

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**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

**AZ APOPTOTIKUS ÉS NEKROTIKUS SEJTEK MAKROFÁGOK ÁLTALI
ELTAKARÍTÁSÁNAK ÉS A TRASZGLUTAMINÁZ 2 VÁZIZOM NEKRÓZIST KÖVETŐ
REGENERÁCIÓBAN BETÖLTÖTT SZEREPÉNEK VIZSGÁLATA**

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

Írta: **Budai Zsófia**
okleveles molekuláris biológus

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

Témavezető: Dr. Sarang Zsolt, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Fésüs László, akadémikus
tagok: Ifj. Prof. Dr. Gallyas Ferenc, az MTA doktora
Dr. Lányi Árpád, PhD

A doktori szigorlat időpontja:

Debreceni Egyetem ÁOK, ÉTK, 3.506.
2019. június 4. 12:30

Az értekezés bírálói: Dr. Lányi Árpád, PhD

Dr. Keller-Pintér Anikó, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Nagy Bálint, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Dombrádi Viktor, az MTA doktora
Ifj. Prof. Dr. Gallyas Ferenc, az MTA doktora

Az értekezés védésének (online formátumban) időpontja:

2020. október 5. 11:00

A nyilvánosságot online módon biztosítjuk. Amennyiben részt kíván venni, úgy jelezze a budai.zsofia@med.unideb.hu e-mail címre küldött üzenetben a vitát megelőző munkanap (2020. október 2.) 17 óráig. A határidő lejártát követően technikai okok miatt már nincs lehetőség a védéshez kapcsolódni.

1 BEVEZETÉS

1.1 A sejthalál típusai

Szervezetünkben milliányi sejt hal el és termelődik újra nap mint nap. A feleslegessé vált, előregedett, vagy meghibásodott sejtek általában programozott módon pusztulnak el. A programozott sejthalál egyik típusa az apoptózis, mely során a sejt megszakítja a kapcsolatokat a környező sejtekkel és az extracelluláris mátrixal (ECM), összezsugorodik, a kromatinállománya kondenzálódik és feldarabolódik, de mindeközben megmarad a plazmamembrán integritása.

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, patológias úton hal el, melyet nekrotízisnak 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, így felpuffadnak, intracelluláris tartalmuk elkezd kiszivárogni az őket körülvevő szöveti környezetbe, ahol autoantigénként hatva lokális gyulladást idéz elő. Az apoptózishoz hasonlóan itt is megjelenik a sejtmembrán külső oldalán a foszfátidilszerin (PS) molekula.

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. A felhalmozódó másodlagosan nekrotikus sejtek lokális gyulladást idéznek elő, mely hosszú távon autoimmun betegségek kialakulásához vezethet. Az elhalt sejtek eliminációs zavarával összefüggésbe hozható humán megbetegedések közé tartoznak pl. a szisztémás lupus erythematosus (SLE) és a reumatoid arthritisz.

1.2 Az elhalt sejtek fagocitózisának mechanizmusa

A legtöbb szövetben szervezetünk professzionális fagocita sejtjei közül elsősorban a makrofágok felelősek az elhalt, vagy feleslegessé vált sejtek eltakarításáért. A sejtek folyamatosan tájékoztatják környezetüket saját állapotukról különböző sejtfelszíni molekulák kifejezésével. 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 és a szignált kibocsátó, elhalt 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: a fagociták migrációja az elhalt sejtek irányába, az elhalt sejtek felismerése, internalizációja és a bekebelezést követő immunmoduláció.

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 a makrofágokat magukhoz. Ilyen ún. "találj meg" jelek a nukleotidok (ATP, UTP), lizofoszfatidilkolin (LPC), fraktalkin (CX3CL1), és a szfingozin-1-foszfát (S1P), melyek kaspáz függő módon szabadulnak fel az apoptotikus sejtekből. Ezeket a szignálokat a makrofágok a kemokin receptoraikkal (pl. S1PR, G2A) érzékelik.

Az elhalt sejtek felismerése

Miután a fagociták odavándoroltak a sejthalál helyére a célsejtek azonosítása az "egyél meg" jeleken keresztül történik. Ezek olyan, a sejtfelszínen végbemenő változásokat foglalnak magukba, mint a glikolizációs mintázat és adhéziós molekulák epitópjainak 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, hanem az egészséges sejteken megtalálható "ne egyél meg" jelek módosulása vagy eltűnése is szükséges. 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), stabilin-2, és az agy-specifikus angiogenezis inhibitor 1 (Bai1). Ezen kívül léteznek indirekt PS receptorok, pl. Mer tirozin kináz (MerTK), integrin $\alpha_3\beta_3$ és koreceptora a transzglutamináz 2 (TG2), melyek különböző hídkepző fehérjéken keresztül kötik a PS-t. Ezek a hídkepző 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 $\alpha_3\beta_3$ vagy az $\alpha_5\beta_5$ integrineket köti össze a PS-el. Hasonló szerepet töltenek be a növekedés leállítás specifikus fehérje 6 (Gas6) és protein S molekulák, melyek a TAM (Tyro3, Ax1, Mer) tirozin kináz receptor család tagjaival kapcsolják össze a PS-t. 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. A nekrotikus sejtek eltakarítása kevésbé kutatott terület, azonban az már bizonyított, hogy a nekrotikus sejtek felszínén is megjelenik a PS, így a nekrotikus sejtek felismerése is történhet PS függő mechanizmusokkal. Egyes az apoptotikus

sejtek felvételében is szerepet játszó fagocita receptorok és egyéb molekulák szerepét már bizonyították a nekrotikus sejtfevételnél. Így pl. a CD14, a trombospondin-CD36-integrin $\alpha_v\beta_3$ komplex és a C1q komplement komponens is hozzájárulnak a nekrotikus sejtek felvételéhez.

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. Ennek hatására a dinamin és Ras-szerű C3 botulinum toxin szubsztrát 1 (Rac1) GTPázok aktiválódnak, melyek a citoskeletális aktin újraszerveződését és a fagocitózishoz szükséges lamellipodium képződést segítik elő.

A dinamin (DYN-1) atipikus GTPáz részt vesz az apoptotikus sejtek, a zimozán, valamint az immunglobulin G és a komplement komponens 3b_i által opsonizált részecskék felvételében is, annak ellenére, hogy mindezek különböző fagocita receptorok segítségével kerülnek felismerésre. A DYN-1 a membrán kitüremkedések kialakulásához és az álláb képződéshez, valamint a sejten belül a fagoszóma leválásához járul hozzá. Egyre több kutatás bizonyítja, hogy a nukleozid-difoszfát-kináz (NDPK) fehérvék a dinamin működéséhez szükséges interakciós partnereként funkcionálhatnak. Az NDPK-k ellátják guanozin-trifoszfáttal (GTP) a dinamin szupercsalád GTPázait, így lehetővé téve azok legnagyobb termodinamikai hatékonysággal történő működését. A dinamin és NDPK-k kölcsönhatását több fajban is vizsgálták. Takács-Vellai Krisztina munkacsoportja *C. elegans* modellorganizmust használva bizonyította, hogy a férgekben jelen lévő NDPK, az NDK-1 részt vesz az apoptotikus sejtek internalizációjában.

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 normál esetben nem okoznak gyulladást vagy autoimmunitást. Az apoptotikus sejtek bekebelezését immunológiailag csendes, sőt gyulladáscsökkentő folyamatnak tekinthetjük, ugyanis az apoptotikus sejtek kifejezetten anti-inflammatorikus útvonalakat indukálnak, elsősorban az őket felvett makrofágokban.

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

nekrozison esnek át és sejttartalmuk kijut a szövetek közé. Ez azért van, mert az apoptózis során a sejtekből kijutó molekulák megváltoznak (pl. hasítódnak vagy kereszt kötődnek) és így nem érik el ugyanazt a hatást, mint, a nekrotikus sejtéből kiszabaduló natív forma. Ilyen pl. a genomi DNS, mely apoptotikus sejtekben kaszpáz-aktivált DNázok által kb. 200 bp méretű fragmentekre darabolódik, melyek jóval kevésbé rendelkeznek immunrendszer aktiváló tulajdonsággal.

Az apoptotikus sejtek számos anti-inflammatorikus molekulát, így pl. transzformáló növekedési faktor béta (TGF β) és IL10 citokineket, valamint a gyulladási sejtek toborzását gátló jeleket is kibocsátanak, ezek az ún. "maradj távol" (Stay away) szignálok (pl. laktoferrin). Számos, az apoptotikus sejtekből származó kemotaktikus jel szintén anti-inflammatorikus molekulának tekinthető (TSP-1, fraktalkin, LPC, adenzin).

Az apoptotikus sejtek felszínére került PS amellet, hogy "egyél meg" jelként funkcionál, fokozza a koleszterol kiáramlást a bekebelező sejtéből, így elősegítve a homeosztázis fenntartását, valamint serkenti az anti-inflammatorikus citokinek (pl. TGF β) termelését, ezzel hozzájárulva az apoptotikus sejtekből felszabaduló antigénnel szembeni immuntolerancia kialakításához. A PS receptorok közül a Stabilin-2, a MerTK és a TG2 is szerepet játszik a fagocitáló makrofágokban kialakuló csökkent gyulladási folyamatok és direkt anti-inflammatorikus hatás kialakításában.

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, pl. a máj X receptor (LXR) és a peroxiszóma-proliferátor aktivált receptor (PPAR), melyek a bekebelezés során transzkripció szinten szabályozzák a lipidek metabolikus folyamatait, egyben gátolják a gyulladási folyamatokat is. A magreceptorok ligand kötést követően serkentik különböző fagocita receptorok génextpresszióját is, ezáltal növelve a makrofágok fagocitózis kapacitását. Némelyik receptor, mint pl. a MerTK expressziójának LXR általi növelése direkt módon történik, azonban más receptoroké a makrofágok retinsav termelésén keresztül, a retinsav receptor alfa (RAR α) közreműködésével zajlik.

Az apoptotikus sejtfelvételt követően a makrofágok szintén anti-inflammatorikus molekulákat termelnek. Ilyenek a TGF β és IL10 anti-inflammatorikus citokinek, valamint a prosztaglandin E₂ és F_{1 α} , lipoxin A₄ vagy a vérlemezke-aktiváló faktor lipid mediátorok. A bekebelezés során a makrofágokban termelődő retinoidok hozzájárulhatnak a TGF β függő T_{reg} sejtek képződéséhez, melyek központi szerepet játszanak az autoimmunitás kialakulásának elkerülésében.

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. Ez 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.

A vázizom regeneráció

A szöveti regeneráció során bekövetkező események megfigyeléséhez kiváló modell a sérülést követő vázizom regeneráció, mely során a különböző sejtek megjelenésének kinetikája, gyulladási állapota és egyéb tulajdonságai már jól ismertek. A vázizom károsodása különböző stimulusokkal (pl. zúzódás, fagyaszttás, toxin injekció) kiváltható, de a regeneráció során, ezektől függetlenül, hasonló sejtes és molekuláris események zajlanak le. Sérülést követően a vázizom sokmagvú sejtjei, az izomrostok nekrozissal halnak el és steril gyulladás alakul ki. Ennek hatására az izom összejtjei, a szatellita sejtek aktiválódnak és elindul bennük a miogenikus program. A szatellita sejtek az izomregenerációt az embrionális izomfejlődéshez hasonló módon, miogenikus transzkripciós faktorok megfelelő időben történő kifejezésével vezénylik le. Ezzel egyidőben immunsejtek, köztük makrofágok és neutrofil granulociták infiltrálják a sérült területet. A regeneráció kezdeti gyulladási 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, melyek már anti-inflammatorikus ún. "gyógyító" fenotípussal rendelkeznek. 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 és angiogenezis figyelhető meg. Végül az újonnan keletkezett izomrostok megnövekednek, és az izomszövet visszatér az eredeti homeosztázisához. A megfelelő regenerációhoz számos egymást követő eseménynek a megfelelő helyen, időben és sorrendben kell végbemennie.

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. Izomregeneráció során az egyik PPAR γ által szabályozott gén a növekedési differenciációs faktor 3-at (Gdf3) kódolja, mely a TGF β fehérjecsalád tagja és a miogenikus sejtek fűzőját támogatja, így szükséges a sokmagvú izomrostok kialakulásához. A Gdf3-at a "gyógyító" makrofágok termelik.

A transzglutamináz 2 szerepe a sebgyógyulásban és az elhalt sejtek eltakarításában

A transzglutamináz 2 transzglutamináz funkciója mellett rendelkezik GTPáz, protein diszulfid izomeráz és protein kináz enzimaktivitással is és a többi transzglutaminázzal ellentétben vannak olyan szakaszai, melyek ideális interakciós partnerré teszik más fehérjék számára. A TG2 interakciós partnerei lehetnek sejt adhézióhoz, migrációhoz és fagocitózishoz köthető fehérjék (pl. fibronektin, 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.

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 kereszt kötő funkciójának köszönhetően hozzájárul az ECM stabilizációhoz és újrászerveződéshez, valamint egyrészt, mint integrin koreceptor, másrészt, mint független adhéziós molekula, különböző sejt-mátrix kölcsönhatásokban (pl. sejt adhézió, fibroblasztok mozgása) is részt vesz, így fontos szerepet játszik a szövetregeneráció folyamatában.

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. Ezen kívül a TG2 bizonyos esetekben hozzájárul a TGF β termeléséhez és aktivációjához, mely szintén anti-inflammatorikus molekulaként vesz részt ebben a folyamatban. Így nem meglepő, hogy TG2 hiányában, a normál esetben immunológiailag csendes apoptotikus sejt eltakarítás gyulladásához, és SLE szerű autoimmun megbetegedéshez vezet egérben.

2 CÉLKITŰZÉS

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. Az apoptotikus sejtek az őket bekebelező makrofágokban anti-inflammatorikus folyamatokat indítanak el, melyhez a PS felismerése és bizonyos PS receptorokon (pl. MerTK) elinduló jelátviteli útvonalak, valamint a makrofágok különböző magreceptorainak aktiválódása is hozzájárulnak. Mivel a nekrotikus sejtek felszínén is megjelenik az apoptotikus sejtek felismerésénél "egyél meg" jelként azonosított PS molekula, ezért kutatásaink során célul tűztük ki, hogy:

- Megvizsgáljuk a különböző PS receptorok szerepét apoptotikus és különböző primer nekrotikus timociták csontvelői eredetű makrofágok (BMDM) általi fagocitózisa során.
- Összehasonlítjuk az apoptotikus és nekrotikus sejtek makrofágok általi eltakarításának hatékonyságát, morfológiáját és a felvételüket követően kiváltott magreceptor aktivációt.

A dinamin GTPáz a fagoszóma kialakulása, záródása és lefűződése során bekövetkező aktin átrendeződés elengedhetetlen szabályozója. A dinamin működéséhez szükséges GTP-t az NDPK-k állítják elő. A dinamin és az NDPK-k kapcsolatának szerepét a különböző membrán átszerveződések során már több fajban is bizonyították. Mivel rágsáló modellben még nem vizsgálták az Nme1 apoptotikus sejtek fagocitózisában betöltött szerepét, ezért Takács-Vellai Krisztina munkacsoportjával kollaborációban célul tűztük ki, hogy:

- Megvizsgáljuk az Nme1 nukleozid-difoszfát-kináz szerepét egér BMDM-ek apoptotikus sejt felvételében.

A transzglutamináz 2 számos biológiai folyamatban szerepet játszik, így az apoptózisban, fibrózisban, az elhalt sejtek fagocitózisában, sebgyógyulásban és gyulladásos folyamatokban is. 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.

3 ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Kísérleti állatok

A kísérletekhez 4 hetes, illetve 2-4 hónapos C57B6, TG2^{+/-} és TG2^{-/-} egereket 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.

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 differenciálását *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 retinsavval (ATRA), 9-cis retinsavval (9CRA), GW3965-tel, dexametazon-acetáttal vagy kontrollként dimetil-szulfoxid (DMSO) kezeltük 24 órán keresztül. Az inhibíciós kísérletek során a makrofágokat BMS777607 TAM receptor tirozin kináz inhibitorral vagy NSC23766 Rac1 kis GTP kötő fehérje inhibitorral kezeltük 24 órán át. Az integrin funkció gátlásához egyrészt arginin-glicin-aszpartát (RGD) peptidet, másrészt anti-CD61 antitestet 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 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 nem specifikus siRNS-ekkel lettek transzfectálva DharmaFECT 1 Transfekciós reagens segítségével. 48 órával a transzfectiót követően vizsgáltuk a sejtek fagocitózis képességét, valamint western blot segítségével az Nme1 fehérje szintjét.

Raw 264.7 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 történt.

Timocita izolálás, sejthalál indukció és PS blokkolás

Elhalt sejtek előállításához 4 hetes C57B6 típusú egér frissen izolált tímuszából nyert sejteket (timocitákat) használtunk. Apoptózist szérumentes RPMI 1640 médiumban (2 mM glutamin, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin) történő 24 órás inkubációval idéztünk elő. Nekrózist hőstresszel, illetve H₂O₂ kezeléssel indukáltunk. Élő kontrollként frissen izolált timocitákat használtunk. Az áramlási citometriás mérésekhez Cell Tracker Deep Red vagy karboxifluorescein-diacetát-szukcinimidil-észter (CFDA-SE) fluoreszcens festékekkel jelöltük az apoptotikus és nekrotikus timocitákat. Egyes kísérleteknél az apoptotikus és nekrotikus timociták felszínén lévő PS-t Alexa Fluor 647-konjugált annexin V-vel fedtük le.

Izom eredetű leukociták izolálása

Izolálást követően a tibialis anterior (TA) izmokat feldaraboltuk, 0.2% kollagenáz II 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 sejtz izolálással különítettük el.

Elhalt timociták annexin V és PI festése

A sejthalál indukció sikerességét Alexa Fluor 647-konjugált annexin V fehérjével és propidium-jodid (PI) DNS festékkel ellenőriztük. A sejtek fluoreszcenciáját Becton Dickinson FACSCalibur áramlási citométer segítségével mértük.

Transzmissziós elektronmikroszkópia

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 az előbb leírt módon fixálásra kerültek. A mintákat a megfelelő előkészítést követően JEOL 1010 transzmissziós elektronmikroszkóppal vizsgáltuk.

***In vitro* fagocitózis vizsgálat**

A BMDM-ekhez/Raw 264.7 sejtekhez hozzáadtuk az apoptotikus és/vagy nekrotikus timocitákat, majd különböző arányokban 37 °C-on együtt inkubáltuk a sejteket különböző időtartamokig. A fagocitózis vizsgálatokat megelőzően mindig normalizáltuk a célsejtek számát, hogy azonos mennyiségű apoptotikus és nekrotikus sejt legyen jelen. 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 reagenst adtunk a sejtekhez.

Áramlási citometria

A fagocitózist és az izomban lévő neutrofilek és makrofágok arányát Becton Dickinson FACSCalibur áramlási citométer segítségével mértük. A fagocitózis vizsgálatához az apoptotikus és nekrotikus sejteket felvett makrofágokat az elhalt sejtek fluoreszcens jele alapján detektáltuk. Az izomból származó sejteket egyszerre festettük Alexa Fluor647 konjugált anti-Ly6G antitesttel és Alexa Fluor 488 konjugált anti-F4/80 antitesttel. A kapott eredményeket a Flowing Software programmal elemeztük.

Lézer pásztázó citometria

A fagocitózis valós idejű követéséhez a BMDM-eket 8 kamrás IBIDI tenyésztőlemezre helyeztük és Hoechst 33342 magfestékkel jelöltük. A fluoreszcensen jelölt apoptotikus (CFDA-SE) és nekrotikus (deep red) timocitákat közvetlenül a mérés megkezdése előtt adtuk a makrofágokhoz (1:10 makrofág:célsejt arányban). A mérés során egy IBIDI inkubátor segítségével a sejteket állandó körülmények között tartottuk. A képeket egy Olympus IX-71 invertált mikroszkóppal, majd ezekből a videó fájlt az ImageJ szoftver segítségével készítettük.

Konfokális mikroszkópia

A fagocitózis valós idejű követéséhez a BMDM-eket 8 kamrás IBIDI tenyésztőlemezre helyeztük és CMTMR festékkel jelöltük. A fluoreszcensen jelölt apoptotikus (CFDA-SE) és nekrotikus (deep red) timocitákat közvetlenül a mérés megkezdése előtt adtuk a makrofágokhoz (1:10 makrofág:célsejt arányban). A time-lapse felvételeket Zeiss LSM510 konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal készítettük.

RNS izolálás, reverz transzkripció PCR és RT-qPCR

Az apoptotikus és nekrotikus sejtek fagocitózist követően a Raw 264.7 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 segítségével, a gyártó által előírt protokollt használva végeztük. A valós idejű kvantitatív PCR során, 3 technikai párhuzamost használva, génspecifikus (Raw 264.7 sejtek esetén MerTK, TG2, C1qb, MFG-E8, SREBP1, RARα; izomból származó leukociták esetén TNFα, IL1, IL6, TGFβ1, Gdf3) TaqMan próbákat tartalmazó oligo mixeket alkalmaztunk. A valós idejű detektálást egy Roche LightCycler LC480 készülék segítségével valósítottuk meg. Az adatok kiértékelését összehasonlító C_T módszerrel végeztük, normalizáló génként gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenázt és β-aktint használtunk.

SDS-PAGE és Western blot

A C57B6 egérből származó kontroll és Nm23-M1/Nme1 csendesített BMDM-ek, illetve a kontroll és 4 napos kardiotoxin (CTX) kigyóméreg injektált TG2^{+/+} és TG2^{-/-} izomból izolált CD45⁺ sejtekből származó fehérje minták koncentrációját 2 mg/ml-re hígítottuk. Az elektroforézis az Nm23 fehérje esetében 15 %-os, a Gdf3 esetében 12%-os SDS-poliakrilamid gélen történt, majd az elválasztott fehérjéket Bio-Rad fűlszárz blottoló készülék segítségével Immobilion-P polivinilidén-fluorid membránra transzferáltuk. A vizualizációhoz anti-Nm23 vagy anti-Gdf3 és az egységes mintafelvitel teszteléséhez anti-β-Actin vagy anti-LaminB elsődleges, majd peroxidázzal jelölt másodlagos antitesteket használtunk. Az Immobilion Western Chemiluminescent HRP szubsztrát segítségével kiváltott kemilumineszcenciát röntgen filmen detektáltuk.

Izomsérülés modellezése CTX injekcióval

Az egerek anesztéziáját pentobarbitállal, majd az izomsérülés modellezését tibialis anterior (TA) izomba történő CTX injekcióval végeztük. 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.

A regenerálódó izom hisztológiai vizsgálata

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 izmokban 6 μm-es szeleteket vágunk, melyeken hematoxilin-eozin (HE) festést vagy DyLight 488 konjugált anti-Laminin antitesttel és DAPI sejtmagfestékkel

immunfluoreszcens festést végeztünk. A metszetekről EVOS_{CI} digitális invertált mikroszkóppal vagy EVOS Fluid Cell Imaging Station fluoreszcens mikroszkóppal készítettünk képeket.

Statisztikai analízis

A bemutatott adatok legalább 3 (egy esetben 2) egymástól függetlenül elvégzett kísérlet eredményeinek átlagát (+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

Az apoptotikus és nekrotikus sejtek felvétele egyaránt PS, MerTK, Tim-4, integrin β_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. A PS a nekrotikus sejtek makrofágok általi eltakarításában betöltött szerepének meghatározásához először rekombináns annexin V fehérjét használva lefedtük az elhalt timociták felszínén lévő PS molekulákat és ezt követően vizsgáltuk a fagocitózis hatékonyságát. Kimutattuk, hogy a kezelés hatására mind az apoptotikus, mind a nekrotikus sejtek felvétele szignifikánsan csökkent a kezeletlen timociták felvételéhez képest, mely arra utal, hogy a PS-nek az apoptotikus mellett a nekrozissal elhalt sejtek eltakarításában is fontos szerepe van.

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 a trombospondin-CD36-integrin $\alpha_v\beta_3$ komplex, a CD14 és a CD36 szerepét már bizonyították a nekrotikus sejtek fagocitózisa kapcsán is. 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 hídkepző 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. A Tim-4 direkt PS receptor szerepét anti-Tim-4 antitestekkel történő blokkolással vizsgáltuk, mely során szintén csökkent apoptotikus és nekrotikus sejt felvételt tapasztaltunk. Az $\alpha_v\beta_3$ integrin receptorok szintén indirekt módon, az MFG-E8 hídkepző fehérjén keresztül képesek felismerni a sejt felszíni PS-t. Az integrin funkciót RGD peptidokkal vagy anti-CD61 antitesttel gátolva szintén csökkent fagocitózist tapasztaltunk minden típusú célsejt esetében. 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 ismét hasonló mértékben csökkent apoptotikus és nekrotikus sejt felvételt tapasztaltunk. Összességében ezek a megfigyeléseink arra utalnak, hogy a

primer nekrotikus sejtek felvételében ugyanazok a PS felismerő receptorok is részt vesznek, melyek az apoptotikus sejt eltakarításban is fontos szerepet játszanak.

Különböző magreceptorok aktiválása 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 retinaldehid-dehidrogenáz (RALDH) enzimek kifejeződését. A RALDH-k retinsavakat termelnek, melyek aztán további fagocita receptorok expressziójának emelkedéséhez vezetnek, így eredményezve hatékonyabb apoptotikus sejt eltakarítást. 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 sejt felvételhez vezet, elsősorban MerTK függő mechanizmusokon keresztül. 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, ATRA RAR agonistával, GW3965 LXR agonistával vagy dexametazon-acetát GR agonistával 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.

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

Valós idejű kvantitatív PCR-al meghatároztuk aMerTK, TG2, C1qb, MFG-E8, szterolszabályozó elemet kötő fehérje 1 (SREBP1) és RAR α LXR és PPAR magreceptor célgénének expressziós változásait az apoptotikus és hőnekrotikus timociták Raw 264.7 makrofágok általi fagocitózisát és feldolgozását követően. Ezekről a génekről tudjuk, hogy apoptotikus sejt felvételt követően megemelkedik az expressziójuk BMDM-ekben, ezáltal segítve az apoptotikus sejtek mielőbbi eltakarítását és az immuntolerancia kialakítását. Kíváncsiak voltunk, hogy nekrotikus sejtek felvételét követően is megfigyelhető-e ez a jelenség. Méréseink alapján a C1qb opsonizáló molekula, a MerTK fagocita receptor és a SREBP1 transzkripciós faktor (mely képes gátolni az NF- κ B általi gyulladáshoz vezető választ) expressziója mind apoptotikus, mind nekrotikus sejtek felvételét követően korai emelkedést mutat. Már 2 órával az elhalt sejtek hozzáadását követően

megemelkedett géneexpressziót tapasztaltunk a nem fagocitáló, nyugalmi makrofágokhoz hasonlítva. A TG2, az MFG-E8 hídképző molekula, valamint a RAR α retinsav receptor (mely újabb, az elhalt sejtek makrofágok általi fagocitózisának hatékonyságát serkentő gének expresszióját szabályozza) gének expressziója is hasonlóképpen megemelkedett mind apoptotikus, mind nekrotikus sejtek felvételét követően. Igazán jelentős emelkedést a 24 órás mintákban tapasztaltunk.

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 sejttípus együttes jelenlétekor kompetíciónak kellene kialakulnia. Hogy ezt a felvétést megvizsgáljuk, rövid távú (30 perc) kompetíciós fagocitózis kísérletet végeztünk, mely során az eltérő módon jelölt apoptotikus és/vagy hőnekrotikus timociták különböző arányokban (1:0, 1:1, 1:3, 1:6, 1:9) voltak a BMDM-ekhez adva. Az 1:0 arányoknál azt találtuk, hogy a hőkezelt primer nekrotikus timociták felvétele ugyanolyan hatékony volt, mint az apoptotikusaké. Amikor az apoptotikus és nekrotikus timociták együtt voltak jelen a makrofágok környezetében, nagyjából azonos mértékben csökkentették a másik sejthaláltípussal elhalt sejtek felvételét. Ezzel ellentétben az élő timocitákat nem kebelezték be a BMDM-ek és e sejtek jelenléte nem csökkentette az elhalt sejtek felvételét sem.

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.

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. 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. 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 sejttípust 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 előtetített makrofágokhoz. Amikor megvizsgáltuk, hogy az első körben fagocitáló makrofágok közül hány százalék vett fel apoptotikus és nekrotikus sejteket, azt tapasztaltuk, hogy a második sejtípus felvétele független volt a korábban bekebelezett célsejttől. Ez azt engedi feltételezni, hogy a kialakult fagocita portálok az apoptotikus és nekrotikus sejtek esetében is hasonlóak vagy akár azonosak lehetnek. Ezek alapján azt feltételezzük, hogy azért tapasztaltuk kevés egyszerre apoptotikus és nekrotikus timocitát is felvett makrofágot, mert rövidtávú (30 perc) fagocitózist vizsgáltunk, mely során valószínűleg a legtöbb makrofág csak egyetlen sejtet tudott bekebelezni.

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, 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, valamint lézer pásztázó citometria és konfokális mikroszkópia segítségével timelapse videókkal is igazoltuk, 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 újraszerveződést szabályozza és számos fagocitózis jelátviteli útvonal által aktiválódik. A Rac1 gátlása az NSC23766 Rac1 inhibitor segítségével csökkentette mind az apoptotikus, mind a nekrotikus sejtek felvételét, 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

Az NM23-M1/Nme1 szerepét 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 homológia, 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 analízis alapján megállapíthatjuk, hogy az Nme1 specifikus csendesítés kb. 55 %-os csökkenést eredményezett az Nme1 fehérje szintjében. 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. Ez arra enged következtetni, hogy az Nme1 fehérje emlősök esetében is a férgeknél tapasztaltakhoz hasonlóan részt vesz az elhalt sejtek eltakarításának mechanizmusában.

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, melyen Nour Al Zaeed PhD hallgatóval közösen dolgozunk.

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^{-/-} egeremből 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. A CSA meghatározását a HE festett metszeten az ImageJ program segítségével az izomrostok manuális kijelölésével végeztük. Később, laminin festés segítségével már automatizálni tudtuk a CSA meghatározását az ImageJ szoftver Muscle morphometry nevű bővítményét használva. Természetesen ebben az esetben is ellenőriztük az izomrostként definiált objektumokat és a fals 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 keresztmetszeti területe szignifikánsan kisebb, és jóval nagyobb számban fordulnak elő kisebb méretű izomrostok, mint a vad típusú izmokban. A CTX injekciót követően 8 napig regenerálódott izmoknál is megfigyelhető, hogy a TG2 hiányos izomrostok CSA-ja kisebb, és szintén jelentősebb a kisebb mérettartományba eső izomrostok populációja. 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.

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 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) fluorescens antitest jelölést végeztünk, melyet áramlási citometriával detektáltunk.

Ahogy azt vártuk, a kontroll mintákban (nem injektált vagy fiziológiás sóoldattal injektált) nem tapasztaltunk számottevő immunsejt populációkat. A CTX injektált izmok esetében a regeneráció második napján közel azonos mennyiségben vannak jelen neutrofilek és makrofágok. A regeneráció negyedik napjára a neutrofil populáció szinte teljesen eltűnik, és nagyobb számban vannak jelen makrofágok. A makrofágok és neutrofilek aránya nem változott TG2 hiányában.

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 gyulladásos (TNF α , IL1, IL6) és anti-inflammatorikus (TGF β 1) citokinek expresszióját, ezáltal képet kapjunk az izomban uralkodó gyulladásos állapotról. Ezen felül a Gdf3 növekedési faktor expresszióját is vizsgáltuk, mely szükséges az újonnan képződött izomrostok fúziójához, így fontos szerepet játszik a vázizom regenerációban.

A TNF α , IL1, IL6 gyulladásos citokinek szintje a 2 napos regenerálódó izomban alacsonyabb, a 4 naposban magasabb volt a TG2^{-/-} leukocitákban. Ez alapján arra következtethetünk, hogy a szatellita sejtek aktivációjához is elengedhetetlen kezdeti gyulladás csökkent, esetleg késleltetett a TG2 hiányos sérült izmokban. A TGF β 1 anti-inflammatorikus citokin expressziója pedig leginkább a regeneráció negyedik napján mutat alacsonyabb szintet, amikor már a gyulladásos 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. A Gdf3 szintjét 4 napos regenerálódó

izomban fehérje szinten is megvizsgáltuk SDS-PAGE és Western blot segítségével, melyben szintén tapasztaltuk a csökkent expressziót. 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 eltakarításának 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, míg mások a nekrotikus sejtek gyors és az apoptotikus sejtekéhez hasonlóan hatékony felvételéről számolnak be. Bár már tudjuk, hogy a nekrotikus sejtek felszínén is megjelenik az apoptotikus sejtek felismerésénél ”egyel 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. Mások eredményei szerint azonban az apoptotikus sejtekhez hasonlóan a nekrotikus sejtek felvétele is PS függő mechanizmusokkal megy végbe. 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, a nekrotikus sejtekről tudjuk, hogy a hirtelen sejtkárosodás eredményeképp gyulladáskeltő hatású anyagok szabadulnak fel belőlük. Az apoptotikus sejtek az őket bekebelező makrofágokban is anti-inflammatorikus folyamatokat indítanak el, melyhez a PS felismerése és bizonyos PS receptorokon elinduló jelátviteli útvonalak is hozzájárulnak. 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, míg mások szerint szintén immunológiailag csendes folyamatnak tekinthető. Mivel a nekrotikus sejtek felvételében is szerepet játszik a PS és receptorai, így feltételezhetjük, hogy a makrofágokban az apoptotikus sejtek bekebelezését követően kiváltott hatásai ebben az esetben is érvényesülnek, így bár a nekrotikus sejtek magukban pro-inflammatorikus folyamatokat indítanak el, a makrofágok általi bekebelezésük segítheti az immuntolerancia kialakulását.

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. 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, opsonizáló és hídképző molekulák génjei aktiválódnak. 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 sejtípus 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. Az L929 sejtek apró apoptotikus testeket formálnak, melyek szorosan záródó fagoszómákkal, míg a nagyméretű nekrotikus sejtek kisebb részletekben, a folyadék fázissal együtt, egy ún. makropinocitózis-szerű mechanizmussal kerültek felvételre. 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 fibroblaszt 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 molekulák. A GR, RAR és LXR magreceptorok aktivációja a makrofágokban mind az apoptotikus, mind a nekrotikus sejtfelvételt fokozza. Ennek jelentősége lehet pl. az apoptotikus sejtfelvételt célzó klinikai terápiák során, melyek ezáltal javíthatják a nekrotikus sejtek eltakarítását is, így hozzájárulva a kezelés sikerességéhez.

Az elhalt sejtek felismerésének hatására a fagocitákban aktiválódó, a bekebelezést elindító evolúciósan konzervált jelátviteli útvonalak hatására többek között aktiválódnak a Rac1 és a dinamin GTPázok, melyek lehetővé teszik a citoskeletális átrendeződést, így a bekebelezéshez szükséges állapotok képződését. A Rac1 gátolt makrofágokkal végzett fagocitózis kísérleteink során azonos mértékben csökkent apoptotikus és nekrotikus sejtfelvételt tapasztaltunk, tehát valószínűleg a fagocitózisban részt vevő receptorokon felül az aktiválódó jelátviteli útvonalakon is osztozik az apoptotikus és nekrotikus sejtfelvétel.

A dinamin megfelelő működéséhez szükséges GTP-vel való ellátását az NDPK-k végzik. *C. elegans* fonálféregben a DYN-1 és az NDK-1 bizonyítottan fizikai interakcióban vannak az apoptotikus sejtek bekebelezése során kialakuló fagoszómák felszínén. Humán monocita eredetű makrofágok esetében is megfigyelhető volt a dinamin és az Nme1 kolokalizációja a fagocita portáiban, 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 sebgyógyási, szövetregenerációs folyamatokat. Hozzájárul az ECM stabilizációjához és újrászerveződéséhez, részt vesz különböző sejt-mátrix kölcsönhatásokban, anti-inflammatorikus molekulaként szerepet játszik az apoptózis program lezajlásában és makrofágokban integrin β_3 koreceptorként működve az apoptotikus sejtek eltakarításában is közreműködik. Annak ellenére, hogy sokat tudunk a TG2 funkcióiról 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. Születés után a TG2 normál esetben nem, vagy csak igen alacsony szinten expresszálódik a vázizomban, azonban idiopátiás gyulladásos miopátiáknál, valamint a regenerációban fontos szerepet játszó neutrofilekben és makrofágokban

kifejeződik. Mindezek alapján úgy gondoltuk, hogy érdemes TG2 hiányos egereket használva megvizsgálni a TG2 CTX okozta vázizom sérülés utáni regenerációban betöltött szerepét.

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 a mioblasztok fúziójának nem megfelelő működésére utalhat.

A regeneráció kezdeti fázisában az izomba beáramló neutrofilek és gyulladásos 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 gyulladásos 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 gyulladásos IL1 és TNF α citokinek expressziója. Ezek alapján úgy tűnik, hogy a TG2 hiányában az izomregeneráció során lezajló gyulladásos válasz csökken, vagy kissé késleltetve jelenik meg.

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. A Gdf3 szintje a TG2 KO regenerálódó izomból 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.

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. A PS bökölése gátolja a miotubulusok kialakulását a mioblaszt fúzió gátlásán keresztül. Egyes PS receptorok is részt vehetnek a mioblaszt fúzióban, ugyanis a PS receptorok által aktivált jelátviteli útvonalak a Rac1 GTPázot aktiválják, mely szükséges a mioblaszt fúzió során végbemenő citoskeletális átrendeződésekhez is. 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. Az

embriónális 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 citoskeletális átrendeződést.

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

A TG2 tehát egyrészt szerepet játszhat a mioblasztok fúziójában, mely mind az embriónális 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 sejttermék eltakarításáról viszonylag keveset tudunk, pedig ezek a különböző sejtállapotok gyakran együtt jelennek meg patológiás helyzetekben. Kísérleteink során hő és H_2O_2 által előlt nekrotikus és szérum éhezettett 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 célgenek (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, az elhalt sejtek PS függő fagocitózisában, valamint a sebgyógyulási folyamatok és a szöveti fibrózis szabályozásában is. 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 gyulladási 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 csökkent 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 GTPáz-t aktiválják. A szekretálódott TG2 ezen kívül akár az MFG-E8-on, vagy a GPR56-on keresztül is serkenetheti az mTOR jelátviteli útvonalat, ezáltal az izomrostok növekedését.



**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/Dynamain.
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., SÁGHY, 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.



Az értekezéshez kapcsolódó konferencia prezentációk

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