációja közben aktiválódó jelátviteli útvonalak Bal oldalt a CED-1, -6 és -7 útvonalban részt vevő fehérjéket (Stabilin 2, CED-1/MEGF10, CED-6/Gulp1, CED-7/ABCA1, DYN-1/dinamin, CED-10/Rac1), jobbra a CED-2, -5, és -12 útvonal fehérjéit (integrin $\alpha_v\beta_5$, Bai1, CED-2/CrkII, CED-5/DOCK180, CED-12/ELMO1, CED-10/Rac1), végül jobb alul az ABL-1 és ABI-1 útvonal résztvevőit (ABL-1, ABI-1, CED-10/Rac1) láthatjuk. A homológ fehérjék esetében felül a *C. elegans*-ban megtalálható fehérje, alul az emlős megfelelőjének neve van feltüntetve. Az ábra a Biorender program segítségével készült.

Egyre több kutatás bizonyítja, hogy a nukleozid-difoszfát-kináz (NDPK) fehérjék a dinamin működéséhez szükséges interakciós partnereként funkcionálhatnak. Az NDPK-k foszfát csoportot juttatnak a nukleozid-difoszfátokra, így nukleozid-trifoszfátokat hoznak létre, melyek energiaforrásként szolgálnak a sejt különböző folyamataihoz (Stegg és mtsai,

2003). Az NDPK-k ellátják guanozin-trifoszfáttal (GTP) a dinamin szupercsalád GTPázait, így lehetővé téve azok legnagyobb termodinamikai hatékonysággal történő működését (Takei és mtsai, 1995; Sweitzer és Hinshaw, 1998; Roux és mtsai, 2006). A dinamin és NDPK-k kölcsönhatását több fajban is vizsgálták. *Drosophilában* bizonyították, hogy az NDPK aktivitás kb. 98%-áért felelős AWD fehérje dinaminnal való együttműködése szükséges a szinaptikus membrán internalizációs folyamatokhoz (Krishnan és mtsai, 2001). A humán NDPK-k, a citoszolikus NM23-H1 (Nme1), valamint a mitokondriális NM23-H4 (Nme4) is szerepet játszanak a membrán átalakító folyamatokban, a dinamin fehérjecsald tagjainak funkcióját támogatva (Boissan és mtsai, 2014). Vellainé Takács Krisztina munkacsoportja *C. elegans* modellorganizmust használva bizonyította, hogy a férgekben jelen lévő NDPK, az NDK-1 részt vesz az apoptotikus sejtek internalizációjában (Fancsalszky és mtsai, 2014).

1.2.4 Az apoptotikus sejtek és makrofágok általi fagocitózisuk immunszabályozó funkciói

Az apoptotikus sejtek hatékony és gyors eltakarítására rendkívül nagy szükség van a szöveti homeosztázis fenntartása érdekében. A szervezetünkben folyamatosan keletkező apoptotikus sejtek és eltakarításuk a szervezet professzionális fagocita sejtjei, vagy a környező sejtek által normál esetben nem okoznak gyulladást vagy autoimmunitást (Hart és mtsai, 2008). Így fertőzés vagy steril gyulladás hiányában az apoptózist, illetve az apoptotikus sejtek bekebelezését immunológiailag csendes, sőt gyulladáscsökkentő folyamatnak tekinthetjük, ugyanis az apoptotikus sejtek az őket felvett makrofágokban kifejezetten anti-inflammatorikus útvonalakat indukálnak (5. ábra). Így pl. a Gram-negatív baktériumok sejtfalában megtalálható lipopoliszacharid (LPS) hatására létrejövő gyulladásos válasz jelentősen csökken, ha a makrofágokat előinkubáljuk apoptotikus sejtekkel (Voll és mtsai, 1997). Ezen kívül, a gyulladás kialakulását követően az apoptotikus neutrofil granulociták makrofágok általi bekebelezése segít elindítani a gyulladásos folyamat befejezését, így hozzájárul a gyulladást követő megfelelő szövetregenerációhoz (Savill és mtsai, 2002; Thorp, 2012).

1.2.4.1 Az apoptotikus sejtek által kibocsátott immunszabályozó molekulák

Érdekes módon az apoptotikus sejtek, ellentétben a primer nekrotikus sejtekkel, valamilyen szinten még akkor is megtartják az anti-inflammatorikus jellegüket, ha szekunder

nekrózison esnek át és sejttartalmuk kijut a szövetek közé (Birge és mtsai, 2008). Ez azzal magyarázható, hogy az apoptotikus sejtekben a DAMP molekulák megváltoznak, így a sejtől való kijutást követően sem érik el ugyanazt a hatást, mint, melyek egy hirtelen hatásra károsodott nekrotikus sejtől szabadulnak fel. Az egyik ilyen fontos DAMP a genomi DNS, mely többek között beindítja a dendritikus sejtek érését (Marichal és mtsai, 2011). Apoptotikus sejtekben a genomi DNS CAD-ok általi erős hidrolízisének következtében kb. 200 bp méretű DNS fragmentek keletkeznek, melyek jóval kevésbé rendelkeznek immunrendszer aktiváló tulajdonsággal (Enari és mtsai, 1998). Ha a DNS degradációja nem megy végbe az elhaló sejtben vagy az azt bekebelező fagocita sejtben, akkor DNS-specifikus antitestek megjelenése által autoimmunitás alakul ki (Enari és mtsai, 1998), mely arra vezethető vissza, hogy a nem megfelelően megemésztett DNS fragmenteket a makrofágokban felismeri a retinsav-indukálható gén I (RIG-I) mintázatfelismerő receptor, így aktiválódik az interferonok és különböző gyulladási citokinek génexpresszióját aktiváló interferon szabályozó faktor 3 (IRF-3) transzkripciós faktor (Okabe és mtsai, 2009). Az aktivált kaszpáz-8 is akadályozza a RIG-I/IRF-3 útvonalat, a RIPK1 proteolitikus inaktiválásán keresztül, mely a RIG-I komplex egyik fontos komponense (Rajput és mtsai, 2011). A sejtmagban a kromatin szerkezet kialakításában részt vevő nagy mobilitású csoport 1 (HMGB1) fehérje egy másik jól ismert DAMP, mely nekrotikus sejtekből passzív módon távozik, azonban apoptotikus sejtekben a hiszton fehérjék kaszpáz függő hipoacetilációjának köszönhetően erősen a DNS-hez kötve marad (Scaffidi és mtsai, 2002).

Az apoptotikus sejtek számos anti-inflammatorikus molekulát, így pl. transzformáló növekedési faktor béta (TGF β) és IL10 citokineket bocsátanak ki (Chen és mtsai, 2001; Gao és mtsai, 1998). A TGF β a monocita migráció stimulálásával és növekedési faktorok termelésével részt vesz a gyulladási válasz kialakulásában (Wahl és mtsai, 1992), valamint számos egyéb funkciójával a visszaszorításában is. Ilyen pl. a neutrofilek és T limfociták endotéliumhoz történő adhéziójának gátlása (Gamble és mtsai, 1988), a makrofágok deaktiválása (Tsunawaki és mtsai, 1988), és a TNF α hatásának ellensúlyozása (Tsunawaki és mtsai, 1988). Ezen kívül a TGF β és az IL10 hozzájárulnak a regulatorikus T sejtek (T_{reg}) differenciációjához is (Chen és mtsai, 2003; Levings és mtsai, 2002; Konkel és mtsai, 2014), mely fontos szerepet játszik az autoimmunitás kialakulásának megakadályozásában (Sakaguchi és mtsai, 2010).

Az apoptotikus sejtek által termelt annexin A1 fehérjét eredetileg egy bekebelezési jelként azonosították, mely az apoptotikus sejtek hatékony eltakarítását segíti (Arur és mtsai, 2003), azonban az apoptotikus sejtek felszínén lévő annexin A1 ezen felül gátolja a

dendritikus sejtek és ezáltal a T sejtek aktivációját is az apoptotikus sejtekből származó antigének ellen (Weyd és mtsai, 2013). Az annexin A5 és A13 molekulák szintén csökkentik a dendritikus sejtek aktivációját, így hozzájárulnak az apoptotikus sejtekkel szembeni immuntoleranciához (Linke és mtsai, 2015). Az annexin A1 gyulladási monociták esetében képes csillapítani az IL6 hatásait, valamint a TNF α termelését is (Pupjalis és mtsai, 2011).

Az apoptotikus sejtek a gyulladási sejtek toborzását gátló jeleket is kibocsátanak, ezek az ún. "maradj távol" (Stay away) szignálok. Az apoptotikus stimulusra termelődő laktoferrin pl. szelektíven gátolja a neutrofil és eozinofil granulociták migrációját, de nem befolyásolja a monociták és makrofágok mozgását az apoptotikus sejtek által kibocsátott kemotaktikus anyagok irányába (Bournazou és mtsai, 2009; Bournazou és mtsai, 2010).

Számos, az apoptotikus sejtekből származó kemotaktikus jel szintén anti-inflammatorikus molekulának tekinthető. Így pl. a TSP-1 képes aktiválni a TGF β -t (Lopez-Dee és mtsai, 2011), a fraktalkin gátolja az LPS-indukálta TNF α termelést (Zujovic és mtsai, 2000) és az LPC megakadályozza a szintén LPS hatásra bekövetkező nitrogén-monoxid (NO) és gyulladási citokin termelést (Huang és mtsai, 2010). Az ATP, amint kaszpáz szabályozott módon a pannexin csatornákon keresztül kikerül az apoptotikus sejtekből (Sandilos és mtsai, 2012), legtöbbször még az apoptotikus sejt felszínén azonnal adenzin-monofoszfáttá (AMP) (Yamaguchi és mtsai, 2014), majd adenzinná bomlik a bekebelező makrofágok sejt felszíni 5' nukleotidáz enzimjének hatására (Sándor és mtsai, 2017; Köröskényi és mtsai, 2011). Az így keletkező adenzin a makrofágok A_{2A} receptorain (A2AR) hatva az adenilát cikláz/protein kináz A útvonalon keresztül csökkenti a NO függő neutrofil migrációt serkentő faktorok (pl. MIP2) termelődését (Köröskényi és mtsai, 2011). A makrofágok felszínén többféle adenzin receptor is megtalálható, a már említett A_{2A} mellett pl. az A₃ (A3R) is kifejeződik. Az A2AR-el ellentétben az A3R támogatja a neutrofil migrációt serkentő faktorok felszabadulását a fagocitáló makrofágokból (Duró és mtsai, 2014). Hogy ennek ellenére az adenzin mégis csak anti-inflammatorikus válaszokat vált ki, annak köszönhető, hogy az A2AR expressziója nő (Köröskényi és mtsai, 2011), az A3R expressziója pedig csökken az apoptotikus sejtet bekebelező makrofágokban (Duró és mtsai, 2014).

1.2.4.2 A makrofágok immunszabályozó funkciói apoptotikus sejtek bekebelezését követően

1.2.4.2.1 Anti-inflammatorikus jelátviteli útvonalak aktiválódása sejtfelszíni fagocita receptorokon keresztül

Az apoptotikus sejtek felszínére került PS amellett, hogy "egyél meg" jelként funkcionál, fokozza a koleszterol kiáramlást a bekebelező sejtéből, így elősegítve a homeosztázis fenntartását (Kiss és mtsai, 2006), valamint serkenti az anti-inflammatorikus citokinek (pl. TGF β) termelését, ezzel hozzájárulva az apoptotikus sejtekből felszabaduló antigénekkal szembeni immuntolerancia kialakításához (Huynh és mtsai, 2002). A PS receptorok közül pl. a Stabilin-2 szerepet játszik a fagocitáló makrofágok fokozott TGF β 1 termelésének elindításában (Park és mtsai, 2008a). A MerTK PS receptor direkt anti-inflammatorikus hatása az LPS-indukált kappa B-inhibitor (I κ B) degradáció megakadályozásán keresztül érvényesül, így gátolja a nukleáris faktor kappa B-t (NF- κ B) és az általa aktiválódó gyulladási folyamatokat (Tibrewal és mtsai, 2008). A többi fagocita receptor szerepét az apoptotikus sejtek fagocitózisát kísérő anti-inflammatorikus hatásokban még vizsgálják, az azonban tisztázódni látszik, hogy a CD36 és az $\alpha_v\beta_3$ integrin receptorok nem vesznek részt a folyamatban (Lucas és mtsai, 2006). Érdekes módon a TG2 integrin koreceptor hiányában pro-inflammatorikus citokinek termelődnek apoptotikus sejtek bekebelezését követően (Falasca és mtsai, 2005). Ez a jelenség azonban valószínűleg nem az integrin jelátvitel zavarára, hanem a TG2 TGF β makrofágok általi aktivációjában betöltött szerepére vezethető vissza (Nunes és mtsai, 1995).

1.2.4.2.2 Anti-inflammatorikus jelátviteli útvonalak aktiválódása magreceptorokon keresztül

A makrofágok által felvett apoptotikus sejtek lebontásának gyorsan meg kell történnie, hogy a fagocita újra további sejtek eltávolítására alkalmas állapotba kerüljön. Az elhalt sejtek bekebelezése nagy metabolikus stresszt jelent a makrofágok számára, melyre metabolizmusuk több ponton történő megváltoztatásával reagálnak. Ezek a változások az immunszuppresszív folyamatokhoz is hozzájárulnak. Így pl. a lipid érzékelő receptorok, melyek a bekebelezés során transzkripciós szinten szabályozzák a lipidek metabolikus folyamatait, egyben gátolják a gyulladási folyamatokat is, melyeket pl. patogén

mintázatfelismerő receptor (TLR) jelátvitel indít el a makrofágokban. Normál esetben az NF- κ B célgenjei a promótereiken lévő korepresszor komplexeknek köszönhetően csendesítve vannak. Gyulladás jelátvitel hatására a korepresszor komplex fehérjéi ubikvitinálódnak és a 19S proteoszóma által lebomlanak, miközben az aktiválódott NF- κ B a sejtmagba transzlokálódik, és a gyulladásos gének promótereire kötődve aktiválja azok expresszióját. Apoptotikus sejtek bekebelezése során a PPAR γ magreceptor ligand kötődés hatására megakadályozza az NF- κ B mediált gének expresszióját, mégpedig a korepresszorok promóterekhez való kötődésének fenntartásával. A PPAR γ -hoz hasonló transzrepresszióra képes a máj X receptor (LXR) magreceptor is. Ezek a receptorok a ligandjuk kötődését követően konformáció változáson esnek át, melynek hatására szumoilálódhatnak, így a korepresszor komplexhez kötődnek, megakadályozva annak proteolitikus lebomlását (Kidani és mtsai, 2012).

A PPAR δ szignálút szintén akadályozza az NF- κ B által mediált génexpressziót, azonban más útvonalon keresztül. A PPAR δ ligand hiányában köti a BCL-6 transzkripciós faktort, mely mikor a PPAR δ ligand kötését követően felszabadul, szekvenca specifikus represszorként gátolja a gyulladásos gének kifejeződését (Lee és mtsai, 2003).

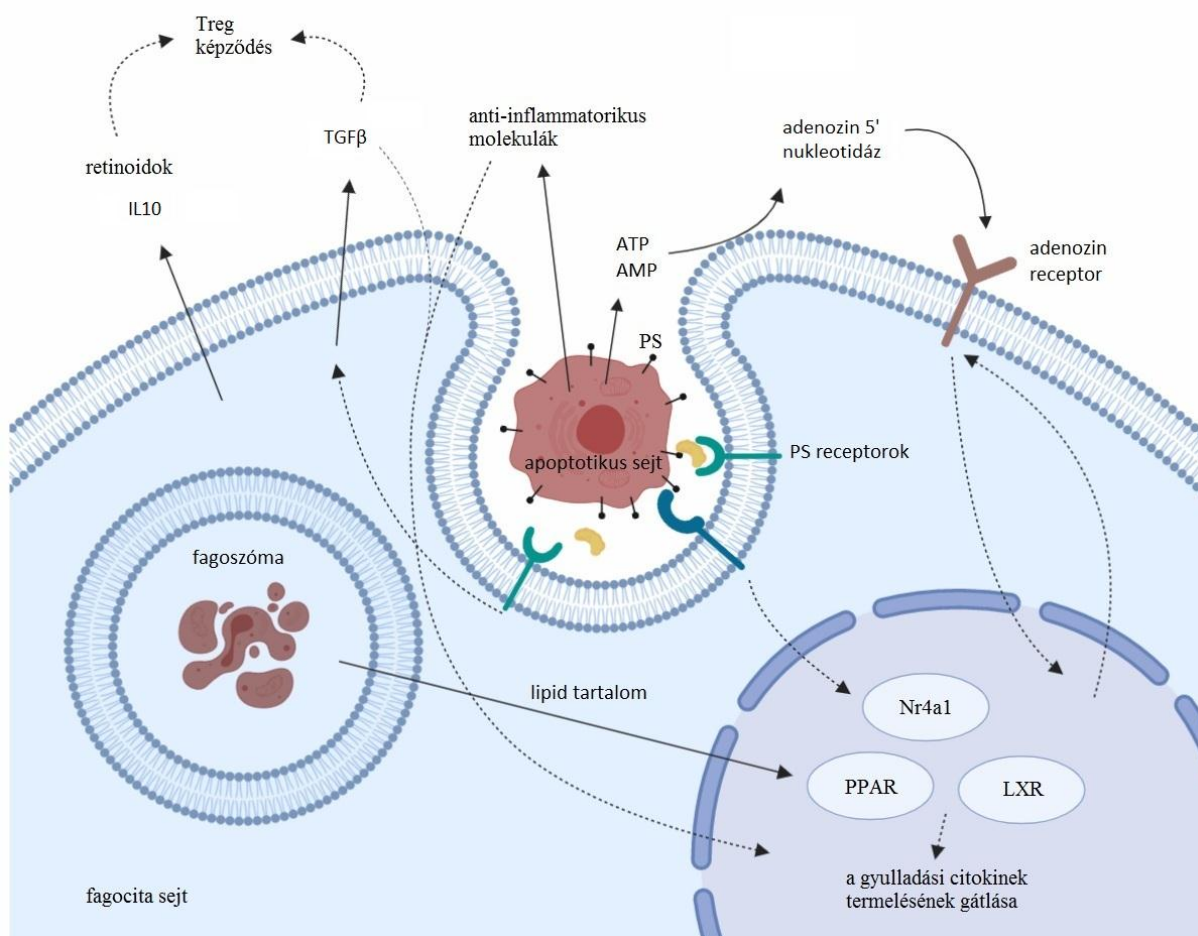
A magreceptorok ligand kötést követően serkentik különböző fagocita receptorok génexpresszióját is, ezáltal növelve a makrofágok fagocitózis kapacitását. Némelyik receptor, mint pl. a MerTK expressziójának LXR általi növelése direkt módon történik, azonban más receptoroké a retinsav receptor alfa (RAR α) közreműködésével (Rébé és mtsai, 2009; Sarang és mtsai, 2014). Az apoptotikus sejteket fagocitáló makrofágokban a magreceptorok aktivációja serkenti a retinsav szintéziséért felelős retinaldehid-dehidrogenáz (RALDH) enzim expresszióját (Garabuczi és mtsai, 2013). A retinsavak, köztük a RAR és a retinoid X receptor (RXR) ligandjai, felerősítik a lipid érzékelő magreceptorok és a retinsav receptorok transzkripciós aktivitását (Sarang és mtsai, 2014). Az aktivált magreceptorok az adenzin anti-inflammatorikus hatásáért felelős A2AR expresszióját is serkentik (Köröskényi és mtsai, 2011).

A lipid érzékelő magreceptorokon kívül az Nr4a1 árva magreceptor is anti-inflammatorikus hatással bír az apoptotikus sejtek bekebelezése során (Ipseiz és mtsai, 2014), ugyanis szintén gátolja a TLR jelátvitelt az NF- κ B aktiválódásának megakadályozásán keresztül (Li és mtsai, 2016; Li és mtsai, 2015).

1.2.4.2.3 Az apoptotikus sejtek felvételét követően a makrofágok által termelt anti-inflammatorikus molekulák

Az apoptotikus sejt felvételt követően a makrofágok által termelt molekulák közül az elsőként felfedezett TGF β és IL10 anti-inflammatorikus citokineken (Voll és mtsai, 1997; Fadok és mtsai, 1998a) kívül már számos más molekulát is azonosítottak. Ezek között megtalálhatóak lipid mediátorok, mint pl. a prosztaglandin E₂ és F_{1 α} , lipoxin A₄ vagy a vérlemezke-aktiváló faktor, melyek szintézise TGF β függő (Freire-de-Lima és mtsai, 2006).

A bekebelezés során a makrofágokban termelődő retinoidok szintén kikerülhetnek a környezetbe és hozzájárulhatnak a TGF β függő T_{reg} sejtek képződéséhez. A T_{reg} sejtek központi szerepet játszanak az autoimmunitás kialakulásának elkerülésében, így a TGF β és a retinoidok nagyban hozzájárulnak ahhoz, hogy az apoptotikus sejtek bekebelezését követően nem alakul ki autoimmun folyamat (Sakaguchi és mtsai, 2010).



5. ábra Az apoptotikus sejtek anti-inflammatorikus hatásai Az apoptotikus sejtek különböző anti-inflammatorikus molekulákat termelnek (pl. TGF β , IL10, annexin I, TSP-1, fraktalkin), hogy gátolják a fagocita sejtek gyulladási citokin termelését. Az ATP, miután kijutott az apoptotikus sejtől a kaspázok által szabályozott pannexin csatornán keresztül, gyorsan adenzinná alakul a makrofágok sejt felszíni 5' nukleotidáz aktivitásának köszönhetően. Az így keletkező adenzin a makrofágok A2A receptorán keresztül gátolja a fagocita sejtben a NO függő neutrofil migrációs faktorok termelődését, gyulladási közegben pedig az LPS indukálta gyulladási citokin termelést. Az apoptotikus sejtek felszínén lévő PS számos PS érzékelő receptort aktivál a makrofágokon, melyek közül néhány a pro-inflammatorikus citokinek termelését akadályozó jelátviteli útvonalakat indukál. A bekebelezést követően az apoptotikus sejtek lipid tartalma aktiválja a fagocita lipid érzékelő magreceptorait (pl. LXR-ok, PPAR-ok), melyek ennek hatására gátolják az NF- κ B által szabályozott gyulladási citokin termelést. Az apoptotikus sejteket bekebelező makrofágok által termelt TGF β , IL10 és retinoidok parakrin és autokrin módon hatva erősítik és fenntartják az anti-inflammatorikus választ és hozzájárulnak a T_{reg} sejtek képződéséhez, ezáltal pedig az autoimmunitás kialakulásának megakadályozásához. Az ábra a biorender program segítségével készült.

1.3 Elhalt sejtek eltakarítása szövetregeneráció során

A gyulladást általában negatív eseményként értelmezzük, azonban az akut szöveti sérülések esetében a gyulladás elengedhetetlen a megfelelő regeneráció lezajlásához. Akár egy bakteriális vagy virális fertőzés esetén, a steril szöveti sérülés hatására is bekövetkezik egy pro-inflammatorikus válasz, mely során gyulladási sejtek toborzása történik a sérülés helyére. Ezt követi a sérült, elhalt sejtek, sejttermelékek fagociták általi eltakarítása, ami hozzájárul a gyulladás megszűnéséhez. Ekkor kezdődik el a szövetregeneráció második fázisa, mely során a valódi regeneráció zajlik, mely magában foglalja az ECM újrászerveződését, az érképződést, és a szöveti homeosztázis helyreállítását.

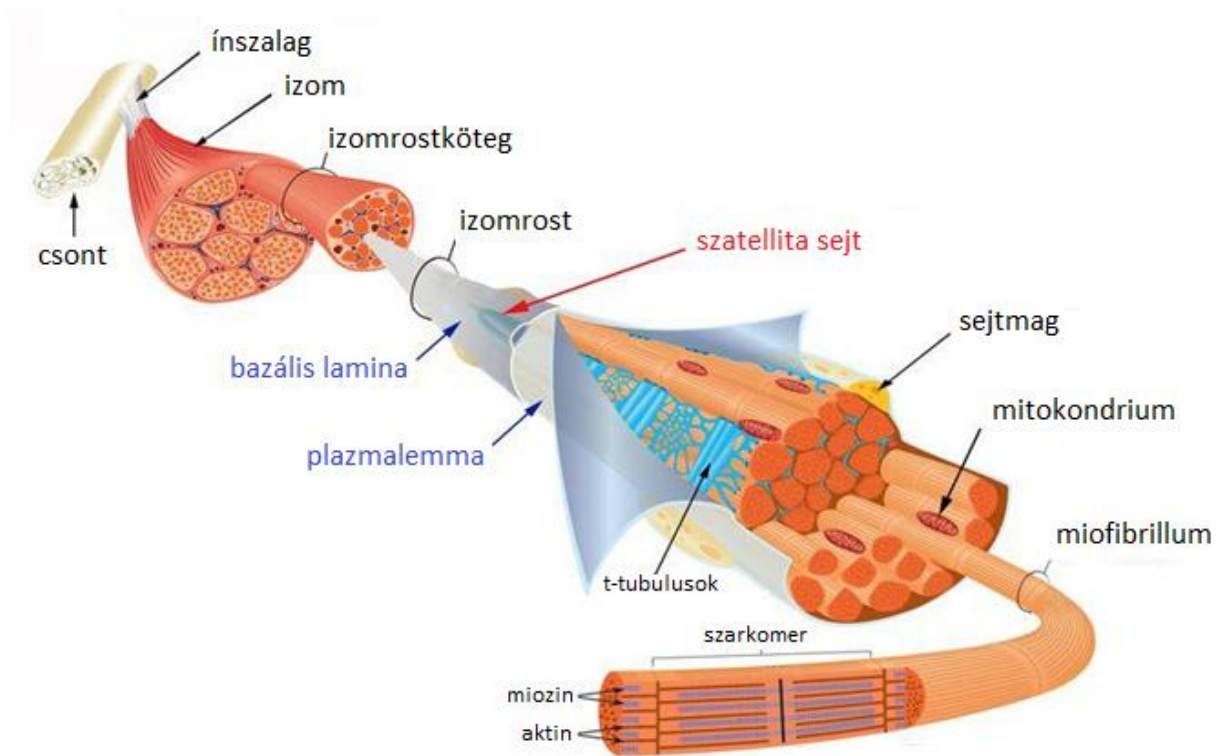
A makrofágok számos szövet regenerációja során mind a pro-inflammatorikus, mind a felépülési fázisban fontos szerepet játszanak, ugyanis hozzájárulnak a gyulladás kialakulásához és a megszűnéséhez is. Hogy ezeket az eltérő funkciókat el tudják látni, a makrofágok folyamatosan változtatják gyulladási állapotukat a regeneráció során. Ezeket a makrofág alcsoportokat legegyszerűbben a sejt felszínen kifejezett markerek alapján tudjuk beazonosítani (Geissmann és mtsai, 2003). A károsodott szövetek olyan monocitákat vonzanak, melyek limfocita antigén 6 komplexet (Ly6C), CCL2 kemokin receptort (CCR2) és alacsony mennyiségű CX3CR1-et fejeznek ki felszínükön. Ezekből a monocitákból a szövetek közt CCR2-öt nem tartalmazó makrofágok lesznek, melyek csak rövid ideig vannak jelen a károsodott helyen, majd átalakulnak Ly6C-t nem, de CX3CR1-et nagy mennyiségben kifejező makrofágokká, melyek a regeneráció végéig jelen vannak (Juban és Chazaud, 2017). Az *in vivo* felfedezések előtt a makrofágok gyulladási fázisairól, más néven polarizációjáról kizárólag *in vitro* kísérletek alapján volt információnk, melyek során elsősorban humán monocita eredetű makrofágokat stimuláltak különböző citokinekkal. Innen erednek a makrofág aktivációs állapotok M1 és M2 elnevezései. Az M1 makrofágok interferon γ (IFN γ) vagy LPS, míg az M2 makrofágok IL4 vagy makrofág kolóniastimuláló faktor (M-CSF) hatására jönnek létre. Ezek az *in vitro* létrehozható, jól elkülönülő makrofág polarizációs állapotok *in vivo* nem figyelhetők meg, ugyanis a szöveti környezetben jóval több faktor játszik szerepet a makrofágok gyulladási állapotának kialakításában. Így *in vivo* az aktivációs állapotok egész spektruma jellemezheti a szövetben jelen lévő makrofágokat (Mosser és Edwards, 2008).

1.3.1 Vázizom regeneráció, mint a szöveti regeneráció vizsgálatához használatos modell

A szöveti regeneráció során bekövetkező események megfigyeléséhez kiváló modell a sérülést követő vázizom regeneráció, mely során a különböző sejtek kinetikája, gyulladási állapota és egyéb tulajdonságai már jól ismertek. A vázizom károsodása különböző stimulusokkal (pl. zúzódás, fagyasztás, toxin injekció) kiváltható, de a regeneráció során, ezektől függetlenül, hasonló sejtes és molekuláris események zajlanak le.

1.3.1.1 A vázizom felépítése

A vázizmokat hosszú, henger alakú, többmagvú izomrostok/miociták alkotják, melyeket kötőszövet tart össze. Minden izomrost miofibrillumokból áll, melyek tartalmazzák az izom legkissebb funkcionális egységeit, a szarkomereket. A szarkomerek döntően az izomkontrakcióért felelős aktin és miozin fehérjékből állnak. Az alapmembrán és az izomrostok plazmamembránja között nyugvó állapotban lévő összejtek is találhatóak az izomban. Ezek az ún. szatellit sejtek felelősek a születést követő vázizom növekedésért, fenntartásért és regenerációért (Mauro, 1961) (6. ábra).

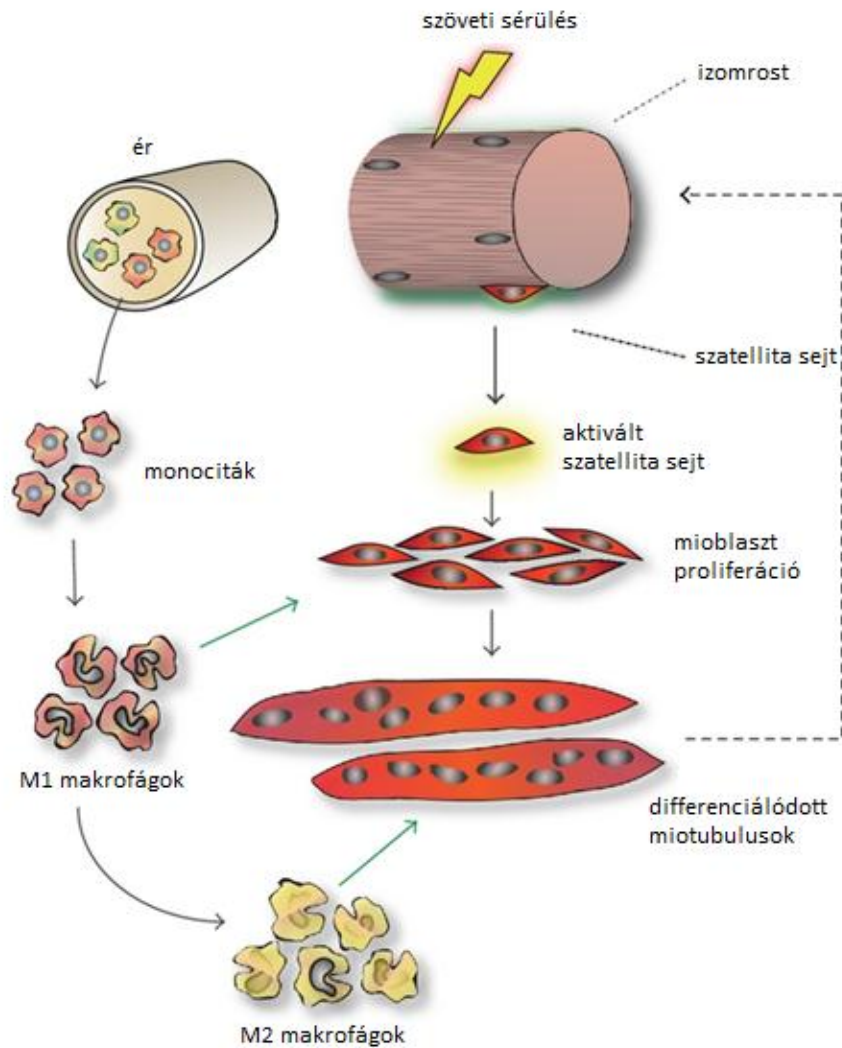


6. ábra: A vázizom felépítése A harántcsíkolt izomrostok többmagvú óriás sejtek, melyekben a miofilamentumok összerendeződve miofibrillumokat képeznek. A miofibrillumok aktint és miozint tartalmazó összehúzó egységei a szarkomerek, melyek a szomszédos miofibrillumokon azonos magasságban helyezkednek el, ebből adódik a harántcsíkolt. A bazális lamina és az izomrostok plazmamembránja között nyugvó állapotban található őssejtek a szatellita sejtek. Az ábra (Relaix és Zammit, 2012) alapján lett módosítva.

1.3.1.2 A vázizom regeneráció folyamata

Sérülést követően a vázizom sokmagvú sejtjei, az izomrostok nekrozissal halnak el és steril gyulladás alakul ki. Ennek hatására az izom őssejtjei, a szatellita sejtek aktiválódnak és elindul bennük a miogénikus program (Snow, 1977). Ezzel egyidőben immunsejtek, köztük makrofágok és neutrofil granulociták infiltrálják a sérült területet. A regeneráció kezdeti gyulladással fázisa során megfigyelhetjük a miogén és a fibro-adipogén progenitorok (FAP) felszaporodását, a pro-inflammatorikus immunsejtek (neutrofilek, gyulladási makrofágok) számának növekedését és a nekrotikus izomrostok eltakarítását. Néhány nappal később a neutrofilek eltűnnek és egyre több makrofág jelenik meg. Az izomregeneráció második fázisa, a felépülési fázis a miogén progenitorok differenciációja és fúziója révén frissen keletkezett, kisméretű izomrostok megjelenésével veszi kezdetét. A FAP-ok száma csökken,

angiogenezis figyelhető meg. Végül az újonnan keletkezett izomrostok megnőnek, és visszaáll az izomszövet eredeti állapota (Yin és mtsai, 2013). A megfelelő regenerációhoz számos egymást követő eseménynek a megfelelő helyen, időben és sorrendben kell végbemennie (7. ábra). Ha a regeneráció első napjaiban túl korai anti-inflammatorikus hatás éri az izmot, vagy néhány nappal később blokkoljuk az anti-inflammatorikus hatásokat, akkor a regenerációs program zavart szenvedhet (Perdiguero és mtsai, 2011).



7. ábra: A vázizom regeneráció eseményei A szatellita sejtek izom rezidens őssejtek, melyek a bazális lamina alatt helyezkednek el nyugalmi állapotban (jobb felül). Izom sérülés esetén a szatellita sejtek aktiválódnak, elkezdenek mioblasztként proliferálni, majd ezt követően miotubulusokká fuzionálnak és differenciálódnak, melyek később megnőnek, így helyettesítik a károsodott izmot. Számos egyéb sejtípus is befolyásolja a regeneráció kimenetelét, ilyenek pl. az erekből kilépő gyulladási sejtek (bal felül). A pro-inflammatorikus monociták és a neutrofil granulociták (nincs ábrázolva) már nem sokkal a sérülést követően megjelennek a károsodás helyén, ahol a monociták pro-inflammatorikus (M1) makrofágokká differenciálódnak. Ezek a sejtek eltávolítják az elhalt sejtörmeléket és számos citokin termeléséért is felelősek, melyek a mioblaszt proliferációt támogatják. A regeneráció későbbi fázisában M2 makrofágok jelennek meg, melyek a mioblasztok differenciációját és fúzióját támogatják. Az ábra (Kharraz és mtsai, 2013) alapján lett módosítva.

1.3.1.2.1 A szatellita sejtek szerepe a vázizom regeneráció során

A szatellita sejtek az izomregenerációt az embrionális izomfejlődéshez hasonló módon, miogenikus transzkripciós faktorok megfelelő időben történő kifejezésével vezénylik le. A nyugvó állapotban lévő szatellita sejtek a Pax7 (Seale és mtsai, 2000) és a Myf5 (Beauchamp és mtsai, 2000) transzkripciós faktorokat fejezik ki, ezek az ún. miogén szabályozó faktorokhoz (MRF) tartoznak. Sérülés esetén a szatellita sejtek aktiválódnak és miogén prekursorokként (mioblasztok) elkezdnek szaporodni. Eközben a Pax7 és a Myf5 mellett a MyoD (Sacco és mtsai, 2008) transzkripciós faktort is kifejezik, mely szintén az MRF-ekhez tartozik. A későbbiekben a miogén prekursorok kilépnek a sejtciklusból és véglegesen differenciálódnak, miközben késői MRF-eket expresszálnak, mint pl. a miogenin (Cornelison és Wold, 1997) és az MRF4 (Cornelison és mtsai, 2000; Smith és mtsai, 1994; Yablonka-Reuveni és Rivera, 1994). Majd ezek a sejtek fuzionálnak egymással és a már létező izomsejtekkel, így képezve új, működőképes izomrostokat. A proliferáló miogén prekursorok egy kis része, mely az öfenntartásért felelős, nem differenciálódik, hanem represszálja a MyoD-t, valamint serkenti a Myf5 és Pax7 expresszióját, így biztosítva az őssejtek jelenlétét a továbbiakban is (Kuang és mtsai, 2007).

1.3.1.2.2 A vázizom regenerációban részt vevő egyéb sejtek

A vázizom regenerációban az elengedhetetlen szatellita sejteken kívül más sejtípusok is fontos szerepet játszanak. A sérülés helyén legnagyobb számban immunsejtek fordulnak elő. Rögtön a sérülést követően egyrészt a keringésből kilépő neutrofilek és monociták (Saclier és mtsai, 2013a), másrészt feltehetőleg a környező kötőszövetekből származó makrofágok (Brigitte és mtsai, 2009) vándorolnak a sérült izomhoz. Eozinofil granulociták és T_{reg} sejtek infiltrációját is megfigyelhetjük, azonban ezek jóval alacsonyabb számban vannak jelen, mint a monociták/makrofágok (Mounier és mtsai, 2013). Ezeknek elsősorban az izomregeneráció kezdeti szakaszában van szerepe. Az eozinofilek elsősorban a FAP-ok (Heredia és mtsai, 2013), a T_{reg} sejtek pedig a miogén prekursorok sokszorozódásában vesznek részt (Burzyn és mtsai, 2013). Az immunsejteken kívül a fibroblaszt sejtek is szerepet játszanak az izomregenerációban. A FAP-ok száma gyorsan megsokszorozódik a sérülést követően, azonban néhány napon belül visszatér a normál szintre (Lemos és mtsai, 2015). Az izomregeneráció későbbi szakaszában lezajló angiogenezis sejtjei szintén befolyásolják a folyamatot. Az endotél sejtek támogatják a miogén sejtek proliferációját és

differenciációját, míg a peri-endoteliális sejtek (pl. periciták, simaizomsejtek) a nyugalmi állapotba való visszatérésükhöz járulnak hozzá (Abou-Khalil és mtsai, 2009; Christov és mtsai, 2007).

1.3.1.2.3 Makrofágok a vázizom regeneráció során

A kardiotoxin (CTX) kígyóméreg okozta izomsérülés esetén a Ly6C-t kifejező (Ly6C⁺) monociták a CCL2-CCR2 tengelyen keresztül 24 órán belül belépnek az izomba és számuk a második nap kezdetétől csökkenni kezd, miközben megjelennek a Ly6C-t nem kifejező (Ly6C⁻) sejtek. A harmadik nap végére már szinte az összes Ly6C⁺ makrofág Ly6C⁻ sejté konvertálódik (Arnold és mtsai, 2007; Varga és mtsai, 2016a). A Ly6C⁻ makrofágok proliferálnak és számuk csak akkor csökken le, amikor az izomban a regeneráció végeztével visszaáll a sérülést megelőző állapot.

A Ly6C⁺ és Ly6C⁻ makrofágok egymás utáni megjelenése az izomregeneráció speciális eseményeivel köthető össze. A Ly6C⁺ makrofágok jelenléte egybeesik a nekrozissal elhaló izomrostok makrofágok általi eltakarításával, a miogenikus őssejtek aktivációjával és proliferációjával, valamint a FAP-ok osztódásával. Később Ly6C⁻ makrofágokat figyelhetünk meg a kisméretű fiatal miotubulusok körül és ezek növekedése, valamint az ezzel párhuzamosan zajló ECM újrászerveződés és angiogenesis során. *In vitro* és *in vivo* vizsgálatok is kimutatták, hogy a pro-inflammatorikus makrofágok stimulálják a miogenikus prekursorok proliferációját, míg az anti-inflammatorikus makrofágok a végső differenciációjukat (miogenin expresszió) és többmagvú miotubulusokká történő fúziójukat támogatják (Saclier és mtsai, 2013b). A FAP-ok sorsa az izomregeneráció során szintén függ a makrofágoktól, ugyanis a makrofágok által termelt TNF α serkenti a FAP apoptózist, míg az általuk termelt TGF β épp ellenkezőleg hat. A fokozott TNF α jelátvitel, illetve a makrofágok sérült szövetbe történő belépésének gátlása túlzott mátrix felhalmozódáshoz és izomfibrózishoz vezet (Lemos és mtsai, 2015). Makrofágok hiányában a megfelelő érképződés sem zajlik le a regenerálódó izomban (Ochoa és mtsai, 2007; Zordan és mtsai, 2014). Az AMP aktivált protein kináz $\alpha 1$ (AMPK $\alpha 1$) hiányos makrofágokkal rendelkező egerekben is csökkent angiogenezist tapasztaltak (Zhu és mtsai, 2016), valamint ugyanezekben az egerekben megfigyelték, hogy a gyulladással járó makrofágok az izomregeneráció során nehezebben alakulnak át a szöveti regenerációt elősegítő "gyógyító" makrofágokká (Mounier és mtsai, 2013). Ezek alapján arra következtethetünk, hogy az anti-

inflammatorikus fenotípussal rendelkező "gyógyító" makrofágok a hatékony érzékeléshez is hozzájárulnak.

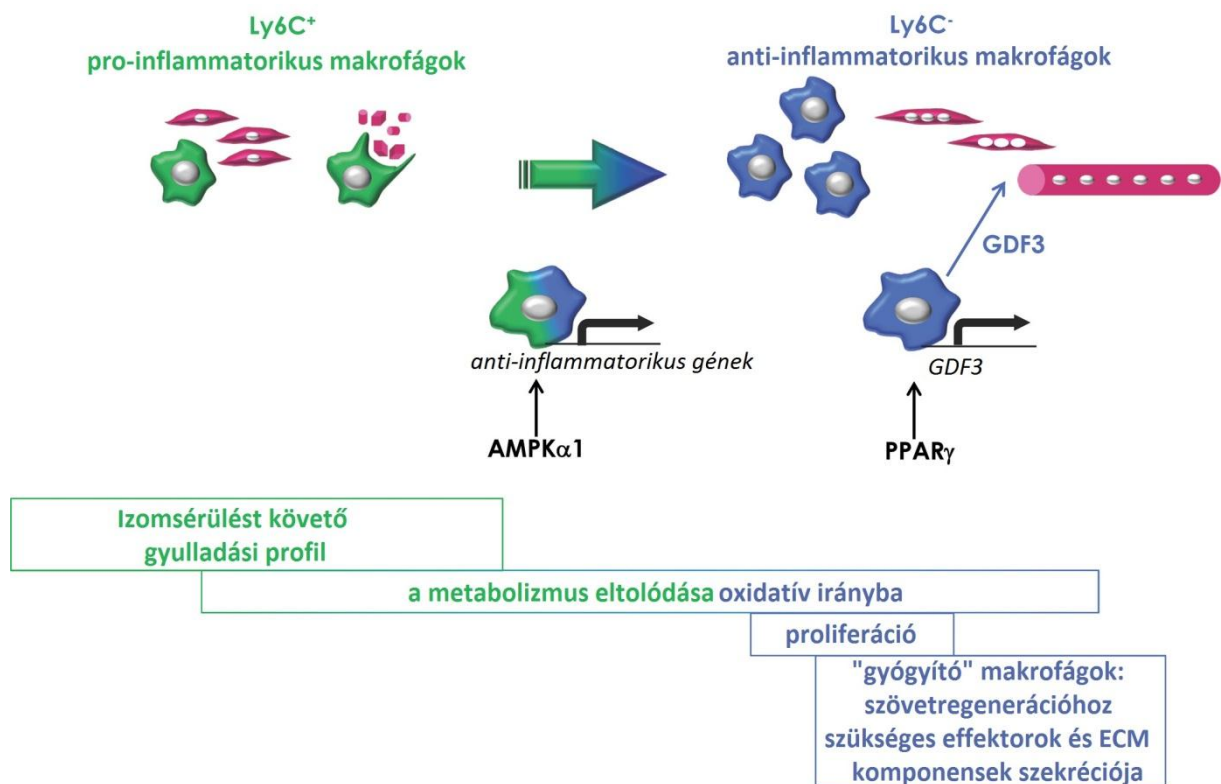
1.3.1.2.3.1 A makrofágok metabolikus átprogramozása

A makrofág polarizáció két végén elhelyezkedő M1 és M2 sejtek nem csak sejtfelszíni fehérjemintázatukban és funkciójukban különböznek, hanem anyagcseréjük is eltér egymástól. Az M1 makrofágokra jellemző, hogy anyagcseréjükben az anaerob glikolízis dominál. Így pl. ezekben a sejtekben a 6-foszforukto-2-kináz/fruktóz-2-6-biszfoszfátáz enzim kináz aktivitása révén magas fruktóz-2,6-biszfoszfát szint tapasztalható, mely serkenti a glikolízist (Rodriguez -Prados és mtsai, 2010). A megemelkedett glikolízishez hozzájárul a hipoxia-indukálható faktor-1 α (HIF-1 α), melynek transzkripcióját az NF- κ B aktiválja (Kim és mtsai, 2006; Rius és mtsai, 2008). A HIF-1 α ezen kívül megemeli az IL1 β expresszióját, ezzel is hozzájárulva a pro-inflammatorikus fenotípus kialakulásához (Tannahill és mtsai, 2013). Az M1 makrofágokban a pentóz-foszfát útvonal (PPP) aktivitása is megemelkedik, mivel a képződő nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát redukált formája (NADPH) szükséges a NADPH oxidáz enzim működéséhez, mely a ROS képződését katalizálja. Ezekkel ellentétben a citromsav ciklus és az oxidatív foszforiláció gátolt az M1 makrofágokban. Az oxidatív foszforiláció blokkolása a gyulladási makrofágokban a HIF-1 α aktiváció hatására termelődő NO által valósul meg (Takeda és mtsai, 2010; Albina és mtsai, 1988), mely gátolja a mitokondrium belső membránjában lévő elektrontranszport lánc IV. komplexét. Az LPS aktiváció hatására a makrofágokban a citromsav ciklusban több ponton elakadást tapasztalhatunk, így bizonyos intermedierek felhalmozódnak (Ryan és O'Neill, 2017). Ilyen pl. a szukcinát, mely részt vesz a gátolt normál mitokondriális elektrontranszport miatt kialakuló fordított elektron áramlás során bekövetkező mitokondriális ROS termelésében (Mills és mtsai, 2016). Ezen kívül a szukcinát szintén hozzájárul a metabolizmus anaerob irányba történő eltolódásához a HIF-1 α aktiválásán keresztül (Selak és mtsai, 2005). Az aktivált M1 makrofágok az extracelluláris térbe is szekretálják a szukcinátot és növelik a szukcinát receptor expresszióját, így a szukcinát autokrin és parakrin módon hatva stimulálja az IL1 β termelést (Littlewood-Evans és mtsai, 2016). A makrofágok klasszikus aktivációja tehát metabolikus átprogramozáshoz és pl. az emlős rapamicin target komplex 1 (mTORC1) és a mitogén-aktivált protein kináz (MNK) kinázok transzlációs gátlásához vezet, mely elősegíti a gyulladást (Su és mtsai, 2015). A másik fő gyulladási

állapot az alternatívan aktivált/anti-inflammatorikus állapot, mely pl. IL4 receptor stimulálás hatására következik be és az M2 makrofágot jellemzi (Sica és Mantovani, 2012; Mosser és Edwards, 2008). Az M2 makrofágra csökkent glikolitikus aktivitás és emelkedett mitokondriális oxidatív foszforiláció jellemző (Tan és mtsai, 2015). Az IL4 hatására kialakuló anti-inflammatorikus fenotípus kialakulásához az mTORC2 és a szignál transzducer és transzkripció aktivátor 6 (STAT6)/IRF4 útvonalak aktiválódása szükséges, melyek a glükóz metabolizmust az oxidatív foszforiláció irányába mozdítják (Huang és mtsai, 2016). Az M2 makrofágokban csökkent PPP működés, intakt citromsav ciklus és normál irányú mitokondriális elektronvándorlás tapasztalható, így itt nem a ROS, hanem az ATP termelődés hangsúlyos (Haschemi és mtsai, 2012; Jha és mtsai, 2015).

A vázizom regeneráció során jelen lévő Ly6C⁺ makrofágra inkább pro-inflammatorikus citokin profil jellemző, így több TNF α -t és IL1 β -t fejeznek ki, miközben a Ly6C⁻ makrofágok anti-inflammatorikus profilt mutatnak, emelkedett IL10 és TGF β expresszióval (Perdiguero és mtsai, 2011; Arnold és mtsai, 2007; Wang és mtsai, 2014; Ruffell és mtsai, 2009). Azonban a Ly6C⁺ és Ly6C⁻ makrofágok génexpressziós profilja nem egyezik az *in vitro* azonosított M1 és M2 makrofágokéval (Xue és mtsai, 2014).

Mint azt már korábban tárgyaltuk, az apoptotikus/elhalt sejtek fagocitózisa anti-inflammatorikus jelátvitelt indukál a makrofágokban, ebben bizonyos metabolikus regulátorok szerepe is bizonyított, mint az AMPK vagy a PPAR receptorok, melyek az elhalt sejtek felvételének hatására aktiválódnak (Han és Ravichandran, 2011). Az AMPK aktivációja serkenti az oxidatív foszforilációt (Hardie, 2014) és az IL10 termelést (Zhu és mtsai, 2015), de csökkenti a pro-inflammatorikus termékek szekrécióját (Jeong és mtsai, 2009). A PPAR γ transzkripció faktor fontos szerepet játszik a lipid metabolizmusban és a gyulladási folyamatok szabályozásában, ugyanis anti-inflammatorikus funkciókat lát el (Namgaladze és Brune, 2016). Izomregeneráció során az egyik PPAR γ által szabályozott gén a növekedési differenciációs faktor 3-at (GDF3) kódolja, mely a TGF β fehérjecsald tagja és a miojenikus sejtek fúzióját támogatja, így szükséges a sokmagvú izomrostok kialakulásához (8. ábra). A Gdf3-at a "gyógyító" makrofágok termelik és expressziója az izomregeneráció 3-4. napján a legmagasabb (Varga és mtsai, 2016b).



8. ábra: A makrofágok fenotípus váltása a vázizom regeneráció során A Ly6C⁺ makrofágokra jellemző pro-inflammatorikus fenotípus alacsony oxidatív metabolizmussal hozható összefüggésbe. Anti-inflammatorikus makrofággá alakulásuk során ezek a sejtek fokozatosan megváltoztatják a metabolizmusukat is, így a citromsav ciklus és a mitokondriális oxidatív foszforiláció lesz domináns, ami a regeneráció végéig így marad. A "gyógyító" Ly6C⁻ makrofágok a szövetregenerációhoz és az ECM újraépüléséhez szükséges faktorokat termelnek. A sejtm metabolizmus két fontos regulátora, az AMPK α 1 és a PPAR γ is részt vesznek a makrofágok gyulladási fenotípusának kialakításában. Az AMPK α 1 az elhalt miogenikus sejtek fagocitózisakor aktiválódik a makrofágokban és szerepet játszik azok anti-inflammatorikus fenotípusra váltásában. A regeneráció későbbi fázisában a "gyógyító" makrofágok nagy mennyiségben termelik a PPAR γ -t, mely a miogenikus sejtek fúzióját támogató növekedési faktor, a GDF3 termelését szabályozza. Az ábra (Juban és Chazaud, 2017) alapján lett módosítva.

1.3.2 A transzglutamináz 2 szerepe a sebgyógyulásban és az elhalt sejtek eltakarításában

A transzglutamináz enzim család tagjai Ca²⁺ függő poszttranszlációs fehérje módosításokat katalizálnak, mint pl. fehérjék keresztkötése, amin beépítés, vagy hely specifikus deamidáció (Greenberg és mtsai, 1991; Lorand és Graham, 2003). Emberben a transzglutamináz család 9 tagja ismert, melyek között a TG2 egyedinek számít, ugyanis transzglutamináz funkciója mellett rendelkezik GTPáz, protein diszulfid izomeráz és protein

kináz enzimaktivitással is (Fésüs és Piacentini, 2002; Gundemir és mtsai, 2012). A TG2 szinte minden sejt-kompartimentben jelen van, így megtalálható a citoplazmában, a mitokondriumban, endoszómákban és a sejtmagban. A sejtfelszínen is megjelenik és az extracelluláris térbe is szekretálódhat (Belkin, 2011). A TG2 a többi transzglutaminázhoz hasonlóan konzervált 3D szerkezettel és katalitikus triáddal rendelkezik (Eckert és mtsai, 2014), de vannak egyedi szakaszai (rendezetlen vagy rövid lineáris motívumok), melyek ideális interakciós partnerré teszik más fehérjék számára. Így a TG2 interakciós partnerei lehetnek sejtadhézióhoz, migrációhoz és fagocitózishoz köthető fehérjék (pl. fibronectin, szindekán-4, MFG-E8), valamint intracelluláris jelátvitelben részt vevő fehérjék (pl. α 1-adrenoceptor, PLC δ 1) is. Ezen felül a TG2 BH3 doménjének köszönhetően az apoptózis szabályozásában is részt vesz (Kanchan és mtsai, 2015). A TG2 széleskörű interakciós készsége teszi lehetővé, hogy számos fehérje hálózatban játszik valamilyen szerepet (Lesort és mtsai, 1998; Milakovic és mtsai, 2004).

A szöveti sérülésre adott válasz különböző események komplex sorozata, melynek fontos elemei a gyulladás kialakulása, sejtek migrációja és proliferációja, az ECM újrászerveződése, új erek képződése és az apoptózis. A sebgyógyuláshoz szükség van a különböző sejtek ECM komponensekkel és növekedési faktorokkal alkotott dinamikus interakciójára. A TG2 keresztköti funkciójának köszönhetően hozzájárul az ECM stabilizációhoz és újrászerveződéshez, így fontos szerepe van a szövetregenerációban (Aeschlimann és Thommazy, 2000). A TG2 extracelluláris szerepe nem merül ki az ECM komponensek keresztkötésében, ugyanis egyrészt, mint integrin koreceptor, másrészt, mint független adhéziós molekula (Isobe és mtsai, 1999; Akimov és mtsai, 2000; Verderio és mtsai, 2004) különböző sejt-mátrix kölcsönhatásokban (pl. sejtadhézió, fibroblasztok mozgása) is részt vesz, melyek szintén alapvető fontosságúak a szövetregeneráció folyamatában (Balklava és mtsai, 2002; Belkin és mtsai, 2001).

Az apoptózis hatékony lezajlása, valamint az apoptotikus vagy nekrotikus sejtek professzionális és nem professzionális fagocita sejtek általi hatékony eltakarítása szintén kulcsfontosságú a normál regenerációhoz és a szöveti homeosztázis fenntartásához. A TG2 mindkét folyamatban részt vesz anti-inflammatorikus molekulaként (Szondy és mtsai, 2017). Egyrészt, ha már elindult az apoptózis program, támogatja azt (Fésüs és Szondy, 2005), az apoptotikus sejt fehérjéit keresztköti gátolja a gyulladást okozó sejt-tartalom felszabadulását (Piredda és mtsai, 1997), hozzájárul a "találj meg" jelek kibocsátásához (Nishiura és mtsai, 1998) és gyorsítja a PS sejtfelszíni megjelenését (Sarang és mtsai, 2007). Másrészt pedig a TG2 makrofágokban integrin β 3 koreceptorként működve szükséges az apoptotikus sejtek

irányába történő migrációhoz (Akimov és Belkin, 2001) és a fagocita portál megnyílásához, így az apoptotikus sejtek megfelelő fagocitózisához (Szondy és mtsai, 2003; Tóth és mtsai, 2009). A TG2 szerepet játszik a makrofágok gyulladásos válaszában is. Hiányában makrofágokban megemelkedik az LPS-indukált gyulladásos citokin termelés, mely háttérben a fokozott kompenzatorikus $\alpha_v\beta_3$ integrin szignál által fenntartott NF- κ B aktivitás áll (Sarang és mtsai, 2011). Ezen kívül a TG2 bizonyos esetekben hozzájárul a TGF β termeléséhez és aktivációjához (Yen és mtsai, 2015; Nunes és mtsai, 1995), mely szintén anti-inflammatorikus molekulaként vesz részt ebben a folyamatban (Fadok és mtsai, 1998a). Így nem meglepő, hogy TG2 hiányában, a normál esetben immunológiailag csendes apoptotikus sejt eltakarítás gyulladáshoz, és SLE szerű autoimmun megbetegedéshez vezet egérben (Szondy és mtsai, 2003).

2 CÉLKITÚZÉS

2.1 Az apoptotikus és nekrotikus sejtek makrofágok általi felvételének összehasonlítása

Annak ellenére, hogy az apoptózissal és nekrozissal elhalt sejtek számos patológiás folyamatban egyszerre vannak jelen, így egy időben van szükség az eltakarításukra, jóval kevesebbet tudunk a nekrozissal elhalt sejtek felvételéről. A szakirodalomban ellentmondásos eredményeket találhatunk az apoptotikus és nekrotikus sejtek makrofágok általi eltakarításának hatékonyságáról és a felvételüket követően kiváltott immunszabályozó funkcióikról. Bár azt már tudjuk, hogy a nekrotikus sejtek felszínén is megjelenik az apoptotikus sejtek felismerésénél "egyél meg" jelként azonosított PS molekula, de abban még nem született konszenzus, hogy a PS függő apoptotikus sejt bekebelezési mechanizmusok részt vesznek-e a nekrotikus sejtek eltakarításában (Cocco és Ucker, 2001; Brouckaert és mtsai, 2004; Hirt és Leist, 2003). Az apoptotikus sejtek az őket bekebelező makrofágokban anti-inflammatorikus folyamatokat indítanak el, melyhez a PS felismerése (Huynh és mtsai, 2002) és bizonyos PS receptorokon (pl. MerTK) elinduló jelátviteli útvonalak is hozzájárulnak (Tibrewal és mtsai, 2008). A bekebelezett és megemésztett apoptotikus sejtek lipid tartalma a makrofágok magreceptoraira hatva is hozzájárul az anti-inflammatorikus hatásokhoz és az elhalt sejtek minél gyorsabb eltakarításához (Sarang és mtsai, 2014; Zahuczky és mtsai, 2011). Kutatásaink során célul tűztük ki a különböző PS receptorok szerepének vizsgálatát növekedési faktor megvonással létrehozott apoptotikus és hő, vagy hidrogén-peroxid (H₂O₂) kezelt primer nekrotikus timociták csontvelői eredetű makrofágok (BMDM) általi fagocitózisa során. Ezen kívül szeretnénk volna meghatározni az általunk vizsgált rendszerben az apoptotikus és nekrotikus sejtek eltakarításának hatékonyságát, és hogy képesek-e ezek a sejtek egymás felvételét gátolni, úgymond "versengeni" a makrofágok általi felvételért. Vizsgálni kívántuk a különböző célsejtek jelenlétében kialakuló makrofág fagocita portál morfológiáját, valamint, hogy a célsejtek együttes jelenlétekor kialakul-e a különböző célsejtekre specializálódott receptorokból álló fagocita kapu, mely képes megkülönböztetni az apoptotikus és nekrotikus sejteket, vagy a kialakult portálon keresztül bármelyik sejt felvétele megtörténhet. Végül szeretnénk volna meghatározni, hogy a nekrotikus sejtek bekebelezése során is végbemegy-e a makrofágokban a magreceptorok aktivációja és ennek hatására a különböző fagocita receptorok expressziójának növekedése, hatékonyabb elhalt sejt eltakarítást eredményezve.

2.2 Az Nme1 NDPK szerepének meghatározása az apoptotikus sejtek makrofágok általi felvételében

A dinamin a fagoszóma kialakulása, záródása és lefűződése során bekövetkező aktin átrendeződés elengedhetetlen szabályozója (Gold és mtsai, 1999; Marie-Anais és mtsai, 2016). A sejtekben a GTP mennyisége jóval alacsonyabb, mint az ATP-é, így szükség van egy NDPK működésére, mely ATP felhasználásával ellátja GTP-vel a dinamin GTPázát az endocitózis során (Boissan és mtsai, 2014). A dinamin és az NDPK-k kapcsolatának szerepét a különböző membrán átszerveződések során már több fajban is bizonyították (Krishnan és mtsai, 2001; Boissan és mtsai, 2014). *C. elegans* fonálféregben Vellainé Takács Krisztina és munkacsoportja bizonyította először, hogy a DYN-1 és az NDK-1 fizikai interakcióban vannak az apoptotikus sejtek bekebelezése során kialakuló fagoszómák felszínén (Fancsalszky és mtsai, 2014). Jelenlegi tanulmányukban azt igazolják, hogy ez az interakció nem csak a bekebelezés kezdeti fázisánál, hanem a fagoszóma érésénél is megfigyelhető, valamint, hogy humán monocita eredetű makrofágok (hMDM) esetében is megfigyelhető a dinamin és az Nme1 kolokalizációja a fagocita portálban. Ezen felül Nme1 hiányos hMDM-eknél csökkent fagocitózist tapasztaltak. Mivel rágszáló modellben még nem vizsgálták az Nme1 apoptotikus sejtek fagocitózisában betöltött szerepét, ezért Vellainé Takács Krisztina munkacsoportjával kollaborációban célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk, szerepet játszik-e az Nme1 nukleozid-difoszfát-kináz az egér BMDM-ek apoptotikus sejt felvételében.

2.3 A transzglutamináz 2 szerepének meghatározása a sérülést követő vázizom regeneráció során

A transzglutamináz 2 számos biológiai folyamatban szerepet játszik, így az apoptózisban, fibrózisban, az elhalt sejtek fagocitózisában, sebgyógyulásban és gyulladással járó folyamatokban is (Fesus és mtsai, 1987; Johnson és mtsai, 1997; Szondy és mtsai, 2003; Haroon és mtsai, 1999; Lee és mtsai, 2004). A születést követően a vázizomban a TG2 nem, vagy alig expresszálódik, de a korai embrionális fejlődés során a mioblasztokban magas expressziót tapasztalhatunk. A TG2 gátlása *in vitro* gátolja a csirke embrióból származó mioblasztok fúzióját, mely a TG2 szerepére utal az embrionális vázizom fejlődés során (Bersten és mtsai, 1983). A TG2 idiopátiás gyulladással járó miopátiánál (Choi és mtsai, 2004), valamint az izomregeneráció során fontos szerepet játszó neutrofilekben és makrofágokban is kifejeződik (Nurminskaya és Belkin, 2012). A TG2 számos gyulladási citokin hatására

indukálódik és hozzájárul a gyulladás kialakulásához is (Chrobok és mtsai, 2017). Emellett bizonyos esetekben szerepet játszik a TGF β termelésében és aktivációjában (Yen és mtsai, 2015; Nunes és mtsai, 1997), így a megnövekedett TG2 expresszió hozzájárulhat az izomfibrózis kialakulásához. Mivel a TG2 megjelenik az embrionális izomfejlődés, valamint a sérülést követő szöveti regeneráció során is, ezért célul tűztük ki, hogy tanulmányozzuk a vázizom regenerációban betöltött szerepét TG2 hiányos (TG2^{-/-}) és vad típusú (TG2^{+/+}) egértörzset használva. Vizsgálni szeretnénk volna az izomszövet szerkezetét kezeletlen és CTX okozta nekrozist követően regenerálódó izmokban, valamint kvantifikálni a sérülést követően a regeneráció különböző napjain az izomba beáramló immunsejteket (makrofágok, neutrofilek) és e sejtek génexpresszióját is. Az izomregenerációban részt vevő fehérjék mélyebb megismerése a későbbiekben hozzájárulhat különböző degeneratív izombetegségek és az időskori szarkopénia gyógyításához/tünetinek enyhítéséhez.

3 ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1 Reagensek

A kísérleteinkhez felhasznált anyagok, reagensek a Sigma-Aldrich-től (MERCK) származnak, egyéb esetben a gyártó/forgalmazó cég az anyag neve után van megjelölve.

3.2 Kísérleti állatok

A kísérletekhez 4 hetes, illetve 2-4 hónapos C57B6, TG2^{+/+} és teljes TG2 knock out (TG2^{-/-}) egereket (De Laurenzi V és Melino G, 2001) használtunk, melyek specifikus patogénmentes környezetben, a Debreceni Egyetem Élettudományi Központjának Állatházban voltak tenyésztve. A kísérleteket a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatkísérleti Bizottsága (DEMÁB) engedélyével, az állatok védelméről és kíméletéről szóló szabályozások betartásával végeztük.

3.3 Sejtizolálás és tenyésztés

3.3.1 BMDM-ek differenciációja, kezelése és siRNA transzfekciója

A csontvelőből származó mieloid progenitorokat 2-4 hónapos C57B6 vagy TG2^{+/+} és TG2^{-/-} egér lábszárcsontjaiból izoláltuk. A progenitorok érett BMDM-ekké differenciáltatását *in vitro* DMEM médiumban (4 mM glutamin, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 10% FBS) 10 % L929 sejtekből származó M-CSF tartalmú felülúszó hozzáadásával végeztük 6 nap alatt. A nem letapadt sejtek 3 nap után le lettek mosva.

A magreceptorok aktiválásához a BMDM-eket all-transz retinsav (ATRA; 1 µM) RAR agonistával, 9-cis retinsav (9CRA; 1 µM) RXR agonistával, GW3965 (Tocris; 1 µM) LXR agonistával, dexametazon-acetát (1 µM) glükokortikoid receptor (GR) agonistával vagy kontrollként dimetil-szulfoxiddal (DMSO; 0,1%) kezeltük 24 órán keresztül.

A jelátviteli útvonalak gátlásához a makrofágokat BMS777607 TAM receptor tirozin kináz inhibitorral (1 µM) vagy NSC23766 Rac1 kis GTP kötő fehérje inhibitorral (Tocris; 100 µM) kezeltük 24 órán át. Az integrin funkció gátlásához egyrészt arginin-glicin-aszpartát (RGD; 2 mg/ml) peptidet, másrészt anti-CD61 antitestet (BD Biosciences; 4 µg/ml) adtunk a BMDM-ekhez 1 órával az apoptotikus és nekrotikus sejtek hozzáadását megelőzően. A

sejtfelszíni Tim-4 PS receptor gátlásához anti-Tim-4 monoklonális antitestet (Thermo Fisher Scientific; 4 µg/ml) használtunk szintén 1 órán keresztül.

Az érett BMDM-ek egér Nme1 specifikus ON-TARGET^{plus} SMARTpool siRNS-el vagy ON-TARGET^{plus} Non-targeting Control Pool (Dharmacon) nem specifikus siRNS-ekkel lettek transzfektálva DharmaFECT 1 transzfekciós reagens (Dharmacon) segítségével a DharmaFECT transzfekciós protokoll alapján. 48 órával a transzfekciót követően vizsgáltuk a sejtek fagocitózis képességét (lásd *in vitro* fagocitózis vizsgálat), valamint western blot segítségével az Nme1 fehérje szintjét.

3.3.2 Raw 267.4 makrofág sejtvonal tenyésztése

A Raw 264.7 egér eredetű monocita-makrofág sejtvonal tenyésztése DMEM (4 mM glutamin, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 10% FBS) médiumban, 37 °C-on 5% CO₂ tartalmú inkubátorban történt. A sejteket passzáláskor tripszinnel (10 perc, 37°C) választottuk fel a tenyésztőflaska aljáról.

3.3.3 Timocita izolálás, sejthalál indukció és PS blokkolás

A különböző módon elhalt sejtek előállításához 4 hetes C57B6 típusú egér frissen izolált tímuszából nyert sejteket (timocitákat) használtunk. Apoptózist növekedési faktor megvonással, szérummentes RPMI 1640 médiumban (2 mM glutamin, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin) történő 24 órás inkubációval idéztünk elő, ezzel elkerülve, hogy a különböző apoptózist indukáló szerek befolyásolják a fagocitózis vizsgálatokat. Nekrózist hőstresszel (55°C, 20 perc), illetve H₂O₂ kezeléssel (1mM, 24 óra) indukáltunk. Mivel az izolált timociták 24 óra alatt spontán is jelentős mértékben elhalnak, így kísérleteink során frissen izolált timocitákat használtunk élő kontrollként. A különböző elhalt sejt mintákban propídiium-jodid (PI) és Alexa Fluor 647-konjugált annexin V (Thermo Fisher Scientific) festéssel határoztuk meg az apoptotikus és nekrotikus sejtek százalékos arányát, ezen felül elektronmikroszkópos morfológia vizsgálatok segítségével is igazoltuk a különböző sejthalál mechanizmusok indukcióját.

Az áramlási citometriás mérésekhez Cell Tracker Deep Red (Thermo Fisher Scientific; 0,5 µM) vagy karboxifluorescein-diacetát-szukcinimidil-észter (CFDA-SE; Thermo Fisher Scientific; 10µM) fluoreszcens festékekkel jelöltük az apoptotikus és nekrotikus timocitákat (10⁷ sejt/ml). A hőnekrotikus sejtek esetében még a nekrózis indukció

előtt történt a jelölés. A festőmédiomot az elhalt sejtekről centrifugálással távolítottuk el (1000 rpm, 10 perc) és megfelelő térfogatú DMEM médiumban (4 mM glutamin, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 10% FBS) vettük fel őket (sejtszámtól függően).

Egyes kísérleteknél az apoptotikus és nekrotikus timociták felszínén lévő PS-t Alexa Fluor 647-konjugált annexin V-vel (Thermo Fisher Scientific) fedtük le.

3.3.4 Izom eredetű leukociták izolálása

Izolálást követően a tibialis anterior (TA) izmokat feldaraboltuk, 0.2% kollagenáz II (Gibco) tartalmú RPMI 1640 médiumban (2 mM glutamin, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin) 37°C-on 1 órán keresztül tovább emésztettük, majd egy 100 µm-es és egy 40 µm-es szűrőn átszűrtük. A CD45⁺ sejteket (leukocitákat) mágneses sejtzisolálással (Miltenyi Biotec) a gyártó leírásának megfelelően különítettük el.

3.4 Elhalt timociták annexin V és PI festése

A sejthalál indukció sikerességét fluoreszcensen jelzett Alexa Fluor 647-konjugált annexin V (Thermo Fisher Scientific) fehérjével és PI DNS festékekkel ellenőriztük. A mintákból 10⁵ db sejtet felvettünk 100 µl annexin-kötő pufferben (PBS + 1 mM CaCl₂), melyhez a gyártó ajánlása alapján 5 µl Alexa Fluor 647-konjugált annexin V oldatot adtunk. Szobahőmérsékleten 15 perc inkubációt követően további 400 µl annexin-kötő puffert és PI-t (50µg/ml) adtunk a mintákhoz. A sejtek fluoreszcenciáját Becton Dickinson FACSCalibur áramlási citométer segítségével mértük (FL4 és FL2 csatornában).

3.5 Transzmissziós elektronmikroszkópia

A fluoreszcens festéssel történő életképesség vizsgálatot kiegészítendő elektronmikroszkópos felvételekkel is igazoltuk, hogy két különböző, az adott sejthalál típusokra jellemző morfológiával rendelkező célsejtet kaptunk a sejthalál indukciót követően. Az apoptotikus és nekrotikus timocitákat a kezelések után összegyűjtöttük, majd 1 % glutáraldehidet tartalmazó 0,1 M kakodilát pufferrel fixáltuk, később 2 % OsO₄ tartalmú azonos pufferrel poszt-fixáltuk.

A fagocitózis morfológiai vizsgálatához a BMDM-ek egy üveglapon voltak inkubálva az apoptotikus és/vagy nekrotikus timocitákkal 30 percen keresztül, majd a már korábban

részletezett módon fixálásra kerültek. A mintákat a megfelelő előkészítést követően JEOL 1010 transzmissziós elektronmikroszkóppal vizsgáltuk.

3.6 *In vitro* fagocitózis vizsgálat

A korábban már differenciáltatott BMDM-ekhez/Raw 267.4 sejtekhez ($1,5 \times 10^5$ db sejt/cm²) hozzáadtuk az apoptotikus és/vagy nekrotikus timocitákat az aktuális kísérletnek megfelelő arányokban és mennyiségben (legalább 1:5 makrofág:célsejt arányban), majd együtt inkubáltuk a sejteket 30/60/90/120 percig, 37°C-on. Mivel a hő- és H₂O₂-kezelt mintákban a sejtek 100%-a nekrotikusnak tekinthető, azonban a szérum éheztetett apoptotikus sejtek között mindig jelen volt kb. 30-40% élő sejt is, így a fagocitózis vizsgálatokat megelőzően mindig normalizáltuk a célsejtek számát, hogy azonos mennyiségű apoptotikus és nekrotikus sejt legyen jelen a makrofágok mellett a kísérletek során. Ezt követően a felülúszót eltávolítottuk a makrofágokról, majd PBS-el lemostuk az esetlegesen rajtuk maradó elhalt sejteket. A letapadó sejtek plate-ről való felválasztása tripszinnel (10 perc, 37°C), illetve mechanikai úton történt. A méréseket elsősorban áramlási citometriával végeztük, azonban néhány kísérletnél transzmissziós elektronmikroszkópia, konfokális mikroszkópia és lézer pásztázó citometria segítségével történt a detektálás. Ezen felül a fagocitózist követően a makrofágokban bekövetkezett génexpressziós változások detektálásához valós idejű kvantitatív PCR (RT-qPCR) technikát alkalmaztunk. A génexpressziós vizsgálatokra szánt mintáknál utolsó lépésként az RNS izoláláshoz szükséges Trizol (Thermo Fisher Scientific) reagenst adtunk a sejtekhez.

A kompetíciós kísérletek során különböző fluoreszcens festékekkel jelölt apoptotikus (CFDA-SE) és nekrotikus (deep red) timociták különböző arányokban (1:1, 1:3, 1:6, 1:9) egyszerre voltak együtt inkubálva a makrofágokkal.

A fagocitózis preferencia megállapításához a makrofágokat először azonosan jelölt (CFDA-SE) apoptotikus vagy nekrotikus sejtekkel inkubáltuk 30 percig, majd alapos mosást követően másik fluoreszcens festékekkel jelölt (deep red) apoptotikus vagy nekrotikus sejteket adtunk a mintákhoz különböző kombinációkban.

A génexpressziós vizsgálatokat Raw 267.4 makrofágokkal végeztük. Az apoptotikus és nekrotikus timocitákat (makrofág:timocita, 1:5 arány) különböző időtartamokig (2/4/6/8/12/24 óra) inkubáltuk együtt a makrofágokkal.

3.7 Áramlási citometria

A fagocitózist Becton Dickinson FACSCalibur áramlási citométer segítségével mértük. Az egyes minták vizsgálatánál először kikapuztuk a makrofág populációt (timociták fagocitózisa esetén ez méret alapján lehetséges (SSC/FSC)), majd ebben a sejtpopulációban határoztuk meg az apoptotikus és nekrotikus sejteket felvett makrofágok százalékos arányát a kibocsátott fluoreszcens jelük alapján (FL1/FL4 csatornában detektálva). A kapott eredményeket a Flowing Software programmal elemeztük.

3.8 Lézer pásztázó citometria

A fagocitózis valós idejű követéséhez a BMDM-eket 8 kamrás tenyésztőlemezre (IBIDI) helyeztük és Hoechst 33342 (Thermo Fisher Scientific) magfestékkel jelöltük. A fluoreszcensen jelölt apoptotikus (CFDA-SE) és nekrotikus (deep red) timocitákat közvetlenül a mérés megkezdése előtt adtuk a makrofágokhoz (1:5 makrofág:célsejt arányban) és 2 órán keresztül vizsgáltuk a fagocitózist. A mérés során egy IBIDI inkubátor segítségével a sejteket állandó körülmények között (37°C, 5% CO₂, 90% páratartalom) tartottuk. A képeket egy IX-71 invertált mikroszkóppal (Olympus), majd ezekből a videó fájlt az ImageJ szoftver (NIH, Bethesda) segítségével készítettük.

3.9 Konfokális mikroszkópia

A fagocitózis valós idejű követéséhez a BMDM-eket 8 kamrás tenyésztőlemezre (IBIDI) helyeztük és 5-(és-6)-(((4-klorometil)benzoil)amino)tetrametilrodamin (CMTMR; Thermo Fisher Scientific; 5µM) festékkel jelöltük. A fluoreszcensen jelölt apoptotikus (CFDA-SE) és nekrotikus (deep red) timocitákat közvetlenül a mérés megkezdése előtt adtuk a makrofágokhoz (1:5 makrofág:célsejt arányban) és 2 órán keresztül vizsgáltuk a fagocitózist. A time-lapse felvételekhez 10 másodpercenként készült egy 140 nm/pixel felbontású kép egy LSM510 konfokális lézer pásztázó mikroszkóp (Zeiss) segítségével. A számunkra érdekes régiót kivágtuk és 16 képkocka/másodperc sebességgel mutatjuk be, így a tömörített videó 160-szor gyorsabb a fagocitózis valós idejénél.

3.10 RNS izolálás, reverz transzkripció PCR és RT-qPCR

Az apoptotikus és nekrotikus sejtek fagocitózist követően a Raw 267.4 sejtekből, valamint az izomból izolált leukocitákból (CD45⁺ sejtek) Trizol reagens segítségével, a gyártó által megadott protokoll alapján totál RNS-t izoláltunk. A kapott RNS koncentrációját 100 ng/μl-re állítottuk be nukleázmentes vízben oldva.

A totál RNS cDNS-re történő átírását High Capacity cDNA Reverz Transcription Kit (Thermo Fischer Scientific) segítségével, a gyártó által előírt protokollt használva végeztük.

A valós idejű kvantitatív PCR során, 3 technikai párhuzamost használva, génspecifikus (Raw 267.4 sejtek esetén MerTK, TG2, C1qb, MFG-E8, SREBP1, RARα; izomból származó leukociták esetén TNFα, IL1, IL6, TGFβ1, Gdf3) TaqMan próbákat tartalmazó oligo mixeket (TaqMan Gene Expression Assay, Thermo Fischer Scientific) alkalmaztunk. A valós idejű detektálást egy Roche LightCycler LC480 készülék segítségével valósítottuk meg. Az adatok kiértékelését összehasonlító CT módszerrel végeztük, normalizáló génként gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenázt és β-aktint használtunk.

3.11 SDS-PAGE és Western blot

A C57B6 egérből származó kontroll és Nm23-M1/Nme1 csendesített BMDM-ek, illetve a kontroll és 4 napos CTX injektált TG2^{+/+} és TG2^{-/-} izomból izolált CD45⁺ sejtek jéghideg lízis pufferben (0,5% Triton X-100, 0,5% proteáz gátló koktél) lettek homogenizálva. A minták fehérje koncentrációját 2 mg/ml-re hígítottuk, majd azonos térfogatú Laemmli pufferrel 100 °C-on inkubáltuk 10 percig. Az elektroforézis az Nm23 fehérje esetében 15 %-os, a Gdf3 esetében 12%-os SDS-poliakrilamid gélen történt, majd az elválasztott fehérjéket Bio-Rad félszáraz blottoló készülék segítségével Immobilion-P polivinilidén-fluorid membránra (Merck Millipore) juttattuk. 5 %-os zsírszegény tejpor oldattal (TTBS-ben oldva) történő blokkolást követően a vizualizációhoz anti-Nm23 (Abcam) vagy anti-Gdf3 (R&D systems) és az egységes mintafelvitel teszteléséhez anti-β-Actin vagy anti-LaminB elsődleges, majd peroxidázzal jelölt másodlagos antitesteket használtunk. Az Immobilion Western Chemiluminescent HRP szubsztrát (ECL) (Merck Millipore) segítségével kiváltott kemilumineszcenciát fotografikus filmen detektáltuk.

3.12 Izomsérülés modellezése CTX injekcióval

Az egerek anesztéziáját 80 mg/kg pentobarbital hasüregbe fecskendezésével végeztük, majd ezt követően 50 µl PBS-ben oldott 12 µM kardiotoxint (Latoxan) injektáltunk az egerek TA lábszárizmaiba. Kísérleteinkhez mindig kizárólag a TA izmokat használtuk, hogy a vázizmok különböző izomrostösszetétele ne befolyásolja eredményeinket. Az izmokat az áramlási citometriás mérésekhez 2, 4 nappal, RT-qPCR-hoz 2, 3, 4 nappal, a hisztológiai vizsgálatokhoz 8 nappal a sérülést követően izoláltuk.

3.13 A regenerálódó izom hisztológiai vizsgálata

3.13.1 Hematoxilin-eozin festett metszetek készítése

A TA izmokat izolálást követően rögtön folyékony nitrogénben hűtött izopentánban (-160°C) lefagyasztottuk, majd a metszésig -80 °C-on tároltuk. Reichert-Jung 1800 CRYOCUT kriosztát segítségével az izmokból 6 µm-es szeleteket vágunk, melyeken hematoxilin-eozin (HE) festést végeztünk. A metszetekről EVOS_{CI} digitális invertált mikroszkóppal (AMG, Thermo Fisher Scientific) készítettünk képeket.

3.13.2 A laminin és a sejtmagok immunhisztokémiai festése

A TA izmokat izolálást követően rögtön folyékony nitrogénben hűtött izopentánban (-160°C) lefagyasztottuk, majd a metszésig -80 °C-on tároltuk. Reichert-Jung 1800 CRYOCUT kriosztát segítségével az izmokból 6 µm-es szeleteket vágunk. A metszeteket 50 %-os FBS-el (PBS-ben oldva) blokkoltuk és az immunhisztokémiai festést DyLight 488 konjugált anti-laminin (invitrogen) antitesttel (1:100) és DAPI sejtmagfestéssel végeztük. A detektáláshoz EVOS Fluid Cell Imaging Station fluoreszcens mikroszkópot használtunk (Thermo Fisher Scientific).

3.14 Az izomban jelen lévő immunsejtek kvantifikálása áramlási citometriával

Izolálást követően a TA izmokat feldaraboltuk, 0.2% kollagenáz II (Gibco) tartalmú RPMI médiumban 37°C-on 1 órán keresztül tovább emésztettük, majd egy 100 µm-es és egy 40 µm-es szűrőn átszűrtük. Az izomból származó sejteket egyszerre festettük Alexa Fluor 647 konjugált anti-Ly6G antitesttel (BioLegend) és Alexa Fluor 488 konjugált anti-F4/80

antitesttel (Invitrogen). A fluoreszcencia intenzitást Becton Dickinson FACSCalibur áramlási citométerrel mértük.

3.15 Statisztikai analízis

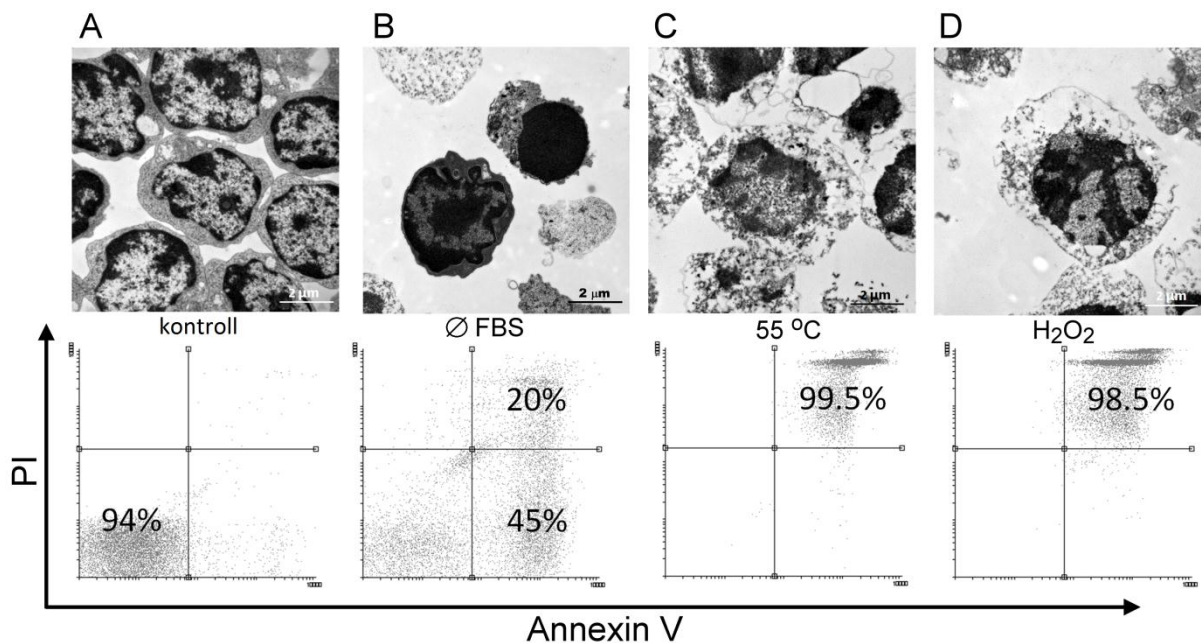
A bemutatott adatok legalább 3 (egy esetben 2) egymástól függetlenül elvégzett kísérlet eredményeinek átlagát (\pm SD) mutatják be, melyek statisztikai kiértékelését kétmintás t-próbával, valamint többszörös összehasonlítás esetén egy- vagy kétutas ANOVA és Tukey post-hoc teszttel végeztük. Statisztikai küszöbnek a $p < 0,05$ értéket használtuk.

4 EREDMÉNYEK

4.1 Az apoptotikus és nekrotikus sejtek makrofágok általi felvételének összehasonlítása

4.1.1 Az apoptotikus és nekrotikus sejtek felvétele egyaránt PS, MerTK, Tim-4, integrin $\beta 3$ és TG2 függő

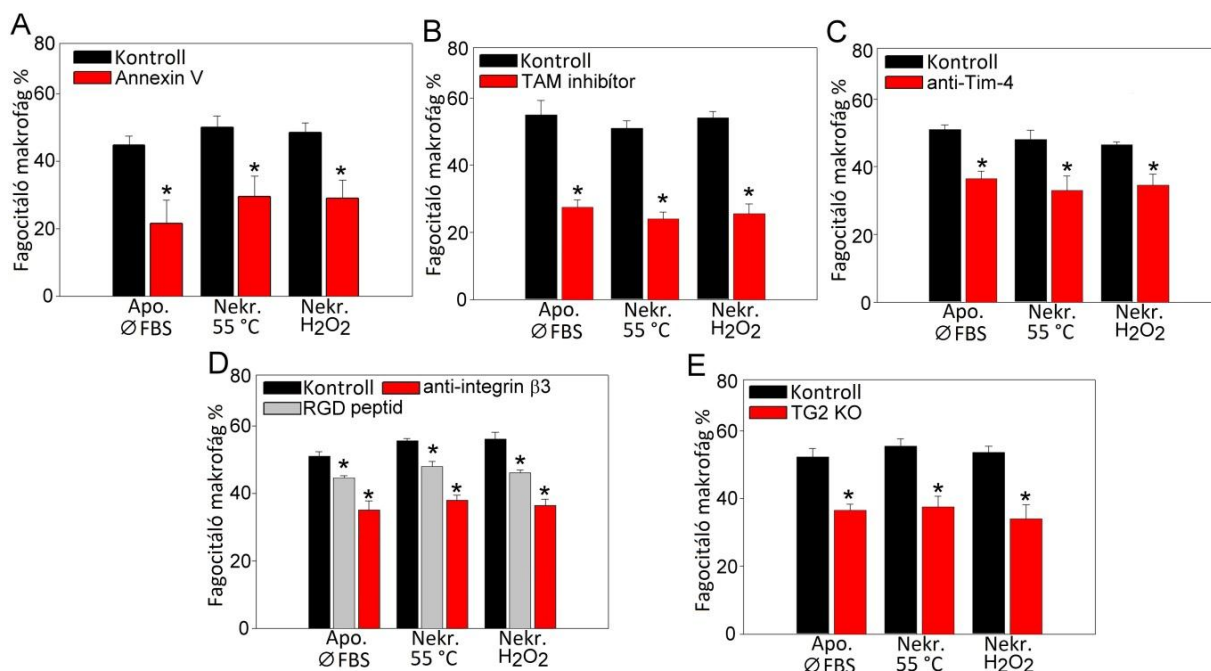
A PS kihelyeződése az apoptotikus sejtek felszínére az egyik legfontosabb jel, melyet a fagocita sejtek felismernek. Az annexin V PS kötő fehérjével végzett kísérleteink, más kutatásokkal összhangban, bizonyították, hogy a PS a hő és H_2O_2 kezeléssel előlt nekrotikus sejteken is megjelenik (9/C, D ábra).



9. ábra: Az apoptotikus és nekrotikus timociták morfológiája és sejt felszíni PS expressziója
A felső sorban a transzmissziós elektronmikroszkópiával készült képek (mérettartomány: 2 μm), alul pedig a PI és annexin V festés áramlási citometriával mért eredménye látható a timociták különböző sejthalál indukciós kezeléseit követően. Közvetlenül izolálást követően vizsgált, élő kontrollnak tekintett timocitáknál fiziológiás morfológiát és annexin V/PI negativitást (A), a 24 órás szérum megvonással létrehozott apoptotikus sejteknél kondenzálódott sejt magokat, valamint a PI festés alapján korai és késői apoptotikus sejt populációkat tapasztalhatunk (B). A 20 percig 55 °C-on hőkezelt (C) és a 24 órán keresztül 1 mM H_2O_2 -al kezelt (D) primer nekrotikus timocitáknál a sejtek korai puffadását és teljes PI pozitivitást látunk.

A kizárólag annexin V pozitív sejteket apoptotikusnak (9/B ábra), az annexin V és PI pozitív sejteket nekrotikusnak (9/C, D ábra), illetve késői apoptotikusnak (9/B ábra) tekintettük. Az élő sejtek nem festődnek (9/A ábra). A sejtek morfológiáját transzmissziós elektronmikroszkópiával vizsgáltuk. Az apoptotikus sejtek megkülönböztetésére használt morfológiai jegyek a kondenzálódott kromatin, a sejt zsugorodása és az intakt plazmamembrán (9/B ábra), a nekrotikus sejtek esetében pedig a "habos citoplazma", a sejtek duzzadása és a plazmamembrán sérülései (9/C, D ábra) voltak.

Hogy megvizsgáljuk a PS szerepét a nekrotikus sejtek makrofágok általi eltakarításában először rekombináns annexin V fehérjét használva lefedtük az elhalt timociták felszínén lévő PS molekulákat és a timocitákat BMDM-ekhez adva vizsgáltuk a fagocitózis hatékonyságát. Kimutattuk, hogy a kezelés hatására mind az apoptotikus, mind a nekrotikus sejtek felvétele szignifikánsan csökkent a kezeletlen timociták felvételéhez képest (10/A ábra), mely arra utal, hogy a PS-nek az apoptotikus és a nekrozissal elhalt sejtek eltakarításában is fontos szerepe van.



10. ábra: PS függő mechanizmusok az apoptotikus és primer nekrotikus sejtek felvétele során Kontroll vagy rekombináns annexin V-el blokkolt fluoreszcensen jelölt apoptotikus vagy nekrotikus timociták BMDM-ek általi fagocitózisa (A). Fluoreszcensen jelölt apoptotikus vagy nekrotikus timociták BMDM-ek általi fagocitózisa a makrofágok 24 órás TAM kináz inhibitor (B), vagy 1 órás anti-Tim-4 antitest (C), anti-integrin β3 antitest/ RGD peptid (D) kezelését követően. TG2 hiányos egérből származó sejtekkel is megvizsgáltuk a fagocitózist (E). Az apoptózis és a nekrozis indukciót az anyagok és módszerek fejezetben leírt módon végeztük. A fagocitózist minden esetben 60 percig vizsgáltuk 5:1 célsejt:makrofág arányt használva. A mérést áramlási citometriával végeztük. Az eredmények három független kísérlet átlagát (±SD) mutatják be (*szignifikánsan különbözik a saját kontrolljától kétutas ANOVA-val meghatározva, $p < 0,05$).

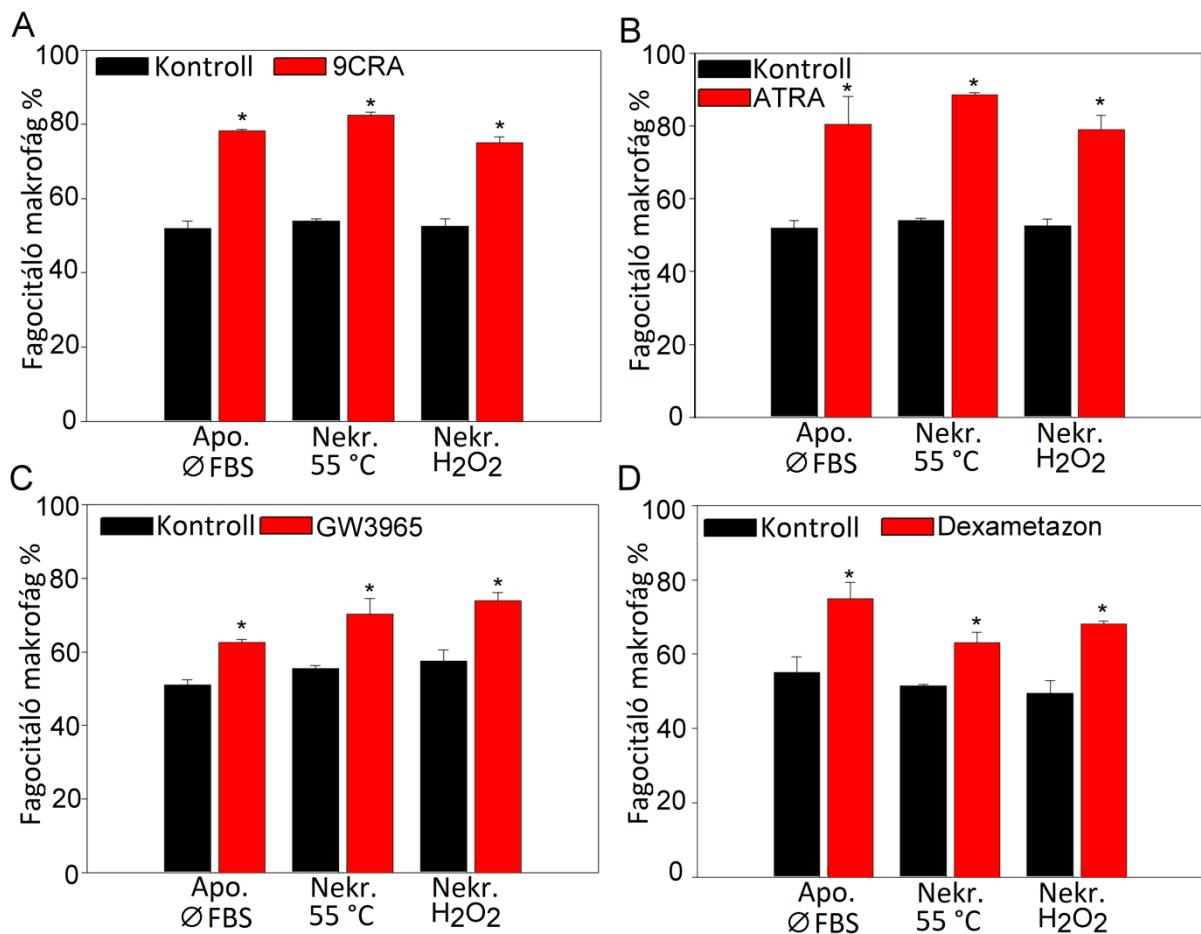
Munkacsoportunk korábban már vizsgálta, hogy mely fagocita receptorok fejeződnek ki egér BMDM-ekben. A talált integrin α_v , β_1 , β_3 , β_5 , MerTK, Tim-4, Stabilin-2, CD14 és a CD36 receptorok közül az integrin $\alpha_v\beta_3$, a CD14 és a CD36 szerepét már bizonyították a nekrotikus sejtek fagocitózisa kapcsán is (Bottcher és mtsai, 2006). Kísérleteink során egyéb, az apoptotikus sejt felvételtől már ismert, PS függő fagocita receptorok szerepét kívántuk meghatározni a nekrotikus sejt felvétel során. A TAM tirozin kináz receptorok családjába tartozó MerTK indirekt módon, különböző hídképző molekulák (Gas6, protein S) segítségével képes kötni a PS-t. BMS777607 TAM tirozin kináz receptor inhibitorral kezelt BMDM-ek közel 50%-kal csökkent mértékben kebelezték be mind apoptotikus, mind nekrotikus timocitákat (10/B ábra). A Tim-4 direkt PS receptor szerepét anti-Tim-4 antitestekkel történő blokkolással vizsgáltuk, mely során szintén csökkent apoptotikus és

nekrotikus sejtfelvételt tapasztaltunk (10/C ábra). Az $\alpha_v\beta_3$ integrin receptorok szintén indirekt módon, az MFG-E8 hídképző fehérjén keresztül képesek felismerni a sejtfelszíni PS-t. Az integrin funkciót RGD peptidekkel vagy anti-CD61 antitesttel gátolva szintén csökkent fagocitózist tapasztaltunk minden típusú célsejt esetében (10/D ábra). Az általunk használt gátlószereket minden esetben a szakirodalomban ajánlott, nem toxikus koncentrációkban használtuk és mi sem tapasztaltuk, hogy hatással lennének a makrofágok életképességére. A makrofágok fagocitózis képességét a különböző kezelések hatására mindig a megfelelő kontroll kezelést kapott (oldószer kontroll vagy antitestek esetében izotípus kontroll) makrofágok fagocitózis képességéhez hasonlítottuk. Munkacsoportunk korábban leírta, hogy a TG2 szintén szerepet játszik az apoptotikus sejtek eltakarításában, mint az integrin β_3 koreceptora, összekötve azt az MFG-E8 molekulával, így hozzájárul a hatékony fagocitózishoz. TG2 hiányos egértörzsből származó BMDM-eket és timocitákat használva szintén hasonló mértékben csökkent apoptotikus és nekrotikus sejtfelvételt tapasztaltunk a vad típusú sejtekkel végzett fagocitózishoz hasonlítva (10/E ábra). Összességében ezek a megfigyeléseink arra utalnak, hogy a vizsgált, az apoptotikus sejtek eltakarításából ismert PS felismerő receptorok a primer nekrotikus sejtek felvételében is fontos szerepet játszanak.

4.1.2 Különböző magreceptorok aktivációja növeli az apoptotikus és nekrotikus sejtek felvételének hatékonyságát

Munkacsoportunk már kimutatta, hogy a bekebelezés során az apoptotikus sejtek lipidtartalma a makrofágokban aktiválja az LXR magreceptort, mely ennek hatására felerősíti a MerTK és különböző RALDH enzimek kifejeződését. A RALDH-k retinoidok szintézisét idézik elő, melyek aztán további fagocita receptorok expressziójának emelkedéséhez vezetnek, így eredményezve hatékonyabb apoptotikus sejt eltakarítást (Sarang és mtsai, 2014). A BMDM-ekben jelen lévő retinoid függő fagocita receptorok közé tartozik a TG2, Tim-4 és a stabilin-2. Emellett a GR aktivációja is megemelkedett apoptotikus sejtfelvételhez vezet, elsősorban MerTK függő mechanizmusokon keresztül (Sarang és mtsai, 2014; Zahuczky és mtsai, 2011). A továbbiakban megvizsgáltuk, hogy a különböző magreceptorok aktiválása milyen hatással van az apoptotikus és nekrotikus timociták BMDM-ek általi felvételére. A makrofágokat 9CRA RXR agonistával (11/A ábra), ATRA RAR agonistával (11/B ábra), GW3965 LXR agonistával (11/C ábra) vagy dexametazon-acetát GR agonistával (11/D ábra) kezeltük 24 órán keresztül az apoptotikus és nekrotikus timocitákkal való inkubációt megelőzően. Eredményeink azt mutatják, hogy a vizsgált magreceptorok

aktivációja hasonlóképpen növelte az apoptotikus és a nekrotikus sejtek felvételét, mely alapján úgy tűnik, a nukleáris receptorok által kiváltott fagocitózis növekedés nem korlátozódik csupán az apoptotikus sejtek felvételére.



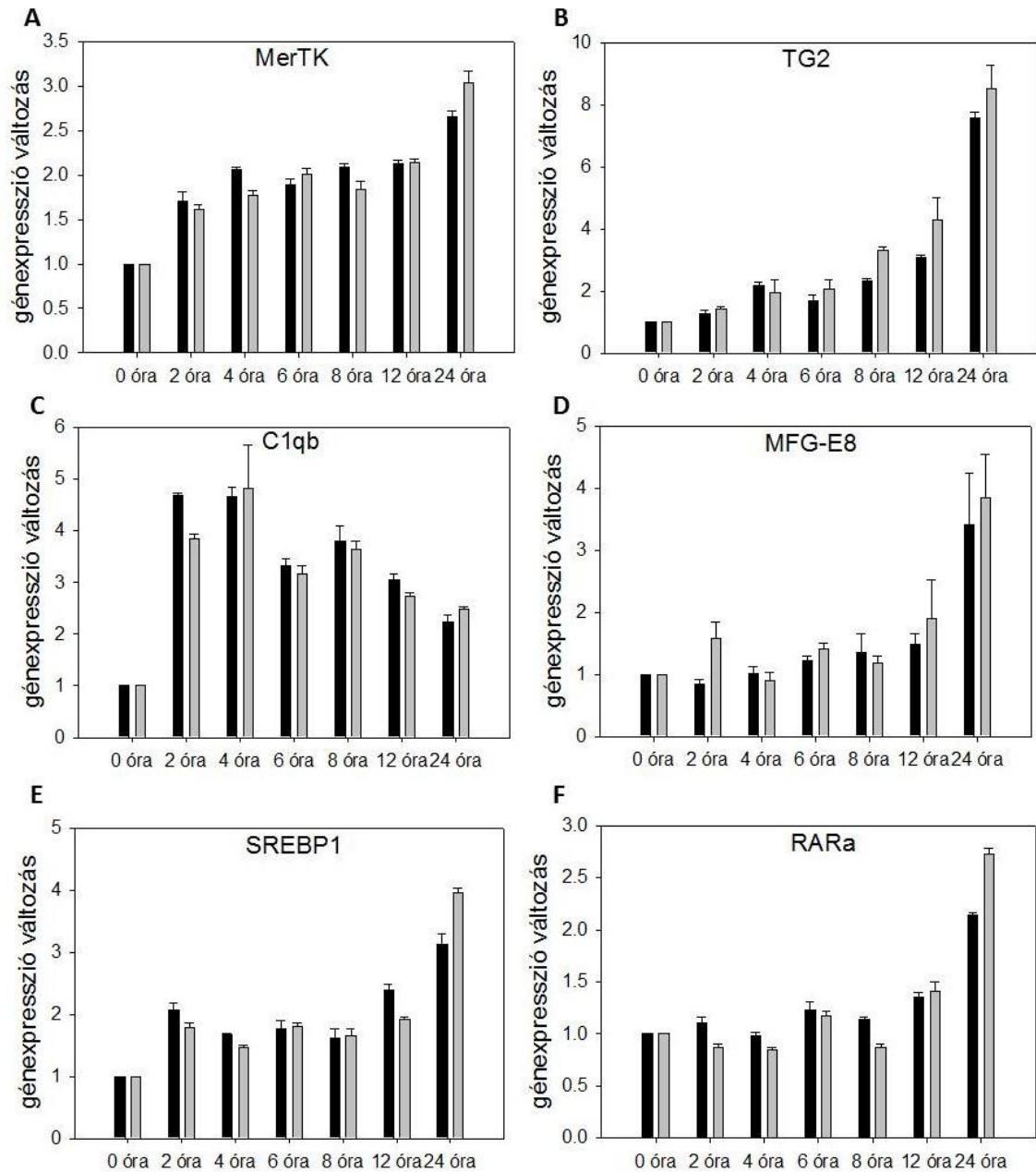
11. ábra: A magreceptorok stimulációja növeli a BMDM-ek általi apoptotikus és nekrotikus sejt felvételt Fluoreszcensen jelölt apoptotikus vagy nekrotikus timociták BMDM-ek általi fagocitózisa a makrofágok 24 óráig történő RXR agonista 9CRA (A), RAR agonista ATRA (B), LXR agonista GW3965 (C) GR agonista dexametazon-acetát (D) kezelését követően. Az apoptózis és a nekrozis indukciót az anyagok és módszerek fejezetben leírt módon végeztük. A fagocitózist minden esetben 60 percig vizsgáltuk 5:1 célsejt:makrofág arányt használva. A mérést áramlási citometriával végeztük. Az eredmények három független kísérlet átlagát (\pm SD) mutatják be (*szignifikánsan különbözik a saját kontrolljától kétmintás t-próbával meghatározva, $p < 0,05$).

4.1.3 A MerTK, TG2, C1qb, MFG-E8, SREBP1 és RAR α magreceptor célgének expressziója azonos mértékben megemelkedett Raw 264.7 makrofágokban apoptotikus és nekrotikus timociták felvételét követően

Valós idejű kvantitatív PCR-al meghatároztuk a MerTK, TG2, C1qb, MFG-E8, szterolszabályozó elemet kötő fehérje 1 (SREBP1) és RAR α LXR és PPAR magreceptor célgének expressziós változásait az apoptotikus és hőnekrotikus timociták fagocitózisát és feldolgozását követően. Ezekről a génekről tudjuk, hogy apoptotikus sejtfelvételt követően megemelkedik az expressziójuk BMDM-ekben, ezáltal segítve az apoptotikus sejtek mielőbbi eltakarítását és az immuntolerancia kialakítását (A-Gonzalez és mtsai, 2009; A-Gonzalez és Hidalgo, 2014; Kidani és Bensinger, 2012; Mukundan és mtsai, 2009). Kíváncsiak voltunk, hogy nekrotikus sejtek felvételét követően is megfigyelhető-e ez a jelenség. Méréseink alapján a C1qb opszonizáló molekula (12/C ábra), a MerTK fagocita receptor (12/A ábra) és a SREBP1 transzkripciós faktor (12/E ábra), mely képes gátolni az NF- κ B általi gyulladásoos választ, expressziója mind apoptotikus, mind nekrotikus sejtek felvételét követően korai emelkedést mutat. Már 2 órával az elhalt sejtek hozzáadását követően megemelkedett génextpressziót tapasztaltunk a nem fagocitáló, nyugalmi makrofágokhoz hasonlítva.

A TG2 (12/B ábra), az MFG-E8 hídképző molekula (12/D ábra), valamint a RAR α retinsav receptor (12/F ábra), mely újabb, az elhalt sejtek makrofágok általi fagocitózisának hatékonyságát serkentő gének expresszióját szabályozza, gének expressziója hasonlóképpen megemelkedett mind apoptotikus, mind nekrotikus sejtek felvételét követően. Igazán jelentős emelkedést a 24 órás mintákban tapasztaltunk.

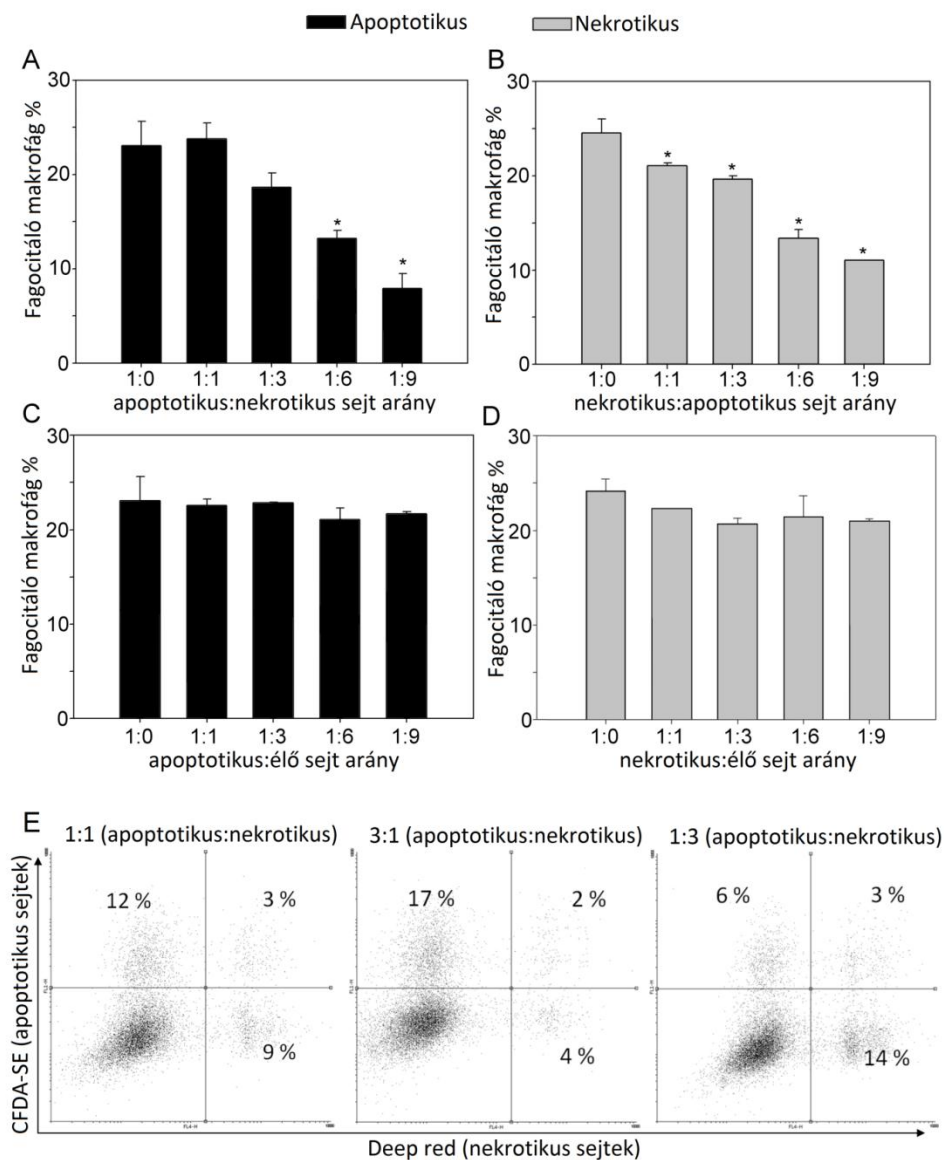
■ Apoptotikus □ Nekrotikus



12. ábra: A *MerTK*, *TG2*, *C1qb*, *MFG-E8*, *SREBP1* és *RARα* gének expressziója apoptotikus és nekrotikus timociták felvételét követően Raw 264.7 makrofágokban A fagocitózis idejének függvényében ábrázoltuk a *MerTK* (A), *TG2* (B), *C1qb* (C), *MFG-E8* (D) *SREBP1* (E) és *RARα* (F) gének relatív expressziójának változását apoptotikus és nekrotikus timocitákat fagocitáló makrofágokban, elhalt sejtekkel nem találkozó, kontroll makrofághoz viszonyítva. Az apoptózis és a nekrozis indukciót az anyagok és módszerek fejezetben leírt módon végeztük. A fagocitózist minden esetben az ábrán jelölt ideig vizsgáltuk 5:1 célsejt:makrofág arányt használva. A mérést kvantitatív valós idejű PCR technika segítségével végeztük. Az eredmények két független kísérlet átlagát (\pm SD) mutatják be.

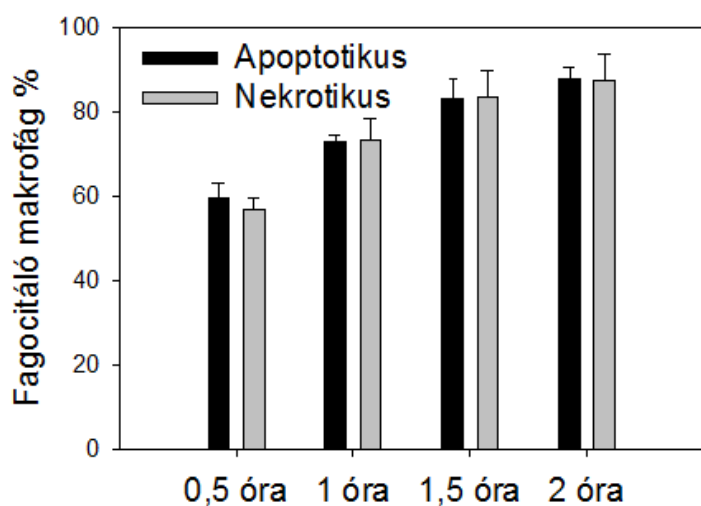
4.1.4 Az apoptotikus és nekrotikus timociták azonos hatékonysággal kerülnek bekebelezésre és versengenek egymással a BMDM-ek általi felvételért *in vitro* fagocitózis során

Ha ugyanazok a receptorok vesznek részt az apoptotikus és a nekrotikus sejtek felvételében, akkor mindkét sejtípus együttes jelenlétekor kompetíciónak kell kialakulnia. Hogy ezt a felvételt megvizsgáljuk, rövid távú (30 perc) kompetíciós fagocitózis kísérleteket végeztünk. A BMDM-eket eltérő színű fluoreszcens festékkel jelölt különböző arányokban (1:0, 1:1, 1:3, 1:6, 1:9) hozzáadott apoptotikus és/vagy nekrotikus timocitákkal együtt inkubáltuk. Az 1:0 arányoknál láthatjuk, hogy a hőkezelt primer nekrotikus timociták felvétele ugyanolyan hatékony volt, mint az apoptotikus timocitáké (13/A, B ábra). Amikor az apoptotikus és nekrotikus timociták együtt voltak jelen a makrofágok környezetében, hasonló mértékben csökkentették a másik sejthaláltípussal elhalt sejtek felvételét (13/A, B ábra). Ezzel ellentétben az élő timocitákat nem kebelezték be a BMDM-ek és e sejtek jelenléte nem csökkentette az elhalt sejtek felvételét sem (13/C, D ábra).



13. ábra: Az apoptotikus és nekrotikus timociták versengenek egymással a BMDM-ek általi felvételért. Vizsgáltuk az apoptotikus sejtek felvételét növekvő mennyiségű nekrotikus sejt jelenlétében (A), a nekrotikus sejtek felvételét növekvő mennyiségű apoptotikus sejt jelenlétében (B), valamint az apoptotikus (C) és nekrotikus (D) sejtek felvételét növekvő mennyiségű élő sejt jelenlétében. A BMDM-ek különböző fluoreszcens festékkel jelölt apoptotikus (CFDA-SE), hőkezelt nekrotikus (deep red) és jelöletlen élő timocitákkal voltak inkubálva az ábrán jelölt arányokban. A reprezentatív áramlási citometriás mérésből származó pontdiagrammokon látható, hogy a mindkét sejtípust felvett makrofágok alacsony %-ban vannak jelen (E). Az apoptotikus és nekrotikus sejtek kezdeti száma mindig 1 millió volt és csak a másik sejtípus számát növeltük. Az apoptózis és a nekrozis indukciót az anyagok és módszerek fejezetben leírt módon végeztük. A fagocitózist minden esetben 30 percig vizsgáltuk, hogy a fagocitózisbeli különbség a különösen magas célsejtszám mellett is detektálható legyen. A mérést áramlási citometriával végeztük. Az eredmények négy független kísérlet átlagát (\pm SD) mutatják be (*szignifikánsan különbözik a kontrolljától kétmintás t-próbával meghatározva, $p < 0,05$).

Az apoptotikus és nekrotikus sejtek felvételének hatékonyságát Raw 264.7 makrofág sejtvonalat használva is megvizsgáltuk. Ebben az esetben is azonos mértékű volt az apoptotikus és nekrotikus sejtek fagocitózisa 30/60/90/120 perces inkubációt követően egyaránt (14. ábra).



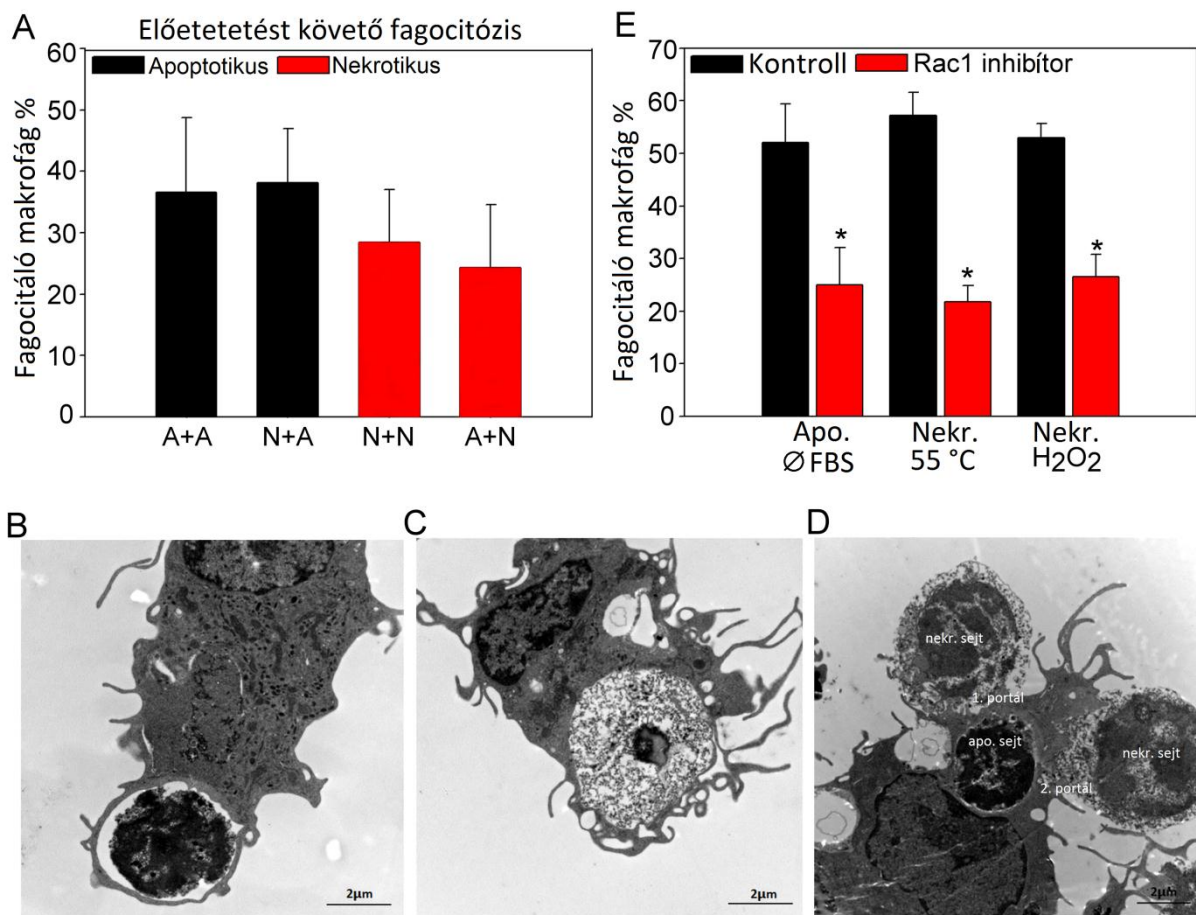
14. ábra: Az apoptotikus és nekrotikus timociták felvétele azonos hatékonyságú Raw 264.7 makrofágok által Fluoreszcensen jelölt apoptotikus vagy nekrotikus timociták Raw 264.7 makrofágok általi fagocitózist 30, 60, 90 és 120 percig vizsgáltuk 5:1 célsejt:makrofág arányt használva. Az apoptózis és a nekrozis indukciót az anyagok és módszerek fejezetben leírt módon végeztük. A mérés áramlási citometriával

történt. Az eredmények három független kísérlet átlagát (\pm SD) mutatják be (az apoptotikus és nekrotikus sejtek felvétele között nincs szignifikáns különbség kétmintás t-próbával meghatározva, $p < 0,05$).

4.1.5 A makrofágok használhatják ugyanazt a fagocita portált egy apoptotikus és egy nekrotikus sejt bekebelezéséhez

A fagocitózis során a fagocita receptorok összegyűlnek, klasztereket képeznek a sejtmembrán egyes területein, ezek az ún. fagocita portálok, melyeken keresztül számos apoptotikus sejt felvétele megtörténhet egymást követően (Tóth és mtsai, 2009; Niedergang és Grinstein, 2018; Nakaya és mtsai, 2008). Érdekes módon az áramlási citometriás mérések során észrevettük, hogy viszonylag kis százalékban vannak jelen olyan makrofágok a mintákban, melyek mind apoptotikus, mind nekrotikus sejtet felvettek (13/E ábra). Felmerült a kialakuló fagocitózis preferencia lehetősége, miszerint egy apoptotikus vagy nekrotikus sejt felvétele meghatározhatja a makrofág későbbi preferenciáját. Mindezek alapján feltételezhetőnek tűnt, hogy a makrofágok különböző fagocita portált alakítanak ki az apoptotikus és a nekrotikus sejtek számára és a már kialakult portál ugyanazt az elhalt sejtípust fogja preferálni a továbbiakban. Hogy megvizsgáljuk ezt a lehetőséget, a makrofágokat először azonosan jelölt apoptotikus vagy nekrotikus timocitákkal inkubáltuk 30

percen keresztül, majd egy alapos mosást követően, további 30 percre másféle fluoreszcens jelöléssel ellátott apoptotikus vagy nekrotikus sejteket adtunk különböző kombinációkban az előtetetett makrofágokhoz. Amikor megvizsgáltuk, hogy az első körben fagocitáló makrofágok közül hány % vett fel apoptotikus és nekrotikus sejteket, azt tapasztaltuk, hogy a második sejtípus felvétele független volt a korábban bekebelezett célsejttől (15/A ábra). Ez azt engedi feltételezni, hogy a kialakult fagocita portálok az apoptotikus és nekrotikus sejtek esetében is hasonlóak vagy akár azonosak lehetnek. Érdekes módon az előtetést követően a nekrotikus sejtek felvétele valamivel alacsonyabb volt, mint az apoptotikusaké (nem szignifikáns a különbség), de ez a csökkent felvétel független volt az előzőleg felvett sejtektől. Ezek alapján azt feltételezzük, hogy azért tapasztaltuk kevés egyszerre apoptotikus és nekrotikus timocitát is felvett makrofágot (13/E ábra), mert rövidtávú (30 perc) fagocitózist vizsgáltunk, mely során valószínűleg a legtöbb makrofág csak egyetlen sejtet tudott bekebelezni.



15. ábra: Az apoptotikus és nekrotikus timociták bekebelezése történhet ugyanazon a fagocita portálon keresztül és *Rac1* függő. A BMDM-eket először CFDA-SE által jelölt apoptotikus vagy nekrotikus timocitákkal inkubáltuk 30 percig, majd e sejtek eltávolítását követően a fagocitózis azonos mennyiségű, de deep red által festett apoptotikus vagy nekrotikus timocitákkal folytatódott további 30 percig. A mérést áramlási citometriával végeztük. A diagrammon azon BMDM-ek populációit láthatjuk, melyek mindkét körben fagocitáltak sejteket. 100%-nak azokat a makrofágokat tekintettük, melyek kebeleztek be az első körben hozzáadott sejtekből (A). Az eredmények három független kísérlet átlagát (\pm SD) mutatják be (nincs szignifikáns különbség egyutas ANOVA-val meghatározva, $p < 0,05$). Az apoptotikus (B), hőkezelt nekrotikus (C), vagy mindkét sejttípus (D) együttes fagocitózisát bemutató reprezentatív transzmissziós elektronmikroszkópos képek. Mérettartomány: 2 μ m. Fluoreszcensen jelölt apoptotikus vagy nekrotikus timociták BMDM-ek általi fagocitózisát áramlási citometriával vizsgáltuk a makrofágok 24 órán át történő *Rac1* inhibitor kezelését követően (E). Az eredmények három független kísérlet átlagát (\pm SD) mutatják be (*szignifikánsan különbözik a saját kontrolljától kétutas ANOVA-val meghatározva, $p < 0,05$). Az apoptózis és a nekrozis indukciót minden esetben az anyagok és módszerek fejezetben leírt módon végeztük. A fagocitózist minden esetben összesen 60 percig, 5:1 célsejt:makrofág arányt használva vizsgáltuk.

Hogy megvizsgáljuk a BMDM-ek által használt internalizációs mechanizmusokat transzmissziós elektronmikroszkópiával végeztünk morfológiai analízist a fagocitózis

közben. Az apoptotikus és nekrotikus sejtek felvételét külön-külön vizsgálva, a makrofágok állabai mindkét esetben szorosan körülölelték a bekebelezésre kerülő részecskét (15/B, C ábra), ez az ún. cipzárszerű bekebelezési mechanizmus. Ezen felül, mikor az apoptotikus és nekrotikus sejtek egyszerre voltak jelen a makrofágok mellett, megfigyeltük, hogy a különböző elhalt sejtek felvétele gyakran történik egymást követően ugyanazon a fagocita portálon keresztül. E megfigyeléseinket elektronmikroszkópos felvételekkel (15/D ábra), valamint lézer pásztázó citometria és konfokális mikroszkópia segítségével timelapse videókkal is igazoltuk (a videók az alábbi linken elérhetők: <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/2211-5463.12584>), mely szintén azt támasztja alá, hogy hasonló/azonos előre kialakult fagocita receptor klaszterek vesznek részt az apoptotikus és nekrotikus sejtek felvételében.

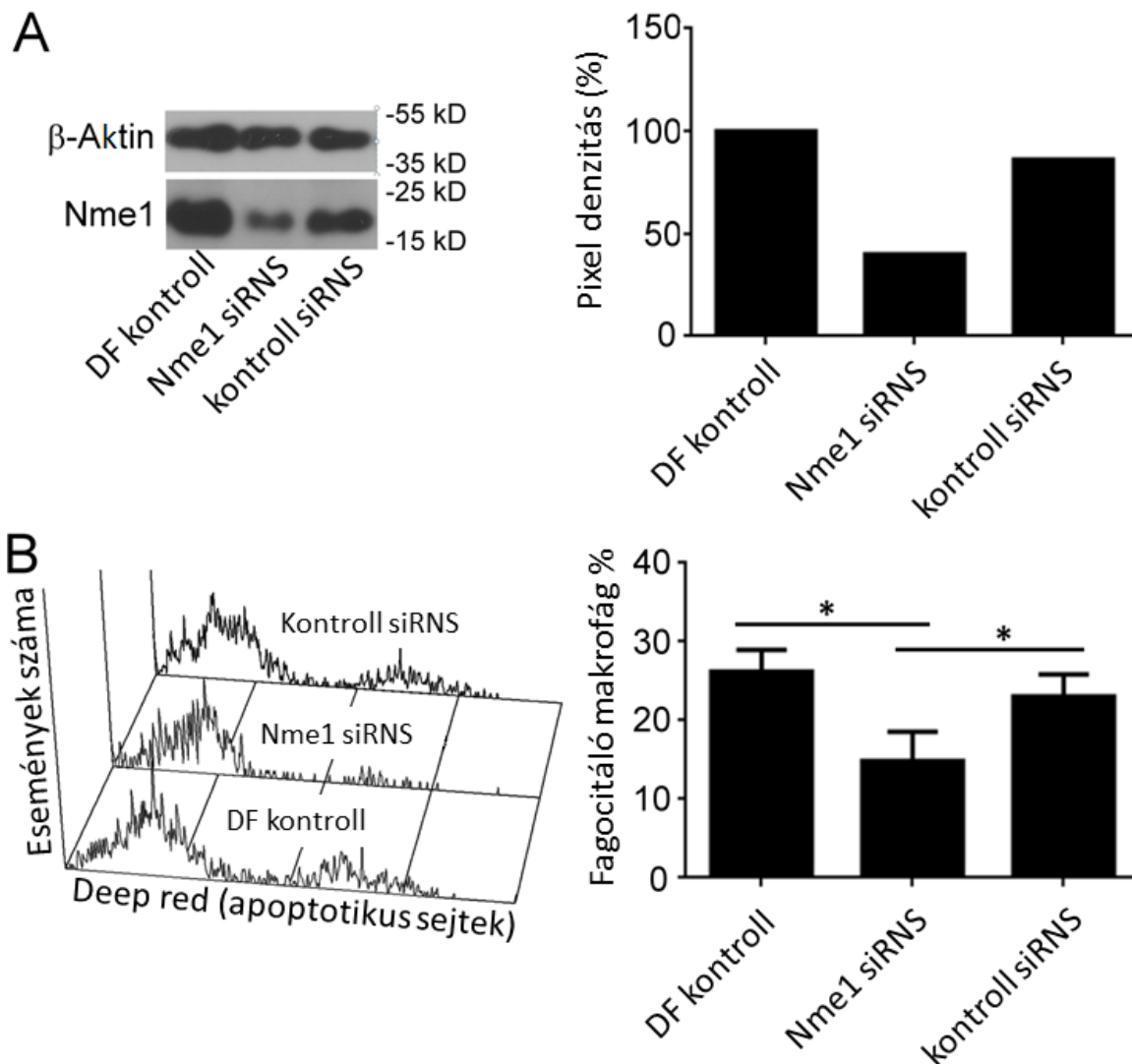
Az apoptotikus sejt felvétel egyik kulcsszereplője a Rac1 kis molekulatömegű GTPáz, mely az állabak képződéséhez szükséges aktin újraszerveződét szabályozza és számos fagocitózis jelátviteli útvonal által aktiválódik (Poon és mtsai, 2014). A Rac1 gátlása az NSC23766 Rac1 inhibitor segítségével csökkentette mind az apoptotikus, mind a nekrotikus sejtek felvételét (15/E ábra), tehát valószínűleg nem csak a fagocitózisban részt vevő receptorokon, hanem az aktiválódó jelátviteli útvonalakon is osztozik az apoptotikus és nekrotikus sejt felvétel.

4.2 Az Nme1 NDPK szerepének meghatározása az apoptotikus sejtek makrofágok általi felvételében

4.2.1 Az NM23-M1/Nme1 szerepet játszik az apoptotikus sejtek BMDM-ek általi fagocitózisában

Mivel az apoptózis és az apoptotikus sejtek eltakarításának mechanizmusa evolúciósan erősen konzervált, így megvizsgáltuk, hogy az NDK-1 szerepére is igaz-e ez. Az NDK-1 egér homológja, az NM23-M1/Nme1 szerepét vizsgáltuk BMDM-eken apoptotikus sejtek bekebelezése közben. A makrofágokban az Nme1 fehérje szintjét Nm23-M1 specifikus siRNS-ek segítségével csökkentettük. Kontrollként nem specifikus siRNS-ekkel és transzfekciós reagenssel kezelt makrofágokat használtunk. A Western blot mérések alapján megállapíthatjuk, hogy az Nme1 specifikus csendesítés kb. 55 %-os csökkenést eredményezett az Nme1 fehérje szintjében (16/A ábra). A csendesítést követően

megvizsgáltuk az apoptotikus timociták BMDM-ek általi felvételének hatékonyságát. 1:5 apoptotikus sejt:makrofág arány mellett fél órás fagocitózist követően az NM23-M1 specifikus siRNS-el kezelt makrofágok 40%-al csökkent apoptotikus sejt fagocitózist mutattak (16/B ábra). Ez arra enged következtetni, hogy az Nme1 fehérje emlősök esetében is a férgekénél tapasztaltakhoz hasonlóan részt vesz az elhalt sejtek eltakarításának mechanizmusában.



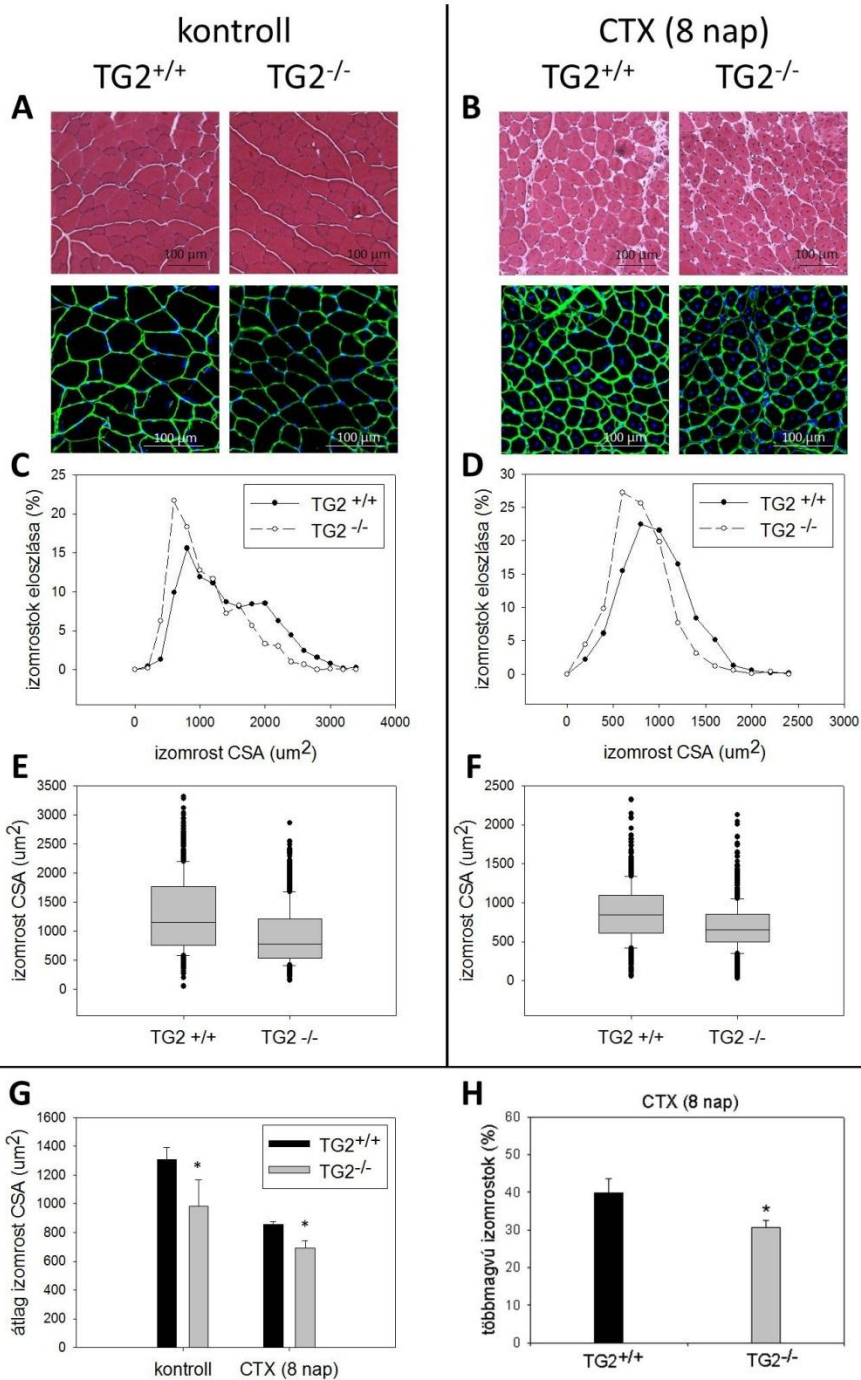
16. ábra: Az *Nme1* csendesítése szignifikánsan csökkenti az apoptotikus timociták BMDM-ek általi felvételét. A BMDM-ek random és *Nme1* specifikus siRNS-ekkel, Dharmafect transzfekciós reagens segítségével történő transzfekciója után (48 óra) egyrészt a sejtekből izolált fehérjék elválasztását követően Western blot analízis segítségével meghatároztuk az *Nme1* fehérje mennyiségét (A), másrészt fluoreszcensen jelölt (deep red) apoptotikus timociták hozzáadásával meghatároztuk a makrofágok fagocitózis kapacitását. Az apoptózis indukciót az anyagok és módszerek fejezetben leírt módon végeztük. A fagocitózist 30 percig 5:1 célsejt:makrofág arányt használva vizsgáltuk. A mérést áramlási citometriával végeztük. A fagocitózis eredmények öt független kísérlet átlagát (\pm SD) mutatják be (*szignifikánsan különbözik egyutas ANOVA-val meghatározva, $p < 0,05$). A Western blot esetén egy reprezentatív kísérlet eredménye látható.

4.3 A transzglutamináz 2 szerepének meghatározása a sérülést követő vázizom regeneráció során

A továbbiakban egy még jelenleg is futó, publikálás előtt álló projekt eddigi eredményeit fogom bemutatni.

4.3.1 A TG2 hiányos izomrostok keresztmetszeti területe mind a kontroll, mind a CTX injektált izmokban kisebb, mint a vad típusúaké

Az izomrostok keresztmetszeti területének (CSA) meghatározásához TG2^{+/+} és TG2^{-/-} egerekből izoláltunk kontroll (nem történt CTX injekció) és 8 napja regenerálódó sérült izmokat (CTX injekciót követően). Az izolált izmokat fagyasztással konzerváltuk és szövettani metszeteket készítettünk belőlük, melyeket HE festéssel, vagy laminin immunhisztokémiai festéssel és DAPI magfestéssel jelöltük (17/A, B ábra).

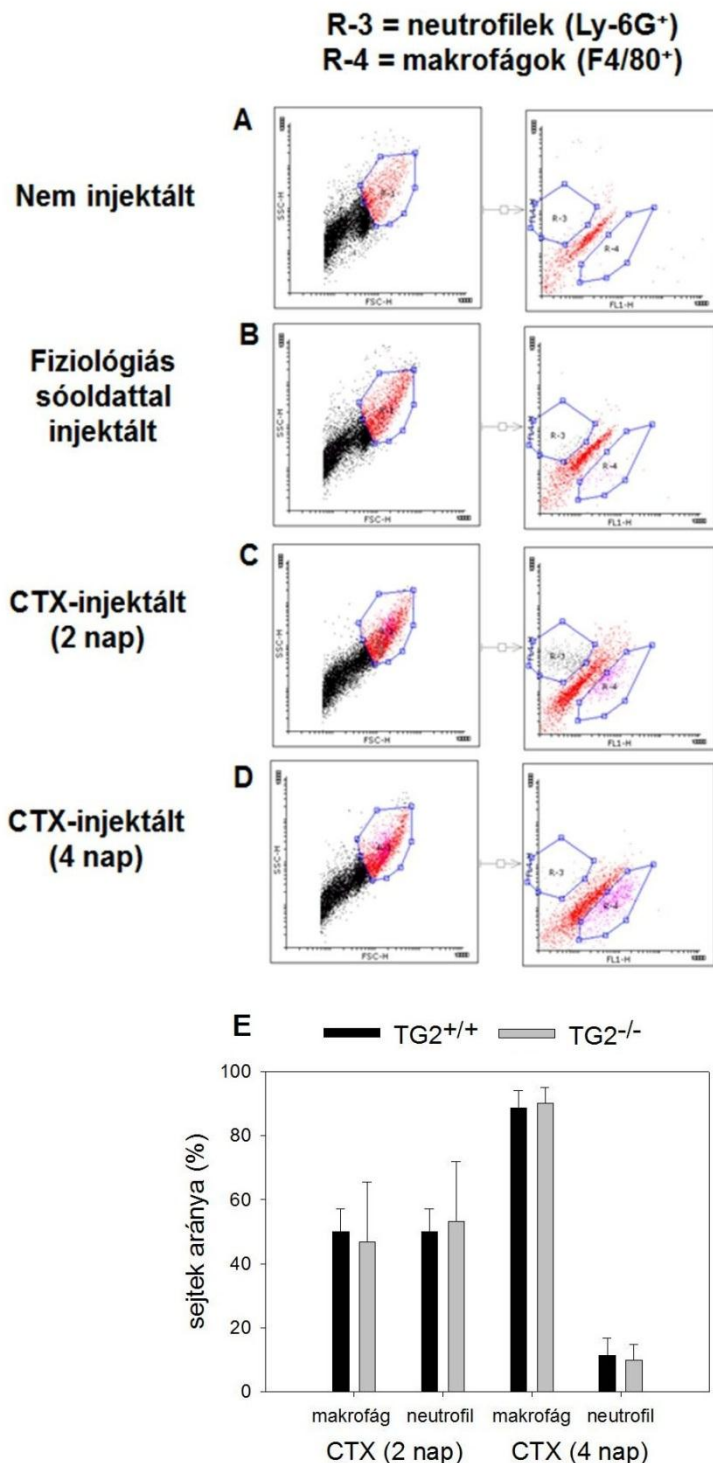


17. ábra: Vad típusú és TG2 hiányos egérből származó kontroll és CTX injektált izmok szövettani metszetei és az izomrostok keresztmetszeti területe. Felül TG2^{+/+} és TG2^{-/-} egérből származó kontroll (A) és 8 nappal a CTX injekciót követően izolált (B) vázizmok HE festett és immunhisztokémiával laminin (zöld), valamint sejtmag (kék) jelölt metszeteiről készült reprezentatív képek láthatók. Alatta a laminin festett metszetek alapján az izomrostok méret szerinti eloszlása (C, D), átlagos CSA-ja (E, F, G) és a többmagvú izomrostok %-a (H) látható. Az eredmények négy független kísérlet átlagát (\pm SD) mutatják be (*szignifikánsan különbözik a vad típusú kontrolljától kétmintás t-próbával meghatározva, $p < 0,05$).

A CSA meghatározását a HE festett metszeteken az ImageJ program segítségével az izomrostok manuális kijelölésével végeztük. A laminin festés segítségével már automatizálni tudtuk a CSA meghatározását az ImageJ Muscle morphometry nevű bővítményét használva. Természetesen ebben az esetben is ellenőriztük az izomrostként definiált objektumokat és a hibás eredményeket eltávolítottuk az adatok közül. Minden mintához négy eger TA izmainak azonos síkjából származó metszeteket elemeztünk (3 metszet/izom), majd az egerenként átlagolt izomrostok CSA-ját átlagoltuk. Az izomrostok méret szerinti eloszlásánál az adott mérettartományba eső rostok százalékos értékét átlagoltuk. A kontroll TG2 hiányos izmokban az izomrostok átlagos kersztmetszeti területe szignifikánsan kisebb (17/E, G ábra), és jóval nagyobb számban fordulnak elő kisebb méretű izomrostok, mint a vad típusú izmokban (17/C ábra). A CTX injekciót követően 8 napig regenerálódott izmokban is megfigyelhető, hogy a TG2 hiányos izomrostok CSA-ja kisebb (17/F, G ábra), és szintén jelentősebb a kisebb mérettartományba eső izomrostok populációja (17/D). Azonban itt már kisebb a különbség, ugyanis a sérülés hatására a vad típusú izmokban újonnan keletkezett izomrostok CSA-ja is kisebb. A regenerálódó izmokban kvantifikáltuk a centrális sejtmagokat és meghatároztuk a többmagvú izomrostok arányát. A TG2 KO izmokban kevesebb többmagvú sejtet detektáltunk, mely a mioblasztok fúziójának nem megfelelő működésére utalhat.

4.3.2 A regenerálódó izomban jelen lévő makrofágok és neutrofilek arányára nincs hatással a TG2 hiánya

A vázizom regenerációt nagyban befolyásolják a lokálisan jelen lévő és időben változó arányban megjelenő immunsejtek, elsősorban a neutrofilek és a makrofágok. Ezért megvizsgáltuk, hogy a regeneráció során TG2 hiányában változik-e az izomba beáramló immunsejtek száma és aránya. A nem injektált vagy fiziológiás sóoldattal injektált kontroll, valamint a CTX injekciót követően 2 és 4 nappal izolált kollagenázzal emésztett izomminták sejtjein F4/80 (makrofág marker) és Ly6G (neutrofil marker) fluoreszcens antitest jelölést végeztünk, melyet áramlási citometriával detektáltunk.



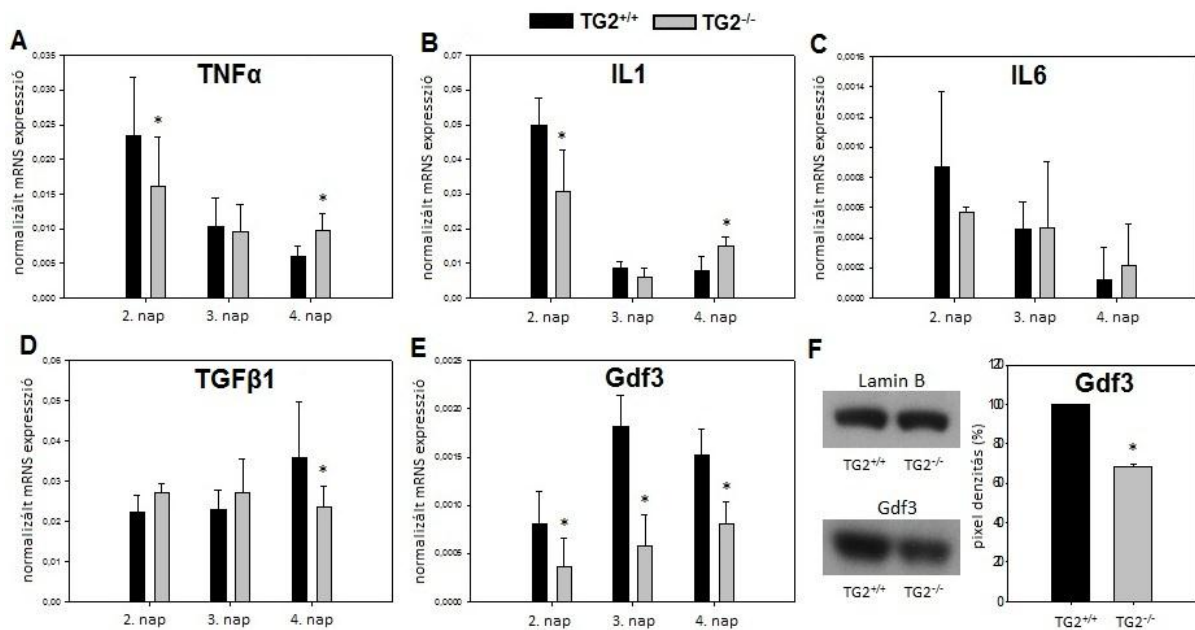
18. ábra: Vázizom eredetű neutrofilek és makrofágok kvantifikálása áramlási citometriával A nem injektált (A), fiziológiás sóoldattal injektált (B), valamint a CTX injekciót követő második (C) és negyedik (D) napon izolált vázizom sejtjeit fluoreszcensen jelölt anti-F4/80 és anti-Ly-6G antitestekkel festettük. A fluoreszcenciát áramlási citometriával mértük. A 2 és 4 napos regenerálódó izomban jelen lévő makrofágok (F4/80⁺ sejtek) és neutrofilek (Ly6G⁺ sejtek) arányát százalékban ábrázoltuk (E). Az eredmények hat független kísérlet átlagát (\pm SD) mutatják be. (A vad típusú és a TG2 hiányos minták között nincs szignifikáns különbség kétmintás t-próbával meghatározva, $p < 0,05$) A reprezentatív pontdiagramok a Flowing Software programban készültek.

Az elvárásainknak megfelelően, a kontroll mintákban nem tapasztaltunk számottevő neutrofil vagy makrofág populációkat (18/A, B ábra). A CTX injektált izmok esetében a regeneráció második napján közel azonos mennyiségben vannak jelen neutrofilek és makrofágok (18/C, E ábra). A regeneráció negyedik napjára az irodalmi adatoknak

megfelelően (Saclier és mtsai, 2013a) a neutrofil populáció szinte teljesen eltűnik, és nagyobb számban vannak jelen makrofágok (18/D, E ábra). A TG2 hiánya nem befolyásolta a makrofágok és neutrofilek arányát a regeneráció két vizsgált időpontjában (18/E ábra).

4.3.3 TG2 hiányában az izomba infiltrálódó leukociták csökkent szinten expresszálják a TNF α , IL1, IL6, TGF β 1 citokineket és a Gdf3 növekedési faktort

Vad típusú és TG2 KO izmokból 2, 3 és 4 nappal a CTX által okozott sérülést követően mágneses sejtszeparálással leukocitákat izoláltunk (CD45⁺ sejtek), hogy megvizsgáljuk az általuk termelt gyulladási (TNF α , IL1, IL6) és anti-inflammatorikus (TGF β 1) citokinek expresszióját, ezáltal képet kapjunk az izomban uralkodó gyulladási állapotról. Ezen felül a Gdf3 növekedési faktor expresszióját is vizsgáltuk, mely szükséges az újonnan képződött izomrostok fúziójához, így fontos szerepet játszik a vázizom regenerációban.



19. ábra: A TNF α , IL1, IL6 és TGF β 1 citokinek, valamint a Gdf3 növekedési faktor expressziója regenerálódó izomból származó leukocitákban. A 2, 3 vagy 4 napos TG2^{+/+} és TG2^{-/-} regenerálódó izmokból izolált leukocitákban RT-qPCR segítségével mértük a TNF α (A), IL1 (B) és IL6 (C) pro-inflammatorikus citokinek, a TGF β 1 (D) anti-inflammatorikus citokin és a Gdf3 (E) növekedési faktor mRNA expresszióját. A Gdf3 fehérje szintjének meghatározása Western blot segítségével történt (F). Az eredmények hat, a densitometria esetében három független kísérlet átlagát (\pm SD) mutatják be (*szignifikánsan különbözik a vad típusú kontrolljától kétmintás t-próbával meghatározva, $p < 0,05$). A Western blot esetében egy reprezentatív kísérlet eredménye látható.

A $\text{TNF}\alpha$, IL1 és IL6 gyulladási citokinek szintje a 2 napos regenerálódó izomban alacsonyabb, míg a 4 napos regenerálódó izomban magasabb (IL6 esetében nem szignifikáns a különbség) volt a $\text{TG2}^{-/-}$ leukocitákban (19/A, B, C ábra). Ez alapján arra következtethetünk, hogy a szatellita sejtek aktivációjához is elengedhetetlen kezdeti gyulladási válasz csökkent, esetleg késleltetett a TG2 hiányos sérült izmokban. A $\text{TGF}\beta 1$ anti-inflammatorikus citokin expressziója pedig a regeneráció negyedik napján mutat alacsonyabb szintet (19/D ábra), amikor már a gyulladással fenotípusú makrofágokat normál esetben felváltják a "gyógyító" makrofágok. Lehetséges, hogy a TG2 hiányában ez is késleltetve történik meg. A Gdf3 növekedési faktor génexpressziója, minden vizsgált időpontban alacsonyabb volt a TG2 KO leukocitákban (19/E ábra). A Gdf3 szintjét 4 napos regenerálódó izomban fehérje szinten is megvizsgáltuk SDS-PAGE és Western blot segítségével, melyben szintén tapasztaltuk a csökkent expressziót (19/F ábra). A Gdf3 csökkent szintje magyarázatot adhat a TG2 hiányos izmokban tapasztalt kisebb izomrost CSA-ra és a többmagvú izomrostok alacsonyabb számára is, ugyanis, ha a mioblasztok fúziója nem működik megfelelően nem tudnak kialakulni az érett, nagyméretű, sokmagvú izomrostok.

5 MEGBESZÉLÉS

A szakirodalmat olvasva az apoptotikus és nekrotikus sejtek makrofágok általi eltakaráításának hatékonyságáról és a felvételüket követően kiváltott immunszabályozó funkcióikról ellentmondásos eredményeket találhatunk. Egyes kutatások szerint az apoptotikus sejtek felvétele hatékonyabb és gyorsabb, mint a nekrotikusaké és nekrotikus sejtek jelenlétében a makrofágok az apoptotikus sejtek felvételét részesítik előnyben (Brouckaert és mtsai, 2004), míg mások a nekrotikus sejtek gyors és az apoptotikus sejtekéhez hasonlóan hatékony felvételéről számolnak be (Hirt és Leist, 2003; Cocco és Ucker, 2001). Bár már tudjuk, hogy ugyan nem aktív módon, de a nekrotikus sejtek felszínén is megjelenik az apoptotikus sejtek felismerésénél "egyél meg" jelként azonosított PS molekula, egyes kutatások szerint az apoptotikus és a nekrotikus sejtek makrofágok általi felismerése nem azonos módon, a PS megjelenésétől függetlenül történik (Cocco és Ucker, 2001). Mások eredményei szerint azonban az apoptotikus sejtekhez hasonlóan a nekrotikus sejtek felvétele is PS függő mechanizmusokkal megy végbe (Brouckaert és mtsai, 2004; Hirt és Leist, 2003). Kutatásaink során különböző PS receptorok szerepét vizsgáltuk apoptotikus és primer nekrotikus timociták BMDM-ek általi fagocitózisa során és megállapítottuk, hogy kísérleti rendszerünkben az apoptotikus és nekrotikus sejtek felvétele azonos hatékonysággal történik és egyaránt PS függő, melyben szerepet játszanak a MerTK, Tim-4 és integrin $\beta 3$ direkt vagy indirekt PS receptorok és az integrin koreceptorként funkcionáló TG2.

Míg az apoptotikus sejtek számos anti-inflammatorikus molekulát bocsátanak ki magukból (pl. TGF β , IL10, TSP-1, LPC), a nekrotikus sejtekről tudjuk, hogy a hirtelen sejtkárosodás eredményeképp gyulladáskeltő hatású anyagok szabadulnak fel belőlük (pl. nem fragmentálódott genomi DNS). Az apoptotikus sejtek az őket bekebelező makrofágokban is anti-inflammatorikus folyamatokat indítanak el, melyhez a PS felismerése (Huynh és mtsai, 2002) és bizonyos PS receptorokon (pl. MerTK) elinduló jelátviteli útvonalak is hozzájárulnak (Tibrewal és mtsai, 2008). A nekrotikus sejtek bekebelezését követően a makrofágokban bekövetkező gyulladási hatásokról is megoszlanak a vélemények. Egyes tanulmányok szerint a nekrotikus sejtek felvétele gyulladási választ generál a makrofágokban (Cocco és Ucker, 2001), míg mások szerint a nekrotikus sejtek felvétele szintén immunológiailag csendes folyamatnak tekinthető (Brouckaert és mtsai, 2004; Hirt és Leist, 2003). Mivel a nekrotikus sejtek felvételében is szerepet játszik a PS és receptorai, így feltételezhetjük, hogy a makrofágokban az apoptotikus sejtek bekebelezését követően kiváltott hatásaik ebben az esetben is érvényesülnek, így bár a nekrotikus sejtek magukban

pro-inflammatorikus folyamatokat indítanak el, a makrofágok általi bekebelezésük segítheti az immuntolerancia kialakulását. Ugyanakkor elképzelhető, hogy eddig még nem azonosított receptorokon keresztül gyulladást fokozó jelátviteli utak is aktiválódnak.

A bekebelezett és megemésztett apoptotikus sejtek lipid tartalma is hozzájárul az anti-inflammatorikus hatásokhoz és az elhalt sejtek minél gyorsabb eltakarításához a makrofágok magreceptoraira hatva (Sarang és mtsai, 2014; Zahuczky és mtsai, 2011). Kísérleteink során a BMDM-ek különböző magreceptorainak aktiválását követően hasonlóképpen megnövekedett apoptotikus és nekrotikus sejt felvételt tapasztaltunk, mely alapján úgy tűnik, a nukleáris receptorok által kiváltott fagocitózis növekedés nem korlátozódik csupán az apoptotikus sejtek felvételére.

Az aktivált magreceptorok hatására többek között különböző, a fagocitózisban részt vevő receptorok, opszonizáló és hídképző molekulák génjei aktiválódnak (Rébé és mtsai, 2009; Sarang és mtsai, 2014). Apoptotikus és nekrotikus timocitákat 24 órán keresztül fagocitáló Raw 264.7 makrofágokkal végzett valós idejű kvantitatív PCR méréseink alapján elmondhatjuk, hogy a megvizsgált néhány, az apoptotikus sejtek felvételét követően a makrofágokban aktiválódó magreceptor célgén (MerTK, TG2, C1qb, MFG-E8, SREBP1 és RAR α) expressziója nekrotikus sejtek felvételét követően is hasonló mértékben megemelkedett. Ebből arra következtethetünk, hogy a nekrotikus sejtek bekebelezése az apoptotikusakéhoz hasonlóan serkenti a makrofágok fagocitáló képességét, így gyorsítja az elhalt sejtek eltakarítását.

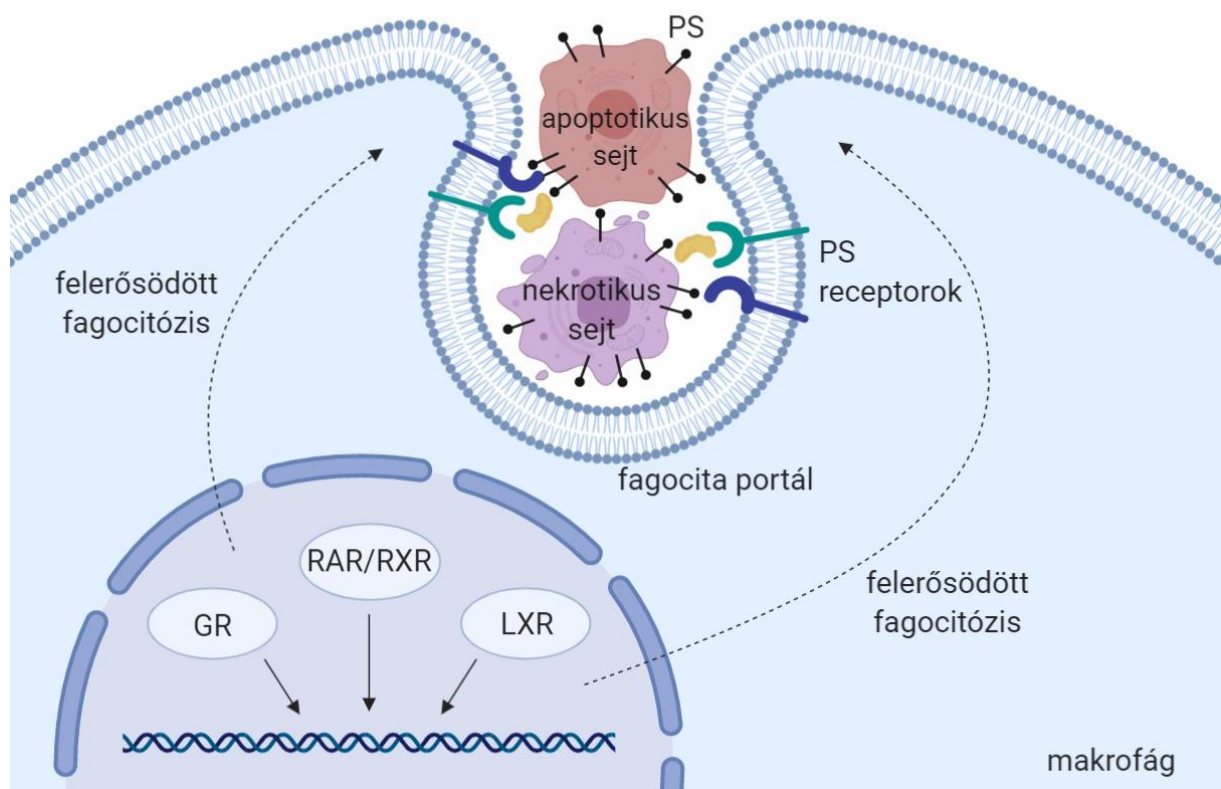
Ha az apoptotikus és a nekrotikus sejtek felvétele azonos mechanizmussal történik, akkor feltételezhetjük, hogy mindkét sejt típus együttes jelenlétében kompetíció alakul ki. Ennek megfelelően kompetíciós fagocitózis kísérleteink során, mikor az apoptotikus és nekrotikus timocitákat különböző arányokban együtt adtuk a BMDM-ekhez, valóban azt tapasztaltuk, hogy a különféleképpen elhalt timociták versengenek egymással a makrofágok általi felvételért.

Egyes korábbi tanulmányok szerint, melyek során korai apoptotikus és nekrotikus L929 fibroblasztok bekebelezésének ultrastrukturális morfológiáját vizsgálták, a makrofágok különböző internalizációs mechanizmust használnak az apoptotikus és a nekrotikus sejtek felvételéhez (Krysko és mtsai, 2003; Krysko és mtsai, 2006). Az L929 sejtek apró apoptotikus testeket formálnak, melyek szorosan záródó fagoszómákkal kerültek felvételre, míg a nagyméretű nekrotikus sejteket kisebb részletekben, a folyadék fázissal együtt, egy ún. makropinocitózis-szerű mechanizmussal vették fel a makrofágok. Az álláb képződés és a bekebelezés morfológiáját a saját kísérleti rendszerünkben transzmissziós

elektronmikroszkópia segítségével megvizsgálva nem tapasztaltunk makropinocitózisra emlékeztető képleteket. Mind az apoptotikus, mind a nekrotikus timociták bekebelezésénél szorosan záródó fagoszómákat láttunk. Ezt az ellentmondást a célsejtek méretének összehasonlítása oldhatja fel. A mi kísérleti rendszerünkben használt timociták kisebb méretűek, mint az L929 sejtek, így ebben az esetben a makrofágok hasonló fagoszómák és állábképződés segítségével távolíthatják el a kisméretű, különbözőképpen elhalt timocitákat.

Mikor a különböző elhalt sejtek egyszerre voltak jelen a makrofágok mellett, elektronmikroszkópos felvételeken, valamint konfokális mikroszkópia segítségével készített timelapse videókon is megfigyeltük, hogy az apoptotikus és nekrotikus sejtek felvétele gyakran történik ugyanazon a fagocita portálon keresztül, egymást követően. Ez arra enged következtetni, hogy hasonló/azonos előre kialakult fagocita receptor klaszterek vesznek részt az apoptotikus és nekrotikus sejtek felvételében. Ezt támasztotta alá az is, hogy az apoptotikus vagy nekrotikus sejtekkel előtetett makrofágoknál sem tapasztaltunk későbbi fagocitózis preferenciát, azaz a különbözőképpen elhalt sejtek felvétele független volt az előzőleg felvett sejtípustól.

Mindezek arra engednek következtetni, hogy a primer nekrotikus sejtek makrofágok általi felvétele morfológiailag megegyezik az apoptotikus sejtfelvétellel és mindkét folyamatban szerepet játszanak az elhalt sejtek részéről a PS, a makrofágok részéről pedig a Tim-4, MerTK, integrin $\alpha_v\beta_3$, TG2 és Rac1 molekulák. A GR, RAR és LXR magreceptorok aktivációja a makrofágokban mind az apoptotikus, mind a nekrotikus sejtfelvételt fokozza (20. ábra). Ennek jelentősége lehet pl. az apoptotikus sejtfelvételt célzó klinikai terápiák során, melyek ezáltal javíthatják a nekrotikus sejtek eltakarítását is, így hozzájárulva a kezelés sikerességéhez.



20. ábra: Az apoptotikus és nekrotikus sejt felvétel közös mechanizmusai Az apoptotikus és nekrotikus sejtek felvétele történhet ugyanazon a fagocita portálon keresztül, ugyanis a makrofágok bizonyos sejtfelszíni PS receptorai részt vesznek mindkét sejt típus felvételében. A bekebelezett apoptotikus és nekrotikus sejtek hatására is aktiválódnak a makrofágok lipid érzékelő magreceptorai, melyek végül közvetlenül, vagy retinoidok által közvetítetten serkentik bizonyos, a fagocitózishoz szükséges, vagy anti-inflammatorikus molekulák expresszióját, így hozzájárulnak az elhalt sejtek mielőbbi eltakarításához és az immuntolerancia kialakulásához. Az ábra a biorender program segítségével készült.

Az elhalt sejtek felismerésének hatására a fagocitákban aktiválódó, a bekebelezést elindító evolúciósan konzervált jelátviteli útvonalak hatására többek között aktiválódnak a Rac1 (Park and Kim, 2017) és a dinamin (Yu és mtsai, 2006) GTPázok, melyek lehetővé teszik a citoskeletális átrendeződést, így a bekebelezéshez szükséges állabak képződését. A Rac1 gátolt makrofágokkal végzett fagocitózis kísérleteink során azonos mértékben csökkent apoptotikus és nekrotikus sejt felvételt tapasztaltunk, tehát valószínűleg a fagocitózisban részt vevő receptorokon felül az aktiválódó jelátviteli útvonalakon is osztozik az apoptotikus és nekrotikus sejt felvétel.

A dinamin megfelelő működéséhez szükséges GTP-vel való ellátását az NDPK-k végzik (Boissan és mtsai, 2014). *C. elegans* fonálféregben a DYN-1 és az NDK-1 bizonyítottan fizikai interakcióban vannak az apoptotikus sejtek bekebelezése során kialakuló

fagoszómák felszínén (Fancsalszky és mtsai, 2014). Ez az interakció nem csak a bekebelezés kezdeti fázisánál, hanem a fagoszóma érésénél is megfigyelhető, az NDK-1 a DYN-1-el azonos időben van jelen a folyamat során. Humán monocita eredetű makrofágok esetében is megfigyelhető volt a dinamin és az Nme1 kolokalizációja a fagocita portálban, valamint Nme1 hiányos hMDM-eknél csökkent fagocitózis figyelhető meg. Rágcsáló modellben is megvizsgáltuk, hogy az Nme1 NDPK hogyan járul hozzá az apoptotikus sejtek eltakarításához. Nme1 csendesített egér BMDM-ek esetében is csökkent apoptotikus sejt fagocitózist tapasztaltunk. Ezek alapján feltételezhető, hogy a dinamin és az Nme1 fagocitózist támogató kooperációja evolúciósan konzervált és szükséges a sikeres fagocitózis lezajlásához.

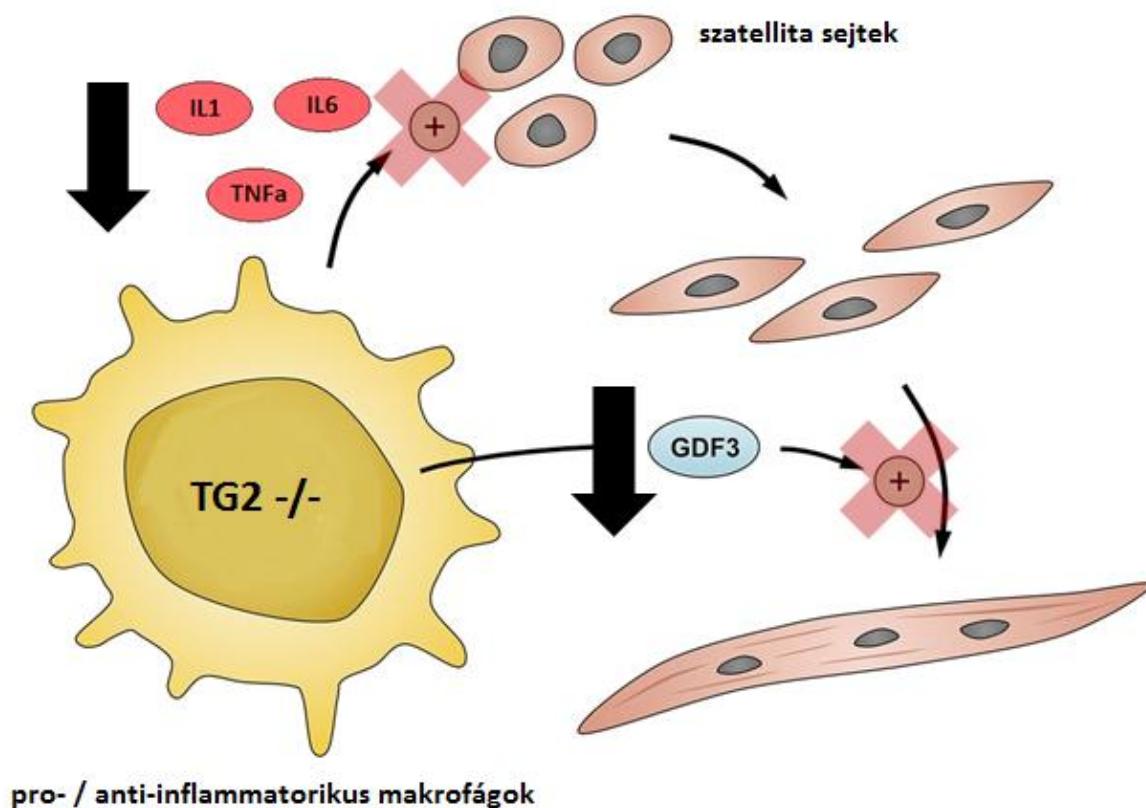
A TG2 keresztköti funkciójának és széleskörű interakciós képességének köszönhetően több szinten is segíti a sebgyógyulási és szövetregenerálódási folyamatokat. Hozzájárul az ECM stabilizációjához és újraszerveződéséhez (Aeschlimann és Thommazy, 2000), részt vesz különböző sejt-mátrix kölcsönhatásokban (Balklava és mtsai, 2002; Belkin és mtsai, 2001), anti-inflammatorikus molekulaként szerepet játszik az apoptózis program lezajlásában (Fésüs és Szondy, 2005; Piredda és mtsai, 1997; Nishiura és mtsai, 1998; Sarang és mtsai, 2007) és makrofágokban integrin $\beta 3$ koreceptorként működve az apoptotikus sejtek eltakarításában is közreműködik (Akimov és Belkin, 2001; Szondy és mtsai, 2003; Tóth és mtsai, 2009). Annak ellenére, hogy sokat tudunk a TG2 funkcióról a szövetregeneráció során, a vázizom regenerációban betöltött szerepe még nem tisztázott.

A TG2 gátlása *in vitro* gátolja a csirke embrióból származó mioblasztok fúzióját, mely a TG2 szerepére utal az embrionális vázizom fejlődés során (Bersten és mtsai, 1983). Születés után a TG2 normál esetben nem, vagy csak igen alacsony szinten expresszálódik a vázizomban, azonban idiopátiás gyulladásoos miopátiáknál (Choi és mtsai, 2004), valamint a regenerációban fontos szerepet játszó neutrofilekben és makrofágokban kifejeződik (Nurminskaya és Belkin, 2012). Mindezek alapján TG2 hiányos egereket használva célul tűztük ki megvizsgálni a TG2 szerepét CTX okozta vázizom sérülés utáni regenerációban.

A sérülést követő napokban következtethetünk a vázizom regeneráció hatékonyságára az izomrostok méretéből. Laminin immunhisztokémiai festés alapján a TG2 hiányos egerekből származó kontroll és CTX injekciót követően 8 napja regenerálódó izomrostok keresztmetszeti átmérője kisebb, mint a vad típusúaké. Ezen kívül a TG2 KO regenerálódó izomrostoknál a centrális sejtmagokat kvantifikálva kevesebb többmagvú sejtet detektáltunk, mely abnormális mioblaszt fúzióra utalhat.

A regeneráció kezdeti fázisában az izomba beáramló neutrofilek és gyulladási makrofágok, valamint a pár nappal később megjelenő "gyógyító" makrofágok számában nem tapasztaltunk különbséget a TG2 hiányos és vad típusú egerekben. Ha a jelen lévő immunsejtek számában nincs is különbség, az általuk termelt, a regenerációt nagyban befolyásoló molekulák mennyiségéről ez már nem mondható el. Kvantitatív valós idejű PCR segítségével megállapítottuk, hogy a regeneráció kezdeti szakaszában a TG2 hiányos izomban jelen lévő leukociták kevésbé expresszálják a szatellita sejtek aktivációjához is elengedhetetlen (Perdiguero és mtsai, 2011) gyulladási citokineket (TNF α , IL1, IL6). Ezen felül, a regeneráció későbbi szakaszában, mikor már a neutrofilek eltűnnek a színről és a "gyógyító" makrofágok dominálnak, a TG2 hiányos izomban csökkent az anti-inflammatorikus TGF β 1, ugyanakkor megnövekedett a gyulladáshoz IL1 és TNF α citokinek expressziója. Ezek alapján úgy tűnik, hogy a TG2 hiányában az izomregeneráció során lezajló gyulladási válasz csökkenten, vagy kissé késleltetve jelenik meg (21. ábra).

A Gdf3 növekedési faktort izomregeneráció során PPAR γ által szabályozott módon a "gyógyító" makrofágok termelik, mely a miogenikus sejtek fúzióját támogatja, így szükséges a sokmagvú izomrostok kialakulásához (Varga és mtsai, 2016b). A Gdf3 szintje a TG2 KO regenerálódó izmokban származó leukocitákban csökkent, melyet mind mRNS, mind fehérje szinten kimutattunk. Ebből tehát arra következtethetünk, hogy a TG2 akár a Gdf3 fehérje szintjének befolyásolásán keresztül is szerepet játszhat a mioblasztok fúziójában (21. ábra).



21. ábra: A TG2 szerepe a vázizom regenerációban TG2 hiányában a vázizomba infiltrálódó leukociták csökkent gyulladási citokin termelést mutatnak a regeneráció kezdeti fázisában, mely befolyásolhatja a szatellita sejtek aktiválódását. A regeneráció későbbi fázisában TG2 hiányában a makrofágok által termelt, a mioblasztok fúziójához szükséges növekedési faktor, a Gdf3 expressziója is csökkent, mely csökkent izomrost méretet eredményezhet. Az ábra (Varga és mtsai, 2016b) alapján lett módosítva.

A PS nem csak az apoptotikus sejtek bekebelezésénél játszik fontos szerepet, hanem bizonyos sejt-sejt fúziós folyamatokban is, beleértve a mioblasztok fúzióját. A PS a vázizom fejlődés során jelen van az élő mioblasztok felszínén és a miogén differenciáció során a sejtek kölcsönható régióiban fejeződik ki (van den Eijnde és mtsai, 2001). A PS bökölése gátolja a miotubulusok kialakulását a mioblaszt fúzió gátlásán keresztül (Jeong és Conboy, 2011). Egyes PS receptorok is részt vehetnek a mioblaszt fúzióban, ugyanis a PS receptorok által aktivált jelátviteli útvonalak a Rac1 GTPáz-t aktiválják, mely szükséges a mioblaszt fúzió során végbemenő citoskeletonális átrendeződésekhez is (Laurin és mtsai, 2008). A Bai1 és Stabilin 2 direkt PS receptorok aktivációja a mioblasztok felszínén lévő PS által szükséges a mioblasztok fúziójához, így hiányukban nem megfelelő izomfejlődés és csökkent sérülés utáni regeneráció tapasztalható (Hochreiter-Hufford és mtsai, 2013; Park és mtsai, 2016). Az embrionális vázizom fejlődés és a sérülést követő izomregeneráció során nagyon hasonló

folyamatok zajlanak le, így nem meglepő, hogy a PS, a Bai1 és a Stabilin 2 szerepe is mindkét folyamat során bizonyítást nyert. A TG2 szintén részt vehet a mioblaszt fúzióban azáltal, hogy szerepet játszik a PS felismerésében az integrin $\beta 3$ és MFG-E8 molekulákkal együttműködve, így aktiválva a Rac1 általi citoszkeletális átrendeződést.

Ezen felül a TG2 más módon is köthető az izomnövekedéshez. Nemrégiben C2C12 mioblaszt sejtvonalon kimutatták, hogy tisztított tejsír globulus membrán (MFGM) fehérje frakció hatására, mely 82%-ban MFG-E8-at tartalmaz, az mTOR útvonalon keresztül hatva megnő a sejtek proliferációja (Li és mtsai, 2018). Az MFGM rendszeres fogyasztása táplálékkiegészítőként egészséges felnőtteknél javítja a vázizom fizikai teljesítményét, beleértve az izomrostok keresztmetszeti területének és vezetési sebességének növekedését (Ota és mtsai, 2015; Minegishi és mtsai, 2016). Időközben a szekretálódott TG2-ről is kiderült, hogy a G fehérjéhez kapcsolt receptor 56-hoz (GPR56) kapcsolódva, szintén az mTOR kináz komplex aktiválódásán keresztül, serkenti a C2C12 mioblasztok fehérje szintézisét, ezáltal növekedését (Kitakaze és mtsai, 2019).

A TG2 tehát egyrészt szerepet játszhat a mioblasztok fúziójában, mely mind az embrionális vázizom fejlődés, mind a sérülést követő izomregeneráció során magyarázatot adna a tapasztalt csökkent izomrost méretre a kontroll és a regenerálódó TG2 KO izmokban. Azonban a szekretálódott TG2 ezen kívül akár az MFG-E8-on, vagy a GPR56-on keresztül is serkentheti az mTOR jelátviteli útvonalat, ezáltal az izomrostok növekedését. Hogy a TG2 szerepét pontosítsuk, a továbbiakban C2C12 mioblaszt sejtvonalon szeretnénk megvizsgálni a TG2 gátlás/csendesítés hatását a sejtek fúziójára, valamint az mTOR útvonal aktivációjára.

6 ÖSSZEFOGLALÁS

Az immunrendszer professzionális fagocita sejtjeinek egyik fő feladata a szervezetünkben nap mint nap keletkező elhalt sejtek eltakarítása. Az apoptotikus sejtek felvételével ellentétben a nekrotikus sejtörmelék eltakarításáról viszonylag keveset tudunk, pedig ezek a különböző sejthalál típusok gyakran együtt jelennek meg patológiás helyzetekben. Kísérleteink során hő és H₂O₂ által elölt nekrotikus és szérum éheztetett apoptotikus timociták egér BMDM-ek általi felvételét vizsgáltuk *in vitro*. Eredményeink alapján a makrofágok azonos hatékonysággal képesek eltakarítani az apoptotikus és nekrotikus sejteket, valamint a két sejtípus verseng a makrofágok általi felvételért. A különféleképpen elhalt sejtek makrofágok általi felvétele hasonló morfológiájú mechanizmussal és legalább részben azonos fagocita receptorok közreműködésével (MerTK, Tim-4, integrin β 3, TG2), PS függő módon, akár ugyanazon a fagocita portálon keresztül is történhet. Az apoptotikus sejtek által kiváltott gyulladáscsökkentő hatás részben a bekebelezést követően a makrofágok lipid érzékelő receptorainak aktiválásán keresztül történik, mely hatására megnő a makrofágok fagocitáló képessége és anti-inflammatorikus citokin termelése. Kimutattuk, hogy a makrofágok különböző magreceptorainak stimulációja az apoptotikusakéhoz hasonlóan serkentette a nekrotikus sejtek felvételét is, valamint, hogy különböző magreceptor célgének (MerTK, TG2, C1qb, MFG-E8, SREBP1, RAR α) expressziója hasonlóképpen megnövekedett apoptotikus és nekrotikus sejtek bekebelezését követően. Összességében elmondhatjuk, hogy az apoptotikus és nekrotikus sejtek eltakarítása azonos mechanizmussal zajlik.

Az elhalt sejtek felismerésének hatására a fagocitákban aktiválódó, evolúciósan konzervált jelátviteli útvonalak hatására többek között aktiválódik a dinamin GTPáz, mely hozzájárul a bekebelezéshez szükséges citoskeletális átrendeződésekhez. A dinamin megfelelő működéséhez szükséges GTP-vel való ellátását az NDPK-k végzik. A dinamin és különböző NDPK-k kapcsolatát különböző membrán átrendeződési folyamatokban már több fajban is kimutatták. Mi egér modellben vizsgáltuk, hogy az Nme1 NDPK hogyan járul hozzá az apoptotikus sejtek eltakarításához. Nme1 csendesített makrofágok esetében csökkent apoptotikus sejt fagocitózist tapasztaltunk. Ezek alapján feltételezhető, hogy a dinamin és az Nme1 fagocitózist támogató kooperációja evolúciósan konzervált és szükséges a sikeres fagocitózis lezajlásához.

A TG2-nek többek között szerepe van az apoptózisban, és mint MFG-E8 kötő integrin koreceptor az elhalt sejtek PS függő fagocitózisában is. Ezen felül a TG2 a sebgyógyulási folyamatok és a szöveti fibrózis szabályozásában is részt vesz. Hogy megvizsgáljuk a TG2 vázizom regenerációban betöltött szerepét kísérleteink során CTX által okozott sérülést követően vizsgáltuk vad típusú és TG2 hiányos egerek TA lábszárizmait. A kontroll és regenerálódó izomrostok keresztmetszeti területének meghatározása alapján a TG2 hiánya a vázizom fejlődés és a regeneráció hatékonyságát is csökkenti. A TG2 KO izmokban tapasztalt kevesebb többmagvú izomrost jelenléte a mioblasztok fúziójának nem megfelelő működésére utalhat. Bár az izomban a gyulladás hatására megjelenő makrofágok és neutrofilek száma nem különbözött jelentős mértékben, a regeneráció kezdeti szakaszában TNF α , IL1 β és IL6 gyulladási citokinek, későbbi szakaszában a TGF β 1 anti-inflammatorikus citokin és az összes mért időpontban a Gdf3 növekedési faktor génexpressziója szignifikánsan alacsonyabb volt a TG2 hiányos leukocitákban. Ezek alapján arra következtethetünk, hogy a regeneráció során lezajló kezdeti gyulladásos fázis, mely szükséges a szatellita sejtek aktivációjához, a TG2 hiányában csökkent, esetleg késleltetve jelenik meg. Ezen felül az M2 vagy ún. "gyógyító" makrofágok anti-inflammatorikus citokin termelése is csökkentnek tűnik a TG2 KO regenerálódó izomban. A Gdf3 növekedési faktor izomregeneráció során a miogenikus sejtek fúzióját támogatja, így szükséges a sokmagvú izomrostok kialakulásához. Ezek alapján a TG2 a Gdf3 fehérje szintjének befolyásolásán keresztül is szerepet játszhat a mioblasztok fúziójában, valamint egyes PS receptorokhoz hasonlóan (Stabilin 2, Bai1), olyan jelátviteli útvonalakat aktiválhat, melyek a mioblaszt fúzió során végbemenő citoskeletális átrendeződésekhez is szükséges Rac1 GTPázot aktiválják. A szekretálódott TG2 ezen kívül akár az MFG-E8-on, vagy a GPR56-on keresztül is serkentheti az mTOR jelátviteli útvonalat, ezáltal az izomrostok növekedését.

7 SUMMARY

One of the major roles of professional phagocytes is the removal of dead cells in the body. In contrast to phagocytosis of apoptotic cells, however, little is known about the clearance of necrotic cells, though they often appear in various human pathologies, thus, must be cleared together. In the present study, we investigated phagocytosis of heat- or H₂O₂-killed necrotic and/or apoptotic thymocytes by mouse BMDMs *in vitro* and found that the two cell types are engulfed at equal efficiency and compete with each other when added together to BMDMs. The uptake of different dead cells by macrophages happens via similar mechanism and with the participation of the same phagocytic receptors (MerTK, Tim-4, integrin β 3, TG2) in a PS dependent way. One of the anti-inflammatory effects of apoptotic cells is mediated via activation of nuclear receptors in phagocytes, leading to enhanced apoptotic cell phagocytosis and anti-inflammatory cytokine production. Indeed, stimulation of different nuclear receptors in macrophages enhanced both apoptotic and necrotic cell uptake. In addition, the expression of different nuclear receptor target genes (MerTK, TG2, C1qb, MFG-E8, SREBP1, RAR α) was similarly increased in response to uptake of apoptotic or necrotic cells. Our data indicate that apoptotic and necrotic cells are cleared via the same mechanisms.

During the uptake of dead cells the GTPase dynamin is activated via evolutionally conserved signaling pathways. Dynamin contributes to the cytoskeletal rearrangement which is required for the engulfment. NDPKs fuel dynamin with GTP required for its proper function. The contribution of dynamin and NDPKs in different membrane remodeling processes was observed in different species. We studied the role of the mouse NDPK, Nme1 in apoptotic cell clearance. The phagocytosis of apoptotic thymocytes was decreased in Nme1 silenced macrophages. Based on these data we can conclude that the phagocytosis promoting cooperation of dynamin and Nme1 is evolutionally conserved and required for the proper phagocytosis.

TG2 was shown to play a role both in apoptotic cell death and, as an MFG-E8 binding co-receptor of integrins, in the clearance of apoptotic cells. TG2 was also implicated as a regulator of wound healing, and tissue fibrosis. To determine the role of TG2 in the skeletal muscle regeneration we induced injury by CTX injection into the TA muscles of TG2^{+/+} and TG2^{-/-} mice. Based on cross-sectional area analysis of control and regenerating muscle fibers, the lack of TG2 affects the skeletal muscle development and reduces the effectivity of

regeneration. The lower number of multinucleated myofibers observed in TG2 KO muscles may refer to the impaired fusion of myoblasts. Although the number of infiltrating neutrophils and macrophages is similar during regeneration in wild type and TG2 deficient muscles, the gene expression of TNF α , IL1 β and IL6 pro-inflammatory cytokines 2 days post injury, the gene expression of TGF β 1 anti-inflammatory cytokine 4 days post injury and the expression of Gdf3 is reduced in leukocytes isolated from TG2^{-/-} muscles. These results indicate that in the absence of TG2 during skeletal muscle regeneration the initial inflammatory response, which is needed to the activation of satellite cells, is decreased or presumably delayed. In addition the anti-inflammatory cytokine production of healing macrophages is also reduced in TG2 deficient regenerating muscle. During muscle regeneration the growth factor Gdf3 enhances primary myoblast fusion thereby it is necessary for the formation of multinucleated myofibers. TG2 may play a role in myoblast fusion by influencing the level of GDF3 or similarly to other PS receptors (Stabilin 2, Bai1) by activating signaling pathways leading to the activation of Rac1 and cytoskeletal rearrangements needed to myoblast fusion. In addition secreted TG2 may enhance the effect of mTOR signaling thereby the growth of myofibers through MFG-E8 or GRP56.

8 IRODALOMJEGYZÉK

- Abou-Khalil R, Le Grand F, Pallafacchina G, Valable S, Authier FJ, Rudnicki MA, Gherardi RK, Germain S, Chretien F, Sotiropoulos A, Lafuste P, Montarras D, Chazaud B (2009) Autocrine and paracrine Angiopoietin 1/Tie -2 signalling promotes muscle satellite cell self-renewal. *Cell Stem Cell*. 5:298-309.
- Aeschlimann D, Thommazy V (2000) Protein crosslinking in assembly and remodelling of extracellular matrices: the role of transglutaminases. *Connect Tissue Res*. 41:1-27.
- A-Gonzalez N, Hidalgo A (2014) Nuclear Receptors and Clearance of Apoptotic Cells: Stimulating the Macrophage's Appetite. *Front Immunol*. 5:211.
- A-Gonzalez N, Bensinger SJ, Hong C, Beceiro S, Bradley MN, Zelcer N, Deniz J, Ramirez C, Diaz M, Gallardo G, de Galarreta CR, Salazar J, Lopez F, Edwards P, Parks J, Andujar M, Tontonoz P, Castrillo A (2009) Apoptotic cells promote their own clearance and immune tolerance through activation of the nuclear receptor LXR. *Immunity*. 31:245-258.
- Akimov SS, Belkin AM (2001) Cell surface tissue transglutaminase is involved in adhesion and migration of monocytic cells on fibronectin. *Blood*. 98:1567-76.
- Akimov SS, Krylov D, Fleischman LF, Belkin AM (2000) Tissue transglutaminase is an integrin-binding adhesion coreceptor for fibronectin. *J Cell Biol*. 148:825-838
- Albert ML, Kim JI, Birge RB (2000) $\alpha 5 \beta 1$ integrin recruits the CrkII/Dock180-rac1 complex for phagocytosis of apoptotic cells. *Nat Cell Biol*. 2:899-905.
- Albina JE, Mills CD, Barbul A, Thirkill CE, Henry WL Jr, Mastrofrancesco B, Caldwell MD (1988) Arginine metabolism in wounds. *Am J Physiol*. 254:459-67.
- Anderson HA, Maylock CA, Williams JA, Paweletz CP, Shu H, Shacter E (2003) Serum-derived protein S binds to phosphatidylserine and stimulates the phagocytosis of apoptotic cells. *Nat. Immunol*. 4:87-91.
- Arnold, L., Henry, A., Poron, F., Baba -Amer, Y., van Rooijen, N., Plonquet, A., Gherardi, R.K. and Chazaud, B (2007) Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *J Exp Med*. 204:1071-1081.
- Arur S, Uche UE, Rezaul K, Fong M, Scranton V, Cowan AE, Mohler W, Han DK (2003) Annexin I is an endogenous ligand that mediates apoptotic cell engulfment. *Dev Cell*. 4:587-598.
- Balklava Z, Verderio E, Collighan R, Gross S, Adams J, Griffin M (2002) Analysis of tissue transglutaminase function in the migration of Swiss 3T3 fibroblasts: the active-state conformation of the enzyme does not affect cell motility but it is important for its secretion. *J Biol Chem*. 277:16567-16575.
- Barnhart BC, Alappat EC, Peter ME (2003) The CD95 type I/type II model. *Semin Immunol*. 15:185-93.
- Beauchamp JR, Heslop L, Yu DS, Tajbakhsh S, Kelly RG, Wernig A, Buckingham ME, Partridge TA, Zammit PS (2000) Expression of CD34 and Myf5 defines the majority of quiescent adult skeletal muscle satellite cells. *J Cell Biol*. 151:1221-1234.
- Belkin AM (2011) Extracellular TG2: emerging functions and regulation. *FEBS J*. 278:4704-16.
- Belkin AM, Akimov SS, Zaritskaya LS, Ratnikov BI, Deryugina EI, Strongin AY (2001) Matrix-dependent proteolysis of surface transglutaminase by membrane-type metalloproteinase regulates cancer cell adhesion and locomotion. *J Biol Chem*. 276:18415-18422.

- Bersten AM, Ahkong QF, Hallinan T, Nelson SJ, Lucy JA (1983) Inhibition of the formation of myotubes in vitro by inhibitors of transglutaminase. *Biochim Biophys Acta*. 762:429-36.
- Birge RB, Ucker DS. (2008) Innate apoptotic immunity: the calming touch of death. *Cell Death Differ*. 15:1096–102.
- Boissan M, Montagnac G, Shen Q, Griparic L, Guitton J, Romao M, Sauvonnet N, Lagache T, Lascu I, Raposo G, Desbourdes C, Schlattner U, Lacombe M-L, Polo S, van der Blik AM, Roux A, Chavrier P (2014) Membrane trafficking. Nucleoside diphosphate kinases fuel dynamin superfamily proteins with GTP for membrane remodeling. *Science*. 344:1510–1515.
- Borisenko GG, Matura T, Liu SX, Tyurin VA, Jianfei J, Serinkan FB, Kagan VE (2003) Macrophage recognition of externalized phosphatidylserine and phagocytosis of apoptotic Jurkat cells—existence of a threshold. *Arch Biochem Biophys*. 413:41–52.
- Bottcher A, Gaip US, Furnrohr BG, Herrmann M, Girkontaite I, Kalden JR and Voll RE (2006) Involvement of phosphatidylserine, alphavbeta3, CD14, CD36, and complement C1q in the phagocytosis of primary necrotic lymphocytes by macrophages. *Arthritis Rheum*. 54: 927–938.
- Bournazou I, Mackenzie KJ, Duffin R, Rossi AG, Gregory CD (2010) Inhibition of eosinophil migration by lactoferrin. *Immunol Cell Biol*. 88:220–223.
- Bournazou I, Pound JD, Duffin R, Bournazos S, Melville LA, Brown SB, Rossi AG, Gregory CD (2009) Apoptotic human cells inhibit migration of granulocytes via release of lactoferrin. *J Clin Invest*. 119:20–32.
- Brenner D, Blaser H, Mak TW (2015) Regulation of tumour necrosis factor signalling: live or let die. *Nat Rev Immunol*. 15:362–74.
- Brigitte M, Schilte C, Plonquet A, Baba-Amer Y, Henri A, Charlier C, Tajbakhsh S, Albert M, Gherardi RK, Chrétien F (2010). Muscle resident macrophages control the immune cell reaction in a mouse model of notexin -induced myoinjury. *Arthritis Rheum*. 62:268 - 279.
- Brouckaert G, Kalai M, Krysko DV, Saelens X, Vercammen D, Ndlovu MN, Haegeman G, D'Herde K, Vandenabeele P (2004) Phagocytosis of necrotic cells by macrophages is phosphatidylserine dependent and does not induce inflammatory cytokine production. *Mol Biol Cell*. 15:1089-100.
- Brown S, Heinisch I, Ross E, Shaw K, Buckley CD, Savill J (2002) Apoptosis disables CD31-mediated cell detachment from phagocytes promoting binding and engulfment. *Nature*. 418:200–3.
- Buja LM, Eigenbrodt ML and Eigenbrodt EH (1993) Apoptosis and necrosis. Basic types and mechanisms of cell death. *Arch Pathol Lab Med*. 117:1208–1214.
- Burzyn D, Kuswanto W, Kolodin D, Shadrach JL, Cerletti M, Jang Y, Sefik E, Tan TG, Wagers AJ, Benoist C, Mathis D (2013) A special population of regulatory T cells potentiates muscle repair. *Cell*. 155:1282 -1295.
- Cejna M, Fritsch G, Printz D, Schulte-Hermann R and Bursch W (1994) Kinetics of apoptosis and secondary necrosis in cultured rat thymocytes and S.49 mouse lymphoma and CEM human leukemia cells. *Biochem Cell Biol*. 72:677–685.
- Chekeni FB, Elliott MR, Sandilos JK, Walk SF, Kinchen JM, Lazarowski ER, Armstrong AJ, Penuela S, Laird DW, Salvesen GS, Isakson BE, Bayliss DA, Ravichandran KS (2010) Pannexin 1 channels mediate 'find-me' signal release and membrane permeability during apoptosis. *Nature*. 467:863–867.
- Chekeni FB, Ravichandran KS (2011) The role of nucleotides in apoptotic cell clearance: implications for disease pathogenesis. *J. Mol. Med*. 89:13–22

- Chen W, Frank ME, Jin W, Wahl SM (2001) TGF- β released by apoptotic T cells contributes to an immunosuppressive milieu. *Immunity*. 14:715–25.
- Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, McGrady G, Wahl SM (2003) Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med*. 198:1875–86.
- Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Tewari M, Dixit VM (1995) FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell*. 81:505–12.
- Choi SC, Simhadri VR, Tian L, Gil-Krzewska A, Krzewski K, Borrego F, Coligan JE (2011) Cutting edge: mouse CD300f (CMRF-35-like molecule-1) recognizes outer membrane-exposed phosphatidylserine and can promote phagocytosis. *J Immunol* 187: 3483–3487.
- Choi YC, Kim TS, Kim SY (2004) Increase in transglutaminase 2 in idiopathic inflammatory myopathies. *EurNeurol*. 51:10-4
- Christov C, Chrétien F, Abou-Khalil R, Bassez G, Vallet G, Authier FJ, Bassaglia Y, Shinin V, Tajbakhsh S, Chazaud B, Gherardi RK (2007) Muscle satellite cells and endothelial cells: close neighbors and privileged partners. *Mol Biol Cell*. 18:1397 -1409.
- Chrobok NL, Sestito C, Wilhelmus MMM, Drukarch B, van Dam AM (2017) Is monocyte- and macrophage-derived tissue transglutaminase involved in inflammatory processes? *Amino Acids*. 49: 441–452.
- Cocco RE and Ucker DS (2001) Distinct modes of macrophage recognition for apoptotic and necrotic cells are not specified exclusively by phosphatidylserine exposure. *Mol. Biol. Cell*. 12:919–930
- Cornelison DD, Olwin BB, Rudnicki MA, Wold BJ (2000) MyoD(-/-) satellite cells in singlefiber culture are differentiation defective and MRF4 deficient. *Dev Biol*. 224:122–137.
- Cornelison DD, Wold BJ (1997) Single-cell analysis of regulatory gene expression in quiescent and activated mouse skeletal muscle satellite cells. *Dev Biol*. 191:270 –283.
- Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, Adams JM (2014) Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 15:49–63.
- De Laurenzi V, Melino G (2001) Gene disruption of tissue transglutaminase. *Mol Cell Biol*. 21:148-55.
- Devitt A, Moffatt OD, Raykundalia C, Capra JD, Simmons DL, Gregory CD (1998) Human CD14 mediates recognition and phagocytosis of apoptotic cells. *Nature*. 392: 505–509.
- Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X (2000) Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*. 102:33–42.
- Duró E, Pallai A, Köröskényi K, Sarang Z, Szondy Z (2014) Adenosine A3 receptors negatively regulate the engulfment-dependent apoptotic cell suppression of inflammation. *Immunol Lett*. 162:292–301.
- Eckert RL, Kaartinen MT, Nurminkaya M, Belkin AM, Colak G, Johnson GV, Mehta K (2014) Transglutaminase regulation of cell function. *Physiol Rev*. 94: 383-417.
- Elliott MR, Chekeni FB, Trampont PC, Lazarowski ER, Kadl A, Walk SF, Park D, Woodson RI, Ostankovich M, Sharma P, Lysiak JJ, Harden TK, Leitinger N, Ravichandran KS (2009) Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. *Nature*. 461:282–286.
- Elward K, Gasque P (2003) 'Eat me' and 'don't eat me' signals govern the innate immune response and tissue repair in the CNS: emphasis on the critical role of the complement system. *Mol Immunol*. 40:85–94.

- Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S (1998) A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature*. 391:43–50.
- Fadok VA, Bratton DL, Guthrie L and Henson PM (2001) Differential effects of apoptotic versus lysed cells on macrophage production of cytokines: role of proteases. *J Immunol*. 166:6847–6854.
- Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, Freed PW, Westcott JY, Henson PM (1998a) Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J Clin Invest*. 101:890–8.
- Fadok VA, Warner ML, Bratton DL, Henson PM (1998b) CD36 is required for phagocytosis of apoptotic cells by human macrophages that use either a phosphatidylserine receptor or the vitronectin receptor (alpha v beta 3). *J Immunol*. 161:6250–6257.
- Falasca L, Iadevaia V, Ciccocanti F, Melino G, Serafino A, Piacentini M (2005) Transglutaminase type II is a key element in the regulation of the antiinflammatory response elicited by apoptotic cell engulfment. *J Immunol*. 174:7330–40.
- Fancsalszky L, Monostori E, Farkas Z, Pourkarimi E, Masoudi N, Hargitai B, Bosnar MH, Dezeljin, M, Zsakai A, Vellai T, Mehta A, and Takacs-Vellai K (2014) NDK-1, the homolog of NM23-H1/ H2 regulates cell migration and apoptotic engulfment in *C. elegans*. *PLoS One*. 9:e92687
- Fésüs L, Piacentini M (2002) Transglutaminase 2: an enigmatic enzyme with diverse functions. *Trends Biochem Sci*. 27:534-9.
- Fésüs L, Szondy Z (2005) Transglutaminase 2 in the balance of cell death and survival. *FEBS Lett*. 579:3297-302.
- Fesüs L, Thomazy V, Falus A (1987) Induction and activation of tissue transglutaminase during programmed cell death. *FEBS Lett*. 224:104-8.
- Flannagan RS, Canton J, Furuya W, Glogauer M, Grinstein S (2014) The phosphatidylserine receptor TIM4 utilizes integrins as coreceptors to effect phagocytosis. *Mol Biol Cell*. 25:1511–1522.
- Freire-de-Lima CG, Xiao YQ, Gardai SJ, Bratton DL, Schiemann WP, Henson PM (2006) Apoptotic cells, through transforming growth factor-beta, coordinately induce anti-inflammatory and suppress pro-inflammatory eicosanoid and NO synthesis in murine macrophages. *J Biol Chem*. 281:38376–84.
- Gaipl US, Kuhn A, Sheriff A, Munoz LE, Franz S, Voll RE, Kalden JR, Herrmann M (2006) Clearance of apoptotic cells in human SLE. *Curr Dir Autoimmun*. 9:173–187.
- Galluzzi L, Kroemer G (2008) Necroptosis: a specialized pathway of programmed necrosis. *Cell*. 135:1161–1163.
- Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA et al (2018) Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ*. 25:486–541.
- Galvan MD, Foreman DB, Zeng E, Tan JC, Bohlson SS (2012) Complement component C1q regulates macrophage expression of Mer tyrosine kinase to promote clearance of apoptotic cells. *J Immunol* 188:3716–3723.
- Gamble JR, Vadas MA (1988) Endothelial adhesiveness for blood neutrophils is inhibited by transforming growth factor-beta. *Science*. 242:97–9.
- Gao Y, Herndon JM, Zhang H, Griffith TS, Ferguson TA (1998) Antiinflammatory effects of CD95 ligand (FasL)-induced apoptosis. *J Exp Med*. 188:887–96.
- Garabuczi É, Kiss B, Felszeghy S, Tsay GJ, Fésüs L, Szondy Z (2013) Retinoids produced by macrophages engulfing apoptotic cells contribute to the appearance of transglutaminase 2 in apoptotic thymocytes. *Amino Acids*. 44:235–44.

- Gardai SJ, McPhillips KA, Frasn SC, Janssen WJ, Starefeldt A, Murphy-Ullrich JE, Bratton DL, Oldenborg PA, Michalak M, Henson PM (2005) Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte. *Cell*. 123:321–34.
- Geissmann F, Jung S, Littman DR (2003) Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity*. 19:71–82.
- Gibert B, Mehlen P (2015) Dependence receptors and cancer: addiction to trophic ligands. *Cancer Res*. 75:5171–75.
- Gold ES, Underhill DM, Morrissette NS, Guo J, McNiven MA, Aderem A (1999) Dynamin 2 is required for phagocytosis in macrophages. *J. Exp. Med*. 190:1849–1856.
- Greenberg CD, Birckbichler PJ, Rice RH (1991) Transglutaminases: multifunctional cross-linking enzymes that stabilize tissues. *FASEB J*. 5: 3071–7.
- Greenberg ME, Sun M, Zhang R, Febbraio M, Silverstein R, Hazen SL (2006) Oxidized phosphatidylserine-CD36 interactions play an essential role in macrophage-dependent phagocytosis of apoptotic cells. *J. Exp. Med*. 203:2613–25.
- Gross A, Yin XM, Wang K, Wei MC, Jockel J, Milliman C, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Korsmeyer SJ (1999) Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death. *J Biol Chem*. 274:1156–63.
- Gude DR, Alvarez SE, Paugh SW, Mitra P, Yu J, Griffiths R, Barbour SE, Milstien S, Spiegel S (2008) Apoptosis induces expression of sphingosine kinase 1 to release sphingosine-1-phosphate as a ‘come-and-get-me’ signal. *FASEB J*. 22:2629–2638.
- Gumienny TL, Brugnera E, Tosello-Trampont AC, Kinchen JM, Haney LB, Nishiwaki K, Walk SF, Nemergut ME, Macara IG, Francis R, Schedl T, Qin Y, Van Aelst L, Hengartner MO, Ravichandran KS (2001) CED-12/ELMO, a novel member of the CrkII/Dock180/ Rac pathway, is required for phagocytosis and cell migration. *Cell*. 107:27–41.
- Gundemir S, Colak G, Tucholski J, Johnson GV (2012) Transglutaminase 2: a molecular Swiss army knife. *Biochim Biophys Acta*. 1823:406–19.
- Hamon Y, Trompier D, Ma Z, Venegas V, Pophillat M, Mignotte V, Zhou Z, Chimini G (2006) Cooperation between engulfment receptors: the case of ABCA1 and MEGF10. *PLoS ONE* 1. e120.
- Hamon Y, Broccardo C, Chambenoit O, Luciani MF, Toti F, Chaslin S, Freyssinet JM, Devaux PF, McNeish J, Marguet D, Chimini G (2000) ABC1 promotes engulfment of apoptotic cells and transbilayer redistribution of phosphatidylserine. *Nat Cell Biol*. 2:399–406.
- Han CZ, Ravichandran KS (2011) Metabolic Connections during Apoptotic Cell Engulfment. *Cell*. 147:1442–1445.
- Hanayama R, Tanaka M, Miwa K, Shinohara A, Iwamatsu A, Nagata S. 2002. Identification of a factor that links apoptotic cells to phagocytes. *Nature*. 417:182–87.
- Hardie DG (2014) AMPK--sensing energy while talking to other signaling pathways. *Cell Metab*. 20:939–52.
- Haroon ZA, Hettasch JM, Lai TS, Dewhirst MW, Greenberg CS (1999) Tissue transglutaminase is expressed, active, and directly involved in rat dermal wound healing and angiogenesis. *FASEB J*. 13:1787–95.
- Hart SP, Dransfield I, Rossi AG (2008) Phagocytosis of apoptotic cells. *Methods*. 44:280–5.
- Haschemi A, Kosma P, Gille L, Evans CR, Burant CF, Starkl P, Knapp B, Haas R, Schmid JA, Jandl C, Amir S, Lubec G, Park J, Esterbauer H, Bilban M, Brizuela L, Pospisilik JA, Otterbein LE, Wagner O (2012) The sedoheptulose kinase CARKL directs

- macrophage polarization through control of glucose metabolism. *Cell Metab.* 15:813–26.
- He M, Kubo H, Morimoto K, Fujino N, Suzuki T, Takahashi T, Yamada M, Yamaya M, Maekawa T, Yamamoto Y, Yamamoto H (2011) Receptor for advanced glycation end products binds to phosphatidylserine and assists in the clearance of apoptotic cells. *EMBO Rep.* 12: 358–364.
- Heredia JE, Mukundan L, Chen FM, Mueller AA, Deo RC, Locksley RM, Rando TA, Chawla A (2013) Type 2 innate signals stimulate fibro/adipogenic progenitors to facilitate muscle regeneration. *Cell.* 153:376–388.
- Hirt UA, Leist M (2003) Rapid, noninflammatory and PS-dependent phagocytic clearance of necrotic cells. *Cell Death Differ.* 10:1156–1164.
- Hochreiter-Hufford A, Ravichandran KS (2013) Clearing the dead: apoptotic cell sensing, recognition, engulfment, and digestion. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 5:a008748.
- Hochreiter-Hufford AE, Lee CS, Kinchen JM, Sokolowski JD, Arandjelovic S, Call JA, Klibanov AL, Yan Z, Mandell JW, Ravichandran KS (2013) Phosphatidylserine receptor BAI1 and apoptotic cells as new promoters of myoblast fusion. *Nature.* 497:263–7.
- Huang LS, Hung ND, Sok DE, Kim MR (2010) Lysophosphatidylcholine containing docosahexaenoic acid at the sn-1 position is anti-inflammatory. *Lipids.* 45:225–36.
- Huang SC, Smith AM, Everts B, Colonna M, Pearce EL, Schilling JD, Pearce EJ (2016) Metabolic Reprogramming Mediated by the mTORC2-IRF4 Signaling Axis Is Essential for Macrophage Alternative Activation. *Immunity.* 45:817–830.
- Hurwitz ME, Vanderzalm PJ, Bloom L, Goldman J, Garriga G, Horvitz HR (2009) Abl kinase inhibits the engulfment of apoptotic corrected cells in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Biol.* 7:e99.
- Huynh ML, Fadok VA, Henson PM (2002) Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF-beta1 secretion and the resolution of inflammation. *J Clin Invest.* 109:41–50.
- Ichim G, Tait SW (2016) A fate worse than death: apoptosis as an oncogenic process. *Nat Rev Cancer.* 16:539–48.
- Ipseiz N, Uderhardt S, Scholtysek C, Steffen M, Schabbauer G, Bozec A, Schett G, Krönke G (2014) The nuclear receptor Nr4a1 mediates anti-inflammatory effects of apoptotic cells. *J Immunol.* 192:4852–8.
- Isobe T, Takahashi H, Ueki S, Takagi J, Saito Y (1999) Activity-independent cell adhesion to tissue-type transglutaminase is mediated by alpha4beta1 integrin. *Eur J Cell Biol.* 78:876–883.
- Jehle AW, Gardai SJ, Li S, Linsel-Nitschke P, Morimoto K, Janssen WJ, Vandivier RW, Wang N, Greenberg S, Dale BM, Qin C, Henson PM, Tall AR (2006) ATP-binding cassette transporter A7 enhances phagocytosis of apoptotic cells and associated ERK signaling in macrophages. *J Cell Biol.* 174:547–556.
- Jeong HW, Hsu KC, Lee JW, Ham M, Huh JY, Shin HJ, Kim WS, Kim JB (2009) Berberine suppresses proinflammatory responses through AMPK activation in macrophages. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 296:E955–E964.
- Jeong J, Conboy IM (2011) Phosphatidylserine directly and positively regulates fusion of myoblasts into myotubes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 414:9–13.
- Jha AK, Huang SC, Sergushichev A, Lampropoulou V, Ivanova Y, Loginicheva E, Chmielewski K, Stewart KM, Ashall J, Everts B, Pearce EJ, Driggers EM, Artyomov MN (2015) Network integration of parallel metabolic and transcriptional data reveals metabolic modules that regulate macrophage polarization. *Immunity.* 42:419–30.

- Johnson TS, Griffin M, Thomas GL, Skill J, Cox A, Yang B, Nicholas B, Birckbichler PJ, Muchaneta-Kubara C, Meguid El Nahas A (1997) The role of transglutaminase in the rat subtotal nephrectomy model of renal fibrosis. *J Clin Invest.* 99:2950-60.
- Juban G, Chazaud B (2017) Metabolic regulation of macrophages during tissue repair: insights from skeletal muscle regeneration. *FEBS Lett.* 591:3007-3021.
- Julien O, Wells JA (2017) Caspases and their substrates. *Cell Death Differ.* 24:1380–89.
- Kallenberger SM, et al. Intra- and interdimeric caspase-8 selfcleavage controls strength and timing of CD95-induced apoptosis. *Sci Signal.* 2014;7:ra23.
- Kanchan K, Fuxreiter M, Fesus L (2015) Physiological, pathological, and structural implications of nonenzymatic protein–protein interactions of the multifunctional human transglutaminase 2. *Cell Mol Life Sci.* 72:3009-35.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 26:239–257.
- Kharraz Y, Guerra J, Mann CJ, Serrano AL, Muñoz-Cánoves P (2013) Macrophage plasticity and the role of inflammation in skeletal muscle repair. *Mediators Inflamm.* 2013:491497.
- Kidani Y, Bensinger SJ (2012) Liver X receptor and peroxisome proliferator-activated receptor as integrators of lipid homeostasis and immunity. *Immunol Rev.* 249:72–83.
- Kim JW, Tchernyshyov I, Semenza GL, Dang CV (2006) HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab.* 3:177–85.
- Kinchen JM, Cabello J, Klingele D, Wong K, Feichtinger R, Schnabel H, Schnabel R, Hengartner MO (2005) Two pathways converge at CED-10 to mediate actin rearrangement and corpse removal in *C. elegans*. *Nature.* 434:93–99.
- Kiss RS, Elliott MR, Ma Z, Marcel YL, Ravichandran KS (2006) Apoptotic cells induce a phosphatidylserine-dependent homeostatic response from phagocytes. *Curr Biol.* 16:2252–2258.
- Kitakaze T, Yoshikawa M, Kobayashi Y, Kimura N, Goshima N, Ishikawa T, Ogata Y, Yamashita Y, Ashida H, Harada N, Yamaji R (2019) Extracellular transglutaminase 2 induces myotube hypertrophy through G protein-coupled receptor 56. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 27:118563.
- Konkel JE, Jin W, Abbatiello B, Grainger JR, Chen W (2014) Thymocyte apoptosis drives the intrathymic generation of regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 111:E465–73.
- Köröskényi K, Duró E, Pallai A, Sarang Z, Kloor D, Ucker DS, Beceiro S, Castrillo A, Chawla A, Ledent CA, Fésüs L, Szondy Z (2011) Involvement of adenosine A2A receptors in engulfment-dependent apoptotic cell suppression of inflammation. *J Immunol.* 186:7144–55.
- Krishnan KS, Rikhy R, Rao S, Shivalkar M, Mosko M, Narayanan R, Etter P, Estes PS, Ramaswami M (2001) Nucleoside diphosphate kinase, a source of GTP, is required for dynamin-dependent synaptic vesicle recycling. *Neuron.* 30:197–210.
- Krysko O, De Ridder L, Cornelissen M (2004) Phosphatidylserine exposure during early primary necrosis (oncosis) in JB6 cells as evidenced by immunogold labeling technique. *Apoptosis.* 9:495–500.
- Krysko DV, Brouckaert G, Kalai M, Vandenabeele P, D'Herde K (2003) Mechanisms of internalization of apoptotic and necrotic L929 cells by a macrophage cell line studied by electron microscopy. *J Morphol.* 258:336-45.
- Krysko DV, Denecker G, Festjens N, Gabriels S, Parthoens E, D'Herde K, Vandenabeele P (2006) Macrophages use different internalization mechanisms to clear apoptotic and necrotic cells. *Cell Death Differ.* 13:2011-22.

- Kuang S, Kuroda K, Le Grand F, Rudnicki MA (2007) Asymmetric self-renewal and commitment of satellite stem cells in muscle. *Cell*. 129:999–1010.
- Lauber K, Bohn E, Kröber SM, Xiao YJ, Blumenthal SG, Lindemann RK, Marini P, Wiedig C, Zobywalski A, Baksh S, Xu Y, Autenrieth IB, Schulze-Osthoff K, Belka C, Stuhler G, Wesselborg S (2003) Apoptotic cells induce migration of phagocytes via caspase-3-mediated release of a lipid attraction signal. *Cell*. 113:717–730.
- Laurin M, Fradet N, Blangy A, Hall A, Vuori K, Coté JF (2008) The atypical Rac activator Dock180 (Dock1) regulates myoblast fusion in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105:15446-51.
- Lecoeur H, Prevost MC, Gougeon ML (2001) Oncosis is associated with exposure of phosphatidylserine residues on the outside layer of the plasma membrane: a reconsideration of the specificity of the annexin V/propidium iodide assay. *Cytometry*. 44:65–72.
- Lee CH, Chawla A, Urbiztondo N, Liao D, Boisvert WA, Evans RM, Curtiss LK (2003) Transcriptional repression of atherogenic inflammation: modulation by PPARdelta. *Science*. 302:453–7.
- Lee J, Kim YS, Choi DH, Bang MS, Han TR, Joh TH, Kim SY (2004) Transglutaminase 2 induces nuclear factor-kappaB activation via a novel pathway in BV-2 microglia. *J Biol Chem*. 279:53725-35.
- Lemos DR, Babaeijandaghi F, Low M, Chang CK, Lee ST, Fiore D, Zhang RH, Natarajan A, Nedospasov SA, Rossi FM (2015) Nilotinib reduces muscle fibrosis in chronic muscle injury by promoting TNF -mediated apoptosis of fibro/adipogenic progenitors. *Nat Med*. 21:786 -94.
- Lesort M, Attanavanich K, Zhang J, Johnson GV (1998) Distinct nuclear localization and activity of tissue transglutaminase. *J Biol Chem*. 273:11991-4.
- Levings MK, Bacchetta R, Schulz U, Roncarolo MG (2002) The role of IL-10 and TGF-beta in the differentiation and effector function of T regulatory cells. *Int Arch Allergy Immunol*. 129:263–76.
- Li H, Xu W, Ma Y, Zhou S, Xiao R (2018) Milk fat globule membrane protein promotes C2C12 cell proliferation through the PI3K/Akt signaling pathway. *Int J Biol Macromol*. 114:1305-1314.
- Li L, Liu Y, Chen HZ, Li FW, Wu JF, Zhang HK, He JP, Xing YZ, Chen Y, Wang WJ, Tian XY, Li AZ, Zhang Q, Huang PQ, Han J, Lin T, Wu Q (2015) Impeding the interaction between Nur77 and p38 reduces LPS-induced inflammation. *Nat Chem Biol*. 11:339–46.
- Li M, Carpio DF, Zheng Y, Bruzzo P, Singh V, Ouaz F, Medzhitov RM, Beg AA (2001) An essential role of the NF-kappa B/Toll-like receptor pathway in induction of inflammatory and tissue-repair gene expression by necrotic cells. *J Immunol*. 166:7128–7135.
- Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X (1997) Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*. 91:479–89.
- Li XM, Zhang S, He XS, Guo PD, Lu XX, Wang JR, Li JM, Wu H (2016) Nur77-mediated TRAF6 signalling protects against LPS-induced sepsis in mice. *J Inflamm (Lond)*. 13:4.
- Li Z, Venegas V, Nagaoka Y, Morino E, Raghavan P, Audhya A, Nakanishi Y, Zhou Z (2015) Necrotic cells actively attract phagocytes through the collaborative action of two distinct PS-exposure mechanisms. *PLoS Genet*. 11:e1005285.

- Linke B, Abeler-Dörner L, Jahndel V, Kurz A, Mahr A, Pfrang S, Linke L, Krammer PH, Weyd H (2015) The tolerogenic function of annexins on apoptotic cells is mediated by the annexin core domain. *J Immunol.* 194:5233–5242.
- Littlewood-Evans A, Sarret S, Apfel V, Loesle P, Dawson J, Zhang J, Muller A, Tigani B, Kneuer R, Patel S, Valeaux S, Gommermann N, Rubic-Schneider T, Junt T, Carballido JM (2016) GPR91 senses extracellular succinate released from inflammatory macrophages and exacerbates rheumatoid arthritis. *J Exp Med.* 213:1655–62.
- Liu QA, Hengartner M (1998) Candidate adaptor protein CED-6 promotes the engulfment of apoptotic cells in *C. elegans*. *Cell.* 93:961–972.
- Lopez-Dee Z, Pidcock K, Gutierrez LS (2011) Thrombospondin-1: multiple paths to inflammation. *Mediators Inflamm.* 2011:296069.
- Lorand L, Graham RM (2003) Transglutaminases: crosslinking enzymes with pleiotropic functions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4:140–56.
- Lucas M, Stuart LM, Zhang A, Hodivala-Dilke K, Febbraio M, Silverstein R, Savill J, Lacy-Hulbert A (2006) Requirements for apoptotic cell contact in regulation of macrophage responses. *J Immunol.* 177:4047–54.
- Luo B, Gan W, Liu Z, Shen Z, Wang J, Shi R, Liu Y, Liu Y, Jiang M, Zhang Z, Wu Y (2016) Erythropoietin signaling in macrophages promotes dying cell clearance and immune tolerance. *Immunity.* 44:287–302.
- Marichal T, Ohata K, Bedoret D, Mesnil C, Sabatel C, Kobiyama K, Lekeux P, Coban C, Akira S, Ishii KJ, Bureau F, Desmet CJ (2011) DNA released from dying host cells mediates aluminum adjuvant activity. *Nat Med.* 17:996–1002.
- Marie-Anais F, Mazzolini J, Herit F, Niedergang F (2016) Dynamin-actin cross talk contributes to phagosome formation and closure. *Traffic.* 17:487–499.
- Mauro A (1961) Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J Biophys Biochem Cytol.* 9:493–495.
- Mehlen P, Tauszig-Delamasure S (2014) Dependence receptors and colorectal cancer. *Gut.* 63:1821–29.
- Miksa M, Amin D, Wu R, Ravikumar TS, Wang P (2007) Fractalkine-induced MFG-E8 leads to enhanced apoptotic cell clearance by macrophages. *Mol Med.* 13:553–560.
- Milakovic T, Tucholski J, McCoy E, Johnson GV (2004) Intracellular localization and activity state of tissue transglutaminase differentially impacts cell death. *J Biol Chem.* 279: 8715-22.
- Mills EL, Kelly B, Logan A, Costa ASH, Varma M, Bryant CE, Turlomousis P, Däbritz JHM, Gottlieb E, Latorre I, Corr SC, McManus G, Ryan D, Jacobs HT, Szibor M, Xavier RJ, Braun T, Frezza C, Murphy MP, O'Neill LA (2016) Succinate dehydrogenase supports metabolic repurposing of mitochondria to drive inflammatory macrophages. *Cell.* 167:457–70e13.
- Minegishi Y, Ota N, Soga S, Shimotoyodome A (2016) Effects of Nutritional Supplementation with Milk Fat Globule Membrane on Physical and Muscle Function in Healthy Adults Aged 60 and Over with Semiweekly Light Exercise: A Randomized Double-Blind, Placebo-Controlled Pilot Trial. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).* 62:409–415.
- Miyaniishi M, Tada K, Koike M, Uchiyama Y, Kitamura T, Nagata S (2007) Identification of Tim4 as a phosphatidylserine receptor. *Nature.* 450:435–439.
- Moldoveanu T, Follis AV, Kriwacki RW, Green DR (2014) Many players in BCL-2 family affairs. *Trends Biochem Sci.* 39:101–11.
- Mosser DM, Edwards JP (2008) Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol.* 8:958–969.

- Mounier R, Théret M, Arnold L, Cuvellier S, Bultot L, Göransson O, Sanz N, Ferry A, Sakamoto K, Foretz M, Viollet B, Chazaud B (2013) AMPK α 1 Regulates Macrophage Skewing at the Time of Resolution of Inflammation during Skeletal Muscle Regeneration. *Cell Metab.* 18:251–264.
- Mukundan L, Odegaard JI, Morel CR, Heredia JE, Mwangi JW, Ricardo-Gonzalez RR, Goh YP, Eagle AR, Dunn SE, Awakuni JU, Nguyen KD, Steinman L, Michie SA, Chawla A (2009) PPAR- δ senses and orchestrates clearance of apoptotic cells to promote tolerance. *Natural Medicine.* 15:1266–1272.
- Murakami Y, Tian L, Voss OH, Margulies DH, Krzewski K, Coligan JE (2014) CD300b regulates the phagocytosis of apoptotic cells via phosphatidylserine recognition. *Cell Death Differ.* 21:1746–1757.
- Nagata S. (2005) DNA degradation in development and programmed cell death. *Annu Rev Immunol.* 23:853–75.
- Naito M, Nagashima K, Mashima T, Tsuruo T (1997) Phosphatidylserine externalization is a downstream event of interleukin-1 beta-converting enzyme family protease activation during apoptosis. *Blood.* 89:2060–66.
- Nakaya M, Kitano M, Matsuda M and Nagata S (2008) Spatiotemporal activation of Rac1 for engulfment of apoptotic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105:9198–9203.
- Namgaladze, D. and Brune, B (2016) Macrophage fatty acid oxidation and its roles in macrophage polarization and fatty acid-induced inflammation. *Biochim Biophys Acta.* 1861:1796–1807.
- Niedergang F and Grinstein S (2018) How to build a phagosome: new concepts for an old process. *Curr Opin Cell Biol.* 50:57–63.
- Nishi C, Toda S, Segawa K, Nagata S (2014) Tim4- and MerTK-mediated engulfment of apoptotic cells by mouse resident peritoneal macrophages. *Mol Cell Biol.* 34:1512–1520.
- Nishiura H, Shibuya Y, Yamamoto T (1998) S19 ribosomal protein crosslinked dimer causes monocyte-predominant infiltration by means of molecular mimicry to complement C5a. *Lab Invest.* 78:1615–23.
- Nunes I, Gleizes PE, Metz CN, Rifkin DB (1997) Latent transforming growth factor-beta binding protein domains involved in activation and transglutaminase-dependent cross-linking of latent transforming growth factor-beta. *J Cell Biol.* 136:1151–63.
- Nunes I, Shapiro RL, Rifkin DB (1995) Characterization of latent TGF-beta activation by murine peritoneal macrophages. *J Immunol.* 155:1450–9.
- Nurminskaya MV, Belkin AM (2012) Cellular Functions of Tissue Transglutaminase. *Int Rev Cell Mol Biol.* 294:1–97.
- Ochoa O, Sun D, Reyes-Reyna SM, Waite LL, Michalek JE, McManus LM, Shireman PK (2007) Delayed angiogenesis and VEGF production in CCR2 $-/-$ mice during impaired skeletal muscle regeneration. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 293:R651–R661.
- Ogden CA, deCathelineau A, Hoffmann PR, Bratton D, Ghebrehiwet B, Fadok VA, Henson PM (2001) C1q and mannose binding lectin engagement of cell surface calreticulin and CD91 initiates macropinocytosis and uptake of apoptotic cells. *J Exp Med.* 194:781–795.
- Okabe Y, Sano T, Nagata S (2009) Regulation of the innate immune response by threonine-phosphatase of eyes absent. *Nature.* 460:520–4.
- Ota N, Soga S, Hase T, Shimotoyodome A (2015) Daily consumption of milk fat globule membrane plus habitual exercise improves physical performance in healthy middle-aged adults. *Springerplus.* 4:120.

- Paidassi H, Tacnet-Delorme P, Garlatti V, Darnault C, Ghebrehiwet B, Gaboriaud C, Arlaud GJ, Frachet P (2008) C1q binds phosphatidylserine and likely acts as a multiligand-bridging molecule in apoptotic cell recognition. *J Immunol.* 180:2329–2338.
- Park D, Hochreiter-Hufford A, Ravichandran KS (2009) The phosphatidylserine receptor TIM-4 does not mediate direct signaling. *Curr Biol.* 19:346–351.
- Park D, Tosello-Trampont AC, Elliott MR, Lu M, Haney LB, Ma Z, Klibanov AL, Mandell JW, Ravichandran KS (2007) BAI1 is an engulfment receptor for apoptotic cells upstream of the ELMO/ Dock180/Rac module. *Nature.* 450:430–434.
- Park SY, Jung MY, Kim HJ, Lee SJ, Kim SY, Lee BH, Kwon TH, Park RW, Kim IS (2008a) Rapid cell corpse clearance by stabilin-2, a membrane phosphatidylserine receptor. *Cell Death Differ.* 15:192–201.
- Park SY, Kang KB, Thapa N, Kim SY, Lee SJ, Kim IS (2008b) Requirement of adaptor protein GULP during stabilin-2-mediated cell corpse engulfment. *J Biol Chem.* 283:10593–10600.
- Park SY, Kim IS (2017) Engulfment signals and the phagocytic machinery for apoptotic cell clearance. *Exp Mol Med.* 49:e331.
- Park SY, Yun Y, Lim JS, Kim MJ, Kim SY, Kim JE, Kim IS (2016) Stabilin-2 modulates the efficiency of myoblast fusion during myogenic differentiation and muscle regeneration. *Nat Commun.* 7:10871.
- Perdiguero E, Sousa-Victor P, Ruiz-Bonilla V, Jardi M, Caelles C, Serrano AL, Munoz-Canoves P (2011) p38/MKP - 1 -regulated AKT coordinates macrophage transitions and resolution of inflammation during tissue repair. *J Cell Biol.* 195:307-322.
- Peter C, Waibel M, Keppeler H, Lehmann R, Xu G, Halama A, Adamski J, Schulze-Osthoff K, Wesselborg S, Lauber K (2012) Release of lysophospholipid 'find-me' signals during apoptosis requires the ATP-binding cassette transporter A1. *Autoimmunity.* 45:568–573.
- Peter C, Waibel M, Radu CG, Yang LV, Witte ON, Schulze-Osthoff K, Wesselborg S, Lauber K (2008) Migration to apoptotic 'find-me' signals is mediated via the phagocyte receptor G2A. *J Biol Chem.* 283:5296–5305.
- Piredda L, Amendola A, Colizzi V, Davies PJ, Farrace MG, Fraziano M, Gentile V, Uray I, Piacentini M, Fesus L (1997) Lack of 'tissue' transglutaminase protein cross-linking leads to leakage of macromolecules from dying cells: relationship to development of autoimmunity in MRLlpr/lpr mice. *Cell Death Differ.* 4:463-72.
- Poon IK, Lucas CD, Rossi AG, Ravichandran KS (2014) Apoptotic cell clearance: basic biology and therapeutic potential. *Nat Rev Immunol.* 14:166–180.
- Potter PK, Cortes-Hernandez J, Quartier P, Botto M, Walport MJ (2003) Lupus-prone mice have an abnormal response to thioglycolate and an impaired clearance of apoptotic cells. *J Immunol.* 170:3223–3232.
- Pupjalis D, Goetsch J, Kottas DJ, Gerke V, Rescher U (2011) Annexin A1 released from apoptotic cells acts through formyl peptide receptors to dampen inflammatory monocyte activation via JAK/STAT/SOCS signalling. *EMBO Mol Med.* 3:102-14.
- Rajput A, Kovalenko A, Bogdanov K, Yang SH, Kang TB, Kim JC, Du J, Wallach D (2011) RIG-I RNA helicase activation of IRF3 transcription factor is negatively regulated by caspase-8-mediated cleavage of the RIP1 protein. *Immunity.* 34:340–51.
- Rébé C, Raveneau M, Chevriaux A, Lakomy D, Sberna AL, Costa A, Bessède G, Athias A, Steinmetz E, Lobaccaro JM, Alves G, Menicacci A, Vachenc S, Solary E, Gambert P, Masson D (2009) Induction of transglutaminase 2 by a liver X receptor/retinoic acid

- receptor alpha pathway increases the clearance of apoptotic cells by human macrophages. *Circ Res.* 105:393–401.
- Reddien PW, Horvitz HR (2000) CED-2/CrkII and CED-10/Rac control phagocytosis and cell migration in *Caenorhabditis elegans*. *Nat Cell Biol.* 2:131–136.
- Relaix F, Zammit PS (2012) Satellite cells are essential for skeletal muscle regeneration: the cell on the edge returns centre stage. *Development.* 139:2845-56.
- Rehman AG, Booth C, Potten CS (2001) What is apoptosis, and why is it important? *BMJ.* 322:1536–1538.
- Rius J, Guma M, Schachtrup C, Akassoglou K, Zinkernagel AS, Nizet V, Johnson RS, Haddad GG, Karin M (2008) NF-kappaB links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1alpha. *Nature.* 453:807–11.
- Rodriguez-Prados JC, Traves PG, Cuenca J, Rico D, Aragonés J, Martín-Sanz P, Cascante M, Bosca L (2010) Substrate fate in activated macrophages: a comparison between innate, classic, and alternative activation. *J Immunol.* 185:605-14.
- Roux A, Uyhazi K, Frost A, De Camilli P (2006) GTP-dependent twisting of dynamin implicates constriction and tension in membrane fission. *Nature.* 441:528–531.
- Ruffell D, Mourkoti F, Gambardella A, Kirstetter P, Lopez RG, Rosenthal N, Nerlov C (2009) A CREB -C/EBPbeta cascade induces M2 macrophage - specific gene expression and promotes muscle injury repair. *Proc Nat Acad Sci U S A.* 106:17475-17480.
- Ryan DG, O'Neill LAJ (2017) Krebs cycle rewired for macrophage and dendritic cell effector functions. *FEBS Lett.* 591:2992–3006.
- Sacco A, Doyonnas R, Kraft P, Vitorovic S, Blau HM (2008) Self-renewal and expansion of single transplanted muscle stem cells. *Nature.* 456:502–506.
- Saclier M, Cuvellier S, Magnan M, Mounier R, Chazaud B (2013a) Monocyte/macrophage interactions with myogenic precursor cells during skeletal muscle regeneration. *FEBS J.* 280:4118-4130.
- Saclier M, Yacoub-Youssef H, Mackey AL, Arnold L, Ardjoune H, Magnan M, Sailhan F, Chelly J, Pavlath GK, Mounier R, Kjaer M, Chazaud B (2013b) Differentially Activated Macrophages Orchestrate Myogenic Precursor Cell Fate During Human Skeletal Muscle Regeneration. *Stem Cells.* 31:384-396.
- Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA (2010) FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol.* 10:490–500.
- Sandilos JK, Chiu YH, Chekeni FB, Armstrong AJ, Walk SF, Ravichandran KS, Bayliss DA (2012) Pannexin 1, an ATP release channel, is activated by caspase cleavage of its pore-associated C-terminal autoinhibitory region. *J Biol Chem.* 287:11303–11.
- Sándor K, Pallai A, Duró E, Legendre P, Couillin I, Sággy T, Szondy Z (2017) Adenosine produced from adenine nucleotides through an interaction between apoptotic cells and engulfing macrophages contributes to the appearance of transglutaminase 2 in dying thymocytes. *Amino Acids.* 115:124–32.
- Sarang Z, Joós G, GarabucziÉ Rühl R, Gregory CD and Szondy Z (2014) Macrophages engulfing apoptotic cells produce nonclassical retinoids to enhance their phagocytic capacity. *J Immunol.* 192:5730–5738.
- Sarang Z, Köröskényi K, Pallai A, Duró E, Melino G, Griffin M, Fésüs L, Szondy Z (2011) Transglutaminase 2 null macrophages respond to lipopolysaccharide stimulation by elevated proinflammatory cytokine production due to an enhanced $\alpha\beta3$ integrin-induced Src tyrosine kinase signaling. *Immunol Lett.* 138:71-8.

- Sarang Z, Mádi A, Koy C, Varga S, Glocker MO, Ucker DS, Kuchay S, Chishti AH, Melino G, Fésüs L, Szondy Z (2007) Tissue transglutaminase (TG2) facilitates phosphatidylserine exposure and calpain activity in calcium-induced death of erythrocytes. *Cell Death Differ.* 14:1842-4.
- Savill J, Dransfield I, Gregory C, Haslett C (2002) A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. *Nat Rev Immunol.* 2:965–75.
- Savill J, Hogg N, Ren Y, Haslett C (1992) Thrombospondin cooperates with CD36 and the vitronectin receptor in macrophage recognition of neutrophils undergoing apoptosis. *J Clin Invest.* 90:1513-1522.
- Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME (2002) Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature.* 418:191–195.
- Scheib JL, Sullivan CS, Carter BD (2012) Jedi-1 and MEGF10 signal engulfment of apoptotic neurons through the tyrosine kinase Syk. *J Neurosci.* 32:13022–13031.
- Seale P, Sabourin LA, Girgis-Gabardo A, Mansouri A, Gruss P, Rudnicki MA (2000) Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell.* 102:777–786.
- Sebbagh M, Renvoizé C, Hamelin J, Riché N, Bertoglio J, Bréard J (2001) Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing. *Nat Cell Biol.* 3:346–52.
- Selak MA, Armour SM, MacKenzie ED, Boulahbel H, Watson DG, Mansfield KD, Pan Y, Simon MC, Thompson CB, Gottlieb E (2005) Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF- α prolyl hydroxylase. *Cancer Cell.* 7:77–85.
- Shi J, Gao W, Shao F (2017) Pyroptosis: gasdermin-mediated programmed necrotic cell death. *Trends Biochem Sci.* 42:245–254.
- Sica A, Mantovani A (2012) Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest.* 122:787-795.
- Smith CK 2nd, Janney MJ, Allen RE (1994) Temporal expression of myogenic regulatory genes during activation, proliferation, differentiation of rat skeletal muscle satellite cells. *J Cell Physiol.* 159:379–385.
- Snow MH (1977) Myogenic cell formation in regenerating rat skeletal muscle injured by mincing. II. An autoradiographic study. *Anat Rec.* 188:201–217.
- Steeg PS, Palmieri D, Ouatas T, Salerno M (2003) Histidine kinases and histidine phosphorylated proteins in mammalian cell biology, signal transduction and cancer. *Cancer Lett.* 190:1–12.
- Strilic B, Yang L, Albarrán-Juárez J, Wachsmuth L, Han K, Müller UC, Pasparakis M, Offermanns S (2016) Tumour-cell-induced endothelial cell necroptosis via death receptor 6 promotes metastasis. *Nature.* 536:215-8.
- Su X, Yu Y, Zhong Y, Giannopoulou EG, Hu X, Liu H, Cross JR, Rättsch G, Rice CM, Ivashkiv LB (2015) Interferon- γ regulates cellular metabolism and mRNA translation to potentiate macrophage activation. *Nat Immunol.* 16:838-49.
- Sullivan CS, Scheib JL, Ma Z, Dang RP, Schafer JM, Hickman FE, Brodsky FM, Ravichandran KS, Carter BD (2014) The adaptor protein GULP promotes Jedi-1-mediated phagocytosis through a clathrin-dependent mechanism. *Mol Biol Cell.* 25:1925–1936.
- Sweitzer SM, Hinshaw JE (1998) Dynamin undergoes a GTP-dependent conformational change causing vesiculation. *Cell.* 93:1021–1029.
- Szondy Z, Sarang Z, Kiss B, Garabuczi É, Köröskényi K (2017) Anti-inflammatory Mechanisms Triggered by Apoptotic Cells during Their Clearance. *Front Immunol.* 8:909.

- Szondy Z, Sarang Z, Molnar P, Nemeth T, Piacentini M, Mastroberardino PG, Falasca L, Aeschlimann D, Kovacs J, Kiss I, Szegezdi E, Lakos G, Rajnavolgyi E, Birckbichler PJ, Melino G, Fesus L (2003) Transglutaminase 2^{-/-} mice reveal a phagocytosis-associated crosstalk between macrophages and apoptotic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100:7812-7.
- Szondy Z, Korponay-Szabó I, Király R, Sarang Z, Tsay GJ (2017) Transglutaminase 2 in human diseases. *Biomedicine (Taipei)*. 7:15.
- Tait SW, Green DR (2010) Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 11:621–32.
- Takeda N, O’Dea EL, Doedens A, Kim JW, Weidemann A, Stockmann C, Asagiri M, Simon MC, Hoffmann A, Johnson RS (2010) Differential activation and antagonistic function of HIF- α isoforms in macrophages are essential for NO homeostasis. *Genes Dev*. 24:491–501.
- Takei K, McPherson PS, Schmid SL, De Camilli P (1995) Tubular membrane invaginations coated by dynamin rings are induced by GTP- γ S in nerve terminals. *Nature*. 374:186–190.
- Tan Z, Xie N, Cui H, Moellering DR, Abraham E, Thannickal VJ, Liu G (2015) Pyruvate dehydrogenase kinase 1 participates in macrophage polarization via regulating glucose metabolism. *J Immunol*. 194:6082-9.
- Tannahill GM, Curtis AM, Adamik J, Palsson-McDermott EM, McGettrick AF, Goel G, Frezza C, Bernard NJ, Kelly B, Foley NH, Zheng L, Gardet A, Tong Z, Jany SS, Corr SC, Haneklaus M, Caffrey BE, Pierce K, Walmsley S, Beasley FC, Cummins E, Nizet V, Whyte M, Taylor CT, Lin H, Masters SL, Gottlieb E, Kelly VP, Clish C, Auron PE, Xavier RJ, O’Neill LA (2013) Succinate is an inflammatory signal that induces IL -1 β through HIF -1 α . *Nature*. 496:238-42.
- Thorp EB (2012) Contrasting inflammation resolution during atherosclerosis and post myocardial infarction at the level of monocyte/macrophage phagocytic clearance. *Front Immunol*. 3:39.
- Tian L, Choi SC, Murakami Y, Allen J, Morse HC 3rd, Qi CF, Krzewski K, Coligan JE (2014) p85 α recruitment by the CD300f phosphatidylserine receptor mediates apoptotic cell clearance required for autoimmunity suppression. *Nat Commun*. 5:3146.
- Tibrewal N, Wu Y, D’mello V, Akakura R, George TC, Varnum B, Birge RB (2008) Autophosphorylation docking site Tyr-867 in Mer receptor tyrosine kinase allows for dissociation of multiple signaling pathways for phagocytosis of apoptotic cells and down-modulation of lipopolysaccharide-inducible NF- κ B transcriptional activation. *J Biol Chem*. 283:3618–27.
- Torr EE, Gardner DH, Thomas L, Goodall DM, Bielemeier A, Willetts R, Griffiths HR, Marshall LJ, Devitt A (2012) Apoptotic cell-derived ICAM-3 promotes both macrophage chemoattraction to and tethering of apoptotic cells. *Cell Death Differ*. 19:671–679.
- Tóth B, Garabuczi E, Sarang Z, Vereb G, Vámosi G, Aeschlimann D, Blaskó B, Bécsi B, Erdődi F, Lacy-Hulbert A, Zhang A, Falasca L, Birge RB, Balajthy Z, Melino G, Fésüs L, Szondy Z (2009) Transglutaminase 2 is needed for the formation of an efficient phagocyte portal in macrophages engulfing apoptotic cells. *J Immunol*. 182:2084–2092.
- Truman LA, Ford CA, Pasikowska M, Pound JD, Wilkinson SJ, Dumitriu IE, Melville L, Melrose LA, Ogden CA, Nibbs R, Graham G, Combadiere C, Gregory CD (2008) CX3CL1/fractalkine is released from apoptotic lymphocytes to stimulate macrophage chemotaxis. *Blood*. 112:5026–5036.
- Tsai RK, Discher DE (2008) Inhibition of “self” engulfment through deactivation of myosin-II at the phagocytic synapse between human cells. *J. Cell Biol*. 180:989–1003.

- Tsai WH, Shih CH, Feng SY, Li IT, Chang SC, Lin YC, Hsu HC (2014) CX3CL1(+) microparticles mediate the chemoattraction of alveolar macrophages toward apoptotic acute promyelocytic leukemic cells. *Cell Physiol Biochem*. 33:594–604.
- Tsunawaki S, Sporn M, Ding A, Nathan C (1988) Deactivation of macrophages by transforming growth factor-beta. *Nature*. 334:260–2.
- Underhill DM, Goodridge HS (2012) Information processing during phagocytosis. *Nat Rev Immunol*. 12:492-502.
- van den Eijnde SM, van den Hoff MJ, Reutelingsperger CP, van Heerde WL, Henfling ME, Vermeij-Keers C, Schutte B, Borgers M, Ramaekers FC (2001) Transient expression of phosphatidylserine at cell-cell contact areas is required for myotube formation. *J Cell Sci*. 114:3631-42.
- Varga T, Mounier R, Horvath A, Cuvellier S, Dumont F, Poliska S, Ardjoune H, Juban G, Nagy L, Chazaud B (2016a) Highly Dynamic Transcriptional Signature of Distinct Macrophage Subsets during Sterile Inflammation, Resolution, and Tissue Repair. *J Immunol*. 196:4771-82.
- Varga T, Mounier R, Patsalos A, Gogolák P, Peloquin M, Horvath A, Pap A, Daniel B, Nagy G, Pintye E, Póliska S, Cuvellier S, Larbi SB, Sansbury BE, Spite M, Brown CW, Chazaud B, Nagy L (2016b) Macrophage PPARgamma, a Lipid Activated Transcription Factor Controls the Growth Factor GDF3 and Skeletal Muscle Regeneration. *Immunity*. 45:1038-1051.
- Venegas V, Zhou Z (2007) Two alternative mechanisms that regulate the presentation of apoptotic cell engulfment signal in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Biol Cell* 18: 3180–3192.
- Verderio EA, Johnson T, Griffin M (2004) Tissue transglutaminase in normal and abnormal wound healing: review article. *Amino Acids*. 26:387-404
- Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LM, Reid GE, Moritz RL, Simpson RJ, Vaux DL (2000) Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell*. 102:43–53.
- Voll RE, Herrmann M, Roth EA, Stach C, Kalden JR, Girkontaite I (1997) Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature*. 390:350–1.
- Wahl SM (1992) Transforming growth factor beta (TGF-beta) in inflammation: a cause and a cure. *J Clin Immunol*. 12:61–74.
- Wang H, Melton DW, Porter L, Sarwar ZU, McManus LM, Shireman PK (2014) Altered macrophage phenotype transition impairs skeletal muscle regeneration. *Am J Pathol*. 184:1167-1184.
- Weigert A, Johann AM, von Knethen A, Schmidt H, Geisslinger G, Brune B (2006) Apoptotic cells promote macrophage survival by releasing the antiapoptotic mediator sphingosine-1-phosphate. *Blood*. 108:1635–1642.
- Weyd H, Abeler-Dörner L, Linke B, Mahr A, Jahndel V, Pfrang S, Schnölzer M, Falk CS, Krammer PH (2013) Annexin A1 on the surface of early apoptotic cells suppresses CD8+ T cell immunity. *PLoS ONE*. 8:e62449.
- Wu HH, Bellmunt E, Scheib JL, Venegas V, Burkert C, Reichardt LF, Zhou Z, Farinas I, Carter BD (2009) Glial precursors clear sensory neuron corpses during development via Jedi-1, an engulfment receptor. *Nat Neurosci*. 12:1534–1541.
- Wu YC, Horvitz HR (1998a) *C. elegans* phagocytosis and cell-migration protein CED-5 is similar to human DOCK180. *Nature*. 392:501–504.
- Wu YC, Horvitz HR (1998b) The *C. elegans* cell corpse engulfment gene *ced-7* encodes a protein similar to ABC transporters. *Cell*. 93:951–960.

- Wu YC, Tsai MC, Cheng LC, Chou CJ, Weng NY (2001) *C. elegans* CED-12 acts in the conserved crkII/DOCK180/Rac pathway to control cell migration and cell corpse engulfment. *Dev Cell*. 1:491–502.
- Xue J, Schmidt SV, Sander J, Draffehn A, Krebs W, Quester I, De Nardo D, Gohel TD, Emde M, Schmidleithner L, Ganesan H, Nino-Castro A, Mallmann MR, Labzin L, Theis H, Kraut M, Beyers M, Latz E, Freeman TC, Ulas T, Schultze JL (2014) Transcriptome-based network analysis reveals a spectrum model of human macrophage activation. *Immunity*. 40:274-288.
- Yablonka-Reuveni Z, Rivera AJ (1994) Temporal expression of regulatory and structural muscle proteins during myogenesis of satellite cells on isolated adult rat fibers. *Dev Biol*. 164:588–603.
- Yamaguchi H, Maruyama T, Urade Y, Nagata S (2014) Immunosuppression via adenosine receptor activation by adenosine monophosphate released from apoptotic cells. *Elife*. 3:e02172.
- Yen JH, Lin LC, Chen MC, Sarang Z, Leong PY, Chang IC, Hsu JD, Chen JH, Hsieh YF, Pallai A, Köröskényi K, Szondy Z, Tsay GJ (2015) The metastatic tumor antigen 1-transglutaminase-2 pathway is involved in self-limitation of monosodium urate crystal-induced inflammation by upregulating TGF- β 1. *Arthritis Res Ther*. 17:65.
- Yin H, Price F, Rudnicki MA (2013) Satellite cells and the muscle stem cell niche. *Physiol Rev*. 93:23-67.
- Yu X, Odera S, Chuang C, Lu N, Zhou Z (2006) *C. elegans* Dynamin mediates the signaling of phagocytic receptor CED-1 for the engulfment and degradation of apoptotic cells. *Dev Cell*. 10:743–757.
- Zahuczky G, Kristóf E, Majai G, Fésüs L (2011) Differentiation and glucocorticoid regulated apopto-phagocytic gene expression patterns in human macrophages. Role of MerTK in enhanced phagocytosis. *PLoS ONE*. 6:e21349.
- Zhu H, Zhang M, Liu Z, Xing J, Moriasi C, Dai X, Zou MH (2016) AMP - Activated Protein Kinase α 1 in Macrophages Promotes Collateral Remodeling and Arteriogenesis in Mice In Vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 36:1868-78.
- Zhu YP, Brown JR, Sag D, Zhang L, Suttles J (2015) Adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase regulates IL-10-mediated anti-inflammatory signaling pathways in macrophages. *J Immunol*. 194:584-94.
- Zordan P, Rigamonti E, Freudenberg K, Conti V, Azzoni E, Rovere-Querini P, Brunelli S (2014) Macrophages commit postnatal endothelium -derived progenitors to angiogenesis and restrict endothelial to mesenchymal transition during muscle regeneration. *Cell Death Dis*. 5:e1031.
- Zujovic V, Benavides J, Vigé X, Carter C, Taupin V (2000) Fractalkine modulates TNF- α secretion and neurotoxicity induced by microglial activation. *Glia*. 29:305–15.

9 PUBLIKÁCIÓK, KONFERENCIÁK



**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/380/2019.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Budai Zsófia
Neptun kód: D56NIA
Doktori Iskola: Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Budai, Z.**, Ujlaky-Nagy, L., Kis, N. G., Antal, M., Bankó, C., Bacsó, Z., Szondy, Z., Sarang, Z.:
Macrophages engulf apoptotic and primary necrotic thymocytes through similar
phosphatidylserine-dependent mechanisms.
FEBS Open Bio. 9, 446-456, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/2211-5463.12584>
IF: 1.959 (2018)
2. Farkas, Z., Petric, M., Liu, X., Herit, F., Rajnavölgyi, É., Szondy, Z., **Budai, Z.**, Orbán, T. I.,
Sándor, S., Mehta, A., Bajtay, Z., Kovács, T., Jung, S. Y., Afaq Shakir, M., Qin, J., Zhou, Z.,
Niedergang, F., Boissan, M., Takács-Vellai, K.: The nucleoside diphosphate kinase NDK-
1/NME1 promotes phagocytosis in concert with DYN-1/Dynamin.
FASEB J. 33 (10), 11606-11614, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1096/fj.201900220R>
IF: 5.391 (2018)





További közlemények

3. Sarang, Z., Sággy, T., **Budai, Z.**, Ujlaky-Nagy, L., Bedekovics, J., Beke, L., Méhes, G., Nagy, G., Rühl, R., Moise, A. R., Palczewski, K., Szondy, Z.: Retinol Saturase Knock-Out Mice are Characterized by Impaired Clearance of Apoptotic Cells and Develop Mild Autoimmunity. *Biomolecules*. 9 (11), 737, 2019.
IF: 4.694 (2018)
4. **Budai, Z.**, Balogh, L., Sarang, Z.: Short-term high-fat meal intake alters the expression of circadian clock-, inflammation-, and oxidative stress-related genes in human skeletal muscle. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 70 (6), 749-758, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/09637486.2018.1557607>
IF: 2.792 (2018)
5. **Budai, Z.**, Balogh, L., Sarang, Z.: Altered gene expression of muscle satellite cells contributes to age-related sarcopenia in mice. *Curr Aging Sci.* 11 (3), 165-172, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.2174/1874609811666180925104241>

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 14,836

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapján szolgáló közleményekre): 7,35

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

Debrecen, 2019.11.29.



Konferenciák

Előadások

Zsófia Budai, László Ujlaky-Nagy, Gréta Nikoletta Kis, Miklós Antal, Csaba Bankó, Zsolt Bacsó, Zsuzsa Szondy and Zsolt Sarang: **Macrophages engulf apoptotic and primary necrotic thymocytes by the same phosphatidylserine-dependent mechanisms.** 2019. március 29-31, Hungarian Molecular Life Sciences Conference 2019, Eger, Magyarország

Zsófia Budai, Nour Al Zaeed, Zsuzsa Szondy and Zsolt Sarang: **The potential role of TG2 in skeletal muscle regeneration.** 12th Molecular, Cell and Immune Biology Winter Symposium, 2019. január 10-11, Debrecen, Magyarország

Zsófia Budai, Tímea Csutak, Nikoletta Gréta Kis, Miklós Antal, Zsuzsa Szondy and Zsolt Sarang: **Comparison of the apoptotic and heat necrotic cell uptake by bone marrow-derived macrophages.** 11th Molecular, Cell and Immune Biology Winter Symposium, 2018. január 4-5, Debrecen, Magyarország

Zsófia Budai, Tímea Csutak, Zsuzsa Szondy and Zsolt Sarang: **Comparison of the necrotic and apoptotic cell uptake by mouse bone marrow-derived macrophages.** 10th Molecular, Cell and Immune Biology Winter Symposium, 2017. január 6-7, Debrecen, Magyarország

Zsófia Budai and Zsolt Sarang: **Comparison of apoptotic and necrotic cell uptake by macrophages.** 9th Molecular, Cell and Immune Biology Winter Symposium, 2016. január 8-9, Debrecen, Magyarország

Budai Zsófia: **Rec-flow: rekombinációs ráta mérése áramlási citometriával.** XXXII. Országos Tudományos Diákköri Konferencia Orvos- és Egészségtudományi Szekció, 2015. április, Budapest, Magyarország

Budai Zsófia: **Rec-flow: rekombinációs ráta mérése áramlási citometriával.** Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi 2014/2015. évi Tudományos Diákköri Konferencia, 2015. február, Debrecen, Magyarország

Poszter prezentációk

Zsófia Budai, Nour Al Zaeed, Zsuzsa Szondy and Zsolt Sarang: **The potential role of transglutaminase 2 in skeletal muscle regeneration.** 2019. március 29-31, Hungarian Molecular Life Sciences Conference 2019, Eger, Magyarország

Zsófia Budai, László Ujlaky-Nagy, Gréta Nikoletta Kis, Miklós Antal, Zsuzsa Szondy and Zsolt Sarang: **Apoptotic and necrotic thymocytes are engulfed by the same phosphatidylserine-dependent mechanisms.** I. Áramlási Citometriai Nap: Hematológia – Immunológia Napjainkban, 2018. október 26, Budapest, Magyarország

Zsófia Budai, László Ujlaky-Nagy, Gréta Nikoletta Kis, Miklós Antal, Zsuzsa Szondy and Zsolt Sarang: **Apoptotic and necrotic thymocytes are engulfed by the same phosphatidylserine-dependent mechanisms.** FEBS3+ meeting, 2018. szeptember 2-4, Siófok, Magyarország

Zsófia Budai, László Balogh and Zsolt Sarang: **Altered gene expression in muscle satellite cells contributes to age-related sarcopenia in mice.** Muscle Development, Regeneration and Disease, 2018. április 22-27, Berlin, Németország

Zsófia Budai, Tímea Csutak, Nikoletta Gréta Kis, Miklós Antal, László Ujlaky-Nagy, Zsuzsa Szondy and Zsolt Sarang: **Comparison of the necrotic and apoptotic cell uptake by mouse bone marrow-derived macrophages.** Hungarian Molecular Life Sciences Conference 2017, 2017. március 31-április 2, Eger, Magyarország

Zsófia Budai, Zsuzsa Szondy and Zsolt Sarang: **Competition of apoptotic and necrotic cells for uptake by bone marrow-derived macrophages.** Cell Symposium: 100 Years of Phagocytes, 2016. szeptember 19-22, Szicília, Olaszország

Zsófia Budai, Zsuzsa Szondy and Zsolt Sarang: **Competition of apoptotic and necrotic cells for uptake by bone marrow-derived macrophages.** Annual Meeting of the Hungarian Biochemical Society, 2016. augusztus 28-31, Szeged, Magyarország

10 KULCSSZAVAK

Apoptózis

Nekrózis

Fagocitózis

Nukleozid difoszfát kináz

Dinamin

Transzglutamináz 2

Vázizom regeneráció

Gdf3

11 KEYWORDS

Apoptosis

Necrosis

Phagocytosis

Nucleoside diphosphate kinase

Dynamine

Transglutaminase 2

Skeletal muscle regeneration

Gdf3

12 KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsőként szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Sarang Zsoltnak és munkacsoportunk vezetőjének, Prof. Dr. Szondy Zsuzsannának, hogy lehetőséget biztosítottak a munkám elvégzéséhez és hogy bármikor bizalommal fordulhattam hozzájuk kérdéseimmel.

Köszönöm Prof. Dr. Fésüs Lászlónak, a Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet korábbi igazgatójának a csoportmegbeszéléseken nyújtott segítségét és hasznos tanácsait.

Köszönöm Prof. Dr. Tózsér Józsefnek, a Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet igazgatójának, hogy az intézet hallgatója lehettem.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Fésüs László, Prof. Dr. Nagy László és Prof. Dr. Tózsér József munkacsoportjainak, hogy mindig szívesen kíségtettek, ha valamilyen vegyszerre vagy műszerre volt szükségem és a Debreceni Egyetem Élettudományi Központjának Állatházban dolgozóknak, akik szakértelmükkel lehetővé tették a munkámhoz szükséges állatkísérletek kivitelezését.

Mindent nagyon köszönök a Szondy munkacsoport korábbi és jelenlegi tagjainak, akikkel együtt dolgozhattam (Kiss Beáta, Fige Éva, Dr. Garabuczi Éva, Dr. Köröskényi Krisztina, Szegediné Szilágyi Piroska, Sággy Tibor, Sándor Katalin, Komóczi Edit, Hartmann Zsolt, Dr. Joós Gergely). Nekik köszönhetően nem csak a munka marad emlékezetes a PhD éveimből.

Külön köszönet illeti Nour Al Zaeed PhD hallgatót, aki nagyon sokat segített a doktori értekezésemben bemutatott izomregenerációs kísérletekben.

Végül, de nem utolsó sorban szeretnék köszönetet mondani a családomnak, akik mindig támogattak abban, hogy azt csináljam, amit igazán szeretek és segítettek tartani bennem a lelket akkor is, amikor elbizonytalanodtam. Hálás vagyok a páromnak és a barátaimnak is, hogy mindig türelmesen és megértően végighallgattak.

Szeretném megköszönni az alábbi pályázatokból származó pénzügyi támogatásokat:

OTKA 124244

EFOP-3.6.1-16-2016-00022

EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00009

GINOP-2.3.2-15- 2016-00006 project