

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

A krónikus gyulladások kialakulása és a nem megfelelő efferocitózis közötti kapcsolat vizsgálata két egérmodellben

Sághy Tibor

Témavezető: Prof. Dr. Szondy Zsuzsa



DEBRECENI EGYETEM

FOGORVOSTUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2020

1. Tartalomjegyzék

1. Tartalomjegyzék.....	1
2. Rövidítések jegyzéke	4
3. Bevezetés	9
4. Irodalmi áttekintés	10
4.1. Apoptózis.....	10
4.2. Az apoptotikus sejtek eltakarítása (efferocitózis).....	13
4.3. Az efferocitózis zavara és a betegségek kapcsolata	17
4.4. A szöveti (2-es típusú) transzglutamináz (TG2).....	17
4.5. A TG2 kapcsolata az apopto-fagocitózis programmal	19
4.6. A TG2 kifejeződésének szabályozása egér timocitákban.....	21
4.7. Az A vitamin anyagcseréje.....	22
4.8. Retinol-szaturáz (RetSat) enzim	24
4.9. Retinoidok és az apoptotikus sejtek fagocitózisa	25
4.10. Az obezitás- egy komplex immun-metabolikus kórkép	26
4.11. Zsírsejtek fagocitózisa elhízásban.....	28
5. Célkitűzések	30
6. Anyagok és módszerek	31
6.1. Reagensok és vegyszerek.....	31
6.2. Kísérleti állatok.....	31
6.3. Csontvelő-transzplantáció	32
6.4. A csontvelői makrofágok izolálása és metabolikus aktivációja	33
6.5. 3T3 sejtek tenyésztése és differenciáltatása	33
6.6. A zsírsejtekre jellemző morfológiai megjelenés vizsgálata a differenciált 3T3 sejteken	34
6.7. A zsírsejtekre jellemzően fokozott expressziót mutató gének (UCP-2, PPAR- γ , leptin és rezisztin) vizsgálata a differenciált 3T3 sejtekben	34
6.8. Inszulin-rezisztencia teszt, intraperitoneális glükóztolerancia teszt (IPGTT) és az inzulin meghatározása	35
6.9. Szövetminták gyűjtése.....	36
6.10. Adipociták és zsírszöveti makrofágok (adipose tissue macrophage, ATM) izolálása	36
6.11. A máj trigliceridszintjei	36
6.12. Hisztológia és immunhisztokémia	37

6.13.	RNS-izolálás és valós idejű kvantitatív PCR (RT-qPCR)	37
6.14.	Time-lapse mikroszkópos képkészítés	38
6.15.	Western blot	38
6.16.	Frissen izolált timociták áramlási citometriával történő elemzése	39
6.17.	A timociták apoptózisa in vitro	39
6.18.	Retinoidok mérése folyadékkromatográffal kapcsolt tömegspektrométer (HPLC/MS/MS) segítségével	39
6.19.	Csontvelői (Bone-Marrow-Derived, BMDM), peritoneális, vagy tioglikolát által kiváltott makrofágok képződése, tenyésztése és kezelése	40
6.20.	Apoptotikus sejtek in vitro fagocitózisa	40
6.21.	Konfokális mikroszkópia	41
6.22.	mRNS-szekvenálás	42
6.23.	Antinukleáris antitestek kimutatása indirekt immunfluoreszcencia assay segítségével	42
6.24.	Anti-dsDNS antitest ELISA	43
6.25.	Kaspáz-3 immunhisztokémia	43
6.26.	IgM-et tartalmazó immunkomplexek kimutatása	43
6.27.	A szérum karbamid koncentrációjának meghatározása	44
6.28.	Statisztikai analízis	44
7.	Eredmények	45
7.1.	A TG2 hiányának hatása a magas zsírtartalmú diétával kiváltott patológiás változásokra egerekben	45
7.1.1.	A TG2 hiányának hatása a zsírsejtek eltakarítására és a magas zsírdiétával kiváltott patológiás változásokra	45
7.1.2.	Adipociták fokozott apoptózisa figyelhető meg a gonadális zsírszövetben a magas zsírtartalmú étrend által kiváltott elhízás során TG2 ^{-/-} egerekben	47
7.1.3.	A TG2 hiánya egerekben fokozza a zsírmáj és az inzulinrezisztencia kialakulását a magas zsírtartalmú étrend által kiváltott elhízás során	48
7.1.4.	A TG2 hiánya nem csontvelői eredetű sejtekben a keringési rendszer plazma-inzulinszintjeinek emelkedéséhez és inzulinrezisztenciához vezet	52
7.1.5.	A TG2 hiánya a csontvelői eredetű sejtekben felelős az elhízással összefüggő adipocita sejthalál, gyulladás és zsírmáj kialakulásáért TG2-null egerekben	54
7.1.6.	A TG2 hiánya a makrofágokban hatékonyabb lizoszómális exocitózist eredményez	56
7.1.7.	Fokozott c-Src szignalizációjuk révén a metabolikusan aktivált TG2-null makrofágok több gyulladásos citokint termelnek, mint a vad típusúak	59

7.1.8.	Az LXR-agonistával történő kezelés visszaállítja a HFD étrend által kiváltott fenotípust a csontvelői eredetű sejtekben TG2-hiánnyal rendelkező egerekben, a máj kisebb mértékű szteatózist eredményezve a vad típusú egerekhez képest.....	61
7.2.	A retinol szaturáz enzim hiányának hatása az elhalt sejtek eltakarítására.....	64
7.2.1.	A retinol-szaturáz hiánya nem befolyásolja sem a retinoidok által szabályozott gének indukcióját, sem a tímusz apopto-fagocitotikus programját.....	64
7.2.2.	A RetSat-null makrofágokban a hosszú távú fagocitózis romlik.....	66
7.2.3.	A RetSat-null makrofágok kevesebb MFG-E8-at expresszálnak.....	67
7.2.4.	Az MFG-E8 termelődésének alacsony szintje felelős a RetSat-null makrofágok hosszú távú fagocitózisának defektusáért	72
7.2.5.	A nőstény RetSat-null egerek hajlamosak enyhe szisztémás lupus erythematosus (SLE)-szerű autoimmunitás kialakulására	74
8.	Megbeszélés	77
9.	Összefoglalás	83
10.	Summary	84
11.	Irodalomjegyzék.....	85
12.	Tárgyszavak	104
13.	Köszönetnyilvánítás	105
14.	Közlemények.....	106

2. Rövidítések jegyzéke

9cRA	9 cisz retinsav
ABCA1	ATP-binding cassette transporter
ACAMP	Apoptotikus sejtekkel asszociálódó molekuláris mintázat
Acp5	Acil karrier protein 5
ADH	Alkohol-dehidrogenáz
AIF	Apoptózis indukáló faktor
ANA	Antinukleáris antitest
Apaf-1	Apoptotikus proteázt aktiváló faktor 1
ATP	Adenozil-trifozfát
ATRA	Transz retinsav
Bad	Bcl-2-kapcsolt sejthalált indító protein
BAI1	Agy-specifikus angiogenesis inhibitor 1
Bak	Bcl-2 homológ antagonista/ölő
Bax	Bcl-2-kapcsolt X protein
Bcl-10	B-sejt lymphoma/leukemia 10
Bcl-2	B-sejt lymphoma-2
Bcl-w	B-sejt lymphoma-w
Bcl-XL	B-sejt lymphoma-XL
Bid	BH3 interakcióba lépő sejthalál domén agonista
Bik	Bcl-2-interakciós ölő
Bim	Bcl-2 interakciós sejthalál mediator

Blk	B lymphoid tirozin kináz
BMDM	Csontvelői eredetű makrofág
BMI	Testtömeg-index
C1qb	Complement Komponens 1q
CAD	Kaspáz-aktivált DNáz
Cdc42	Sejtosztódást szabályozó protein 42
c-FLIP	Celluláris FLICE –inhibitorikus protein
CLS	Korona szerű struktúra
COPD	Krónikus elzáródásos tüdőbetegség
CRABP	Celluláris retinsav kötő protein II
CRT	Kalretikulin
CT	Komputer tomográfia
Ctsk	Katepszin K
CX3CL1	Kemokin (C-X3-C motívum) ligand 1
DD	Haláldomén
DEG	Eltérő mértékben kifejeződő gén
DEX	Dexametazon
DISC	Sejthalált indukáló jelátviteli komplex
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilszulfoxid
EDTA	Etilén-dimaimin-tetraacetát
EEA1	Korai endoszóma-antigén 1
ELISA	Enzim-kapcsolt immunoszorbens esszé
FACS	Fluoreszcens aktivált sejt szétválogatás

FADD	Fas-kapcsolt sejthalál domén
FADH	Flavin adenin dinukleotid
FasL	Első apoptózis szignál (Fas) ligand
FasR	Első apoptózis szignál (Fas) receptor
FBS	Fötális borjúsérum
FITC	Fluoreszcein
FRD	False discovery rate
GAPDH	Glicerinaldehid 3-foszfát dehidrogenáz
Gas6	Növekedés specifikus gátló 6
gWAT	Gonadális fehér zsírszövet
HFD	Magas zsírtartalmú diéta
HIV	Humán immunodeficiencia vírus
HSD	Magas szaharóz tartalmú diéta
HtrA2/Omi	Magas hőmérsékletet igénylő protein A2
IAP	Apotózis inhibitor
IBMX	3-izobutil-1-metilxantin
ICAM3	Intercelluláris adhézios molekula 3
IL1 β	Interleukin β
IL-6 receptor	Interleukin 6 receptor
LacZ	Beta-galaktozidáz
LAMP1	Lizoszomális membránhoz kapcsolt protein 1
Lamp2	Lizoszomális membránhoz kapcsolt protein 2
Laptn5	Lizoszomális transzmembrán protein 5
LDL	Alacsony denzitású lipoprotein

Lipa	Lipáz A
LXR	Máj X-receptor
MAC	Mitokondriális apoptózis-indukált csatorna
MCP-1	Monocita kemoattraktáns protein-1
Mertk	Mer tirozin kináz receptor
MFG-E8	Tej zsírcsomó-EGF faktor 8
MPT	Mitokondriális permeabilitás tranzíció
MyD88	Mieloid differenciációs korai válasz 88
NADPH	Nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát
ND	Normális diéta
NF- κ B	Magi kappa B faktor
NPY	Neuropeptid Y
P2Y2	Purinreceptor 2
PANX1	Pannexin 1
PARP	Poli (ADP-ribóz) polimeráz
PBS	Foszfát-pufferolt sóoldat
PCR	Polimeráz láncreakció
PPAR δ/γ	Peroxiszóma proliferátor-aktivált receptor δ/γ
Rab5	Ras-rokon protein 5
Rab7	Ras-rokon protein 7
Rac1	Ras-rokon C3-botulinum toxin szubsztrát 1
RAL	Retinaldehid
RAP1GDS	Rap1 GTPáz-GDP Disszociációt stimuláló 1
RAR	Retinsav receptor
RARE	Retinsav receptor válaszadó elem

RetSat	Retinol szaturáz
RhoA	Ras homológ géncsaládtag A
RILP	Rab-kapcsolatos lizoszomális protein
RIP	Receptor-kapcsolt protein
ROCK	Rho-kapcsolt protein kináz
RXR	Retinoid X receptor
RXRE	Retinoid X receptor válaszadó elem
SCARF1	Scavenger receptor F osztály tag 1
SET	Endoplazmatikus retikulum-kapcsolt komplex
SLE	Szisztémás lupus erythematosus
Smac/DIABLO	Második mitokondrium eredetű kaszpáz aktivátor/közvetlen apoptózis inhibitor-kötő alacsony pI-jű protein
Src	Szarkóma (kináz)
TG2	Szöveti transzglutamináz
TGF- β	Transzformáló növekedési faktor béta
TIM4	T-sejt immunoglobulin mucin fehérje 4
TLR	Toll-szerű receptor
TNF α	Tumor nekrosis faktor α
TRADD	TNFR1-kapcsolt sejthalál domént tartalmazó fehérje
TSP-1	Trombospondin 1
UCP2	Mitokondriális szétkapcsoló fehérje 2
UTP	Uridin-trifoszfát

3. Bevezetés

Apoptotikus mechanizmusok eredményeképpen naponta több milliárd sejt hal el az emberi szervezetben. Ezen elhalt sejtek eltakarítása kulcsfontosságú a szöveti homeosztázis fenntartásában, nem megfelelő működése viszont több patológiás folyamattal, krónikus gyulladásos betegséggel hozható összefüggésbe (pl. autoimmunitás, 2-es típusú diabétesz és az elhízás). Az elmúlt évtizedekben az elhalt sejtek eltakarításáról kialakult látásmódunk nagyban kiszélesedett. Jelentős számú közlemény született, amely az efferocitózis összetett jelátviteli folyamatait tárta fel. Ennek ellenére számos eleme még mindig ismeretlen maradt.

Disszertációmban az elhalt sejtek eltakarításának zavarát és a zavar patológiás következményeit vizsgáltam két knock out (TG2 hiányos, illetve RetSat hiányos) egértörzsben.

A transzglutamináz 2 (TG2) fehérje az integrin $\beta 3$ receptor koreceptoraként működve hozzájárul az apoptotikus sejtek makrofágok általi megfelelő eltávolításához. A disszertációmban arra tettem kísérletet, megvizsgáljam, hogy az elhalt sejt eltakarítás predesztinált genetikus zavara (a TG2 hiánya) fokozhatja-e a metabolikus szindróma kialakulását magas zsírdiétán tartott egerekben és ennek egyik rész elemeként sérül-e az apoptotikus zsírsejtek felvétele, ha magas a zsírtartalmuk. Munkacsoportunk korábbi eredményeit összegezve felmerült, hogy az elhaló sejteket eltakarító makrofágokban a retinol szaturáz útvonalon keresztül keletkező retinoidok fokozzák az efferocitózist. Ezért kísérleteim második részében retinol szaturáz hiányos egerekben vizsgáltam, hogy a retinol szaturáz enzim hiánya befolyásolja-e az efferocitózis folyamatát.

4. Irodalmi áttekintés

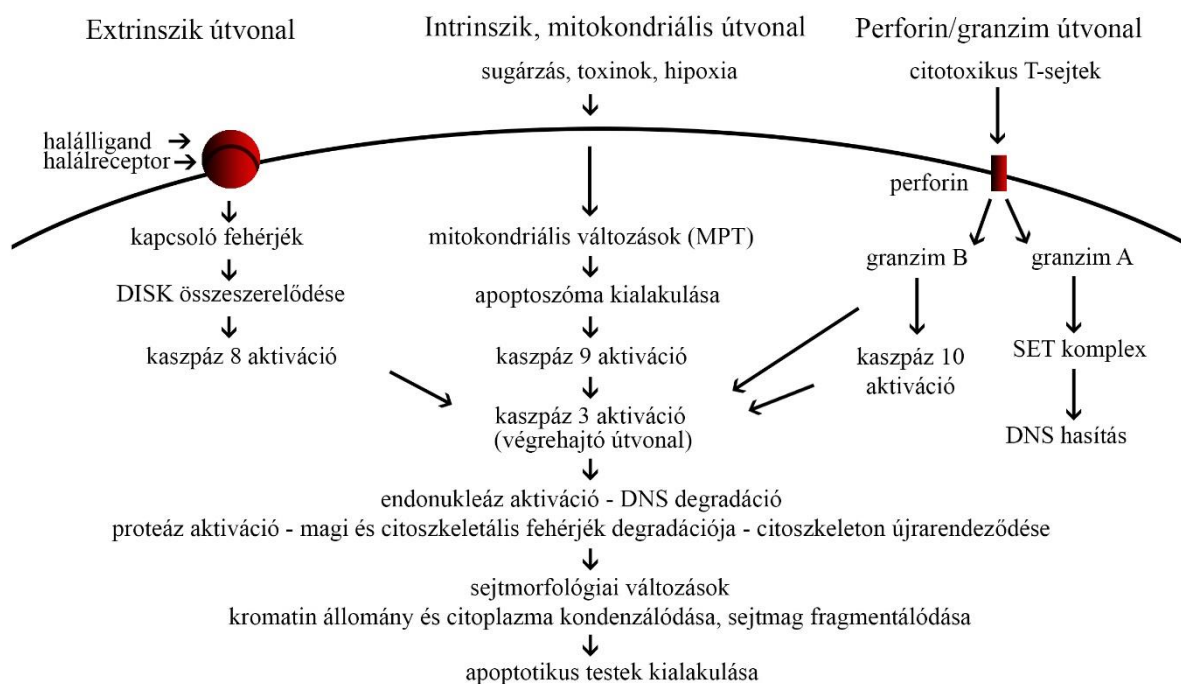
4.1. Apoptózis

A sejtek halálának megfelelő időben és mértékben történő indítása, és az elhaló sejtek hatékony eltakarítása a szöveti homeosztázis fenntartásának alapvető feltétele. Emlősökben a legtöbb sejt halála az apoptózis folyamatának aktiválásán keresztül valósul meg. Az apoptózis központi molekuláris mechanizmusát először C. elegans-ban írták le. A férgek sejtjeinek száma, valamint az egyedfejlődésük során apoptózissal elhaló sejtek mintázata meghatározott. Hagyományosan négy különböző funkciót társítanak hozzá: 1) morfogenezis irányítása, 2) szükségtelen szövetek és szervek eltávolítása, 3) szöveti sejtszám szabályozása, 4) bizonyos sejtek eliminálása. A sejthalál e típusát szinte minden sejtben közel azonos, meghatározott morfológiai változások sora jellemzi (Elmore, 2007).

A szervezeten belül zajló apoptózis mechanizmusa alapvetően három fő fázisra osztható: A) iniciáció és végrehajtás, B) DNS fragmentáció, C) apoptotikus test bekebelezés. A program aktiválódását követően a sejt térfogata csökken, majd felszíne felhólyagosodik, így legömbölyödve elválik a szomszédos sejtektől és az extracelluláris mátrixtól. A sejtmag kromatin állománya erősen kondenzálódik, marginalizálódik – majd később a DNS feldarabolódik. Végül a sejthártya befűződésével sejtorganelumokat és sejtmagdarabokat tartalmazó apoptotikus testek jönnek létre, melyeket a környező fagocita sejtek távolítanak el. A folyamat során megmarad a sejtmembrán integritása, viszont a kettős foszfolipid aszimmetria megszűnik, így a belső membrán alkotói kikerülnek a felszínre, mely jelként szolgál a fagocita sejtek számára (Häcker, 2000). Az apoptózis folyamatának aktiválódása elsősorban a makrofágok számára nagy élettani jelentőségű, hiszen a program lehetővé teszi, hogy az elhaló sejt szabályozottan membránnal határolt kis darabokra essen a felvételt megelőzően. A kis timociták esetében a nekrotikus sejtelhalás is az apoptotikus sejtek felvételéhez használt receptorokon keresztüli bekebeleződéshez vezet (Budai és mtsai, 2019).

Az apoptózis molekuláris folyamatait több különböző tényező is kiválthatja: külső faktorok sejthalál receptorokon keresztül hatva, valamint a belső mitokondriális útvonal aktiválódásához vezető jelek (Igney és Krammer, 2002). Ezeken kívül felfedeztek egy T-sejt vagy NK sejt mediált citotoxicitást követően kialakuló perforin/granzim-függő útvonalat is. A Granzim A vagy granzim B által indukált útvonal ugyanabba a terminális útvonalba kapcsolódik be, ahova

a külső vagy a belső mitokondriális útvonal is (Elmore, 2007). A külső, extrinsic útvonalat sejtfelszíni halálreceptorokhoz kötődő külső ligandok aktiválják. A receptorok a tumor nekózis faktor (TNF) receptor szupercsaládnak a tagjai, és tartalmaznak egy 80 aminosavból álló citoplazmatikus halál domént (DD), mely a jelátvitelben tölt be fontos szerepet. Máig a legjobban tanulmányozott receptorok és ligandjai: a FasL/FasR, TNF- α /TNFR1, Apo3L/DR3, Apo2L/DR4 és az Apo2L/DR5. A Fas ligand receprorához kötődve a FADD (Fas-kapcsolt halál domén) adapter fehérje, míg a TNF a TNF receptorhoz kötve a TRADD (TNF receptor-kapcsolt halál domén) adapternek a FADD és RIP (receptorral interakcióba lépő kináz) fehérjével együtt való bekötődését eredményezi (Ashkenazi és Dixit, 1998). A FADD kölcsönhatásba kerül a kaszpáz-8-cal és kialakul a DISC (sejthalált indukáló szignalizációs komplex), ami a FADD és a kaszpáz-8 vagy a kaszpáz-10 molekulákból épül fel. A kaszpáz-8 autokatalízisével a folyamat csatlakozik a terminális útvonalhoz. Az extrinsic útvonal szabályozója a cFLIP fehérje a FADD és kaszpáz-8 molekulához kötődve (Scaffidi és mtsai, 1999).



1. ábra Az apoptotózishoz vezető események sematikus ábrázolása. Az apoptózis fő útvonalai külső és belső, valamint perforin / granzim útvonalak (Elmore, 2007).

(DISC az ábrán is– sejthalált indukáló szignalizációs komplex, SET - endoplazmatikus retikulum-kapcsolt komplex, MPT - mitokondriális permeabilitás tranzíció)

A mitokondriális útvonal indukálásához vagy a sejthalálprogramot szuppresszálo jelek hiánya, vagy az apoptózist pozitívan aktiváló stimulusok szükségesek. A túlélő jelek, például a növekedési faktorok, hormonok vagy citokinek, jelenlétének hiánya miatt a sejthalál program nem gátlódik, így az apoptózis aktiválódik. Stimuláló jelek lehetnek például a sugárzás, toxinok, a hipoxia, hőhatások, vírusfertőzések vagy szabadgyökök (Elmore, 2007).

A különböző ingerek hatására a mitokondrium membránján pórusok kéződnek és pro-apoptotikus fehérjék szabadulnak ki a mitokondriumból. Az egyik ilyen fehérjecsoport tagja a citokróm C, a Smac/DIALBO (második mitokondrium eredetű kaszpáz aktivátor/közvetlen apoptózis inhibitor-kötő alacsony pI-jű protein) és a HtrA2/Omi (magas hőmérsékletet igénylő protein A2) szerin-proteáz, melyek a kaszpáz-függő útvonalat aktiválják. A citokróm c köti és aktiválja az Apaf-1-t (apoptotikus proteázt aktiváló faktor 1) és a prokaspáz-9-et megformálva ezzel az apoptoszómát. A másik felszabaduló proapoptotikus fehérje-csoport tagjai az AIF (apoptózis indukáló faktor), az endonukleáz G és a CAD (kaspáz aktiválta DNáz), melyek az apoptózis késői eseményként szabadulnak csak fel. Az AIF a sejtmagba kerülve a DNS-t 50-300 kb-os darabokra vágja és kondenzálja (Saelens 2004). Az endonukleáz G a sejtmagban a kromatin hasításával oligonukleoszómális DNS fragmentumokat hoz létre. Ezek után a CAD is felszabadul és miután a kaszpáz-3 hasította és közömbösítette inhibitorát az iCAD fehérjét, a magba transzlokálódik és további oligonukleoszómális fragmentációt, valamint erőteljesebb DNS kondenzációt okoz (Enari és mtsai,1998).

A mitokondriális események szabályozásában a Bcl-2 család fehérjéi játszanak meghatározó szerepet, melynek tagjai közül a Bax és a Bak fehérje képezi a mitokondriális csatornát. E fehérjék csatornaképző tulajdonságát szabályozzák az anti-apoptotikus (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-XS, Bcl-w és A1) vagy a pro-apoptotikus csak BH3 domént tartalmazó (Bid, Bad, Bim, Bik, Blk stb.) fehérjék elősegítve vagy gátolva a mitokondriális pórus formálódását (Tsujimoto és Shimizu, 2000).

A szenzitizált CD8⁺ T sejtek és az NK sejtek képesek megölni célsejteket. Ezek a sejtek nemcsak extrinsic útvonalon halálreceptorok aktivációjával, hanem egy az eddigiektől különböző úton is képesek elpusztítani a targetet. A folyamat során perforint, egy transzmembrán pórust formálni képes fehérjét, illetve ezeken a pórusokon át citoszolikus granulumokat juttatnak a célsejtbe (Trapani és Smyth, 2002). A granulumok legfontosabb összetevői a granzim A és granzim B szerin proteázok. A granzim B egyrészt hasítja a prokaspáz-10-et, valamint az iCAD faktort másrészt kapcsolódhat a mitokondriális útvonalhoz a Bid fehérje hasításán, és így a citokróm c felszabadulásának indukálásán keresztül. Emellett

a granzim B képes a kaszpáz-3 direkt aktivációjára is, így megkerülve a szignalizációs útvonalat közvetlenül aktiválódik a terminális fázis. A granzim A kaszpáz-független útvonalat indít el, mely a DNS hasítását eredményezi (Barry és Bleackley, 2002).

Az apoptózis végső terminális útvonalában iniciátor kaszpázok (pl. kaszpáz-8,-9, és -10) hasítják effektor kaszpázok inaktív formáit aktiválva azokat. Az effektor kaszpázok (kaspáz -3,-6,-7) a sejt más fehérje szubsztátjait hasítják az apoptotikus folyamatok végrehajtásaként. Ezek a szubsztátok például citokeratinok, PARP (poli-ADP-ribóz-polimeráz), nukleáris fehérje (NuMA) stb, melyek hozzájárulnak az apoptotikus folyamatok során bekövetkező morfológiai és biokémiai változásokhoz (Slee és mtsai, 2001). A legfontosabb effektor kaszpáz a kaszpáz-3, mely képes az iCAD inhibítort hasítani, így aktiválni a felszabaduló CAD endonukleázt. Emellett a citoskeletális reorganizációt is irányítja az aktin kötő fehérje a genzolin hasításán keresztül. Az apoptotikus sejtek felismerését és felvételét teszik lehetővé a külső membránba kerülő foszfatidil-szerin molekulák is, melyek kifordulásának indukciójában szintén a kaszpáz-8 és kaszpáz-3 játszik szerepet. Így gyulladásos folyamatok elindulása nélkül lehetséges az elhalt sejtek eltávolítása (Elmore, 2007). Korábbi kísérletek kimutatták, hogy a hipertrófiás zsírszövetek elsősorban a mitokondriális apoptózis úton aktivált apoptózissal halnak el (Bid függő) (Alkhoury és mtsai, 2010), de ehhez hozzájárulhat a metabolikusan aktivált makrofágok által termelt TNF α is (Kratz és mtsai, 2014).

4.2. Az apoptotikus sejtek eltakarítása (efferocitózis)

A folyamatosan zajló sejtelhalás következtében naponta több millió sejtet takarítanak el a professzionális és nem professzionális fagocita sejtek gyulladás és immunválasz kialakulása nélkül (Poon és mtsai, 2014). Az efferocitózis nem passzív folyamat, hanem gondosan megkomponált lépések sorozata, melynek célja, hogy eltakarítsa a sejttesteket és limitálja a potenciálisan károsító anyagok kibocsátását ezzel fenntartva az immunológiai toleranciát. Az efferocitózist négy fő lépésre oszthatjuk: az elhaló sejtek, „találj meg” szignáljainak kibocsátása, a fagociták felismerése és kapcsolódása az elhaló sejt „egyél meg” szignáljaihoz, az elhalt test bekebelezése, valamint a sejt degradációja és immunológiai feldolgozása (Green és mtsai, 2016).

A célsejtek érzékelése során az apoptotikus sejt kemotaktikus „találj meg” jelek felszabadításával képes a makrofágokat az elhalás helyszínére vonzani. Ezek a „találj meg” jelek lehetnek szolubilisak vagy kis membrán vezikulába csomagoltak. A nukleotidok, mint pl. az ATP és az UTP kulcsmolekulák a fagociták számára az apoptotikus sejtek megtalálásában (Elliott és mtsai, 2009). Bár nem, mint kemotaktikus szignálok, hanem azok jelátviteli folyamatának felerősítőjeként vesznek részt a kemotaxis aktiválásában, önmagukban és lebontási termékeiken keresztül (Kronlage és mtsai, 2010; Joós és mtsai, 2017). A nukleotidok kibocsátásához szükséges a pannexin 1 csatorna kaszpáz-3 általi aktiválódása az apoptotikus sejteken. Az apoptotikus sejtek lizofoszfátidil-kolin és a szfingozin-1-foszfát molekulák szekretálásával képesek monocitákat az apoptotikus sejtekhez vonzani (Lauber és mtsai, 2003; Hait és mtsai, 2006). Bizonyos molekulák, köztük az intercelluláris adhéziós molekula 3 (ICAM3) és a CX3C-kemokin-ligandum 1 proteolitikusan hasított formája (CX3CL1) az apoptotikus sejtek által kibocsátott mikropartikulumokhoz kapcsolódva szállítódnak és biztosítják a kemotaxist a makrofágok számára. Ilyen vezikulák által közvetített makrofág toborzás csak bizonyos sejtípusokra jellemző: például Burkitt-limfómára, vagy a germinális centrum apoptotikus B- sejtjeire (Truman és mtsai, 2008).

A fagociták számára kibocsátott attraktánsok mellett az apoptotikus sejtek kibocsátanak, „maradj távol” (stay away) szignálokat is a gyulladásos immunsejtek távoltartására. A laktoferrin, mint, „maradj távol” szignál megemelkedett expresszióját több sejtípusnál megfigyelték apoptózis indukcióját követően, ami megakadályozza a neutrofil granulociták kemotaxisát és aktivációját (Poon és mtsai, 2014).

A fagociták toborzását követően az elhalt sejtekhez kapcsolódást az, „egyél meg” szignálok biztosítják. Az apoptotikus sejtek jól meghatározott markerkészletet fejeznek ki a sejtfelszínükön (apoptotikus sejtekkel asszociálódó molekuláris mintázat – ACAMP) segítve a fagociták általi felismerést és megkötést. Az „egyél meg” jelek közül legjelentősebb a foszfátidil-szerin plazmamembrán külső felszínére történő expozíciója, mely a nekrozissal ellentétben aktív enzimatis kaszpáz-függő mechanizmussal valósul meg (Leventis és Grinstein, 2010). Az externalizált foszfátidilszerint több ismert fagocita-receptor közvetlenül is felismeri, így a T-sejt immunglobulin-mucin receptor (TIM4) (Miyanishi és mtsai, 2007), a BAI1 (Park és mtsai, 2007), vagy a stabilizin-2 (Park és mtsai, 2008). Más receptorok, például a Mer tirozin kináz (MerTk) (Scott és mtsai, 2001), a SCARF1 (Ramirez-Ortiz és mtsai, 2013), és az $\alpha\beta3 / \beta5$ integrin receptor, mely utóbbi CD36-tal (Savill és mtsai, 1992) vagy szöveti transzglutaminázzal (TG2) együtt (Tóth és mtsai, 2009) ismeri fel az apoptotikus sejteket,

hídképző molekulákat igényelnek a kötődéshez. A hídképző molekulák például milk fat-globulin-EGF 8-as faktor (MFG-E8), Gas6, trombospondin-1, protein S egyaránt kötődnek a fagociták és az apoptotikus sejtek molekuláihoz is. A foszfatidil-szerin megjelenése és felismerése feltétele a bekebelezésnek, de nem minden esetben elégséges, így más „egyél meg” jelek is segítik az efferocitózist. A kalreticulin felületi expozíciója szintén hasonló szerepet tölt be, melyet a fagociták az alacsony sűrűségű lipoprotein (LDL) -receptor-kapcsolódó fehérje néven is ismert CD91 receptoraikkal ismernek fel (Ogden és mtsai, 2001). Az oxidált LDL-szerű csoportok és a glikozilált felszíni fehérjék is szolgálhatnak, „egyél meg” jelekként, melyek a scavenger receptorokhoz és a lektinekhez kötődnek. Mivel átmenetileg bizonyos élő sejteken is megjelenhetnek foszfatidilszerin molekulák, az élő sejtek kifejeznek, „ne egyél meg” molekulákat is (CD31, a CD47 és a CD61), melyek gátolják a bekebelezést. Ezek az apoptotikus sejtekről hiányoznak (Martinez, 2017). A receptorok némelyike, például a Tim-4 vagy a CD14 (Devitt és mtsai, 2004), az elhaló sejtekkel történő összekapcsolódásban játszanak szerepet. Más receptorok, például a CD36 (Greenberg és mtsai, 2006), a Mer tirozin-kináz (Mertk) (Cohen és mtsai, 2002), a stabilin-2 (Park és mtsai, 2008), a BAI1 vagy az integrin $\beta 3$ és koreceptora, a TG2 (Tóth és mtsai, 2009), viszont két párhuzamos, evolúciósan konzervált jelátviteli útvonalat indítanak be. Ezen szignálok alacsony molekulatömegű GTP-áz, a Rac1 aktiválásán keresztül a citoszkeleton újraszerveződését váltják ki (Kinchin és mtsai, 2005). Kimutatták, hogy a különböző makrofág populációk különféle fagocita-receptorokat vagy hídképző molekulákat használnak az efferocitózishoz; a peritoneális makrofágok például sok Tim-4-et fejeznek ki, míg az ún. „tingible body” makrofágok MFG-E8-at termelnek (Miyamishi és mtsai, 2007, Miksa és mtsai, 2008).

Az elhalt sejtek bekebelezése során változások mennek végbe az membránszerveződésben és az aktin citoszkeleton szerkezetében is, így kialakulhat a „fagocitikus csésze”, majd a fagoszóma. Ezt a folyamatot a RhoA, Cdc42 és Rac kis GTP-ázok szabályozzák. A RhoA aktivációja gátolja, míg a Cdc42, és a Rac elősegítik a bekebelezést (Nakaya és mtsai, 2006). A folyamat során aktinszálak elágazásait a coroninok, míg a fragmentáció folyamatát a gelsolin és cofilin fehérjék segítik. Miután a membrán körbeveszi a célpontot és bezáródik, a partikulum disztális végénél létrehozza az új fagoszómát (Green és mtsai, 2016).

A fagoszómának érése során megváltozik a membrán összetétele és a tartalma, így alkalmassá válik a bekebelezett tartalom emésztésére. Az új fagoszóma különböző eredetű vezikulumokkal fuzionál, így hamar korai endoszómává alakul és belseje enyhén savassá változik. A membránfúziós eseményeket a Rab5 kis GTPáz szabályozza és toborozza az EEA1 (korai endoszóma-antigén 1) fehérjét, melynek citoplazmatikus oldali fixálásáért a foszfatidilinozitol-3-foszfát felelős

A korai endoszóma antigén elősegíti további a fagoszóma érésében résztvevő fehérjék felvételét, így a Rab7-et is, mely a késői endoszómák egyik markere. A számos endoszómával történő fúzió ellenére sem nő a korai fagoszóma mérete, mert leválnak róluk vezikulumok, melyek a transz-Golgi hálózathoz kapcsolódnak be. A fagoszóma-lumen savasodása az aktív V-ATP-ázok fokozatos felhalmozódásából adódik, mely képes protonokat juttatni a fagoszóma belsejébe citoszolikus ATP-t használva energiaforrásként. A Rab7 közvetíti a fagoszóma fúzióját a késői endoszómákkal. és új fehérjéket is toboroz a membránba, például az RILP (Rab-interacting lysosomal protein) amely kötődik a dinein-dinaktin komplexhez és a fagoszómát a mikrotubulusokhoz kapcsolja. Így képes a késői fagoszóma és a lizoszóma egymás irányába mozogni, majd a membránfúziót követően kialakul a fagolizoszóma (Rosales és Uribe-Querol, 2017). A fagolizoszómában történik a fagocitált partikulumok, a különböző makromolekulák lebontása és feldolgozása. Membránjuk összetételére jellemző a foszfoinozitol-3-foszfát feldúsulása és a mannóz-6-foszfát receptorok hiánya, valamint nagy mennyiségű V-ATP-ázainak köszönhetően a belső nagyon alacsony pH (pH 4.5).

A fagolizoszómában a számos hidrolitikus enzim - katepszinek, proteázok, lizozimek és lipázok mellett, melyek a makromolekulák degradációjáért felelnek, NADPH oxidáz is található, mely szuperoxidot ($O_2^{\cdot-}$) termel, károsítva a fagolizoszóma tartalmának makromolekuláit (Kinchen és Ravichandran, 2008). A megemésztett makromolekulák extra energiát biztosítanak, melyek szükségesek a további fagocitikus folyamatokhoz. Azonban túl sok energia képződése esetén a fagocita sejtek fokozzák a mitokondriális szétkapcsolódó fehérje (UCP2) kifejeződését, mely csökkenti a mitokondriális membránpotenciált és a reaktív oxigéngyökök kialakítását is. A további hatékony fagocitikus folyamatok biztosítása érdekében a peroxiszóma-proliferátor aktivált (PPAR) δ/γ és a máj X (LXR) α/β receptorok aktivációján keresztül az apoptotikus sejtek átprogramozzák a makrofágokat, nemcsak metabolizmusuk megváltoztatásával, hanem fagocitikus receptoraik kifejeződésének fokozásával is (Green és mtsai, 2016). Míg a legtöbb patogén célpont fagocitálása gyulladásos választ vált ki a makrofágokból, addig az apoptotikus sejtek azonnal gátolják a gyulladásos citokin gének

átíródását a makrofágokban (Szondy és mtsai, 2017). Majd mind a nukleáris receptorok aktiválódása, mind a szolubilis mediátorok felszabadítása hozzájárul a gyulladás nélküli válasz fenntartásához (Simon és mtsai, 2018).

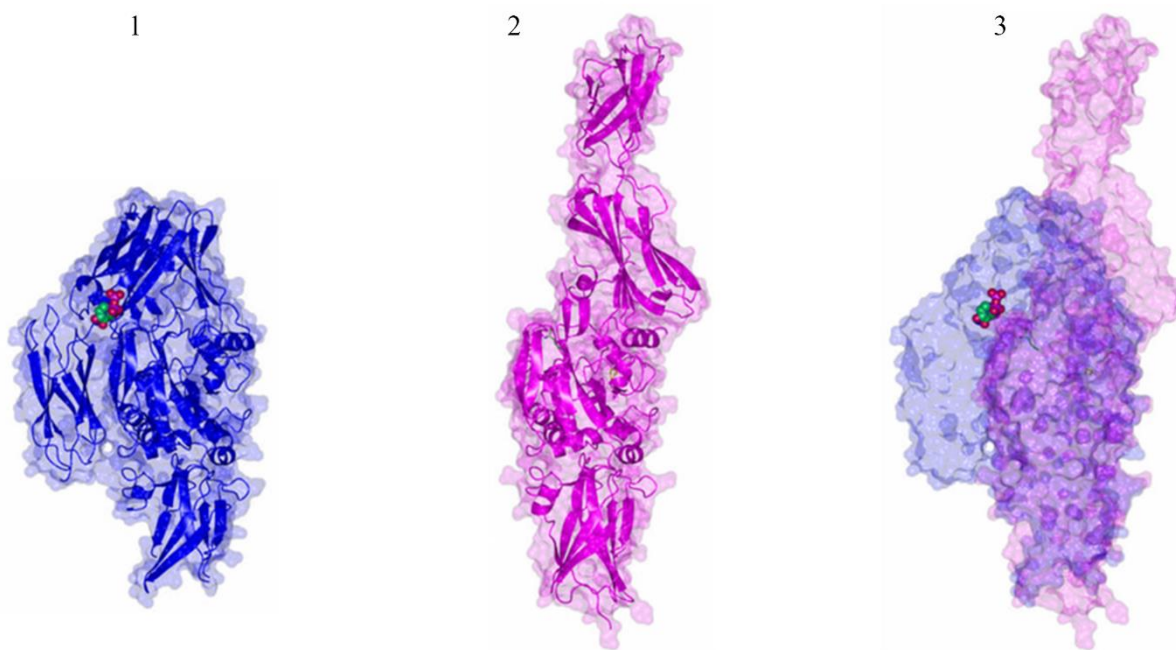
4.3. Az efferocitózis zavara és a betegségek kapcsolata

Az efferocitózis zavara egyes autoimmun kórképek tekintetében vált a leginkább ismertté. Bizonyos autoimmun folyamatok vonatkozásában állat és humán vonalon végzett kísérletek és tanulmányok is azt támasztják alá, hogy az adott kórállapot kialakulása és az efferocitózis zavara között szoros összefüggés van. A legtöbb knock out egértörzsben, melyben megfigyelhető az efferocitózis zavara, a szisztémás lupus erythematosushoz (SLE) tüneteinek hasonló autoimmun tünetek alakulnak ki (Hanayama és mtsai, 2004; Scott és mtsai, 2001; Botto, 1998; Szondy és mtsai, 2003; Lewis és Botto, 2006). A humán SLE kapcsán szintén igazolt az elhaló sejtek eltávolításának zavara (Muñoz és mtsai, 2010), továbbá bizonyítottan állhat a fagocitózis genetikailag meghatározott defektusa is a betegség manifesztációjának hátterében (Lewis és Botto, 2006). Az SLE-n kívül azonban számos más patológiás állapot is összefüggésben lehet az efferocitózis zavarával. A teljesség igénye nélkül néhány ezek közül: tüdő és légúti kórképek (COPD, asztma és a cisztikus fibrózis (Henson és Tuder, 2008), atheroszklerózis (Seimon és Tabas, 2009), neurodegeneratív betegségek, mint a Parkinson-, Alzheimer- és Huntington-kór (Mattson és mtsai, 2000), a 2-es típusú diabétesz és az elhízás (O'Brien és mtsai, 2002, Li és mtsai, 2009), valamint a krónikus fogágybetegség (parodontitisz). A zavart efferocitózis két okból is krónikus gyulladásához vezet: egyrészt az el nem takarított sejtek szekunder nekrotikussá alakulnak, és sejttartalmuk a szövetekbe kikerülve gyulladást indít, másrészt a zavart efferocitózis gyakran társul gyulladásos folyamatot gátló mechanizmus zavarával is (Szondy és mtsai, 2014).

4.4. A szöveti (2-es típusú) transzglutamináz (TG2)

A szöveti transzglutamináz egy változatos biológiai aktivitásokkal rendelkező, különleges enzim. A transzglutaminázok (Folk és Chung, 1985) tiol- és Ca^{2+} -függő acil-transzferázok családját alkotják, amelyek a peptidkötésben lévő glutamin oldalláncok γ -karboxamid csoportjai és különféle elsődleges aminok, például a lizin ϵ -aminocsoportja közötti kovalens kötés képződését katalizálják bizonyos fehérjékben. A reakció a fehérjék poszttranszlációs

módosítását eredményezi ϵ -(γ -glutamil) -lizin keresztkötések létrehozása és/vagy poliaminok és hiszton fehérjékbe történő kovalens beépítése révén. Ez idáig nyolc különböző enzimatikusan aktív transzglutaminázról számoltak be (Grenard és mtsai, 2001). A TG2 igen különlegesnek számít közöttük, hiszen transzglutamináz aktivitása mellett GTP-áz (Nakaoka és mtsai, 1994), protein diszulfid izomeráz (Hasegawa és mtsai, 2003), valamint protein kináz (Mishra és mtsai, 2007) enzimaktivitással is rendelkezik.



2. ábra A transzglutamináz 2 ismert konformációja. A felső ábrák a transzglutamináz 2 enzim zárt (1) és nyitott (2) konformációit, valamint a konformációk egyesülését (3) mutatják (Jeitner és mtsai, 2013).

A TG2 túlnyomórészt a citoplazmában található; a fehérje azonban számottevő mennyiségben van jelen a sejtmagban, a plazmamembránban és az extracelluláris mátrixban is (Fésüs és Piacentini, 2002). Fiziológias körülmények esetén a TG2 transzamidáló aktivitása látens, különféle patológias állapotokban viszont gyakran nyilvánul meg emelkedett Ca^{2+} -szinttel párosulva (Lorand és Graham, 2003). A GTP vagy a Ca^{2+} bekötődése gátolja a TG2 transzamidáz, illetve GTP-áz funkcióját (ebben a sorrendben), amelyek *in vivo* egymást kölcsönösen kizáró enzimaktivitások (Monsonago és mtsai, 1998). A kétezres évek elején számos megfigyelés hangsúlyozza a TG2 sejt–mátrix kölcsönhatásokban betöltött szerepét (Lorand és Graham, 2003). Habár a TG2-nek nincs vezető szekvenciája, és nincsenek sem hidrofób doménjei, sem az endoplazmatikus retikulumban vagy a Golgi-apparátusban végbemenő poszttranszlációs módosításai, mégis sokféle sejt felszínén és az extracelluláris

mátrixban is jelen van (Thomazy és Fésüs, 1989; Upchurch és mtsai, 1991). A sejten kívül a TG2 kölcsönhatásba lép a fő extracelluláris proteinnek számító fibronektinnel (Hang és mtsai, 2005), illetve különböző integrinekkal is; közvetlen nemkovalens kölcsönhatást alakít ki ugyanis az integrin β_1 és β_3 alegységeivel, valamint stabil hármas komplexeket képez az integrinekkal és a fibronektinnel (Akimov és mtsai, 2000).

Ugyanilyen hármas komplex képződik a makrofágok felszínén az integrin β_3 és az MFG-E8 molekulákkal is (Tóth és mtsai, 2009). A TG2 integrin receptorokhoz történő kapcsolódása a ligand kötődésétől függetlenül is indukálja az integrin klaszterekben történő rendeződését és módosíthatja az integrin jelátviteli útvonalat (Akimov és mtsai, 2000).

4.5. A TG2 kapcsolata az apopto-fagocitózis programmal

Fésüs, Falus és Thomázy vetették fel a 80-as évek végén, hogy a TG2 kapcsolódhat a sejtek apoptózis programjával, mivel a TG2 kifejeződését azokban a szövetekben találták különösen magasnak, amelyekről ismert volt, hogy gyors turnoverűek, és magasabb sejtelhalási ráta jellemző rájuk (Fésüs és mtsai, 1987). Mivel ekkor még szinte semmi sem volt ismert az apoptózis programról, feltételezték, hogy annak elindítója lehet. Valóban, egér timocitákban a fehérje megjelenése megelőzi a DNS degradációjával jellemezhető sejtmagi változásokat (Szondy és mtsai, 1997), és a TG2 indukciója számos *in vivo* apoptózis modellben kimutatható volt. Így a fehérje kifejeződése fokozódik a timociták különféle jelekkel indított apoptózisa során (Szondy és mtsai, 1997), az emlő szoptatást követő involúciója során, a sárgatest születést követő visszafejlődésekor (Szegezdi és mtsai, 2000) vagy az elhaló hepatocitákban is (Piacentini és mtsai, 1991).

A TG2 indukciója kimutatható az embrionális fejlődés során elhaló sejtekben is (Nagy és mtsai, 1997), vagy a HIV-fertőzött személyek elhaló T-limfocitaiban is (Amendola és mtsai, 1996). Mindezek a megfigyelések vizsgálatok egész sorát indították el, amelyekben a TG2 kettős szerepét figyelték meg az apoptózis szabályozása szempontjából. A TG2 a sejteken belül kalcium függő aktivációt követően fokozta, apoptózis programot, azáltal, hogy bizonyos fehérjéket keresztköött (pl. retinoblasztóma, RAP1GDS) (Fésüs és Szondy, 2005; Hsieh és mtsai, 2013), illetve felvetették, hogy egyik doménje BH3 aktivitással bír (Rodolfo és mtsai, 2004). Ugyanakkor úgy tűnik, hogy a sejtek felszínén az integrin β jelátvitel fokozásán keresztül fontos sejttúlélési szignálutat aktivál, és így mind az őssejtek (Song és mtsai, 2007), mind egyes daganatos sejtek túlélését segíti (Eckert, 2019). A TG2 sok sejtti történő expressziója, és az apoptózis programmal bemutatott kapcsolata miatt, nagy várakozás fogadta

a TG2 hiányos egerek fenotípusát. Nagy meglepetésre azonban a TG2 hiányos egér szépen fejlődött és semmilyen klasszikus apoptózis zavarra utaló tünetet nem mutatott (Boisvert és mtsai 2006). Munkacsoportunk megfigyelései szerint ez várható is volt, mivel egér timociták olyan szignálokra, amelyek *in vivo* elindítják mind a TG2 kifejeződését, mind az apoptózist, elhaltak *in vitro* is. Ugyanakkor *in vitro* a TG2 nem indukálódott bennük (Szegezdi és mtsai, 2000).

A TG2 null egereken munkacsoportunk által végzett vizsgálatok azonban kimutatták, hogy bár a TG2 egyértelműen nem szükséges az apoptotikus program elindulásához, az apoptotikus sejtek helyesen lezajló fagocitózisához azonban szükség van rá. Noha az apoptotikus sejtek részéről a TG2 hozzájárulhat a fagocitózishoz a foszfatidilszerin sejtfelszínre kihelyeződésének elősegítése (Sarang és mtsai, 2007), illetve a makrofágok számára kemotaktikus faktorként szolgáló S19 ribonukleáris fehérje kereszt kötése révén (Nishiura és mtsai, 1998), hiánya a makrofágokban okoz igazán lényeges funkcióveztést. Ez részben a TGF- β nevű immun szupresszív citokin aktivációban bekövetkező hibával hozható összefüggésbe (Szondy és mtsai, 2003), mivel a TGF- β az apoptotikus sejteket bekebelező makrofágokból szabadul fel (Fadok és mtsai, 1998), és előmozdítja az apoptotikus sejtek hosszútávú fagocitózist (Rose és mtsai, 1995). Laborunk eredményei közé sorolhatjuk annak bizonyítását is, hogy a TG2-re a makrofágok sejtfelszínén is szükség van, mégpedig az integrin $\beta 3$ receptorok koncentrációjának növeléséhez a „fagocitotikus csészében”. Az $\alpha \beta 3$ -receptorok kulcsfontosságú szerepet játszanak az apoptotikus sejtek felvételének elindításában (Akakura és mtsai, 2004), és a szükséges koncentráció hiányában az integrin $\beta 3$ nem képes megfelelően aktiválni sem a Rac jelátviteli útvonalat, sem az aktin citoszeletális újrarendeződését. Ebben a folyamatban a TG2 mind az integrin $\beta 3$, mind az MFG-E8 molekulához kötődik (Tóth és mtsai, 2009). A szövetintegritás megőrzésének érdekében a TG2 részt vesz az elhaló és a fagocitózist végző sejtek közötti párbeszédben. A laboratóriumunkban TG2 null egereken végzett korábbi *in vivo* tanulmányok eredményei alapján azt feltételezzük, hogy a TG2 fő szerepe *in vivo* az apoptotikus-fagocitotikus folyamat vonatkozásában annak biztosítása, hogy ha egyszer az apoptózis elkezdődik, akkor gyulladás keltése és látható szöveti sérülés nélkül menjen végbe. A TG2 ezt számtalan módon éri el. Sok sejt típusban például az apoptózis sebességét fokozza, vagy közvetlenül az apoptotikus sejtekben (Rodolfo és mtsai, 2004; Sarang és mtsai, 2007), vagy közvetve a makrofágokban kifejtve hatását, ahol az apoptotikus sejteket bekebelező makrofágok által felszabadított TGF- β -t aktiválja (Kojima és mtsai, 1993). A TGF- β ezt követően apoptózist vált ki a TGF- β -ra érzékeny sejtekben, például a timocitákban (Szondy és

mtsai, 2003). Emellett részt vesz a TG2 *in vivo* indukálásában mind a makrofágokban, mind az apoptotikus sejtekben, ezáltal egyfajta önszabályozó hurkot képez a TG2 expressziójának szabályozásában (Szondy és mtsai, 2003).

A fehérjék TG2-függő keresztükötése és a védőréteggént szolgáló fehérjeburkok képződése megakadályozza az ártalmas sejttartalmak kiszabadulását az apoptotikus sejtekből (Piredda és mtsai, 1997), míg a TG2 a makrofágokban gyorsítja a fagocitózist (Szondy és mtsai, 2003). Az apoptotikus sejtekben a TG2 ráadásul elősegíti a kemoattraktánsok keletkezését (Nishiura és mtsai, 1998), aminek köszönhetően a makrofágok könnyebben odatalálnak az apoptózis helyére, illetve a foszfatidilszerin kihelyeződését (Sarang és mtsai, 2007), ami megkönnyíti számukra az apoptotikus sejtek felismerését. A TGF- β ezen kívül a gyulladáskeltő citokinek képződésének makrofágok általi helyes downregulációjához is szükséges (Fadok és mtsai, 1998; Falasca és mtsai, 2005). Ezek a mechanizmusok biztosítják, hogy az összes nemkívánatos sejt mielőbb elpusztításra és eltávolításra kerüljön, elejét véve a másodlagos nekrozisnak és a gyulladásnak. Abban az esetben, ha mégis nekrozis következne be, a TG2 segít fenntartani a szövet stabilitását és támogatja a javító folyamatokat (Nardacci és mtsai, 2003). A TG2-/- állatokban mindezek a gyulladásgátló folyamatok zavartak, ami rövidtávon a gyulladást okozó sejteknek az apoptózis helyszínén való megjelenését, hosszú távon pedig autoimmunitás kialakulását eredményezik (Szondy és mtsai, 2003). A TG2 hiánya hajlamosít krónikus gyulladásos megbetegedésekre, pl. atherosclerosisra is (Boisvert és mtsai, 2006).

4.6. A TG2 kifejeződésének szabályozása egér timocitákban

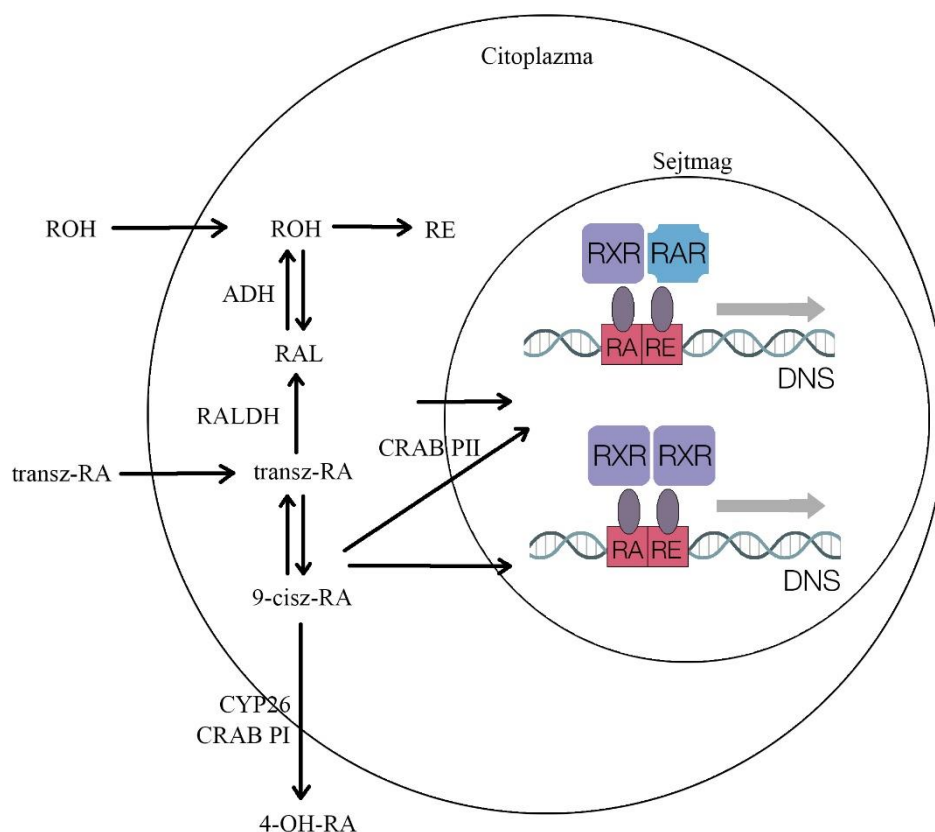
A TG2 *in vivo* expressziója az elhaló timocitákban transzkripció szinten szabályozott, amelyet az bizonyít, hogy olyan egerekben, amelyek a béta-galaktozidáz riporter gént hordozzák a TG2 promóter kontrollja alatt, a béta-galaktozidáz kifejeződése erős korrelációt mutat az endogén TG2 expresszióval (Szegezdi és mtsai, 2000). Míg *in vivo* a TG2 erősen indukálódik az elhaló timocitákban, a TG2 indukciója *in vitro* már nem figyelhető meg, ha ugyanazzal a stimulussal váltják ki a sejthalált (Szegezdi és mtsai, 2000). Ez arra utal, hogy a szöveti környezetből érkező szignálok járulnak hozzá az enzim *in vivo* indukciójához az apoptózis alatt álló timocitákban. Az első TG2 expressziót szabályozó szignálra véletlenül bukkantak rá, amikor kiderült, hogy a TG2 TG2-függően indukálódik (Szondy és mtsai, 2003). Mivel a TG2-ről ismert volt, hogy a látens TGF- β -t aktiválja (Upchurch és mtsai, 1991), és a TGF- β rendelkezik válaszadó elemmel a TG2 promóterében (Ritter és Davies, 1998), felmerült a TGF- β esetleges közvetítő szerepe, amit végül TGF- β neutralizáló antitest injektálásával

bizonyítottak. A TGF- β azonban csak az egyik apoptotikus sejteket felvevő makrofágok által termelt szignál molekula volt, amelyről kiderült, hogy hozzájárul a TG2 timocitákbeli indukciójához. Csoportunk kimutatta, hogy mind a retinoidok (Garabuczi és mtsai, 2013), mind az adenzin (Sándor és mtsai, 2017) efferoitózis függő módon keletkeznek a makrofágokban, és hozzájárulnak a TG2 *in vivo* indukciójához. Már korábban is retinoidok voltak a legjobban ismert aktivátorai a TG2 kifejeződésének egy három részből álló válaszadó elemen keresztül, amely a TG2 promóterében a transzkripció start helytől 1.7 kb távolságra felfelé helyezkedik el (Nagy és mtsai, 1996). A makrofágok által kibocsájtott, a timocita TG2 kifejeződését együttesen szabályozó szignálok meghatározása tette lehetővé, hogy megtalálták és karakterizálták a TG2 kifejeződésének szabályozásban résztvevő enhanszereket is. Ezek az enhanszerek a transzkripció kezdőhelyétől +30 kb, -7,9 kb, -13 kb, -20 kb és -28 kb távolságra helyezkednek el és egy szuperenhanszert alkotnak. Mindegyikük köti a retinoid receptorokat, de a többi szignál érzékelésében és a szignálokra adott transzkripció válasz összehangolásában a -13 kb és -20 kb távolságban elhelyezkedő enhanszer vesz részt. Így mind a TG2 promóterének, mind az enhanszereken történő TG2 expresszió szabályozásnak kulcsszignáljai a retinoidok, amelyek az A vitamin származékai (Sándor és mtsai, 2016).

4.7. Az A vitamin anyagcséréje

Az A-vitamin homeosztázist a retinoidok szállításában, termelődésében és lebontásában résztvevő enzimek és fehérjék hálózata szabályozza. A táplálékkal felvett A vitamin (retinol) retinolkötő fehérjéhez kapcsolódva szállítódik a vérben, és főleg a máj Ito sejtjeiben raktározódik (Moise és mtsai, 2007). Az A-vitamin élettani funkcióit főként saját metabolitjai, a retinaldehid és a retinsav (RA) közvetítik. Ezek végrehajtásában a konverziókat katalizáló enzimek sokasága segíti (Duester, 2000). A retinol retinállá (retinaldehiddé), majd annak retinsavvá történő átalakulása két oxidációs lépésben valósul meg (Theodosiou és mtsai, 2010). A retinol reverzibilisen retinaldehiddé, majd a retinaldehid irreverzibilisen retinsavvá alakul (Napoli, 1999). A retinol két enzimsalád, az alkohol-dehidrogenázok (ADH-k) és a retinol-dehidrogenázok (RDH-k) vagy rövidláncú dehidrogenáz/reduktázok (SDR-ek) segítségével oxidálódik reverzibilisen retinaldehiddé. Ebben a lépésben két RDH (az RDH2 és az RDH10) játszik kiemelt szerepet a különböző szövetekben (Wu és mtsai, 2004). A termelt retinaldehid számos jelentős élettani szereppel bír. A látást például a fotonaktiváció hatására a rodopszinhoz kötött 11-cisz-retinál mediálja. Újabban a retinaldehidet a peroxiszóma-proliferátor aktivált receptor γ (PPAR γ) antagonistájának is tekintik (Ziouzenkova és mtsai, 2007). A retinsavat a

hepatocitákban bizonyos enzimek, például a citokróm-P450 26A1 (CYP26A1) még hidrofilebb termékekké módosíthatják tovább (Abu-Abed és mtsai, 2001), ami egyben kiürítésüket is elősegíti. A retinsavak a sejtben celluláris retinsavkötő fehérjékhez (CRABP) kapcsolódva találhatók. Ezek közül a II-es a retinsavak magi transzportját segíti elő, míg az I-es a lebontás felé irányítja a metabolizmusát, így keletkezésükön vagy receptoraikon kívül ezen két fehérje kifejeződésének aránya is szabályozza, hogy az egyes sejtek válaszolnak-e retinsav szignálra (Dong és mtsai, 1999).



3. ábra A retinsavak az A-vitamin aktív metabolitjai, melyek hatásukat magreceptorokon keresztül fejtik ki a sejtben. (ROH – retinol, RE - retinil-észter, ADH - alkohol-dehidrogenáz, RAL – retinaldehid, RALDH - retinaldehid-dehidrogenáz, transz-RA – transz retinsav, CRAB PII - celluláris retinsav kötő fehérje II, CRAB PI - celluláris retinsav kötő fehérje I, 9-cisz-RA - 9cisz retinsav, CYP26 - citokróm P-450 fehérjék, RXR - retinoid X receptor, RAR - retinsav receptor, RARE - retinsav receptor válaszadó elem)

A retinsavak fiziológias hatásait a sejtmagban elhelyezkedő, a magi receptor családba tartozó retinoid receptorokon retinsav (RAR) és retinoid X (RXR) receptorokon keresztül fejtik ki. (Mangelsdorf és mtsai, 1995). Ezek a receptorok ligandfüggő transzkripciós faktorok, amelyek a célgének specifikus válaszadó elemeihez (RARE, RXRE) kötődnek, és RAR/RXR heterodimerek vagy RXR homodimerek formájában transzaktiválják az adott célgént. Az RXR emellett számos más lipidérzékelő magreceptorral univerzális heterodimerizációs partnere is, pl. a makrofág biológiában meghatározó szerepet játszó LXR és PPAR receptoroké is (Willy és mtsai, 1995; Kliewer és mtsai 1992).

A csupa-transz retinsav (ATRA) és a 9 cisz retinsav (9cRA) ekvipotensek a RAR aktivációját illetően, míg az ATRA 50-szer kevésbé hatásos aktivátora az RXR-nek, mint a 9cRA (Heyman és mtsai, 1992). Bár az ATRA nem kötődik az RXR receptorokhoz, feltételezik, hogy az ATRA a sejtekben 9cRA-vá alakulhat, nem enzim katalizálta módon (Shih és mtsai, 1997). Bár sokáig elfogadott volt, hogy az RXR természetes aktivátora a 9cRA, a megjelenő új technikák, amelyek lehetővé tették, hogy szövetekben is detektálják a retinsavakat, nem támasztották alá ezt a feltételezést, mivel egyetlen szövetben sem tudtak 9cRA-t kimutatni (Krežel és mtsai, 2019). Ezt alátámasztandóan, bár retinsavak keletkezését munkacsoportunk is ki tudta mutatni egér apoptózisba lépő timocitákban egy olyan RARE LacZ transzgén egérben, amelyben a bejuttatott LacZ riporter gén kifejeződése egy adott sejtben a retinsav szignáltól és a retinsav receptorok kifejeződésétől függ (Garabuczi és mtsai, 2013), mi sem találtuk a klasszikus ATRA és 9cRA retinsavakat. Ehelyett egy retinaldehid-dehidrogenáz-függő módon termelődő, a molekulatömege alapján feltehetően dihidroretinol-származék csúcsot detektáltunk apoptotizáló tímuszban (Sarang és mtsai, 2014).

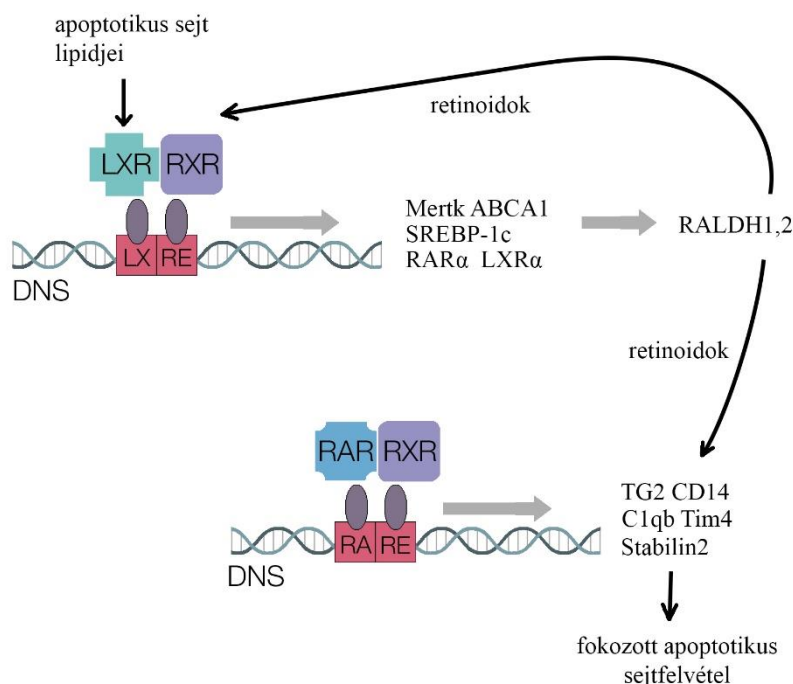
4.8. Retinol-szaturáz (RetSat) enzim

A retinol-szaturáz (RetSat) egy NADH/NADPH- vagy FADH-függő oxidoreduktáz, amely nagy mennyiségben termelődik a májban, a zsírszövetben és a vesében (Moise és mtsai, 2004). A RetSat kifejeződésének fő transzkripciós szabályozói a PPAR α és az ún. „forkhead box O1” (FoxO1) a májban (Shin és mtsai, 2012), illetve a PPAR γ a zsírszövetben, ahol a RetSat expresszióját a prekursor sejtek adipocitákká történő differenciálódása indítja be (Schupp és mtsai, 2009). A retinol-szaturáz sztereospecifikusan telítette teszi a csupa-transz-retinol C13-C14 kettős kötését, így az (13R)-csupa-transz-13,14-dihidroretinollá alakul át. Ez a vegyület megtalálható a retinol-szaturáz expresszáló sejtekben és a retinil-palmitáttal etetett egerek

májában (Moise és mtsai, 2008) is. Az csupa-transz-13,14-dihidroretinol (dihidroretinol) *in vivo* csupa-transz-13,14-dihidroretinsavvá oxidálódik, amely a retinsav receptor (RAR) szelektív agonistája, valamint 9-cisz-13,14-dihidroretinsavvá, amely az RXR receptor szelektív agonistája (Moise és mtsai, 2009). Egyesek feltételezik, hogy a 9-cisz-13,14-dihidroretinsav lehet az RXR régóta keresett fiziológiás ligandja (Krężel és mtsai, 2019). Egyes kutatások azonban arra is rámutattak, hogy a RetSat más biológiai funkciókkal is rendelkezhet, mivel hiányának nem minden következménye állítható vissza dihidroretinol adásával (Schupp és mtsai, 2009; Heidenreich és mtsai, 2017).

4.9. Retinoidok és az apoptotikus sejtek fagocitózisa

Bár az apoptotikus sejteket felvevő makrofágok által termelt retinoidok részt vesznek a TG2 kifejeződésének szabályozásában az apoptotikus sejtekben, a keletkező retinoidoknak nem ez az egyedüli feladata. Laboratóriumunkban korábban folyt kísérletek kimutatták, hogy retinoidok és retinoid receptor agonisták hatására *in vitro* a makrofágok apoptotikus sejtet eltávolító képessége jelentősen megnövekszik. Ez a hatás úgy valósul meg, hogy a retinoidok az RAR α aktiválásán keresztül fagocitózishoz kapcsolt fehérjék (köztük a TG2 is) kifejeződését fokozzák. Az RXR receptorokat is aktiváló retinoidok hatásosabbnak bizonyultak valószínűleg azért, mert az egyes fagocitózis gének átíródását fokozó PPAR és LXR receptorok működét is képesek voltak aktiválni az RXR ligálásán keresztül (Sarang és mtsai, 2014). Az apoptotikus sejtek fagocitózisa során a retinoidok termelődése magában a makrofágokban történik (Garbuczi és mtsai, 2013) azáltal, hogy az apoptotikus sejtek lipidjei által aktivált lipidérzékelő magi receptorok indukálják mind a retinsav képződésben résztvevő retinol szaturáz és RALDH enzimek kifejeződését, mind pedig az RAR α kifejeződését (Garabuczi és mtsai, 2013; Sarang és mtsai, 2014). A keletkező retinoidok pedig részben az RAR α részben a fagocitózist fokozó RXR heterodimer transzkripciós faktorok aktiválásán keresztül fokozzák számos fagocitózis kapcsolt fehérje kifejeződését.



4. ábra Az LXR indukciója fokozza a makrofágok apoptotikus sejteket fagocitáló képességét. Az apoptotikus sejt lipidjeinek hatására aktiválódó LXR célgénjeiek, mint például a Mer tirozin-kináz, az ABCA1, SREBPc1 és a RARα. fokozott átírását indítja el. Magában az LXR gén promóterében is találhatóak LXR kötőhelyek, így a ligációt követően az LXR önmaga transzkripcióját is szabályozhatja egy autoregulációs mechanizmus révén. Az SREBPc1 közvetve hozzájárul a retinoidok termelésének fokozódásához a RALDH1 kifejeződésének serkentésével. A termelt retinoid az LXR és RAR receptokra hatva a MerTK, valamint a TG2, Tim4, stabilin-2, CD14 és C1qb fagocitikus gének felszabályozásán keresztül fokozza a fagocitózist. (LXR – máj X-receptor, RXR - retinoid X receptor, máj X válaszadó elem, MerTK - Mer tirozin kináz receptor, ABCA 1 – ATP-kötő kazettatranszporter, SREBP-1c - szterol szabályozó elemet kötő fehérje 1c, RARα - retinsav receptor α, RALDH - retinaldehid-dehidrogenáz, TG2 - szöveti transzglutamináz 2, C1qb - complement komponens 1q, Tim4 - T-sejt immunoglobulin mucin protein 4).

4.10. Az obezitás- egy komplex immun-metabolikus kórkép

Az elhízás olyan anyagcserezavar, melynek során különböző hatásokra (genetikai, idegrendszeri, endokrin vagy környezeti) az energiaháztartás egyensúlya a táplálékfelvétel növelésének irányába tolódik el. A szervezetben a normális mértéket meghaladó zsírfelhalmozódás történik. Túlsúlyosnak a 25-30 kg/m², elhízottnak a 30 kg/m² feletti

testtömeg-indexű egyéneket tekintjük. Az elhízás társulhat olyan gyakori betegségekhez, mint az inzulin-rezisztencia, 2-es típusú diabetes, kardiovaszkuláris betegedések, tumoros megbetegedések és hozzájárul a metabolikus szindróma kialakulásához is (Goossens és mtsai, 2017). Az elhízásnak szerteágazó patobiokémiai hatását figyelhetjük meg az egész szervezetre nézve. A megnövekedett táplálékbevitel hatására a zsírsejtek száma megnövekszik, majd ezek a sejtek egyre nagyobb méretűvé – hipertrófiássá - válnak a növekvő mennyiségű zsír tárolása következtében (Hausman és mtsai, 2001). A zsírszövet az energia tárolása mellett endokrin szervként is funkcionál, így különböző bioaktív anyagokat szekretál. Specifikus hormonjai az adipokinek, melyek hatását a máj, az izomszövet és az agy is képes érzékelni befolyásolva ezáltal a szervezet energiaegyensúlyát, és metabolikus működését (Kershaw és Flier, 2004). Azonban elhízásban a hipertrófiás zsírsejtek adipokintermelése megváltozik, a gyulladáskeltő és gyulladásgátló adipokinek aránya felborul: kevesebb adiponektint, termelnek, valamint több rezisztint és leptint szekretálnak (Jung és Choi, 2014). A nagymértékű hasi zsírtömeg növekedését a vaszkularizációs folyamatok nem tudják követni, így a szövetben hipoxia alakul ki. Hipoxia hatására a zsírsejtek Bid-mediált apoptózissal halnak el, és a felszabadított kemoattraktánsok - MCP-1, szolubilis IL-6 receptor (Kanda és mtsai, 2006; Kraakman és mtsai, 2015) - hatására makrofágok vándorolnak be a szövetbe (Alkhouri és mtsai, 2010). Az elhaló zsírsejtek bevándorló makrofágok általi bekebelezése, eltakarítása kulcsfontosságú az elhízáshoz kapcsolódó patológiás folyamatok aktiválásában (Strissel és mtsai, 2007). A zsírsejtek elhalása, olyan meghatározó a kövérséghez kapcsolódó patológiás folyamatok elindításában, hogy Bid hiányos egerekben, ahol a hipertrófiás zsírsejtek elhalása később következik be, annak ellenére, hogy az elhízás mértéke azonos, a patológiás folyamatok is csak a zsírsejtek elhalásának arányában detektálhatók (Alkhouri és mtsai, 2010). Ugyanakkor a kaszpáz-8 zsírsejt specifikus aktiválása gyorsítja a folyamatokat (Pajvani és mtsai, 2005). A makrofágok szerepét pedig az bizonyítja, hogy ha bevándorlásukat megakadályozzuk a zsírszövetbe például a szolubilis IL-6 jelátvitelének gátlásával, akkor e patológiás folyamatok is blokkolódnak (Kraakman és mtsai, 2015).

Az elhízott egyének zsírszövetében a makrofágok aránya elérheti akár az 50%-ot is (Weisberg és mtsai, 2003). A folyamatok eredményeképpen kialakul egy krónikus alacsony-szintű gyulladás, amit nemcsak a zsírsejtek gyulladásos faktorai, de a makrofágok fenotípusa is elősegít (Wellen és Hotamisligil, 2003). Ugyanis a nem elhízott, normál zsírszövetben található makrofágokkal ellentétben - melyek gátolják a gyulladásos folyamatokat - az elhízottak zsírszövetében metabolikusan aktivált makrofágok találhatók. Ezen típusa a makrofágoknak

metabolikus betegségekben alakul ki magas glükóz, inzulin és palmitát szint mellett, és gyulladásos citokineket (IL1 β , TNF α , MCP-1) termel, hozzájárulva a zsírszövetben meglévő gyulladásos környezethez (Coats és mtsai, 2017).

A metabolikusan aktivált makrofágok egyrészt internalizálják az adipociták által leadott zsírsavakat és zsírtartalmú vezikulumokat (Flaherty és mtsai, 2019), ezáltal csökkentve a zsírterhelésüket, másrészt eltakarítják az apoptotikus sejteket. A makrofágok reagálnak a zsírszöveti faktorokra, melyek lizoszóma-biogenezist indítanak el a sejtekben a megnövekedett zsírtartalom metabolizálása céljából (Xu és mtsai, 2013). Aktiválódnak lizoszóma keletkezéséhez és működéséhez szükséges gének úgymint a Lamp2 és Laptm5, strukturális gének, hidrolázok savas lipázok, foszfataázok és proteázok (Lipa, Acp5 és Ctsk) génjei, savas pH kialakításához szükséges ionpumpák és egyéb transzportfehérjék génjei (Coats és mtsai, 2017). A zsírtömeg elsődlegesen a hasi és a bőr alatti zsírszövetben raktározódik, viszont az elhízás előrehaladtával a hipertrófiás zsírsejtek egyre nagyobb arányban halnak el, így átrendeződnek a zsírraktárak (Ouchi és mtsai, 2011). Az átrendeződés során a lipidlerakódások jelennek meg a vázizomban és a májban is, ami további funkcionális károsodásokat okozhat. A gyulladásos citokinek és a rezisztin egyidejű megemelkedett termelődése gátolja az inzulin jelpályáját, és ez inzulinrezisztencia kialakulásához vezet. A fokozódó inzulin rezisztenciát eleinte kompenzálja a megemelkedett inzulin szint, később azonban kettes típusú cukorbetegség alakul ki.

4.11. Zsírsejtek fagocitózisa elhízásban

Mivel az adipociták lényegesen nagyobb méretűek, mint a makrofágok, és nagy mennyiségű lipidet tartalmaznak, nem a hagyományos fagocitikus úton történik a bekebelezésük és eltakarításuk. A zsírszövetbe bevándorolt makrofágok a zsírsejtek köré szerveződnek és egy korona-szerű struktúrát (crown-like structure) hoznak léte (Cinti és mtsai, 2005), amelyek valójában a szövettani kétdimenziós leképezései annak, hogy egy elhalt zsírsejt felvételében egyidejűleg számos makrofág vesz részt, amely a zsírsejtet körbevéve, azzal közvetlen kontaktusba lép. A hipertrofikus adipociták triglicerideket és a nem-észterezett zsírsavakat szabadítanak fel, amelyeket a makrofágok képesek internalizálni. A makrofágokból nagy mennyiségű lipid felvétele után habos sejtek alakulnak ki, melyeknek telítődik a metabolikus rendszerük és nem képesek megfelelően betölteni a funkciójukat hozzájárulva ezzel a metabolikus szindróma kialakulásához (Coats és mtsai, 2017). A makrofágok képesek az

extracelluláris mátrixhoz szorosan kötődő nagyobb méretű partikulumok extracelluláris savas lítikus kompartmentben történő emésztésére. Ez a folyamat az exofágia, melyet atherosclerosisban figyeltek meg az aggregált LDL makrofágok általi degradációja vizsgálva (Haka és mtsai, 2009). Elhízásban hasonló mechanizmusok játszanak szerepet a zsírsejtek eltakarításában. A folyamatot lizoszómális exocitózisnak nevezték el, mert szövettani képeken az látszott, hogy a makrofág zsírsejt határon felhalmozódnak a LAMP1 molekulát kifejező lizoszómák, melyek membránja mintha fuzionálna a makrofág sejtmembránnal és egyidejűleg a zsírsejt membránnal egy külső zsíremésztésben résztvevő teret hozva ezzel létre (Haka és mtsai, 2016). Az extracelluláris katabolikus folyamatok során a makrofágok lizoszómális hidrolázokat használnak az apoptotikus adipociták emésztéséhez. A hidrolázok savas környezetet igényelnek, ennek megfelelően az alacsony pH-jú régiók meg is jelennek az extracelluláris kompartmentben, de ezek időszakosak, átmenetiek és percek alatt eloszlanak. A savas környezetet V-ATP-ázok biztosítják protonokat pumpálva a citoplazmából a lizoszómális szinapszisba (Haka és mtsai, 2016). A lizoszómális exocitózis sebességének szabályozásában a TLR2 vesz részt (Coats és mtsai, 2017), melynek ligandjai tri- és diacilglicerol peptidek is (Oliveira-Nascimento és mtsai, 2012), amelyek felszabadulhatnak elhaló zsírsejtekből. Ezen kísérletek közlői feltételezték, hogy a zsírsejt teljes emésztése lizoszómális exocitózis útján történik meg. Eredményeimben majd bemutatom, hogy mi egy kicsit ártérteleztük ezt a lizoszómális exocitózis folyamatot.

5. Célkitűzések

- I. Mivel a rendelkezésre álló adatok arra utalnak, hogy a zsírsejtek elhalása és azok eltakarítása központi szerepet játszik a metabolikus szindrómában megfigyelhető patológias változások elindításában, kísérleteinkben hosszabb távon arra keressük a választ, hogy sérül-e az apoptotikus zsírsejtek felvétele, ha magas a zsírtartalmuk. E kérdés megválaszolásához első lépésként azt vizsgáltuk, hogy az elhalt sejt eltakarítás genetikus zavara (a TG2 hiánya) fokozhatja-e a metabolikus szindróma kialakulását magas zsírdiétán tartott egerekben.

- II. Munkacsoportunk korábbi eredményei alapján felmerült, hogy az elhaló sejteket eltakarító makrofágokban az efferocitózis fokozódása a retinol szaturáz útvonalon keresztül keletkező retinoidok által valósul meg. Ezért kísérleteim második részében azt vizsgáltam retinol szaturáz hiányos egerekben, amelyek egyébként fokozottan halmoznak fel zsírt normál diétán tartva is, hogy a retinol szaturáz enzim hiánya befolyásolja-e az efferocitózis folyamatát.

6. Anyagok és módszerek

6.1. Reagensok és vegyszerek

A reagensok nagy részét a Sigma-Aldrich (Budapest, Magyarország) cégtől szereztük be. Amennyiben nem, azt külön jeleztem.

6.2. Kísérleti állatok

Az etetési kísérlet 16 hete során nyolchetes a hím, TG2-hiányos (De Laurenzi és Melino, 2001) egereket és vad típusú testvéreiket külön ketrecekben tartottunk (ad libitum etetés víz és táplálék biztosításával). Az első két hétben az állatokat magas szukróz/alacsony zsírtartalmú étrenden tartottuk (HSD; 10% kcal% zsír; 17% kcal% szukróz; Research Diets Inc. D12450H). Ezt a bevezető időszakot követően az egereket két csoportra osztottuk: a HSD csoport a HSD-étrenden maradt, míg a HFD csoportot magas szukróz/magas zsírtartalmú étrendre (HFD; 45% kcal% zsír, 17% kcal% szukróz; Research Diets Inc. D12451) tettük át a következő 14 hetes periódusra. A kontroll csoport egereit mindvégig normál diétán tartottuk (ND; 13% kcal% zsír; 4.6% kcal% szukróz; Special Diets Services, VRF1 (P)). A csontvelő-transzplantáción átesett (bone marrow transplanted, BMT) egereket a kísérlet teljes ideje alatt specifikus, patogénmentes környezetben (autoklávozott szűrőtetős ketrecekben) tartottuk, és a transzplantációt követő négy héten át ivóvizükbe antibiotikumokat (amoxicillin/klavulánsav, 500 mg/ 125 mg/l ivóvíz) adagoltunk. A transzplantációt követő 2 hétben normál étrendben részesültek, majd 16 hétig a HFD étrend szerint etettük őket. Az in vivo LXR liganddal való kezeléshez az egereket a csontvelő-transzplantáció után 20 mg/kg/nap GW3965-tel (AbMole, M1929) kiegészített HFD étrenden tartottuk a fent leírtak szerint. Az állatokat 12 órás periódusokban váltakozó módon világos/sötét helyen tartottuk, és ad libitum etettük és itattuk őket. Az egerek testtömegét és a bevitt táplálék mennyiségét hetente regisztráltuk. Szövetminták gyűjtéséhez az egereket a 17. héten izoflurán túladozolásával kiiktattuk a Debreceni Egyetemen alkalmazott szabályzatnak megfelelően. A retinol-szaturáz enzimhez kapcsolódó kísérleteket 4 hetes, 2–4 hónapos vagy 1 éves C57BL/6J RetSat^{+/+} egereken, illetve RetSat^{-/-} testvéreiken végeztük (Moise és mtsai, 2010). A tímuszban történő génexpresszió, illetve a tímuszsejtek összetételének meghatározásához 4 hetes egereket intraperitoneálisan vagy 0,3 mg dimetil-szulfoxidban (DMSO) oldott dexametazon-acetáttal

(DEX), vagy csak a vivőanyaggal oltottunk be, vagy pedig 5 Gy sugárzásnak tettük ki őket. A tímuszban végzett DEX kezelés hosszú távú hatásainak meghatározásához 4 hetes egereket 6 napon keresztül naponta egyszer 1 mg/kg DEX-szel oltottuk, majd 0,5 Gy sugárzásnak tettük ki őket a Lauber és társai által leírt módon (Lauber és mtsai, 2013). Az egereket a Kísérleti Állatházban, specifikus patogénmentes körülmények között tartottuk. Az összes kísérletet a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatkísérleti Bizottságának (DEMÁB) jóváhagyásával végeztük

6.3. Csontvelő-transzplantáció

A recipiens csontvelő eltávolításához a recipiens BoyJ, TG2-null és TG2+/+ vad típusú egereket (7 hetes hímekeket) Theratron 780C kobaltágyú alkalmazásával 11 Gy sugárzásnak tettük ki. Az irradiációra kerülő állatokat átlátszó, lapos, kör alakú ketrecbe („mouse pie cage”) helyeztük, amelyben akár 11 (éber) egér is elfért. A besugárzást követően a BoyJ, TG2-null és TG2+/+ vad típusú egerek combcsontjából, sípcsontjából és felkarcsontjából (steril RPMI 1640 médiummal) kimosott, izolált csontvelői sejteket retro-orbitalis injekcióval beadtuk a recipiens egerekbe (20×10^6 csontvelői (BM) sejt/egér). Ez a BMT CD45 kongenikus kísérleti modell lehetővé tette, hogy megvizsgáljuk a donornak, a kompetitornak és a gazdaszervezetnek a vérképzésre és a donor sejtek repopulációjának hatékonyságára gyakorolt hatását (CD45.1 és CD45.2 allél variánst hordozó kongenikus egerek összehasonlítása). Mindehhez később, általában 8–12 héttel a csontvelő-transzplantációt követően áramlási citometriával meghatároztuk a CD45.1 és CD45.2 hozzájárulásának mértékét. Röviden összefoglalva, az egerek farkának végéből egy apró darabot levágtunk, és a kiserkenő egy csepp vért 0,5 ml foszfát-pufferolt sóoldatba (PBS) cseppentettük, amely 1% foetalis borjú szérumot és 10 U/ml heparin puffert tartalmazott (a mintákat jégén hűtöttük). A sejteket közvetlenül ezután 2 µl egér anti-egér CD45.2-FITC (104-es klón) és 2 µl patkány anti-egér GR1-PE (RB6-8C5-ös klón) antitestekkel (BD Pharmingen, San Jose, CA, USA) festettük, majd jégben 30 percig inkubáltuk. Kétszeri, jéghideg PBS-foetalis borjú szérum-heparin puffer keverékkel történő mosás után a sejteket 0,5–1 ml BD FACS lizáló oldatban (BD Pharmingen, San Jose, CA, USA) szuszpendáltuk, szobahőmérsékleten 5 percig inkubáltuk, majd centrifugáltuk ($400 \times g$, 5 perc, 4 °C). A kétszeresen festett mintákat FACS (BD FACS Calibur) készülékben vizsgáltuk, és meghatároztuk a donor sejtek arányát. A repopuláció mértéke granulocita frakcióra kikapuzva 95% fölött volt.

6.4. A csontvelői makrofágok izolálása és metabolikus aktivációja

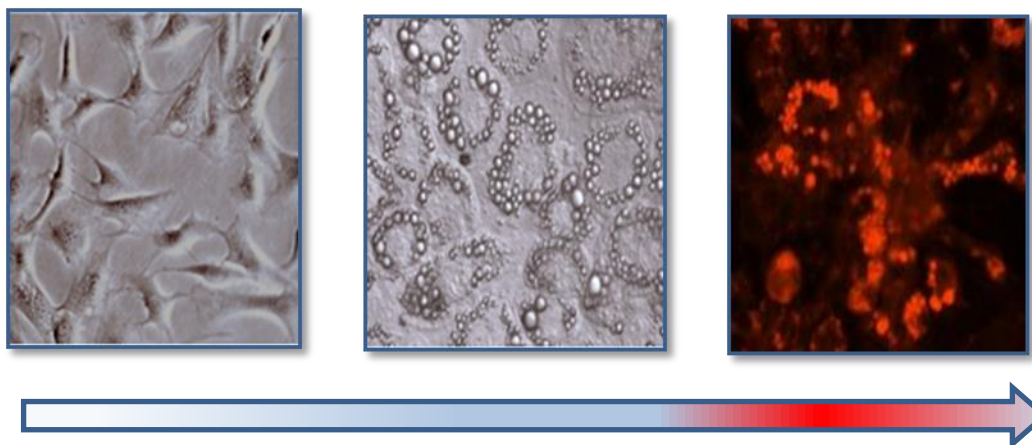
A csontvelői sejteket 3–6 hónapos hím TG2-null egerek és vad típusú társaik combcsontjából izoláltuk. A csontvelői makrofágokat 7 napig 10% FBS-t, 2 mM L-glutamint, 1 mM nátrium-piruvátot, 50 μ M 2-merkaptotetanolt és 100 U/ml penicillin/100 μ g/ml streptomycint, valamint 10% L929 fibroblaszt kondicionált médiumot tartalmazó DMEM oldatban differenciáltattuk. A metabolikus aktivációhoz a differenciáltatott makrofágokat 30 mM D-glükóz, 10 nM inzulin és 0,4 mM nátrium-palmitát keverékével kezeltük 24 (16) órán keresztül. A nátrium-palmitát oldat készítéséhez 200 mM törzsoldatot 70%-os etanolban hígítottunk, majd 10% zsírsavmentes, alacsony endotoxintartalmú BSA-hoz (pH 7,4-re állítva) adtuk, így 5 mM palmitát-BSA törzsoldatot kaptunk, amelyet egy 0,22 μ m-es, alacsony fehérjekötő kapacitással rendelkező szűrőn átszűrtünk. Az eljárás során a kontroll kezelésekhez BSA/etanolt használtunk. Néhány kísérletben a 24 órás metabolikus aktiválás során a csontvelői makrofágokat 2 μ M végkoncentrációban PP2-vel, a fehérje tirozin-kinázok Src családját reverzibilisen, ATP-kompetitív módon gátló inhibitorral, vagy pedig 0,5 mg/ml RGD peptiddel (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) kezeltük.

6.5. 3T3 sejtek tenyésztése és differenciáltatása

3T3-L1 egér preadipocitákat (ATCC, Manassas, VA, USA) szubkonfluens kultúrában tartottunk 4.5 g/l D-glükózt, 2 mM L-glutamint és 10% (v/v) magzati borjú szérumot tartalmazó DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) médiumban. A differenciáltatáshoz 2 nappal a konfluencia elérése után 2 μ g/ml inzulin, 0,5 mM izobutilmetilxantin, és 0,25 μ M dexametazon adtunk a sejtekhez. A sejteket három napig ebben a médiumban, majd további két napig 1 μ g/ml inzulinnal kiegészített médiumban tartottuk. Tíz nap differenciáltatás után az FBS-t elhagytuk a médiumból és a sejteket még egy napig tenyésztettük, hogy apoptózist indítsunk el (Niesler és mtsai, 2000). A kiindulási sejthalál-index nagyon alacsony volt, ám a szérum eltávolítása után az annexin-V-pozitív sejtek százalékos aránya jelentősen megnőtt (24 óra elteltével ≥ 90).

6.6. A zsírsejtekre jellemző morfológiai megjelenés vizsgálata a differenciált 3T3 sejteken

3T3-L1 eredetű differenciált adipociták lipidtartalmát 30 percig Nílus Red festékkel 1 µg/ml festettük. A képeket EVOS® FL Cell Imaging digitális mikroszkóp segítségével elemeztük.



5. ábra A fibroblaszt-szerű preadipocita differenciációt követő a zsírsejt-szerű morfológia ellenőrzése fénymikroszkóppal Nílus vörös festéssel

6.7. A zsírsejtekre jellemzően fokozott expressziót mutató gének (UCP-2, PPAR-γ, leptin és rezisztin) vizsgálata a differenciált 3T3 sejtekben

A kvantitatív PCR technika segítségével a vizsgált gének cDNS mennyiségének meghatározásából következtetni lehet az adott gén expressziós szintjére.

A QPCR összeállítása során 96 lyukú tenyésztőedényt használtunk

QPCR mix:

Nukleáz mentes víz: 2,04µl

MgCl₂ (25 mM): 1,2µl

Puffer (10x): 1µl

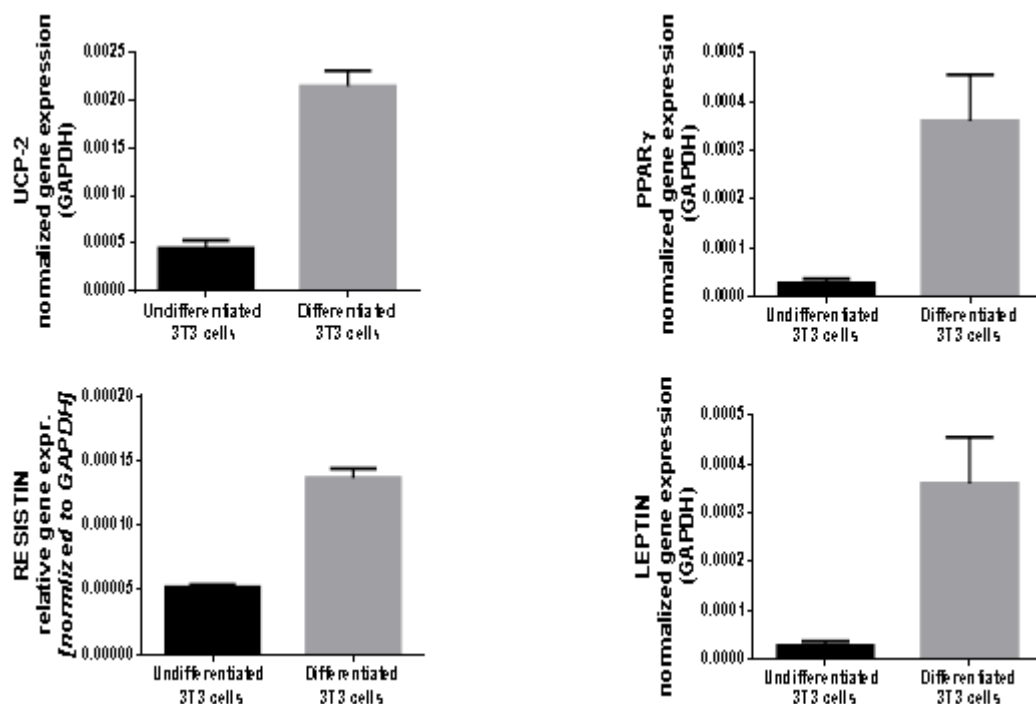
dNTP (2,5 mM): 0,5µl

Random primer (40X oligomix): 0,2µl

Taq Polimeráz (5 U/µM): 0,062µl

Összesen: 5µl / reakció (tényésztőlyuk)

Ezenfelül minden reakció 5 µl cDNS mintát tartalmazott, tehát a reakció végtérfogata 10 µl. A vizsgált gének mRNS tartalmát 3 technikai párhozamos alkalmazásával határoztuk meg. A mérni kívánt gének expresszióját a GAPDH háztartási génre normalizáltuk. Az eredmények, összehasonlító CT módszerrel elemeztük.



6. ábra Adipocita specifikus gének kifejeződése 3T3 fibroblasztok differenciáltságának a végén. (A mérést 3T3 fibroblaszt sejtek differenciációjának ellenőrzése céljából végeztük el.)

6.8. Inszulin-rezisztencia teszt, intraperitoneális glükóztolerancia teszt (IPGTT) és az inzulin meghatározása

A 15. héten inzulin-rezisztencia tesztet, a 16. héten pedig IPGTT-t végeztünk. Hat órás éheztetést követően 0,75 IU/ttkg inzulin (ACTRAPID Penfill 100 IU/ml) (Novo Nordisk, Bagsværd, Dánia) vagy 2 g/ttkg glükózt injektáltunk intraperitoneálisan. A vércukorszintet az inzulin vagy glükóz beadását követő meghatározott időpontokban DCont Trend glükóz (vércukor) mérő készülékkel (DCont, Budapest, Magyarország) határoztuk meg. A plazma inzulinszintjeit egér inzulin 80-INSMS-E01 ELISA kittel (ALPCO, Cambridge, UK) mértük meg a gyártó utasításai alapján.

6.9. Szövetminták gyűjtése

Az etetési időszak befejeződésekor az állatokat izofluránnal túlaltattuk, és megmértük testtömegüket, testhosszúságukat, májuk tömegét, valamint gonádjaik fehér zsírszövetének (gWAT) tömegét. A vérből, a májból és a gWAT-ból további elemzésre mintát vettünk. A vérmintát hagytuk megalvadni, majd a plazma kinyerésére 12 000 rpm-en, 15 percig centrifugáltuk. Szövettani elemzés céljából a zsírszövetet és a májmintákat 4% paraformaldehidben fixáltuk; a génexpresszió és a máj trigliceridszintjének meghatározásához a mintákat az extrakció előtt folyékony nitrogénben lefagyasztottuk és $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ra eltároltuk.

6.10. Adipociták és zsírszöveti makrofágok (adipose tissue macrophage, ATM) izolálása

A gWAT szövetmintákat elmetsettük, majd mostuk és szállító pufferbe helyeztük őket (DMEM, 1% Penicillin–Streptomycin oldattal és 1% borjú szérum albuminnal (BSA) kiegészítve). A szövetet feldaraboltuk, azután 30–60 percig $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on 20 g/L BSA-val és 0,5 g/l 1-es típusú kollagenázzal (C6885) kiegészített emésztőoldatban (HEPES puffer (pH 7,4; H3375) emésztettük, végül (100 μm -es) nejlon szűrőn átszűrtük. Centrifugálást követően az adipocitákat összegyűjtöttük és RNS-izolálása előtt $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ra eltároltuk. A vörösvérsejtek hemolízissel (ACK Lysing Buffer) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) történő eltávolítása után a sztróma vaszkuláris sejtfrakcióját festő pufferben (PBS, 0,5% BSA-val és 2 mM EDTA-val kiegészítve) szuszpendáltuk. Az ATM-eket a sztróma vaszkuláris sejtfrakciójából MACS technológia (F4/80-alapú pozitív szelekció; (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Németország) segítségével izoláltuk a gyártó utasításai alapján.

6.11. A máj trigliceridszintjei

A triglicerid koncentrációkat elszappanosított, neutralizált (egy éjszaka $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on etanolos kálium-hidroxidban emésztett) májkivonatban mértük meg enzimatis glicerol assay (Free Glycerol Reagent, Glycerol Standard Solution) segítségével a gyártó utasításai alapján.

6.12. Hisztológia és immunhisztokémia

A májmintákat 4%-os semleges formaldehid pufferben fixáltuk és paraffinba ágyztuk. A paraffinmetszeteket hematoxilin-eozin festéssel megfestettük. A szövetmetszeteket Leica DMRB/E fénymikroszkóppal elemeztük (Leica, Heerbrugg, Svájc). A paraffinba való beágyazást követően a gWAT szövetmintákból 6 µm vastagságú szeleteket vágunk. A szeleteket üveg tárgylemezre helyeztük, eltávolítottuk belőlük a paraffint, majd szobahőmérsékleten, 50 percig 10%-os normál kecske szérumban (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) tároltuk őket. A metszeteket először a F4/80-as makrofág marker ellen patkányban előállított antitesttel inkubáltuk (1:1000 hígítás) (Hycult Biotech, Uden, Hollandia), majd Alexa Fluor 555-tel konjugált kecske anti-patkány IgG-t tartalmazó oldatba tettük őket (1:1000 hígítás) (Molecular Probes, Eugene, OR, USA). Zsírszövet-metszeteinkben az Apoptag fluoreszcein kitben elérhető, fluoreszceinnel jelölt anti-digoxigenin antitest erős aspecifikus kötődését figyeltük meg a mintáinkkal. Ezt az aspecifikus kötődés a gWAT szövetek szerkezetének, sejttállományának feltérképezésére használtuk fel. Az immunfestett metszeteket DAPI-t tartalmazó Vectashield Antifade Mounting Mediummal (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) kezeltük. Az adipociták és a sejtmagok számát ImageJ szoftverrel, míg arövidítés CLS-ek számát manuálisan határoztuk meg.

6.13. RNS-izolálás és valós idejű kvantitatív PCR (RT-qPCR)

A minták totál RNS-ének izolálásához TRIzol reagenst (UD-Genomed, Debrecen, Magyarország) használtunk. A cDNS-szintetizáláshoz a nagy kapacitású High-Capacity cDNA Archive Kitet (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) használtuk a gyártó utasításait követve. A génexpresszió szintjeit qRT-PCR-rel határoztuk meg, FAM-MGB-vel jelölt Taq-Man próbák (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) segítségével, Roche Light Cycler 480 platformon, valós idejű PCR alkalmazásával. A mintákból triplikátumokat készítettünk. Az expressziós értékeket GAPDH háztartási génre, vagy β-aktin mRNS-éhez normalizáltuk. Az mRNS relatív mennyiségét összehasonlító CT módszerrel számoltuk ki.

6.14. Time-lapse mikroszkópos képkészítés

A 3T3-L1-ből származó adipocitákat Nile red festékkel festettük a lipidcseppek azonosításához, míg a makrofágokat Hoechst 33342-vel (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), illetve 10 μ M 5-karboxifluorescein-diacetáttal (CFDA) festettük, hogy láthatóvá tegyük a sejtmagjukat, illetve a sejtplazmájukat. A vad típusú vagy TG2-null makrofágokat az apoptotikus adipociták tetejére rétegeztük 5:1 arányban. A ko-kultúrát hőmérséklet-, páratartalom- és CO₂-szabályozással ellátott, motorizált Olympus IX-81 inverz mikroszkópba helyeztük (Olympus America, Center Valley, PA, USA), amely egy hűtött Hamamatsu ORCA-R2 (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu City, Japan) nagy felbontású monokróm CDD kamerával és egy DP21-CU 2-megapixeles digitális színes kamerával (Olympus America, Center Valley, PA, USA) is fel volt szerelve. A sejteket 5 órán keresztül vizsgáltuk és minden 5. percben készítettünk egy képet. Az adatokból Xcellence szoftver (Olympus America, Center Valley, PA, USA) segítségével videófájlt hoztunk létre. A szérum megvonásával apoptózisra kényszerített adipociták lipidjeit Nile red festéssel (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) jelöltük.

6.15. Western blot

Az Mme kiírni csontvelői makrofágokat PBS-sel mostuk, majd lízis-pufferrel [50 mM Tris (T5941) pH 6,8, 2% SDS, 5% glicerol, 2 mM DTT, 2,5 mM EDTA, 2,5 mM EGTA (kiegészített proteáz és foszfatáz inhibitor koktéllal disszociáltuk őket). A mintákat 10 percig SDS-mintapufferben forraltuk 100 °C-on. A mintákat 12% SDS-PAGE segítségével szeparáltuk, majd PVDF membránra helyeztük őket (Bio-Rad, Budapest, Magyarország). A membránt 1 órán keresztül, szobahőmérsékleten, 5% BSA-t tartalmazó TBST pufferrel blokkoltuk [10 mM Tris, pH 8,0; 0,15 M NaCl (S7653); 0,05% Tween 20 (P1379)], majd anti-foszfo(Tyr416)- Src, c-Src (Cells Signaling Technology, Danvers, MA, USA) és β -aktin (5441) elsődleges antitestekkel 4 °C-on, egy éjszakán át reagáltattuk. β -aktint használtuk, mint (loading control) feltöltési kontroll. TBST pufferrel történő mosás után a blotokat 1 órán keresztül, szobahőmérsékleten, HRP-konjugált másodlagos antitestekkel inkubáltuk. A fehérjéket kemilumineszcencia segítségével detektáltuk (Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate) (WBKLS0500). A sávok pixelsűrűségét ImageJ szoftverrel határoztuk meg.

6.16. Frissen izolált timociták áramlási citometriával történő elemzése

A timocitákat az egerek többféle kezelését követő meghatározott időpontokban izoláltuk, a mintákat kétszer átmostuk, majd jéghideg PBS-ben felszuszpendáltuk és vagy fikoeritrinnel (PE) jelölt anti-CD4, illetve Cy5-konjugált anti-CD8 (PharMingen, San Diego, CA, USA) antitestekkel, vagy fluoreszcein-izotiocianáttal (FITC) jelölt annexin-V-tel kötő pufferben megfestettük őket. A sejtekből származó fluoreszcencia elemzését FACSCalibur (Beckton Dickinson) készülékkel végeztük.

6.17. A timociták apoptózisa in vitro

Az izolált timocitákat (105 sejt/ml) 5% foetalis borjú szérumot (FBS), 2 mM glutamint, 1 mM nátrium-piruvátot és 5×10^{-5} M merkaptotetanolt tartalmazó RPMI 1640 médiumban tenyésztettük 37 °C-on, 5% CO₂ jelenlétében. Apoptózist 0,1 µM DEX hozzáadásával váltottunk ki. A sejthalál mértékét 6 óra múlva az elhalt sejtek annexin V-FITC jelölésével határoztuk meg. A sejtekből származó fluoreszcencia elemzését FACSCalibur (Beckton Dickinson) készülékkel végeztük.

6.18. Retinoidok mérése folyadékkromatográffal kapcsolt tömegspektrométer (HPLC/MS/MS) segítségével

Négyhetes RetSat-null egereket intraperitoneálisan vagy csak dimetil-szulfoxidban (DMSO), vagy N,N-dietil-amino-benzaldehidben (DEAB) (0,24 mg/g testtömeg) oldott 0,3 mg dexametazon-acetáttal (DEX), vagy pedig vivőanyaggal oltottunk be. A tímuszokat 24 óra múlva sötét helyiségben eltávolítottuk, folyékony nitrogénben gyorsfagyasztottuk, majd -70 °C-on eltároltuk. A retinsavak koncentrációját az egerek tímuszában a saját HPLC-MS-MS módszerünkkel határoztuk meg (Rühl és mtsai, 2006). A meghatározásokhoz a tímusz mintákból 100 mg-ot háromszoros mennyiségű izopropanolban hígítottunk, majd a szöveteket olló segítségével feldaraboltuk és 10 másodpercig vortexeltük. A mintákat ezután 5 percre ultrahangos vízfürdőbe tettük, 6 percig rázattuk, majd +4 °C-on, 13 000 rpm-en Heraeus BIOFUGE Fresco (Kendro Laboratory Products, East Coast, Southern, USA) készülékben centrifugáltuk. A centrifugálást követően a felülúszókat 30 °C-on, Eppendorf 5301 (Eppendorf, Németország) koncentrátorban beszáritottuk. A beszáritott extraktumokat 60 µL metanolban felszuszpendáltuk, vortexeltük, rázattuk, ammónium-acetát 40 µL, 60 mM-os vizes oldatában

hígítottuk, automata mintaadagolóba tettük, majd HPLC-MS-MS készülékben elemeztük. Célkitűzéseink között szerepelt továbbá új dihidro-retinsav-származékok kimutatása is, ezért MS-MS készülékünket egyedi ionvizsgálati (single ion recording, SIR) üzemmódba állítottuk át 303 m/z (tömeg/töltés) arányú jelek detektálására, a relatív intenzitás követésével.

6.19. Csontvelői (Bone-Marrow-Derived, BMDM), peritoneális, vagy tioglikolát által kiváltott makrofágok képződése, tenyésztése és kezelése

A csontvelői progenitorokat 2–4 hónapos egerek combcsontjából izoláltuk steril fiziológiás sóoldattal történő mosást alkalmazva. A sejteket 5 napig a makrofág kolóniastimuláló faktor (M-CSF) forrásaként szolgáló 10%-os, L929 sejtekből származó kondicionált oldattal, valamint 2 mM glutaminnal, 100 U/ml penicillinnel és 100 mg/ml streptomycinnel kiegészített DMEM médiumban, 37 °C-on, 5% CO₂ mellett differenciáltattuk. A le nem tapadt sejteket minden második nap lemostuk. A differenciáltatás végén, a teljes mRNS-expresszió meghatározására mind a vad típusú, mind a RetSat-null egerekből származó BMDM-eket összegyűjtöttük, és ugyanezt minden egyes nap megtettük a differenciáltatásuk közben is, kezelés nélkül vagy csupa-transz-13,14-dihidroretinol (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Németország) jelenlétében, hogy qRT-PCR analízissel meghatározhassuk különböző génjeik expressziójának mértékét. A szöveti rezidens peritoneális makrofágokat RPMI 1640 médiummal mostuk ki a hasüregből. A tioglikolát által aktivált peritoneális makrofág-képződéshez az egereket 4 ml 4%-os tioglikolát oldattal (PBS-ben) kezeltük, majd a makrofágokat négy nappal később peritoneális mosással begyűjtöttük. A peritoneális makrofágokat ezután 10% magzati borjú szérumot (fetal calf serum, FCS) tartalmazó RPMI 1640 médiumban 24-lyukú lemezekre osztottuk szét (1 × 10⁶ sejt/ml). A csontvelői eredetű vagy a szöveti rezidens peritoneális makrofágokat az ábramagyarázatokon látható módon számos vegyülettel kezeltük, majd fagocitotikus kapacitásukat, illetve mRNS-expressziójukat is meghatároztuk.

6.20. Apoptotikus sejtek in vitro fagocitózisa

A csontvelői, illetve peritoneális makrofágokat 24 órán keresztül 10 μM 5(6)-karboxifluoreszcein-diacetáttal (CFDA-SE) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) festettük. Az apoptotikus timociták előállításához a tímuszt 4 hetes C57BL/6 egerekből gyűjtöttük, majd a timocitákat izoláltuk és 24 óráig (10⁷ sejt/ml) 2 mM glutamint, 100 U/ml penicillint,

100 mg/ml streptomycint és 2,5 μ M Deep Red festéket (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) tartalmazó, szérummentes RPMI 1640 médiumban tenyésztettük. Az annexin-V-tel jelölt apoptotikus timociták százalékos aránya $\geq 80\%$ -nak adódott. A festett apoptotikus timocitákat 5:1 (apoptotikus sejtek: makrofágok) arányban a makrofágokhoz adtuk és 1 óráig inkubáltuk. Ezt követően az apoptotikus sejteket lemostuk, majd a makrofágokat tripszines kezeléssel felszedtük. A hosszú távú fagocitózis assay-hez a makrofágokat először 5 órára festetlen apoptotikus sejtekhez, majd újabb 1 órára festett apoptotikus sejtekhez adtuk. A sejteket vagy FACSCalibur készülékkel, vagy pedig konfokális mikroszkópban vizsgáltuk.

6.21. Konfokális mikroszkópia

A vad típusú (WT) és RetSat^{-/-} egerekből származó peritoneális és csontvelői makrofágokat 8 kamrás tárgylemezen (3×105 /lyuk) (Ibidi, Gräfelfing, Németország) osztottuk szét. A fagocitózis esszét a fent leírt módon végrehajtottuk. Ezt követően a makrofágokat lemostuk és 1% paraformaldehidben fixáltuk. A számításokat és a statisztikai elemzéseket a mikroszkópos képek alapján végeztük el. A konfokális fluoreszcens képeket Zeiss LSM 880 inverz mikroszkóppal készítettük, a különböző fluoreszcencia markereknek megfelelő excitációs és emissziós filtereket használva (objektív: C-Apochromat 40x/1.2 W Korr; 488 nm excitáció 493–600 nm emissziós tartománnyal; 633 nm excitáció 638–755 nm emissziós tartománnyal). A pixelek méretezése és a mintavételezés a hullámhossznak megfelelően és a Nyquist-teória alapján történt. Nagy felbontású, ún. „tile scan” automatikus fókuszbeállítással működő rendszert használtunk. A további képelemzést Zeiss Zen és ImageJ szoftverekkel végeztük a bekebelezett apoptotikus sejtek számának meghatározására.

A zsírsejtekkel történt kísérletek esetén az 1 μ m vastagságú optikai szeleteket egyesével, Olympus FV3000 konfokális mikroszkópban vizsgáltuk. A szkennelést 40 $\times$ nagyítású olajimmerziós lencsékkel (NA 1.3) végeztük. A konfokális beállítások (lézrerősség, konfokális apertúra és elektronikus erősítés) mindvégig azonosak voltak, és ügyeltünk arra, hogy az F4/80-as makrofág marker immunfestéséből származó „pöttyöknek” megfelelő pixelek ne legyenek telítettek. A felvételeket Adobe Photoshop CS3 programmal dolgoztuk fel és ImageJ szoftverrel elemeztük.

6.22. mRNS-szekvenálás

Annak érdekében, hogy adatokat gyűjthessünk a vad típusú és RetSat-null csontvelői makrofágok globális transzkriptómjáról, nagy áteresztőképességű mRNS-szekvenciaanalízist végeztünk Illumina szekvenáló platformon. A teljes RNS-minta minőségét Agilent BioAnalyzer segítségével, Eukaryotic Total RNA Nano Kit felhasználásával ellenőriztük a gyártó által megadott eljárás szerint (Agilent, Santa Clara, CA, USA). Könyvtárkészítéshez $a > 7$ RNS integritásértékkel (RIN) rendelkező mintákat válogattuk be. Az RNS-Seq könyvtárakat totál RNS-ből készítettük TruSeq RNA mintaelőkészítő kit (Illumina) felhasználásával a gyártó által megadott eljárás szerint. Röviden, a poly-A RNS-t oligo-dT-konjugált mágnesgyöngyökkel megkötöttük, majd az eluált mRNS-t 94 °C-on fragmentáltuk. Az ún. „first-strand” cDNS-t random primert használó reverz transzkripció során hoztuk létre, majd egy második („second-strand”) szintézist követően kettősszálú cDNS-t készítettünk. A végek kijavítása, az A-farok kialakítása és az adapter szekvenciák ligálása után az adapterekkel ligált fragmenteket PCR-rel dúsítottuk és amplifikáltuk, végül pedig könyvtárakat hoztunk létre szekvenáláshoz. A szekvenálásokat Illumina HiSeq2500 készülékkel végeztük ún. „single-end” 50 bp szekvenálást alkalmazva. A 117 különbözőképpen expresszált gén génontológiai (GO) dúsításának elemzését STRING (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes v10) adatbázis segítségével végeztük, lefedve a fehérjék közötti fizikai interakciókat és funkcionális kapcsolatokat is (JensenLab, <https://string-db.org/>).

6.23. Antinukleáris antitestek kimutatása indirekt immunfluoreszcencia assay segítségével

Az antinukleáris antitesteket HEp-2 sejteken detektáltuk indirekt immunfluoreszcencia kit segítségével (Euroimmun GmbH, Lübeck, Németország), a gyártó utasításait követve, leszámítva azt az egyetlen módosítást, hogy az eredeti konjugáló oldatot Alexa Fluor 488-cal (A-11001, Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA, 1:400 hígítás) jelölt kecske anti-egér IgG (H+L) antitestre cseréltük. Az egyes lyukak fluoreszcencia mintázatát és intenzitását vizuálisan, LED fényforrással felszerelt fluoreszcens mikroszkóppal (Eurostar II Plus) tanulmányoztuk. A fluoreszcencia intenzitását egy szemi-kvantitatív skálán rögzítettük (negatív, 1+, 2+, 3+, 4+ pozitív).

6.24. Anti-dsDNA antitest ELISA

A mintákat anti-dsDNA antitestek kimutatása céljából is megvizsgáltuk, méghozzá az immunometrikus direkt ELISA tesz kit segítségével (ORG 604) (Orgentec Diagnostika GmbH, Mainz, Németország). Az egér autoantitestek kimutatásához az eredeti konjugátumot peroxidázzal konjugált juh anti-egér IgG antitesttel (1:10000 hígítás) helyettesítettük. A lemezen zajló kémiai reakciók leállítása után ETI-MAX 3000 ELISA processor készülékkel, 450 nm-en leolvastuk az optikai denzitásokat (OD).

6.25. Kaszpáz-3 immunhisztokémia

Egy éves vad típusú vagy RetSat^{-/-} egerek lépét eltávolítottuk, majd 4% foszfát-pufferben oldott formaldehidben fixáltuk 1 napig. A mintákat a paraffinba történő beágyazást megelőzően, a standard eljárásnak megfelelően kiszárítottuk. Miután a paraffin megszilárdult, a tömböket mikrotóm segítségével 3–4 µm vastagságú szeletekre vágtuk. A paraffin eltávolítása és az azt követő hematoxin-eozin festés (HE) után immunhisztokémiai festést végeztünk hasított kaszpáz-3-ellenes elsődleges monoklonális antitesttel (Cell Signaling Technology Inc, Global Headquarters USA) 1:300 hígítási arányban, valamint torna-peroxidázzal (HRP) jelölt polimer anti-nyúl másodlagos antitesttel (Dako, Glostrup, Dánia) is. Az immunfestés intenzitását és eloszlását fénymikroszkópban értékeltük (Leica DM2500 mikroszkóp, DFC 420-as kamera és Leica Application Suite V3 szoftver; Leica).

6.26. IgM-et tartalmazó immunkomplexek kimutatása

Egy éves RetSat^{+/+} vagy RetSat^{-/-} egerek veséjét eltávolítottuk és vízszintesen keresztbevágtuk, majd a szövetdarabokat izopentánnal, folyékony nitrogénben gyorsfagyasztottuk. A fagyasztott mintákból 4 µm-es metszeteket készítettünk, hideg acetonban fixáltuk, majd PBS-ben kihígított, FITC-jelölt anti-egér IgM antitestekkel inkubáltuk őket (1:40). PBS-sel való öblítést követően a tárgylemezeket pufferelt glicerolba helyeztük. Az immunfestést fénymikroszkópban értékeltük (Leica DM2500 mikroszkóp, DFC 420-as kamera és Leica Application Suite V3 szoftver; Leica).

6.27. A szérumban lévő karbamid koncentrációjának meghatározása

A mérés során a Rahmatullah és Boyde által leírt módszert alkalmaztuk (Rahmatullah és mtsai, 1980).

6.28. Statisztikai analízis

Az adatokat minden esetben $\pm$ SD középértékként tüntettük fel. A statisztikai elemzést minden esetben GraphPad Prism 6.01 program segítségével végeztük, és a $p < 0,05$ értéket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak, amelyet csillaggal jelöltünk (*). Két csoport közötti különbség megállapításához kétszélű, két mintás nem egyenlő variációjú Student t-próbát, $n > 2$ számú csoportok esetén pedig egyszempontos varianciaanalízist (ANOVA) alkalmaztunk (Tukey-féle többszörös összehasonlítással). Két csoport közötti különbség megállapításához kétszélű, két mintás nem egyenlő variációjú Student t-próbát, $n > 2$ számú csoportok esetén pedig egyszempontos varianciaanalízist (ANOVA) alkalmaztunk (Tukey-féle többszörös összehasonlítással). A két független faktorral elkülönített adatsorok esetében két szempontos ANOVA-elemzést használtunk.

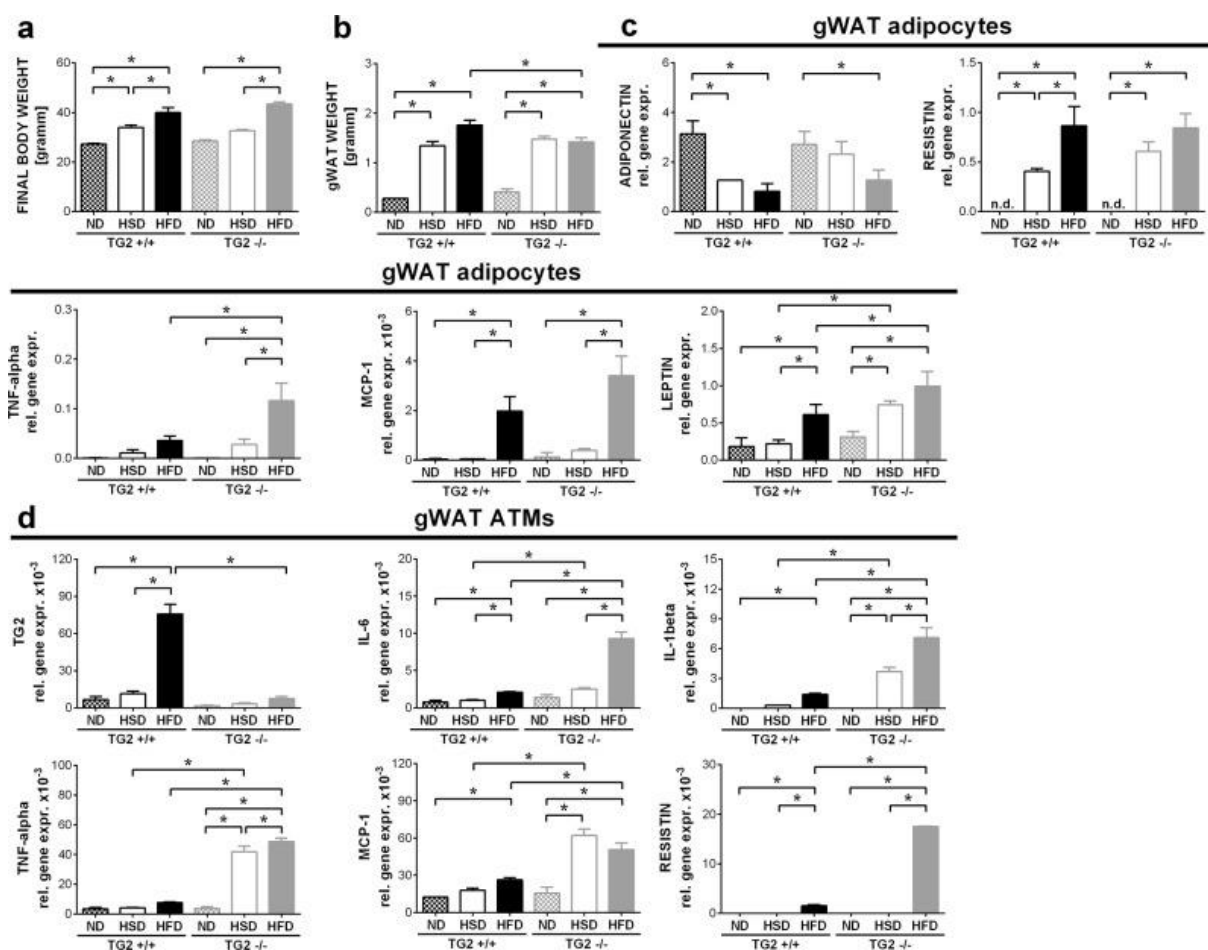
7. Eredmények

7.1. A TG2 hiányának hatása a magas zsírtartalmú diétával kiváltott patológiás változásokra egerekben

7.1.1. A TG2 hiányának hatása a zsírszövet eltakarítására és a magas zsírdiétával kiváltott patológiás változásokra

Magas szukróz/magas zsírtartalmú étrenden (HFD) vagy magas szukróztartalmú étrenden (HSD) tartott vad típusú egerekben markáns elhízás alakult ki a standard kontroll étrenden (ND) tartott egerekhez képest. A HFD, HSD vagy ND étrenden tartott egerek testtömege $40,0 \pm 5,5$ vs. $33,9 \pm 2,6$ vs. $27,2 \pm 0,6$ g volt, ebben a sorrendben, $p < 0,01$). A TG2 hiánya nem gyakorolt jelentős hatást a három különböző típusú étrenden tartott egerek súlygyarapodására (7a. ábra).

Ahogy az 7b. ábrán látható, a gonadális zsírszövet (gWAT) tömege HSD vagy HFD étrend mellett is jelentősen nőtt mind a vad típusú, mind a TG2-null egerekben a kontroll étrenden tartott társaikhoz képest. A HFD étrenden tartott TG2-null egerekben azonban a gonadális zsír jelentősen kisebb mennyiségű volt, mint a HFD étrenden tartott vad típusú egerek esetében, nagy valószínűséggel a TG2-null egerek gonadális zsírszöveti adipocitáinak az adott időpontban zajló fokozott apoptózisának köszönhetően (lásd később). A TG2 hiánya nem befolyásolta az adiponektin és a rezisztin expressziós szintjének elhízással összefüggő módosulásait (7c. ábra), de a $\text{TNF}\alpha$, és leptin elhízás által kiváltott expressziója a TG2-null állatok gWAT adipocitában jelentősen fokozódott a vad típusúakhoz képest (7c. ábra). A HSD és a HFD jelentősen beindította a zsírszöveti makrofágok gyulladásos citokinjeinek mRNS-expresszióját is, amely TG2 hiányában még kifejezettebb volt (7d. ábra). Ezek az adatok mind azt mutatják, hogy bár a TG2 hiánya nem befolyásolja a súlygyarapodást, azonban a TG2-null állatok gWAT-jában az étrend által kiváltott elhízás során sokkal nagyobb mértékű a gyulladás.

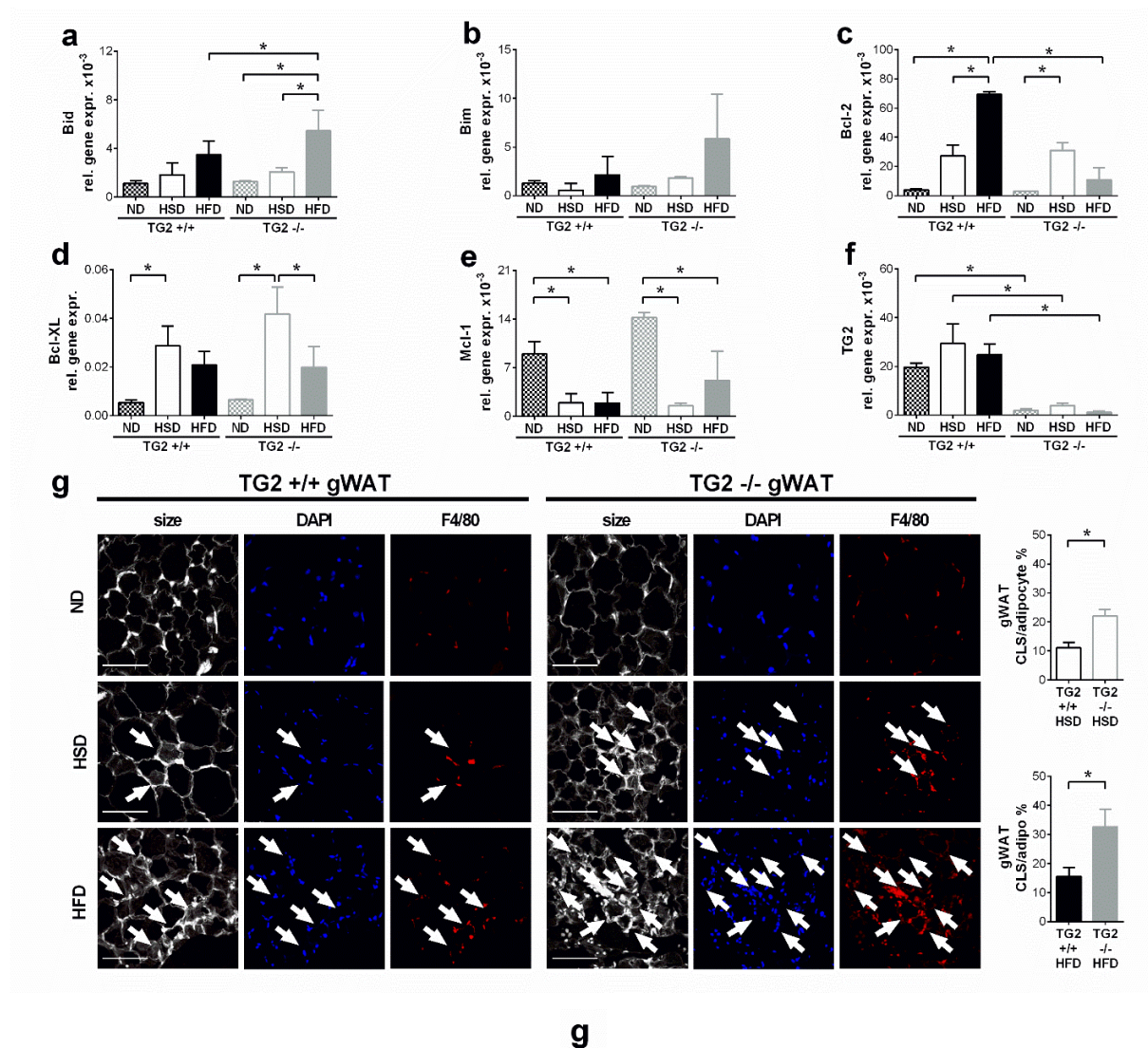


7. ábra A TG2 hiánya nem befolyásolja a súlygyarapodást az étrend által kiváltott elhízás során, de fokozza a gonadális fehér zsírszövet adipocitáinak és zsírszöveti makrofágjainak gyulladásos citokin termelődését

(a) Normál (ND), magas szukróz/acsony zsírtartalmú (HSD), illetve magas szukróz/magas zsírtartalmú (HFD) étrenden tartott vad típusú és TG2-null egerek testtömege az etetési időszak végén. (b) ND, HSD vagy HFD étrenden tartott vad típusú és TG2-null egerek gonadális zsírszövetének tömege az etetési időszak végén. (c) A gWAT adipociták qRT-PCR módszer segítségével meghatározott adiponektin, rezisztin, TNF- α , MCP-1, és leptin relatív génexpressziós szintjei ND, HSD vagy HFD étrenden tartott vad típusú és TG2-null egerekben az etetési időszak végén. Referencia gén: GAPDH. (d) A gWAT makrofágok qRT-PCR módszerrel meghatározott TG2, IL-1 β , IL-6, TNF- α , MCP-1, és rezisztin relatív génexpressziós szintjei ND, HSD vagy HFD étrenden tartott vad típusú és TG2-null egerekben az etetési időszak végén. Referencia gén: GAPDH. Az eredményeket átlag $\pm$ SD értékként tüntettük fel (n = 8 egér csoportonként). A statisztikai szignifikanciát kétutas varianciaanalízissel (ANOVA) határoztuk meg (* $p < 0,05$).

7.1.2. Adipociták fokozott apoptózisa figyelhető meg a gonadális zsírszövetben a magas zsírtartalmú étrend által kiváltott elhízás során TG2^{-/-} egerekben

Mivel az elhízás hozzájárul az adipociták sejthalálához, elhatároztuk, hogy a gWAT adipocitáiban több proapoptotikus és antiapoptotikus gén kifejeződését is megvizsgáljuk.



8. ábra Adipociták fokozott apoptózisa a gonadális zsírszövetben az étrend által kiváltott elhízás során TG2^{-/-} egerekben

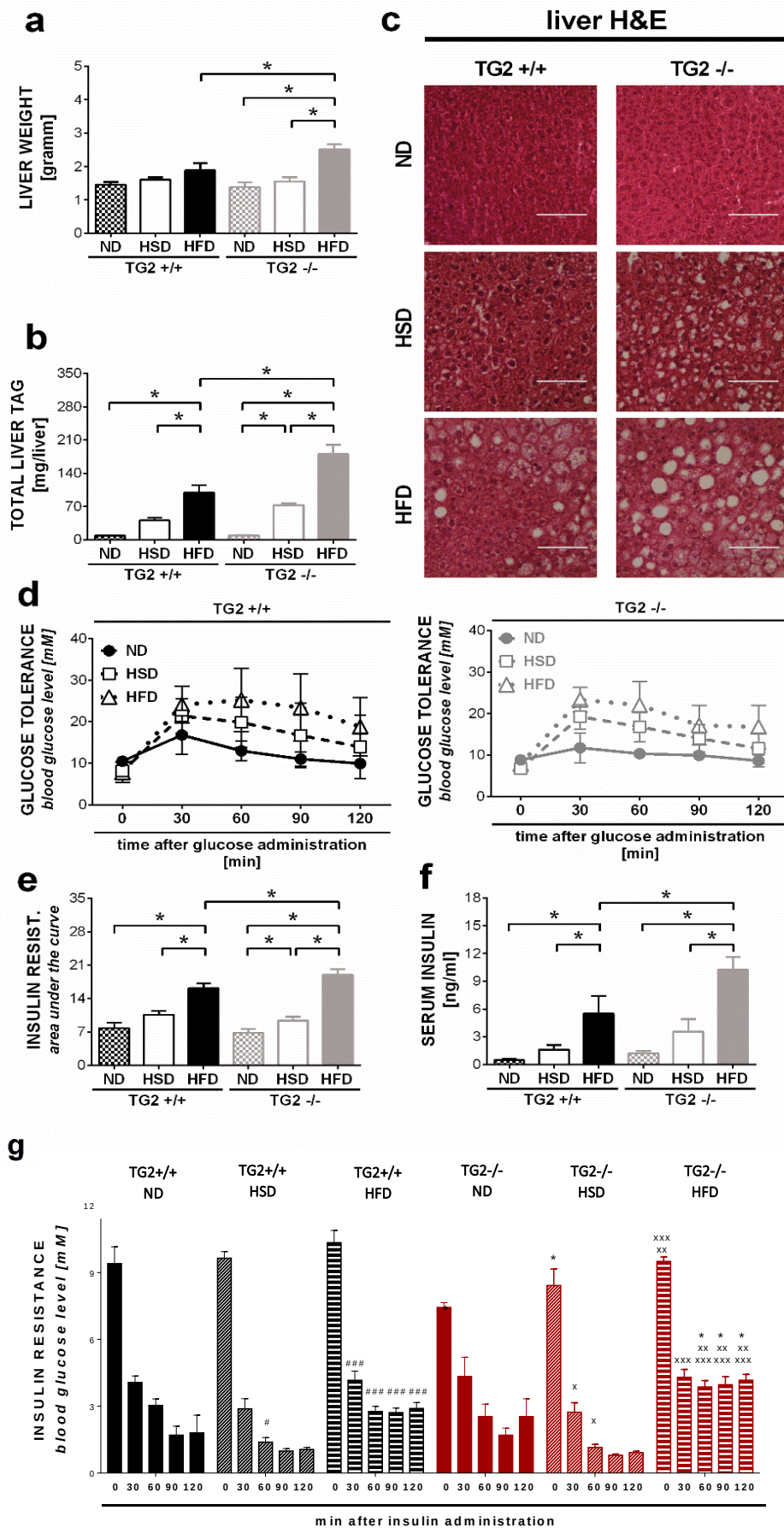
(a-f) Az apoptózissal összefüggésben lévő Bid, Bim, Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1 és TG2 relatív génexpressziós szintjei az ND, HSD vagy HFD étrenden tartott vad típusú és TG2-null egerek gonadális zsírszöveti adipocitáiban, qRT-PCR módszerrel meghatározva, az etetési időszak végén. A referencia gén a GAPDH volt. Az eredményeket átlag $\pm$ SD értéként közöljük (n = 8 egér csoportonként). A statisztikai szignifikanciát egyszempontos varianciaanalízissel (ANOVA) határoztuk meg (*p < 0,05). (g) A paraffinba ágyazott, különböző étrenden tartott vad típusú és TG2-null egerek gWAT-ját

tartalmazó tárgylemezeket a nem specifikusan jelölő anti-digoxin antitesttel, anti-F4/80 antitesttel és DAPI-val festettük meg, hogy láthatóvá tegyük az adipocitákat, makrofágokat és sejtmagokat konfokális mikroszkóp alatt. Lépték skála, 100 μ m. Mindegyik csoportban három különböző egér véletlenszerűen kiválasztott metszetének adott területén meghatároztuk a CLS (korona szerűen elhelyezkedő) sejtek számát. Az eredményeket átlag $\pm$ SD értéként közöljük (n=3 egér csoportonként). A statisztikai szignifikancia megállapításához kétszélű, két mintás nem egyenlő varianciájú Student t-próbát (*p < 0,05) alkalmaztunk.

Ahogy az az 8. ábrán is látható, a gWAT adipocitákban a proapoptotikus Bid, szignifikánsan indukálódott az étrend által kiváltott elhízás során. Érdekes módon nem csak a proapoptotikus gének, hanem két antiapoptotikus gén, a Bcl-2 és a Bcl-xl mRNS-szintjét is megemelkedettnek találtuk (8c. és 8d. ábra). A HFD étrenden tartott TG2-null egerek Bcl-2 mRNS-szintjei azonban vad típusú társaikhoz képest jelentősen lecsökkentek. Másfelől, míg az antiapoptotikus Mcl-1 szintjei lecsökkentek (8e. ábra), a TG2 expressziója nem változott a TG2-null egerek gWAT adipocitáiban az étrend által kiváltott elhízás során (8f. ábra). Ezek az adatok együttesen az jelzik, hogy a TG2-hiányos, HFD étrenden tartott egerek gWAT-jában nagyobb mértékű az adipociták étrend által kiváltott sejthalála. Amikor a holt adipocitákat a CLS struktúrák (Coats és mtsai, 2017; Murano és mtsai, 2008) jelölésével azonosítottuk, a HSD vagy HFD étrenden tartott TG2-null egerek gWAT-jában valóban jelentősen több elhaló sejtet detektáltunk, mint vad típusú társaikban (8g. ábra).

7.1.3. A TG2 hiánya egerekben fokozza a zsírmáj és az inzulinrezisztencia kialakulását a magas zsírtartalmú étrend által kiváltott elhízás során

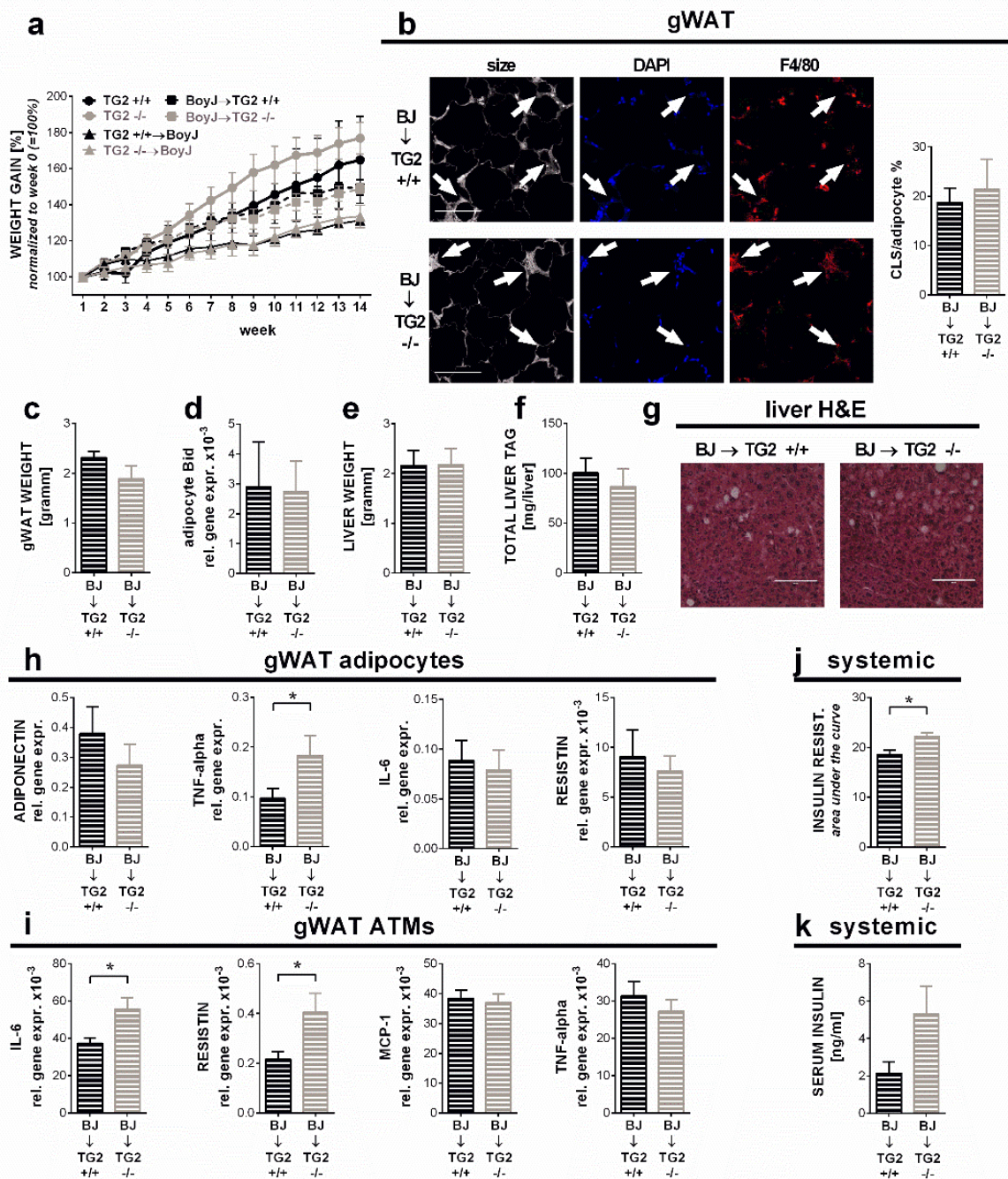
Mivel a gonadális zsírszövetben bekövetkező apoptózis mértékének és a gyulladásos citokinek termelődésének a fokozódása összefüggésben van az ektópiás zsírraktározással, beleértve a zsírmáj kialakulását (szteatózist) (Alkhoury és mtsai, 2010) és az inzulinrezisztenciát (Coats és mtsai, 2017), a vizsgált egerekben meghatároztuk a szteatózis mértékét, illetve a glükóztoleranciában és az inzulinrezisztenciában bekövetkező változásokat. A gWAT adipocitáinak fokozott apoptózisa mellett (8. ábra) a HFD étrenden tartott TG2-null egerekben a máj tömege (9a. ábra) és a máj triacilglicerol-tartalma (9b. ábra) is jelentősen magasabb volt, mint a HFD étrenden tartott vad típusú egerekben. A máj szövetmetszeteinek hematoxin-eozinnal való megfestése megerősítette ezeket az eredményeket (9c. ábra).



9. ábra Fokozott máj szteatózis, inzulinrezisztencia és emelkedett éhgyomri plazma-inzulinszintek az étrend által kiváltott elhízás során TG2-/- egerekben

(a) ND, HSD vagy HFD étrenden tartott vad típusú és TG2-null egerek májának tömege az etetési időszak végén. (b) ND, HSD vagy HFD étrenden tartott vad típusú és TG2-null egerek májának triacilglicerol-tartalma az etetési időszak végén. A triacilglicerol mennyiségét enzimatis glicerol assay segítségével, elszappanosított, neutralizált májkivonatokból határoztuk meg. (c) A paraffinba ágyazott, ugyanazokból az egerekből származó májszövetet tartalmazó tárgylemezeket H&E festéssel festettük meg a szövet architektúrájának láthatóvá tételéhez. A három felvételtől egyet-egyet tüntettünk fel. Lépték skála, 250 μ m. (d) ND, HSD vagy HFD étrenden tartott vad típusú és TG2-null egerek intraperitoneális glükóztolerancia-vizsgálatának eredményei. (e) ND, HSD vagy HFD étrenden tartott vad típusú és TG2-null egerek inzulinrezisztencia értékei az etetési időszak 15. hetén végzett vizsgálatból. (f) ND, HSD vagy HFD étrenden tartott vad típusú és TG2-null egerek plazmainzulinszintjei az etetési időszak végén, egér-inzulin ELISA kittel meghatározva. Az adatokat átlag $\pm$ SD értéként közöljük (n = 8 egér csoportonként). (g) ND, HSD vagy HFD étrenden tartott vad típusú és TG2-null egerek inzulinrezisztencia értékei az etetési időszak 15. hetén végzett vizsgálatból. A statisztikai szignifikanciát egyszempontos varianciaanalízissel (ANOVA) határoztuk meg (*p < 0,05).

A glükóztolerancia-vizsgálatok során az ND étrenden tartott egerekhez képest a HSD vagy HFD étrenden tartottakban csökkent glükóztolerancia volt megfigyelhető. A TG2 hiánya azonban nem rontotta tovább a glükóztoleranciában az étrend hatására bekövetkező változásokat (9d. ábra). Az inzulintolerancia-vizsgálatok alapján viszont a HFD étrenden tartott TG2-hiányos egerekben az inzulinrezisztencia mértéke fokozottabb (9e. ábra). Ezeket az eredményeket alátámasztotta az éhgyomri plazma inzulinszint emelkedése a vad típusú egerekkel szemben (9f. ábra). Ezek az adatok együtt azt jelzik, hogy az SLE-hez (Szondy és mtsai, 2003) vagy az atherosclerózishoz (Van Herck és mtsai, 2010) hasonlóan a TG2 hiánya érzékenyebbé teszi a szervezetet az elhízás által okozott gyulladás és az annak következtében fellépő problémák kialakulására is.



10. ábra A TG2 hiánya a nem csontvelői eredetű sejtekben fokozza az inzulinrezisztencia kialakulását a HFD étrenden tartott egerekben

(a) HFD étrenden tartott BoyJ egerek csontvelőjével transzplantált TG2 $+/+$ és TG2 $-/-$ egerek heti súlygyarapodása. (b) BoyJ egerekből származó csontvelővel transzplantált TG2 $+/+$ és TG2 $-/-$ egerekből gyűjtött gWAT konfokális mikroszkópos képei a HFD etetési időszak végén. A paraffinba ágyazott gWAT tárgylemezeket a nem specifikusan jelölő anti-digoxin antitesttel, anti-F4/80 antitesttel és DAPI-val festettük meg, hogy láthatóvá tegyük az adipocitákat, makrofágokat és sejtmagokat konfokális mikroszkóp alatt. Lépték skála, 100 μ m. Mindegyik csoportban három különböző egér véletlenszerűen

kiválasztott metszetének adott területén meghatároztuk a CLS sejtek számát. Az eredményeket átlag $\pm$ SD értéként közöljük ($n = 3$ egér csoportonként). A statisztikai szignifikancia megállapításához kétszélű, két mintás nem egyenlő varianciájú Student t-próbát ($*p < 0,05$) alkalmaztunk. (c) A b) pontban szereplő egerek gWAT-jának tömege. (d) Az apoptózissal kapcsolatos Bid relatív génexpressziójának szintje ugyanazn egerek gWAT adipocitáiban. (e) Ugyanazn egerek májának tömege. (f) Ugyanazn egerek májának triacilglicerol-tartalma enzimátikus glicerol assay segítségével, elszappanosított, neutralizált májkivonatokból meghatározva. (g) A paraffinba ágyazott, ugyanezekből az egerekből származó májszövetet tartalmazó tárgylemezeket H&E festéssel festettük meg a szövet architektúrájának láthatóvá tételéhez. A három felvétélből egyet-egyet tüntettünk fel. Lépték skála, 250 μ m. (h) Az ugyanezekből az egerekből gyűjtött gWAT adipociták relatív adipokin génexpressziós szintjei. (i) Ugyanezen egerek gWAT makrofágjainak gyulladásí citokin és rezisztin relatív génexpressziós szintjei qRT-PCR módszerrel meghatározva, referencia génként GAPDH-t használva. (j) Ugyanezen egerek inzulinrezisztencia értékei. Az inzulinrezisztencia vizsgálatot a 15. héten végeztük el (6 órás éheztetést követően 0,75 NE/ttkg inzulint adtunk be intraperitoneálisan). (k) A szérum inzulinszintjei egér inzulin ELISA kit segítségével meghatározva. Az adatokat átlag $\pm$ SD értéként közöljük ($n = 8$ egér csoportonként). A statisztikai szignifikanciát egyszempontos varianciaanalízissel (ANOVA) határoztuk meg ($*p < 0,05$),

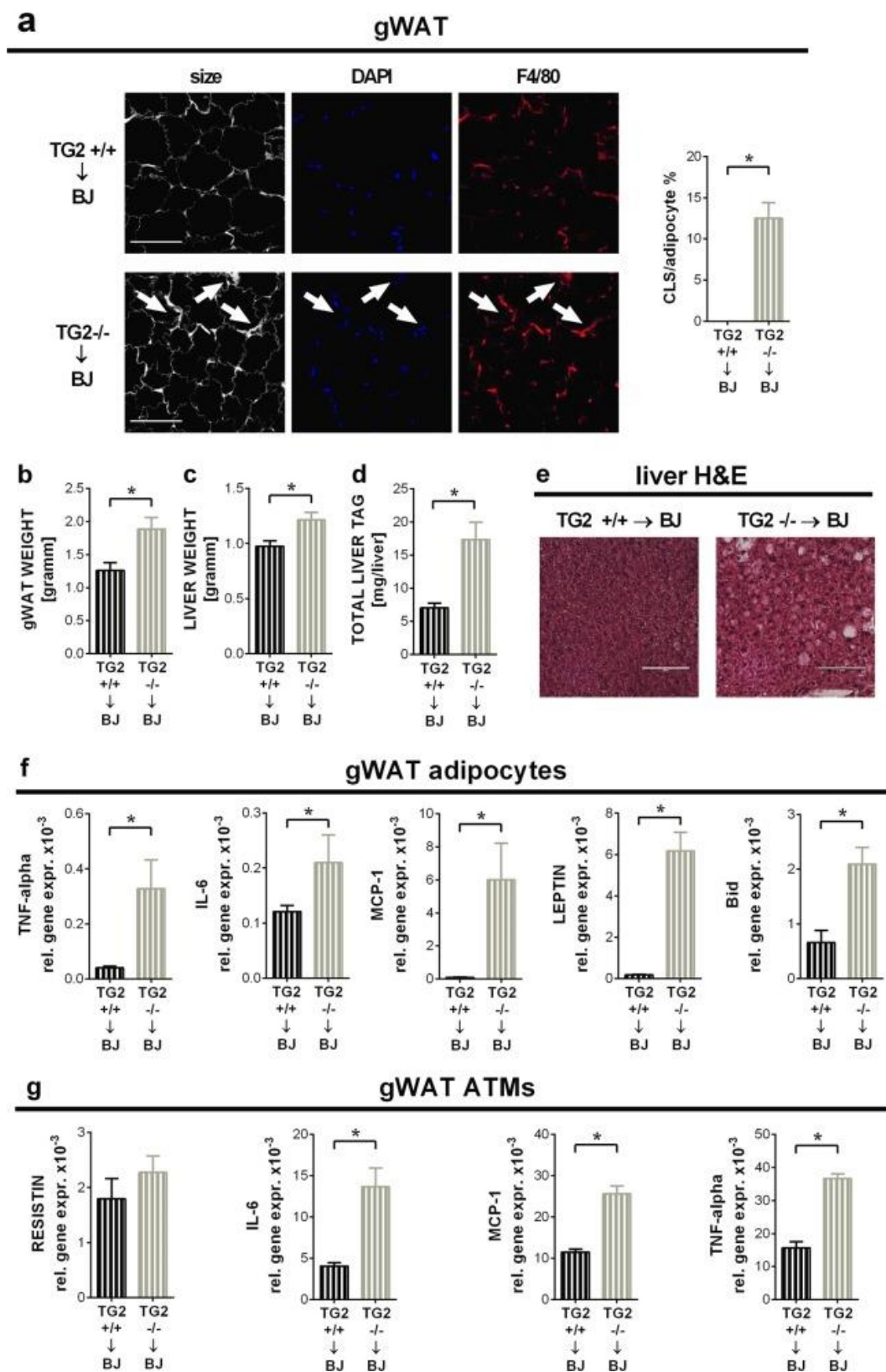
7.1.4. A TG2 hiánya nem csontvelői eredetű sejtekben a keringési rendszer plazma-inzulinszintjeinek emelkedéséhez és inzulinrezisztenciához vezet

A TG2 nemcsak makrofágokban, hanem adipocitákban (Myneni és mtsai, 2015) és hepatocitákban (Piacentini és mtsai, 2018) is kifejeződik. Annak kiderítésére, hogy a TG2 hiánya csontvelői eredetű vagy más típusú sejtekben felelős-e a fenti változásokért, vad típusú és TG2-null egereket terminálisan sugárzásnak tettünk ki, majd csontvelőjüket vagy vad típusú, vagy TG2-null egerekből izolált csontvelőre cseréltük, minden kombinációban. A csontvelő-eltávolítás és -helyreállítás sikeres kivitelezése érdekében ezekben a kísérletekben vad típusú BoyJ egereket (egy CD57BL/6 variáns törzset) alkalmaztunk, amelyek a CD45 molekula CD45.1 allél variánsát expresszálják, míg a C57BL/6 egerek CD45.2-pozitívak. A csontvelő-transzplantációt követően az egereken haematológiai és áramlási citometriai analízist végeztünk, amelyek 95% fölötti leukocita-repopulációt mutattak. A 16 hétig tartó etetés végéig a besugárzott CD57BL/6 egerek jelentősen kevesebb súlyt szedtek fel, mint sugárzásnak ki nem tett társaik (10a. ábra), ami összhangban áll más, korábban publikált megfigyelésekkel (Maeda és mtsai, 2005; Johnson és mtsai, 2016). A nem csontvelői eredetű sejteket jellemző TG2-hiány nem befolyásolta jelentősen sem az elhaló adipociták százalékos arányát, sem a gonádok

tömegét, a gWAT adipociták Bid-expresszióját, a máj tömegét vagy a máj triacilgliceroltartalmát, de a TNF- α kivételével az adipocitákban a gyulladásos citokinek és adipokinek mRNS-expresszióját sem (10b-h. ábrák). Másrészt viszont a zsírszöveti makrofágok által termelt rezisztin és IL-6 mennyisége jelentősen magasabbnak mutatkozott a TG2-hiányos egerek nem csontvelői eredetű sejtjeiben, miközben a TNF- α vagy az MCP-1 termelésében nem következett be változás (10i. ábra). Ráadásul inzulintolerancia-vizsgálat segítségével fokozott inzulinrezisztenciát, valamint szignifikáns éhgyomri plazma-inzulinszint emelkedését mutattuk ki a keringésben (10i. és 10k. ábrák).

7.1.5. A TG2 hiánya a csontvelői eredetű sejtekben felelős az elhízással összefüggő adipocita sejthalál, gyulladás és zsírmáj kialakulásáért TG2-null egerekben

A csontvelői eredetű sejtekben a TG2 hiánya – feltehetően a fokozott TNF- α (Prins és mtsai, 1997; Qi és mtsai, 2018) és leptin (Gullicksen és mtsai, 2003) termelésnek köszönhetően – a HFD étrenden tartott egerek gWAT adipocitáinak nagyobb mértékű elhalásához vezetett a transzplantáció során vad típusú csontvelővel transzplantált egerekkel összehasonlítva (11a. ábra). Emellett a TG2-hiányos csontvelővel rendelkező állatokban jelentősen nagyobb tömegű gonadális zsírt (11b. ábra), megnövekedett máj tömeget és TAG tartalmat regisztráltunk (11c. és 11d. ábra). A szteatózis fokozódását a májszövet metszeteinek haematoxin-eozin festése is igazolta (11e. ábra). Ezekkel az adatokkal összhangban, a csontvelői eredetű sejtek TG2-hiányának fennállása esetén a zsírszövet adipocitáiban a TNF- α , IL-6, MCP-1, leptin és Bid mRNS-expressziójának jelentős fokozódását detektáltuk a HFD étrenden tartott egerekben (11f. ábra). TG2 hiányában a gWAT makrofágok IL-6, MCP-1 és TNF α mRNS expressziójában is jelentős emelkedést tapasztaltunk (11g. ábra). Ahogyan az később a 14j. ábrán is látható lesz, a plazmában keringő inzulin molekulák szintje is magasabbnak adódott a csontvelői sejtek TG2-hiányos állapota esetén. Mindent összevetve adatainkból kitűnik, hogy a vad típusú egerekkel szemben TG2-null egerekben a TG2-t nem termelő csontvelői eredetű sejtek jelentik a hajtóerőt a fokozott gyulladás és a HFD-etetés súlyosabb patológiai következményeinek kialakulásában.

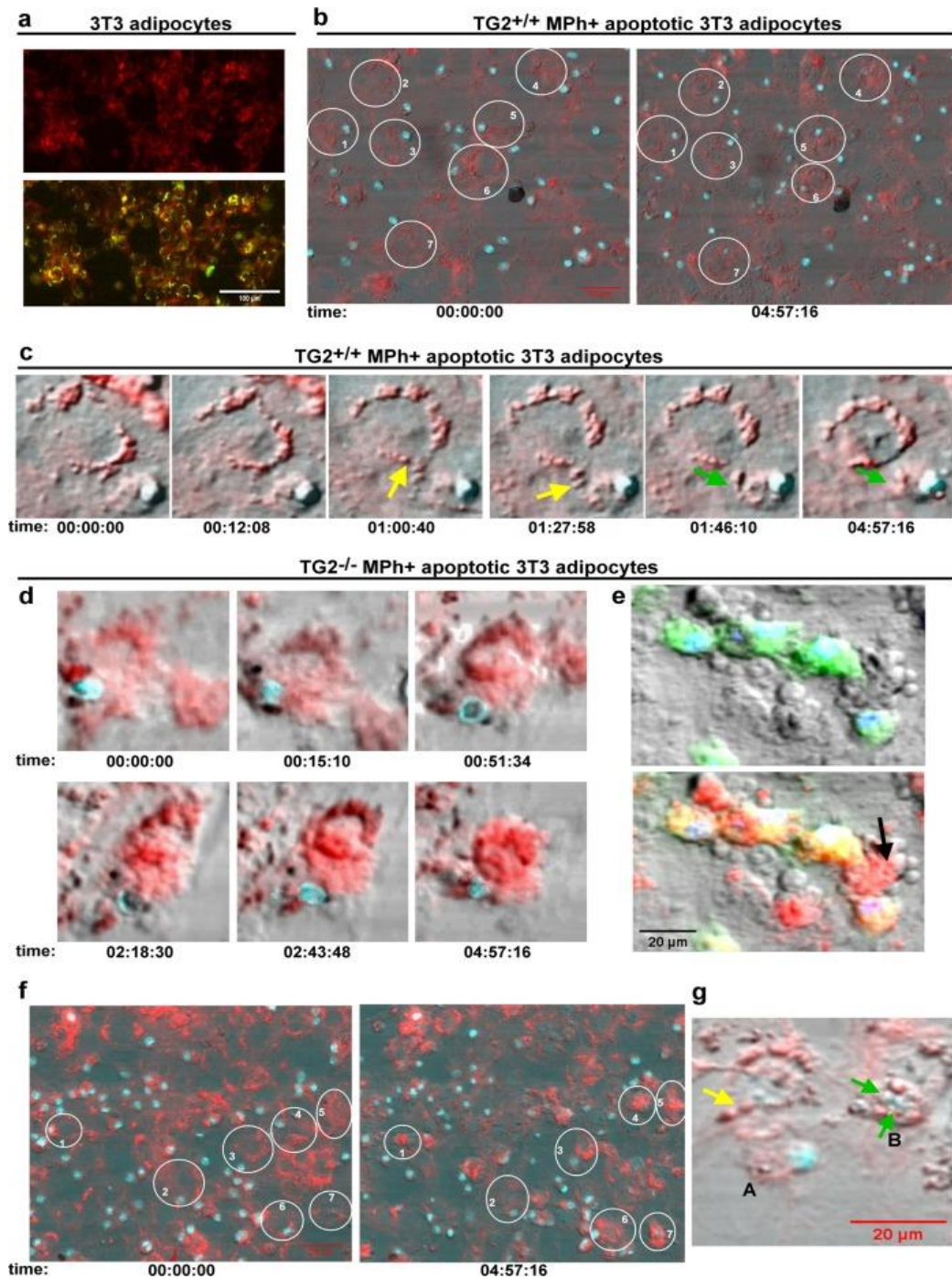


11. ábra A TG2 hiánya csontvelői eredetű sejtekben hozzájárul az adipociták sejthalálához, valamint gyulladás és zsírmáj kialakulásához HFD étrenden tartott egerekben.

(a) TG2^{+/+} vagy TG2^{-/-} egerekből származó csontvelővel transzplantált BoyJ egerekből gyűjtött gWAT konfokális mikroszkópos képei a HFD etetési időszak végén. A paraffinba ágyazott gWAT tárgylemezeket a nem specifikusan jelölő antidigoxin antitesttel, anti-F4/80 antitesttel és DAPI-val festettük meg, hogy láthatóvá tegyük az adipocitákat, makrofágokat és sejtmagokat konfokális mikroszkóp alatt. Léptékvonal: 100 μ m. Mindegyik csoportban három különböző egér véletlenszerűen kiválasztott metszetének adott területén meghatároztuk a CLS sejtek számát. Az eredményeket átlag $\pm$ SD értéként tüntettük fel ($n=3$ egér csoportonként). A statisztikai szignifikancia megállapításához kétszélű, két mintás nem egyenlő varianciájú Student t-próbát ($*p<0,05$) alkalmaztunk. **(b)** Az (a) pontban bemutatott egerek gWAT szövetének tömege. **(c)** Ugyanezen egerek májának tömege. **(d)** Ugyanezen egerek májának triacilglicerol-tartalma elszappanosított, neutralizált májkivonatokból enzimatis glicerol assay segítségével meghatározva. **(e)** A paraffinba ágyazott, ugyanezekből az egerekből származó májszövetet tartalmazó tárgylemezeket H&E-festéssel festettük meg a szövet architektúrájának láthatóvá tételéhez. A három felvételt egyet-egyét tüntettünk fel. Léptékvonal: 250 μ m. **(f)** Ugyanezen egerek gWAT adipocitáinak gyulladásos citokin, leptin és Bid relatív génexpressziós szintjei qRT-PCR módszerrel meghatározva, referencia génként GAPDH-t használva. **(g)** Ugyanezen egerek gWAT makrofágjainak gyulladásos citokin és rezisztin relatív génexpressziós szintjei qRT-PCR módszerrel meghatározva, referencia génként GAPDH-t használva. Az eredményeket átlag $\pm$ SD értéként tüntettük fel ($n=8$ egér csoportonként). A statisztikai szignifikanciát egyszempontos varianciaanalízissel (ANOVA) határoztuk meg ($*p<0,05$).

7.1.6. A TG2 hiánya a makrofágokban hatékonyabb lizoszómális exocitózist eredményez

Mivel eredeti hipotézisünk az volt, hogy a fokozott elhízáshoz köthető gyulladást a TG2-null egerekben az apoptotikus sejtek fagocitózisában mutatkozó romlás eredményezi, elhatároztuk, hogy megvizsgáljuk, szükség van-e makrofágok által termelt TG2-re az apoptotikus adipociták eltávolításához. vizsgáltuk a folyamatot. Erre a célra 3T3 fibroblasztokból differenciáltatott adipocitákat tettünk apoptotikussá szérum megvonásával, majd vad típusú és TG2-null csontvelői eredetű makrofágokhoz adtuk őket, eltávolításukat pedig az idő függvényében pásztázó (laser scanning) citometria segítségével nyomon követtük. Meglepő módon, mint ahogy az a 12. ábrán látható, a makrofágok TG2-hiánya nem késleltette, hanem épp ellenkezőleg, felgyorsította az elhalt adipociták lizoszómális exocitózist. Azt is megfigyeltük, hogy az apoptózis útján elinduló adipociták először lipideket tartalmazó vezikulákat képeznek, amelyeket foszfatidilszerin-pozitív membrán vesz körül, jelezve a sejthalált (12a. ábra). A makrofágok hozzákapcsolódnak az elhalt adipocitákhoz, és folyamatosan bekebelezik ezeket a lipidtartalmú vezikulákat.



12. ábra A TG2-null makrofágok gyorsabban takarítják el az apoptotikus adipociták lipid tartalmú extracelluláris vezikuláit, mint a vad típusúak

(a) Az apoptotikus adipociták lipidtartalmú extracelluláris vezikulákat képeznek, amelyeket sejtfelszínükön foszfatidilszerin-pozitív membrán vesz körül. Pásztázó (laser scanning) citometriás képfelvétel apoptotikus 3T3 adipocitákról, amelyekben 24 órán át tartó szérummegvonással sejthalált váltottunk ki, majd a lipidek, illetve a foszfatidil-szerin kimutatásához Nile red (nílusvörös) festékekkel, illetve FITC-cel jelölt annexin-V-tel (zöld) festettük őket. Léptékvonal: 100 μ m. (b) 3T3 adipociták, amelyekben 24 órán át tartó szérummegvonással sejthalált váltottunk ki, a lipidek kimutatásához Nile red (nílusvörös) festékekkel festettünk, majd vitális Hoechst DNS sejtmagfestékekkel (kék) festett vad típusú

BMDM sejteke helyeztünk melléjük. Az apoptotikus adipociták eltakarítását 5 órán át pásztázó mikroszkóppal követtük. A 2-es számú kiegészítő videófelvétel első és utolsó képén számos apoptotikus adipocita/makrofág sejtpár látható, amelyek az eltakarítás állapotáról tudósítanak az 5 órás időtartam végén **(c)** Egy apoptotikus adipocita és egy vad típusú makrofág párosa a lizoszómális exocitózis folyamatában. 3T3 adipocitákat, amelyekben 24 órán át tartó szérummegvonással sejthalált váltottunk ki, a lipidek kimutatásához Nile red festékekkel festettünk, majd vitális Hoechst DNS sejtmagfestékekkel (kék) festett, vad típusú BMDM sejteknek tettünk ki. Az apoptotikus adipociták eltakarítását 5 órán át pásztázó mikroszkóppal követtük. A sárga nyilak lipidtartalmú vezikulák makrofágok általi felvételét, a zöld nyilak pedig a makrofágok által már bekebelezett vezikulákat mutatják. A makrofág sejtplazmájában látható vörös vezikulák azt jelzik, hogy az adipocitából lipid került felvételre. **(d)** Egy apoptotikus adipocita és egy TG2-null makrofág párosa az apoptotikus adipociták TG2-null makrofágok általi felvételét szemlélteti. A 3T3 adipocitákat, amelyekben 24 órán át tartó szérummegvonással sejthalált váltottunk ki, a lipidek kimutatásához Nile red festékekkel festettük, majd vitális Hoechst DNS sejtmagfestékekkel (kék) festett, TG2-null BMDM sejteknek tettük ki. Az apoptotikus adipociták eltakarítását 5 órán át pásztázó mikroszkóppal követtük **(e)** Azért, hogy a makrofágok és az adipociták jobban szétváljanak a képeken, az előző festésekhez még a makrofágok CFDA-val történő jelölését (zöld) is hozzátettük. A felső panelen lévő képen a zsír nincsen vörössel megjelölve, míg az alsó panelen az összes szín egyszerre látható. A nyíl egy zsugorodó adipocitára mutat, amelynek membránján apoptotikus testek képződnek, amelyek viszont nem tartalmazzak lipidet. Léptékvonal: 20 μ m. **(f)** 3T3 adipociták, amelyekben 24 órán át tartó szérummegvonással sejthalált váltottunk ki, a lipidek kimutatásához Nile red festékekkel festettünk, majd vitális Hoechst DNS sejtmagfestékekkel (kék) festett TG2-null BMDM sejteknek tettünk ki. Az apoptotikus adipociták eltakarítását 5 órán át pásztázó mikroszkóppal követtük. **(g)** A lizoszómális exocitózis befejeztével a TG2-null makrofágok bekebelezik a maradék zsírsejtet. Pásztázó citometriás felvétel 3T3 adipocitákról, amelyekben 24 órán át tartó szérummegvonással sejthalált váltottunk ki, a lipidek kimutatásához Nile red festékekkel festettünk, majd vitális Hoechst DNS sejtmagfestékekkel (kék) festett, TG2-null BMDM sejteknek tettünk ki. Az adipociták eltakarításának ebben a fázisában a Hoechst az adipociták sejtmagját is enyhén megfesti. A sárga nyíl a lipidtartalmú vezikulák felvételének egy utolsó mozzanatát jelöli az „A” makrofágon. A zöld nyilak a „B” makrofág által felvett sejtmagokra mutatnak. Léptékvonal: 20 μ m.

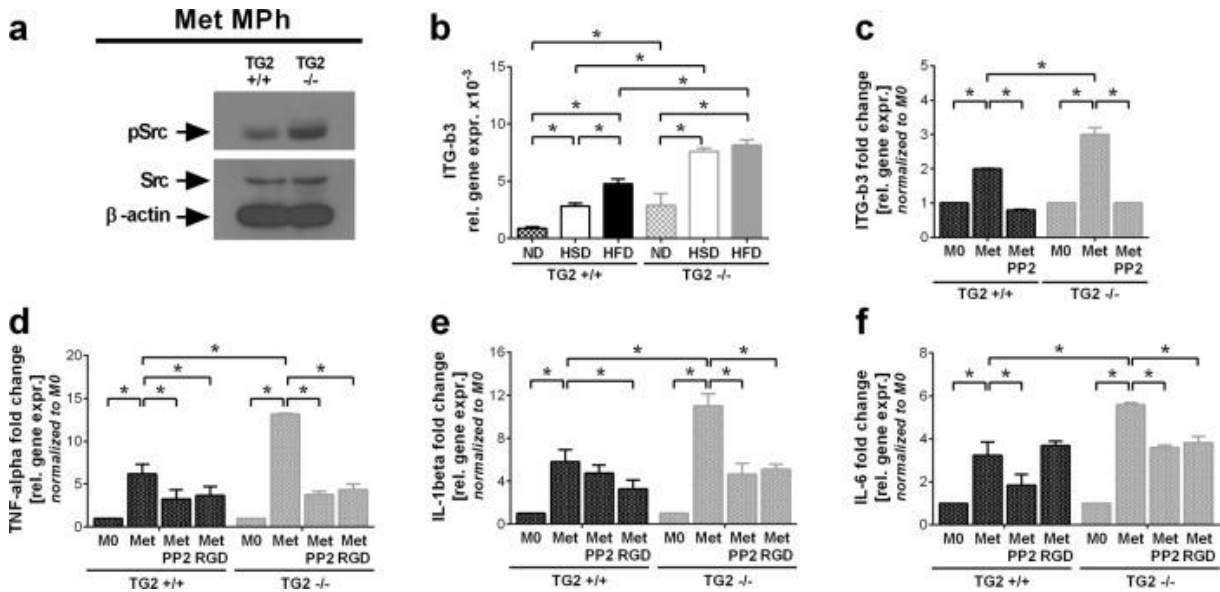
Az 5 órás videófelvétel teljes ideje alatt az egyik elhalt adipocitára kapcsolódó vad típusú makrofág az egyik vezikulát a másik után veszi fel (12b. és 12c. ábra), de nem végez az eltakarítással. A TG2-null makrofágok azonban sokkal gyorsabban veszik fel ezeket a lipidtartalmú vezikulákat (12d–f. ábrák) és váltják ki a membrán „blebbinget” (hólyagok kialakulását) magában foglaló klasszikus apoptotikus program elindulását. Miután az adipociták sejtplazmájának teljes tartalmát eltávolították, a TG2-null makrofágok végül a feldarabolódó sejtmagot is megemésztik (12g. ábra). A vad típusú makrofágok közül viszont a videó végéig egy sem volt képes eljutni a bekebelezésnek eddig a befejező lépéséig.

7.1.7. Fokozott c-Src szignalizációjuk révén a metabolikusan aktivált TG2-null makrofágok több gyulladásos citokint termelnek, mint a vad típusúak

A laboratóriumunkban korábban végzett kísérletek kimutatták, hogy TG2 hiányában a β 3-integrin szignalizáció módosul, amely fokozott c-Src tirozin kináz aktivitást eredményez (Janiak és mtsai, 2006). Ennek megfelelően TG2-null makrofágokban a foszforilált c-Src mennyisége, a β 3-integrin szintje, valamint az c-SRC-függő β 3-integrin foszforiláció mértéke fokozódik, amely a kiindulási I κ B szintek csökkenéséhez, és ennek következtében a gyulladásos citokinek fokozott transzkripciójához vezet a lipopoliszachariddal történő találkozás után (Sarang és mtsai, 2011). A lipopoliszacharidhoz hasonlóan a palmitátról is kimutatták, hogy aktiválja a TLR4-et (Shi és mtsai, 2006) és a c-Src-t (Holzer és mtsai, 2011). Ezért metabolikusan aktivált makrofágokban, amelyeket az előzetesen leírt módon (Coats és mtsai, 2017) in vitro hoztunk létre, meghatároztuk a pSrc szinteket, és TG2 hiányában azok emelkedett szintjét tapasztaltuk (13a. ábra). A következő lépésben gWAT makrofágokban meghatároztuk a β 3-integrin mRNS-szintjét, amelynek HSD és HFD étrend mellett is az emelkedését tapasztaltuk, valamint azt, hogy mind a kiindulási, mind a HSD/HFD étrend által kiváltott szintek lényegesen magasabbak voltak TG2 hiányában (13b. ábra). Ehhez hasonlóan TG2 hiányában az MMe makrofágok β 3-integrin szintjében is jelentősen megnövekedett expressziót mutattunk ki (13c. ábra). A β 3-integrin expressziójának kiváltódása MMe makrofágokban teljesen c-Src-függő módon zajlott, mivel az Src-inhibitor PP2 ezt megakadályozta.

A metabolikus aktiváció jelentősen magasabb TNF- α , IL-1 β , és IL-6 mRNS-szinteket váltott ki a TG2-null MMe makrofágokban, mint a vad típusúakban (13d-f. ábra). Az Src-inhibitor PP2 és az integrinreceptor-inhibitor RGD peptid ráadásul meggátolta a gyulladásos citokinek

képződését mind a vad típusú, mind a TG2-null MMe makrofágokban, és ezeknek az inhibitoroknak a jelenlétében semmilyen különbség nem mutatkozott a metabolikus aktiváció által kiváltott gyulladásos citokinek indukciójában. Ezek az adatok alátámasztják, hogy a TG2-null makrofágok érzékenyebbek a gyulladás általi stimulációra, és ez egy fokozott β 3-integrin/c-Src jelátvitel következménye.

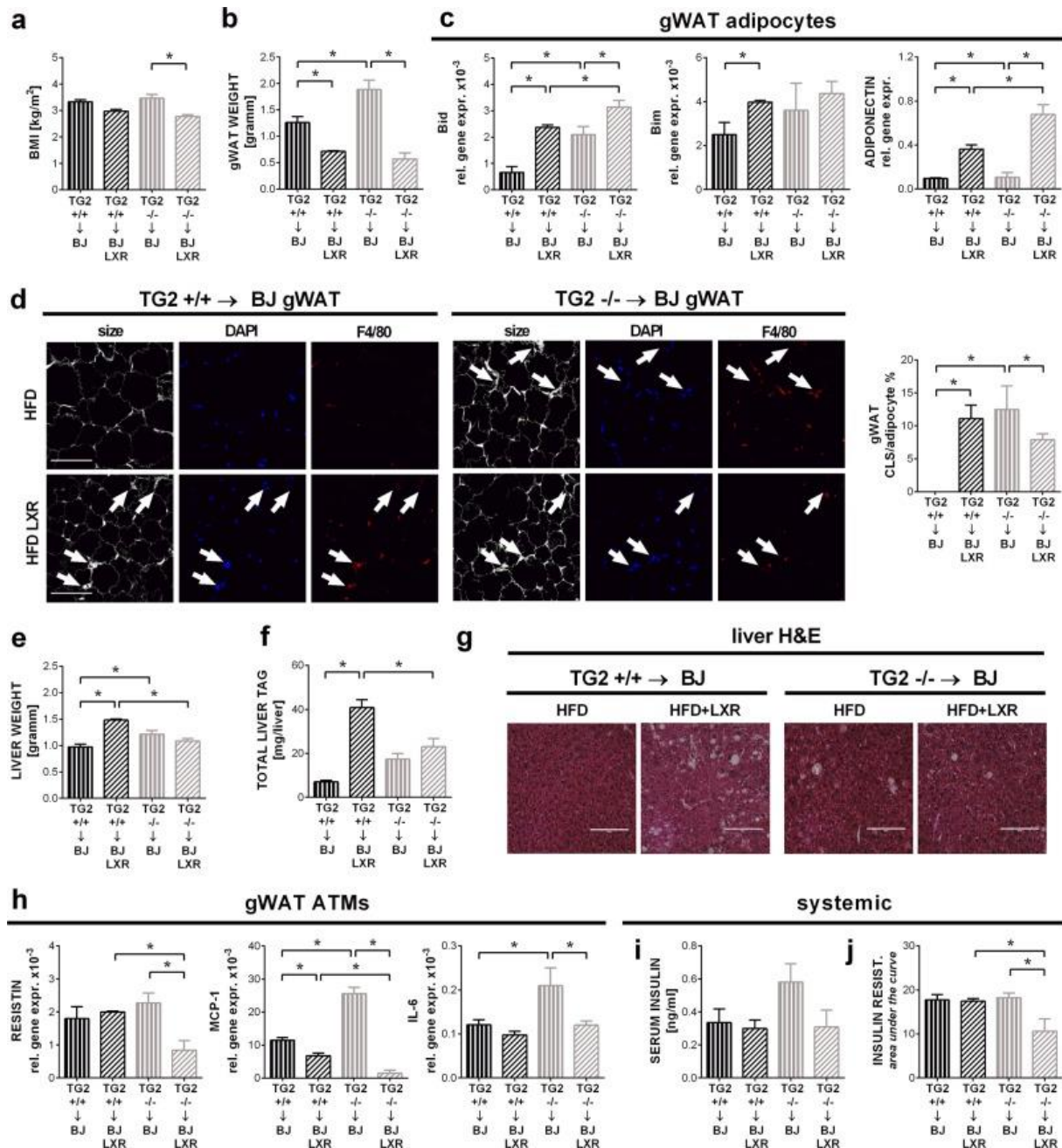


13. ábra Fokozott c-Src szignalizációjuk révén a metabolikusan aktivált TG2-null makrofágok több gyulladásos citokint termelnek, mint a vad típusúak.

(a) Vad típusú és TG2-null metabolikusan aktivált BMDM sejtek c-Src és p-Src szintjei Western blot analízissel meghatározva, referencia fehérjeként β -aktint használva. (b) gWAT makrofágok qRT-PCR módszerrel meghatározott β 3-integrin relatív génexpressziójának szintjei ND, HSD vagy HFD étrenden tartott vad típusú és TG2-null egerekben az etetési időszak végén. Referencia génként GAPDH-t használtunk. (c–f) Metabolikusan aktivált vad típusú vagy TG2-null BMDM sejtek qRT-PCR módszerrel meghatározott β 3-integrin, TNF- α , IL-1 β és IL-6 relatív génexpressziós szintjei kezelés nélkül, illetve 2 μ M PP2 vagy 0,5 mg/ml RGD peptid hozzáadását követően. Referencia génként GAPDH-t használtam. Az eredményeket átlag $\pm$ SD értéként tüntettük fel ($n = 8$ egér csoportonként, $n = 4$ a metabolikusan aktivált makrofágok esetén). A statisztikai szignifikanciát kétszemponos varianciaanalízissel (ANOVA) határoztuk meg (* $p < 0,05$).

7.1.8. Az LXR-agonistával történő kezelés visszaállítja a HFD étrend által kiváltott fenotípust a csontvelői eredetű sejtjeikben TG2-hiánnyal rendelkező egerekben, a máj kisebb mértékű szteatózist eredményezve a vad típusú egerekhez képest

A máj X-receptorok (LXR-ek) a szervezet koleszterin-, zsírsav- és glükózanyagcseréjének szabályozásában kulcsfontosságú szerepet játszó sejtmagi receptorok (Faulds és mtsai, 2010). Az LXR receptorok aktivációja emellett erősen csökkenti a makrofágok gyulladásos folyamatait is (Schulman, 2017). Bár az LXR-agonistával történő kezelésről kimutatták, hogy a magas zsírtartalmú étrend által kiváltott elhízás során jelentősen befolyásolja a metabolizmust a súlygyarapodást mérséklése, a fehér zsírszövet lipolízisének és zsírsav-oxidációjának (Dib és mtsai, 2014), valamint a máj szteatózisének (Zhang és mtsai, 2012) beindítása, illetve az inzulinérzékenység javítása révén (Gao és Liu, 2013) (Dong és mtsai, 2017), úgy véltük, hogy ha a TG2-hiány a makrofágokban elsősorban a gyulladást befolyásolja, akkor az LXR-agonistával történő kezelés ugyanolyan fenotípust eredményez a TG2-t termelő, mint a TG2-hiányos csontvelői eredetű sejtekkel rendelkező, HFD étrenden tartott egerekben. Ezért a TG2-t termelő és nem termelő csontvelői eredetű sejtekkel rendelkező, csontvelő-transzplantáción átesett egereket az LXR-agonista GW3965 és magas zsírtartalmú táplálék keverékével etettük az etetési időszak teljes ideje alatt, a mások által leírt módon (A-Gonzalez és mtsai, 2009). Egy korábban publikált tanulmánnyal (Gao és Liu, 2013) egyetértésben az LXR-agonistával történő kezelés meggátolta az egész test (14a. ábra) és a gonádok zsírtömegének (14b. ábra) gyarapodását a HFD étrenden tartott egerekben. Ez a fehér zsírszövet adipocitáinak fokozott apoptózisával volt összefüggésbe hozható, amelyet a gWAT adipocitáinak fokozott Bid és Bim expressziója indíthatott el (14c. ábra). Ha azonban a csontvelői eredetű sejtekből hiányzott a TG2, az LXR-rel kezelt egerek gonadális zsírjából származó szövetmetszeteken a holt adipociták százalékos arányának csökkenését figyeltük meg (14d. ábra), amely talán a hatékonyabb eltakarításnak volt köszönhető. Ehhez hasonlóan a májban jelentősen megnövekedett, LXR aktivációhoz köthető szteatózist csak vad típusú egerekben mutattunk ki (14e–g). Az LXR-agonistával kezelt TG2-null gWAT makrofágok lényegesen kevesebb MCP-1-et és rezisztint termeltek, mint vad típusú társaik (14h. ábra), míg az ugyanabból az egerből származó gWAT adipociták jelentősen több adiponektint (14c. ábra), ami javuló inzulinérzékenységet tükröz. Bár a plazmában keringő éhgyomri inzulinszintekben nem volt különbség az LXR-agonistával kezelt egerek között (14i. ábra), a TG2-hiányos csontvelői eredetű sejtekkel rendelkező állatok fokozott inzulinérzékenységet mutattak (14j. ábra).



14. ábra Az LXR-agonistával történő kezelés visszaállítja a HFD étrend által kiváltott elhízást és csökkenti a zsírmáját a csontvelői eredetű sejtjeikben TG2-hiánnyal rendelkező egerekben

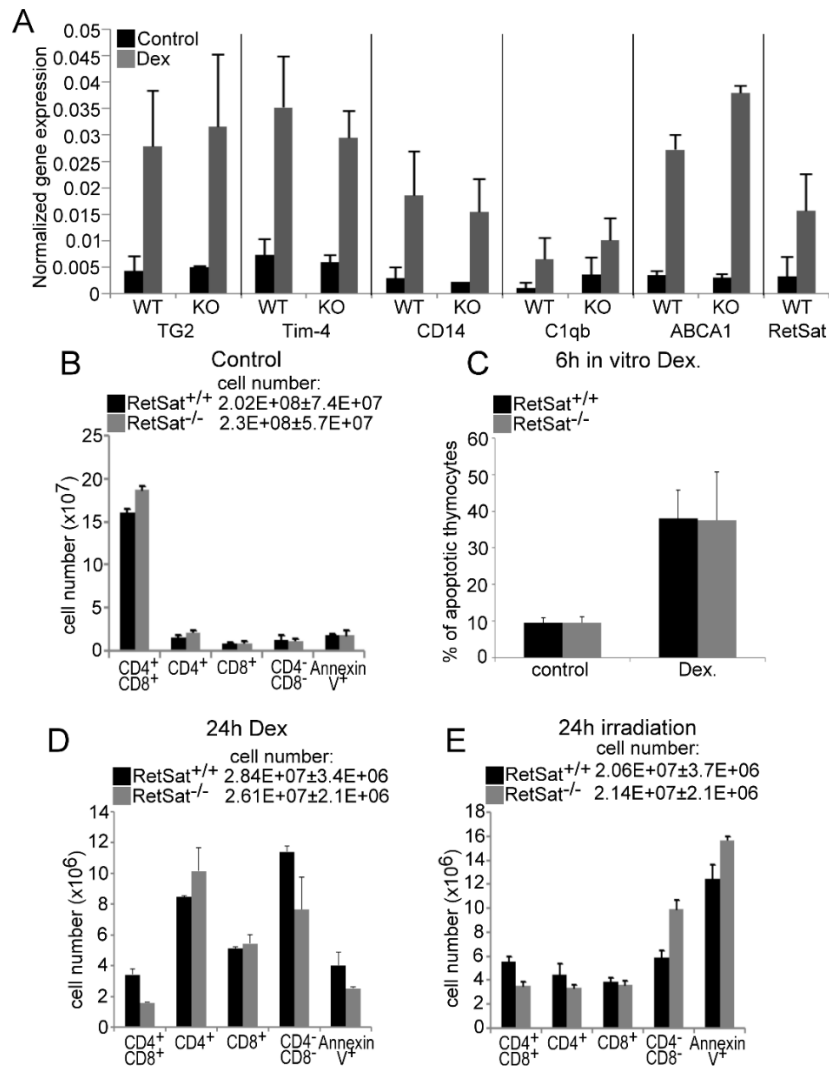
(a) TG2^{+/+} vagy TG2^{-/-} egerekből származó csontvelővel transzplantált BoyJ egerek testtömeg-indexe (BMI) a 16 hetes HFD etetési időszak végén az LXR-agonista GW3965 kezeléssel kombinációban vagy anélkül (20 mg/kg/nap). (b) Ugyanazon egerek gWAT-jának tömege. (c) Ugyanazon egerek gWAT adipocitáinak Bid, Bim és adiponektin relatív génexpressziós szintjei qRT-PCR módszerrel meghatározva, referencia génként GAPDH-t használva. (d) Az ugyanazokból az egerekből gyűjtött gWAT konfokális mikroszkópos képei. A paraffinba ágyazott gWAT tárgylemezeket a nem specifikusan jelölő antidigoxin antitesttel, anti-F4/80 antitesttel és DAPI-val festettük meg, hogy láthatóvá tegyük az adipocitákat, makrofágokat és sejtmagokat konfokális mikroszkóp alatt.

Léptékvonal: 100 μm . Mindegyik csoportban három különböző egér véletlenszerűen kiválasztott metszetének adott területén meghatároztuk a CLS sejtek számát. Az eredményeket átlag $\pm$ SD értékként tüntettük fel ($n = 3$ egér csoportonként). A statisztikai szignifikancia megállapításához kétszélű, két mintás nem egyenlő varianciájú Student t-próbát ($*p < 0,05$) alkalmaztunk. **(e)** Ugyanazon egerek májának tömege. **(f)** Ugyanazon egerek májának triacilglicerol-tartalma enzimátikus glicerol assay segítségével, elszappanosított, neutralizált májkivonatokból meghatározva. **(g)** A paraffinba ágyazott, ugyanazokból az egerekből származó májszövetet tartalmazó tárgylemezeket H&E-festéssel festettük meg a szövet architektúrájának láthatóvá tételéhez. A három felvételtől egyet-egyet tüntettünk fel. Léptékvonal: 250 μm . **(h)** Ugyanazon egerek gWAT makrofágjainak MCP-1, IL-6 és rezisztin relatív génexpressziós szintjei qRT-PCR módszerrel meghatározva, referencia génként GAPDH-t használva. **(i)** A szérum inzulinszintjei egér inzulin ELISA kit segítségével meghatározva. **(j)** Ugyanazon egerek inzulinrezisztencia értékei. Az inzulinrezisztencia vizsgálatot a 15. héten végeztük el (6 órás éheztetést követően 0,75 NE/ttkg inzulint adtunk be intraperitoneálisan). Az adatokat átlag $\pm$ SD értékként tüntettük fel ($n = 8$ egér csoportonként). A statisztikai szignifikanciát kétszemponos varianciaanalízissel (ANOVA) határoztuk meg ($*p < 0,05$).

7.2. A retinol szaturáz enzim hiányának hatása az elhalt sejtek eltakarítására

7.2.1. A retinol-szaturáz hiánya nem befolyásolja sem a retinoidok által szabályozott gének indukcióját, sem a tímusz apopto-fagocitotikus programját

Korábbi tanulmányainkban felvetettük, hogy a makrofágokban az apoptotikus sejtek bekebelezése során legalább 5 efferocitózissal kapcsolatos gén (TG2, CD14, C1qb, Tim-4 és ABCA1) expressziója indukálódik, még hozzá retinoidfüggő módon. Ezeknek a géneknek az expressziója fokozódik apoptotizáló timocitákban is, de a klasszikus retinsavakat vagy retinsav szint emelkedését nem találtunk, viszont egy lehetséges dihidroretinol-származék fokozott termelődését mutattuk ki (Sarang és mtsai, 2014). Ezért megmértük, hatással van-e a RetSat hiánya ugyanezeknek a géneknek a kifejeződésére az apoptotizáló tímuszban. Ahogy az a 15a. ábrán is látható, RetSat hiányában a vizsgált gének közül egyiknek az expressziója sem módosult az apoptotizáló tímuszban. Az apoptotizáló tímuszban ráadásul RetSat hiányában is ugyanaz, a korábbi tanulmányainkban már megfigyelt retinaldehid-dehidrogenáz függő retinoid csúcs amely sejteink szerint egy dihidroretinol-származék lett volna. (az adatokat itt nem tüntettük fel). Ezért arra a következtetésre jutottunk, hogy vagy a RetSattal összefüggő retinoidok nem játszanak meghatározó szerepet a retinoidokkal kapcsolatos gének indukciójában, vagy pedig RetSat hiányában más retinoidok helyettesítik őket az egerek tímuszában. Mivel az apopto-fagocitotikus program kulcsfontosságú szerepet játszik a T-sejt készlet kialakításában (Starr és mtsai, 2003) (Chen és Konkel, 2015), és a retinoidokról a munkacsoportunkban korábban kimutatták, hogy befolyásolják a tímuszban zajló T-sejt szelekciós folyamatokat (Sarang és mtsai, 2014), megvizsgáltuk, hogy a RetSat hiánya hatással van-e a tímusz sejtösszetételére. Azonban ahogy az 15b. ábrán látható, a RetSat hiánya nem befolyásolta a különféle timocitapopulációk sejtösszetételét vagy méretét. Mivel a RetSat a bekebelezést végző makrofágokban indukálódott, azt is megvizsgáltuk, hogy a RetSat hiánya befolyásolja-e a makrofágok képességét az apoptotikus timociták eltakarítására in vivo. A RetSat-null timocitákban, amelyekben in vitro sejthalált váltottunk ki, ugyanolyan gyorsan indult be az apoptózis (15c. ábra). Ehhez hasonlóan a sejthalálnak sem a dexametazonnal, sem a gamma-sugárzással való kiváltása nem befolyásolta jelentősen a timociták számának csökkenését vagy az annexin-V-pozitív, eltávolításra nem került timocita populációk százalékos arányát (15d. és 15e. ábra), ami azt jelzi, hogy a timocitáknak in vivo sem az apoptózist, sem a fagocitózist nem befolyásolja jelentősen a RetSat hiánya.

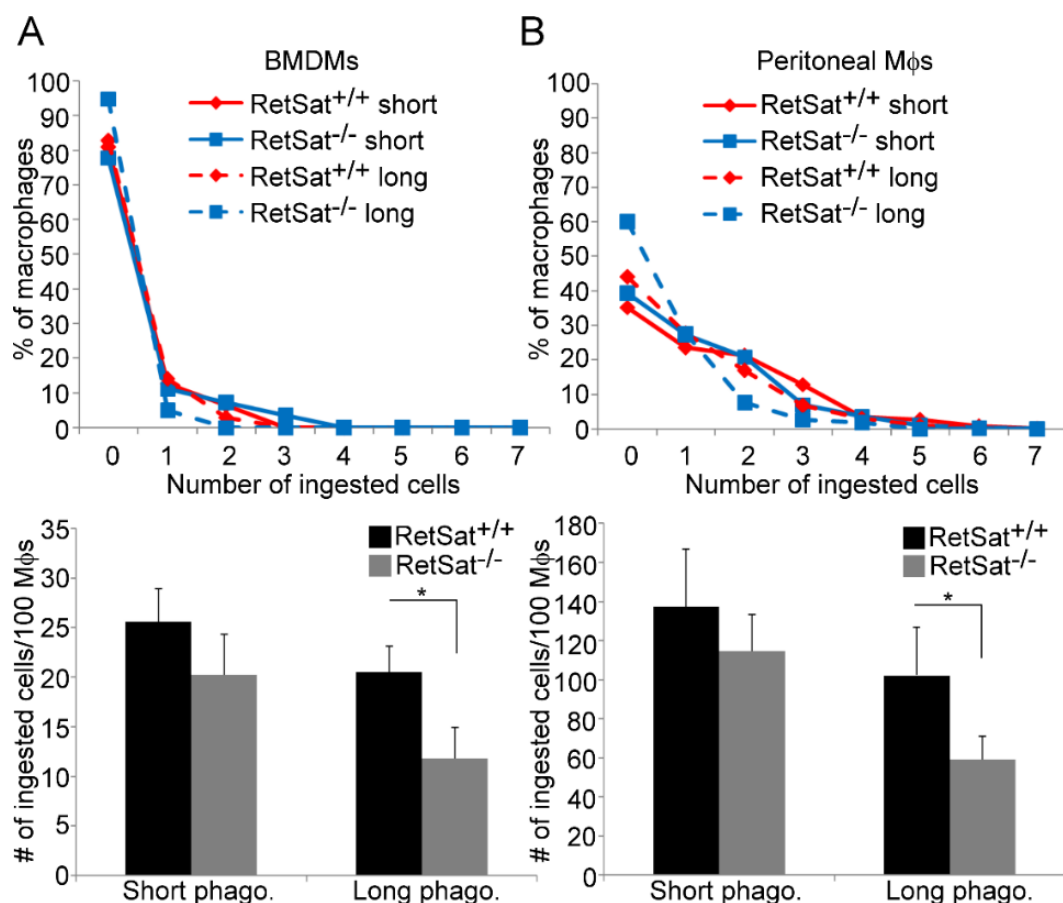


15. ábra A retinol-szaturáz (RetSat) hiánya egerekben nem befolyásolja a retinoidok által szabályozott, efferoitózissal összefüggő gének expresszióját vagy a tímusz apopto-fagocitotikus programját

(a) Négyhetes egereket intraperitoneálisan vagy 0,3 mg dexametazon-acetáttal (DEX), vagy csak a vivőanyaggal oltottunk be, hogy kiválsuk a timociták apoptózisát. A tímuszokat 24 óra múlva begyűjtöttük, majd qRT-PCR módszerrel meghatároztuk a génexpressziót (n = 4) úgy, hogy normalizáló géneként β -aktint használtunk. WT (wild type), vad típusú; KO, knock-out. Az eredményeket átlag $\pm$ SD értékként tüntettük fel (n = 4). (b) Különböző timocita sejtpopulációk száma négyhetes vad típusú és RetSat-null egerek tímuszában. Az eredményeket átlag $\pm$ SD értékként tüntettük fel (n = 4). (c) Az annexin-V-pozitív timociták százalékos aránya hat órával az apoptózis 1 μ M DEX-szel *in vitro* történő kiváltása után. (d,e) Különböző timocita sejtpopulációk száma négyhetes vad típusú és RetSat-null egerek tímuszában 24 órával a 0,3 mg-os DEX-kezelés (d) vagy 5 Gy besugárzás (e) után. Az eredményeket átlag $\pm$ SD értékként tüntettük fel (n = 4).

7.2.2. A RetSat-null makrofágokban a hosszú távú fagocitózis romlik

Mivel a különböző makrofágok *in vivo* különböző fagocitotikus receptorokat és hídképző molekulákat használnak az efferocitózisa (Miyanishi és mtsai, 2007) (Miksa és mtsai, 2008), elhatároztuk, hogy *in vitro* megvizsgáljuk a RetSat-null peritoneális és csontvelői eredetű makrofágok (BMDM-ek) efferocitotikus kapacitását. Ahogyan azt a 16a. és 16b. ábra is szemlélteti, az apoptotikus sejtek 1 órán keresztüli felvételét követő mérések alapján a rövid távú fagocitózist nem befolyásolta a RetSat hiánya. Amikor azonban a fagocitózis mértékét 5 órás, folyamatos efferocitózist követően határoztuk meg, a RetSat-null makrofágok mindkét típusában a fagocitotikus kapacitás csökkenését tapasztaltuk a vad típusú kontrollokhoz képest. Ezek az adatok azt jelzik, hogy a RetSat hozzájárul az apoptotikus sejtek hatékony efferocitózisához.



16. ábra A RetSat hiánya késlelteti a csontvelői eredetű makrofágok (BMDM-ek) és a peritoneális makrofágok hosszú távú fagocitózist

5(6)-karboxifluoreszcein-diacetáttal (CFDA-SE) jelölt (a) BMDM sejteket vagy (b) peritoneális makrofágokat Deep Red festékkel jelölt apoptotikus timocitákkal 1 órán keresztül inkubáltunk (1:5 makrofág—célsejt arányban) úgy, hogy a timocitákat vagy azonnal (rövid távú fagocitózis), vagy csak azután adtuk a makrofágokhoz, hogy azokat előtte 5 óráig jelöletlen apoptotikus timocitákkal inkubáltuk együtt. A felvett sejtek számát konfokális mikroszkóp segítségével határoztuk meg. A felső panelek az egyik reprezentatív kísérletet szemléltetik. A felvett összes sejt számát az alsó panelek mutatják átlag $\pm$ SD értéként feltüntetve ($n = 3$), * $p < 0,05$.

7.2.3. A RetSat-null makrofágok kevesebb MFG-E8-at expresszálnak

Azért, hogy meghatározhassuk a fagocitózis hosszútávon történő romlásának okait, teljes RNS-szekvenálást alkalmaztunk, amely során 117 különbözőképpen expresszált gént (DEG) azonosítottuk a RetSat^{+/+} és RetSat^{-/-} BMDM-ek között (legalább másfélszeres változást és $< 0,05$ korrigált p -értéket alapul véve). A RetSat^{-/-} sejtekben összesen 59 transzkript volt csökkent génexpresszióval jellemezhető és 58 transzkript mutatott megnövekedett génexpressziót. A DEG-ek listáját az 1. táblázat tartalmazza. A lecsökkent, illetve megnövekedett transzkriptek átlag fold change (FC) értéke $-15,1 \pm 97,1$, illetve $3,1 \pm 2,7$ volt. A lecsökkent és megnövekedett transzkriptek medián FC-értéke -2 , illetve $2,1$ volt.

1. táblázat A RetSat vad és RetSat hiányos BMDM közötti 117 eltérően expresszált gén felsorolása (legalább 1,5-szörös változás FC) és korrigált P (P corr érték $< 0,05$ alapján)

Gene Symbol	FC	p (Corr)	Gene Symbol	FC	p (Corr)
Npy	-742.1	1.6×10^{-05}	Dgat2	19.0	1.3×10^{-04}
1700112E06Rik	-9.2	1.4×10^{-04}	Nbea	8.2	6.9×10^{-04}
Rtn4rl2	-5.4	2.6×10^{-02}	Morn4	7.8	3.8×10^{-06}
Dcstamp	-4.7	1.4×10^{-02}	2410066E13Rik	7.4	1.3×10^{-06}
Itgb7	-4.7	2.0×10^{-02}	Fah	6.7	7.2×10^{-08}
Gata2	-4.5	1.5×10^{-02}	Hddc3	5.9	7.1×10^{-07}
Wdr54	-3.8	1.4×10^{-02}	Wdfy1	5.8	2.2×10^{-07}
Elmod3	-3.2	3.2×10^{-04}	Dkk2	4.9	2.7×10^{-05}
Gm15446	-2.9	5.3×10^{-03}	Cdo1	4.4	1.9×10^{-04}
Gm7799	-2.9	5.0×10^{-02}	Sh3d21	4.4	6.8×10^{-06}
Gpr68	-2.9	4.8×10^{-02}	Slco3a1	4.3	8.4×10^{-09}

Gene Symbol	FC	p (Corr)	Gene Symbol	FC	p (Corr)
Krt80	-2.9	2.5×10^{-02}	AC166773.1	3.9	4.1×10^{-06}
Mfge8	-2.7	2.4×10^{-02}	Gbp10	3.6	1.7×10^{-03}
Pde1c	-2.6	7.1×10^{-03}	Gpx3	3.5	2.6×10^{-04}
Galnt9	-2.5	3.5×10^{-02}	Gm13014	3.5	3.0×10^{-04}
Gm12895	-2.5	2.9×10^{-02}	Camk2b	3.5	1.6×10^{-03}
Gm14109	-2.5	2.6×10^{-03}	Pde2a	3.2	4.4×10^{-07}
Gm9746	-2.4	2.5×10^{-04}	Lrrc9	3.2	7.3×10^{-04}
Kalrn	-2.4	4.0×10^{-02}	Itm2a	3.0	2.9×10^{-04}
Il1rn	-2.4	1.8×10^{-02}	Xkr6	2.9	7.7×10^{-04}
Itpka	-2.3	5.4×10^{-05}	Rab4a	2.7	5.3×10^{-07}
Dnajb13	-2.3	3.5×10^{-02}	Pyroxd2	2.7	8.0×10^{-04}
Tnip3	-2.2	1.0×10^{-02}	AC123679.1	2.6	8.2×10^{-06}
Gpc1	-2.2	2.0×10^{-02}	Efcab7	2.4	3.6×10^{-04}
RP24-281K23.1	-2.1	7.1×10^{-03}	Prdm5	2.3	1.7×10^{-04}
Gm3788	-2.1	1.0×10^{-02}	Mageh1	2.2	9.8×10^{-04}
Gm9844	-2.1	1.0×10^{-02}	Mrph	2.2	1.5×10^{-03}
Tmsb10	-2.1	1.9×10^{-02}	Gm4772	2.2	3.8×10^{-04}
4931413K12Rik	-2.0	1.4×10^{-02}	Nnt	2.1	7.3×10^{-07}
D14Ert449e	-2.0	1.8×10^{-03}	Dhcr24	2.1	5.0×10^{-05}
RetSat	-2.0	2.9×10^{-04}	Syp	2.1	1.6×10^{-03}
RP23-291E6.5	-2.0	2.9×10^{-02}	Klra3	2.1	1.4×10^{-05}
Itgax	-1.9	4.0×10^{-02}	B130055M24Rik	2.0	6.3×10^{-04}
Ak4	-1.9	3.0×10^{-03}	C1qtnf6	2.0	6.1×10^{-05}
Csf1	-1.9	1.4×10^{-02}	Pdgfc	2.0	7.6×10^{-05}
Tiam1	-1.9	3.3×10^{-02}	AL627077.2	2.0	1.0×10^{-03}
Maff	-1.9	1.0×10^{-02}	Gm13228	2.0	9.8×10^{-09}
Cd52	-1.9	2.9×10^{-03}	Spr-ps1	2.0	5.8×10^{-04}
Zfp932	-1.8	1.6×10^{-02}	Neo1	1.9	9.7×10^{-04}
Gm11625	-1.8	3.4×10^{-02}	Tmem231	1.9	4.7×10^{-04}
Ide	-1.7	7.2×10^{-04}	Fam115a	1.9	6.3×10^{-04}
Dfna5	-1.7	1.4×10^{-02}	Usp11	1.8	9.5×10^{-04}
Sema4a	-1.7	1.2×10^{-02}	Aldh1l1	1.8	4.6×10^{-04}
Cldn26	-1.7	1.7×10^{-02}	Zcchc14	1.8	1.2×10^{-03}
Lanc12	-1.7	7.1×10^{-04}	Dynlt1b	1.8	6.8×10^{-04}
Blm	-1.7	4.3×10^{-02}	Dynlt1a	1.8	8.3×10^{-04}
Oit3	-1.7	4.0×10^{-02}	Ric3	1.7	6.4×10^{-04}
Cebpb	-1.7	3.1×10^{-02}	Slc40a1	1.7	7.9×10^{-05}
Hilpda	-1.6	1.3×10^{-02}	Ppp1r9a	1.7	2.6×10^{-04}

Gene Symbol	FC	p (Corr)	Gene Symbol	FC	p (Corr)
S100a8	-1.6	2.5×10^{-03}	Pbxip1	1.7	8.5×10^{-04}
Padi4	-1.6	1.9×10^{-02}	Dynlt1-ps1	1.6	1.5×10^{-04}
Ephx1	-1.6	1.3×10^{-02}	Cd59a	1.6	1.2×10^{-05}
Gm7665	-1.5	4.5×10^{-02}	Ms4a6b	1.6	4.9×10^{-05}
Entpd4	-1.5	2.9×10^{-04}	Sass6	1.6	1.3×10^{-04}
Gm11810	-1.5	4.2×10^{-02}	Plekha8	1.6	3.9×10^{-04}
Napsa	-1.5	3.1×10^{-02}	Cadm1	1.6	1.4×10^{-03}
Ifi30	-1.5	1.1×10^{-02}	Nradd	1.6	4.4×10^{-04}
Gm12854	-1.5	1.5×10^{-02}	AC113059.1	1.5	1.1×10^{-03}
Gm10108	-1.5	1.9×10^{-02}			

Gene Symbol	FC	p (Corr)	Gene Symbol	FC	p (Corr)
S100a8	-1.6	2.5×10^{-03}	Pbxip1	1.7	8.5×10^{-04}
Padi4	-1.6	1.9×10^{-02}	Dynlt1-ps1	1.6	1.5×10^{-04}
Ephx1	-1.6	1.3×10^{-02}	Cd59a	1.6	1.2×10^{-05}
Gm7665	-1.5	4.5×10^{-02}	Ms4a6b	1.6	4.9×10^{-05}
Entpd4	-1.5	2.9×10^{-04}	Sass6	1.6	1.3×10^{-04}
Gm11810	-1.5	4.2×10^{-02}	Plekha8	1.6	3.9×10^{-04}
Napsa	-1.5	3.1×10^{-02}	Cadm1	1.6	1.4×10^{-03}
Ifi30	-1.5	1.1×10^{-02}	Nradd	1.6	4.4×10^{-04}
Gm12854	-1.5	1.5×10^{-02}	AC113059.1	1.5	1.1×10^{-03}
Gm10108	-1.5	1.9×10^{-02}			

Az adatokat 3-3 vad, vagy RetSat null egérből differenciált BMDM-ekből nyertük. Néhány RetSat mRNS expressziót a RetSat null sejtekben is észleltünk. Ez azért lehet, mert a generációk során a knock-out egerekből csak a RetSat gén első exonját helyettesítette a neomycin rezisztenciakazetta, és ez átíródott a fennmaradó exonokkal együtt nem funkcionális RetSat mRNS-eket eredményezve.

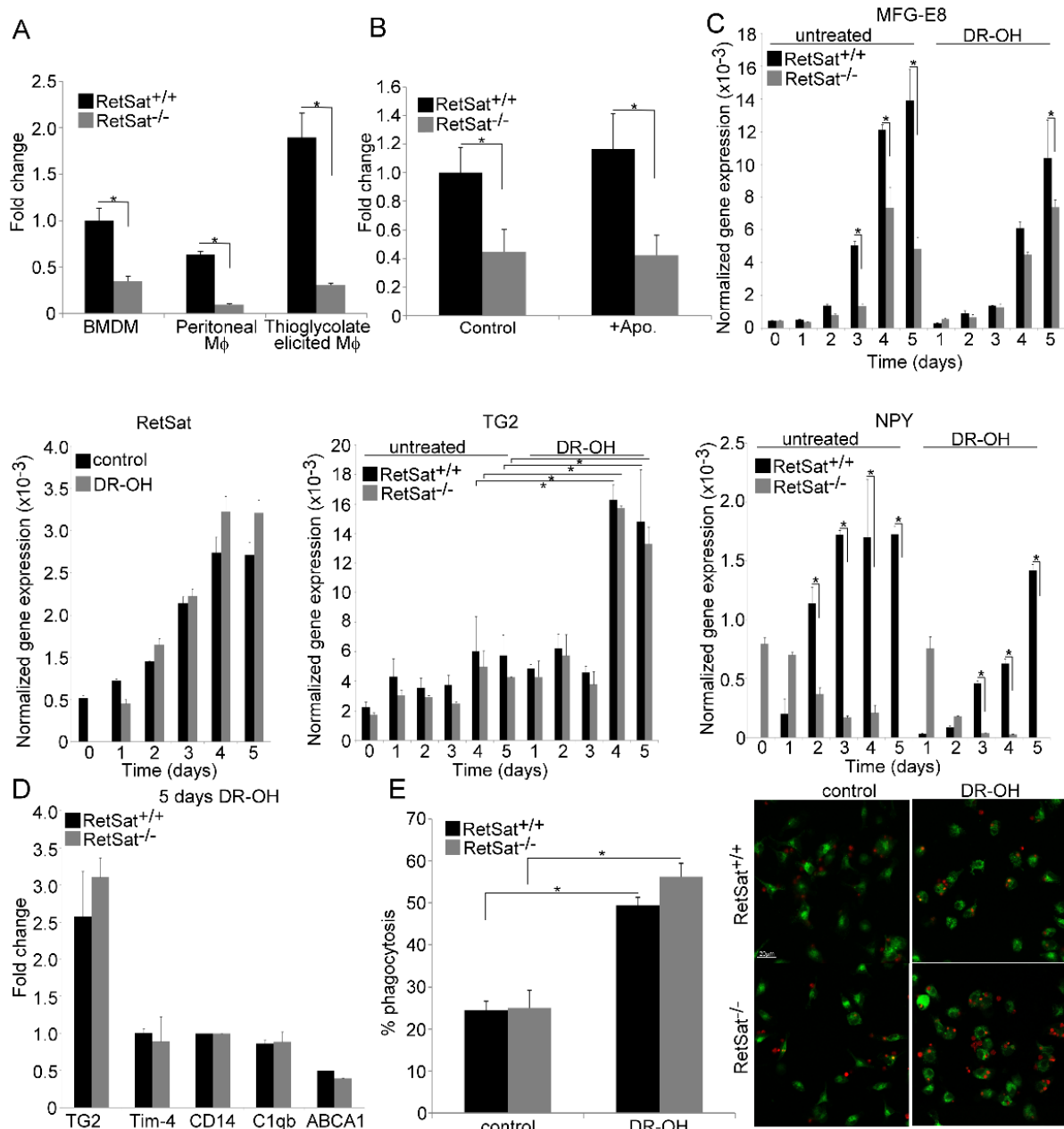
A funkcionális elemzés feltárta, hogy a monociták differenciációjával kapcsolatos gének szignifikánsan nagyobb számban vannak jelen a DEG-ek között (2. táblázat).

2. táblázat A 117 különbözőképpen expresszáldott gén génontológiai (GO) elemzése FRD: hamis találati arány Benjamini-Hochberg tesztel meghatározva (FRD <0,05)

GO-Term	Description	Count in Gene Set	FDR
GO:0061003	positive regulation of dendritic spine morphogenesis	4 of 23	0.0107
GO:0036006	cellular response to macrophage colony-stimulating factor stimulus	3 of 8	0.0126
GO:0045655	regulation of monocyte differentiation	3 of 17	0.0294
GO:0032502	developmental process	40 of 5213	0.0294

Az eredmények igazolása érdekében qRT-PCR segítségével meghatároztuk az MFG-E8 mRNS-expresszióját csontvelői eredetű, peritoneális és tioglikolát által stimulált peritoneális RetSat-null makrofágokban, és a vad típusú sejtekhez képest csökkent expressziót figyeltünk meg (17a. ábra). A csontvelői eredetű makrofágok vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy az apoptotikus sejtekkel való 5 órás inkubálás nem növelte az MFG-E8 expresszióját, de az MFG-E8 expresszióban kezdetben megfigyelt különbség állandó maradt (17b. ábra). Mivel az induláskor végzett elemzésünk azt jelezte, hogy néhány differenciációval összefüggő gén expressziója megváltozik a RetSat-null makrofágokban (2. táblázat), elhatároztuk, hogy megvizsgáljuk, változik-e az MFG-E8 expressziója a csontvelői eredetű monociták differenciálódása során, és a dihidroretinol adása módosítja-e ezt. Ahogy az a 17c. ábrán is látható, a vad típusú és a RetSat-null monociták MFG-E8-expressziójában nem volt különbség, és a monociták differenciálódása során mind a RetSat, mind az MFG-E8 expressziója indukálódott. Az MFG-E8 expressziójának beindulása azonban kevésbé volt erőteljes a RetSat-null sejtekben. Meglepő módon a dihidroretinol adásával nem tudtuk orvosolni az MFG-E8 indukciójában jelentkező defektust. Ezek az adatok azt jelzik, hogy a RetSatnak nem a monocita/makrofág differenciáció alatti dihidroretinol-termelése szabályozza az MFG-E8 expresszióját makrofágokban.

Bár nem találtunk különbséget a retinoiddal összefüggő gének expressziójában a RetSat-null csontvelői eredetű makrofágokban vad típusú makrofágokkal összehasonlítva (1. táblázat), kimutattuk, hogy dihidroretinol adása hatást gyakorol expressziójukra differenciálódásuk során. Ahogy az a 17c. ábrán is látható, a TG2 expressziója a monociták differenciálódása során emelkedett, és a dihidroretinol adása jelentősen fokozta az expresszióját. Semmi különbséget nem fedeztünk fel viszont a vad típusú és a RetSat-null sejtek TG2 expressziójában vagy a dihidroretinolra adott válasza között. Másrészt, a másik négy retinoid által szabályozott gén expressziója sem a vad típusú, sem a RetSat-null sejtek differenciálódása során nem indult meg dihidroretinol hatására (17d. ábra). Érdekes módon ezen gének indukciójának elmaradása ellenére a differenciálódás alatt adott dihidroretinol rövid távon fokozta a makrofágok fagocitózist, ahogyan azt a FACS elemzés és a konfokális mikroszkópia is kimutatta (17e. ábra). Mivel azonban dihidroretinol adása nélkül és adásával sem találtunk különbséget a vad típusú és a RetSat-null csontvelői eredetű makrofágok rövid távú fagocitózisa között, ezek az adatok azt jelzik, hogy bár a RetSat expressziója indukálódik a monocita/makrofág differenciáció során, dihidroretinoidok valószínűleg nem termelődnek jelentős mennyiségben.



17. ábra A RetSat hiánya számos makrofágtípusban csökkent MFG-E8 mRNS-expresszióhoz vezet

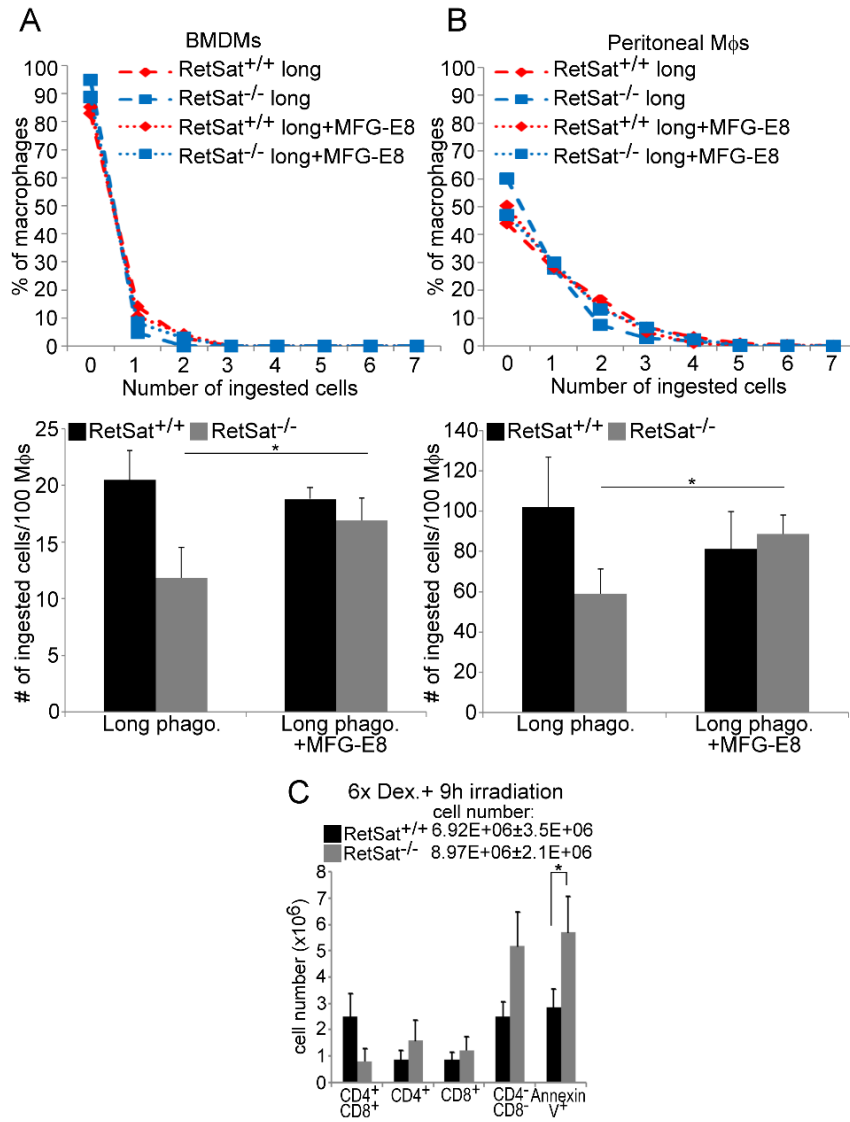
(a) Az MFG-E8 expressziója vad típusú és RetSat-null BMDM sejtekben, peritoneális makrofágokban és tioglikolát által stimulált makrofágokban. Ezeket a makrofágokat az Anyagok és módszerek c. részben leírtak szerint hoztuk létre. (b) Vad típusú és RetSat-null BMDM makrofágok relatív MFG-E8 mRNS-expressziója az efferocitózis előtt, illetve 5 órával azután, a sejtfelvételt nem végző, vad típusú BMDM sejtekkel összehasonlítva. (c) A RetSat, az MFG-E8, a TG2 és a NPY normalizált mRNS-expressziója vad típusú és RetSat-null monociták differenciációja során 1 μ M all-*transz*-13,14- dihidroretinol (DR-OH) jelenlétében vagy anélkül. (d) Retinoidokra érzékeny efferocitózis gének indukálása az ötnapos monocita differenciáció végén vad típusú és RetSat-null sejtekben 1 μ M all-*transz*-13,14- dihidroretinol jelenlétében, a vivőanyaggal kezelt kontroll sejtekhez viszonyítva. Az mRNS-expressziót ezen

kísérletek mindegyikében qRT-PCR segítségével határoztuk meg, normalizáló génként β -aktint használtunk. Az eredményeket átlag $\pm$ SD értéként tüntettük fel ($n = 4$), * $p < 0,05$. **(e)** 1 μ M all-*transz*-13,14-dihidroretinol jelenlétében vagy anélkül differenciáltatott vad típusú és RetSat-null BMDM sejtek rövid távú fagocitózisa. A bekebelezést végző makrofágok százalékos arányát áramlási citometriás elemzéssel határoztuk meg. Az eredményeket átlag $\pm$ SD értéként tüntettük fel ($n = 4$), * $p < 0,05$. Emellett az egyik reprezentatív konfokális mikroszkópos képet is feltüntettük. A CFDA-SE-vel jelölt makrofágok zöld sejtekként, míg a Deep Red festékkel jelölt apoptotikus timociták vörös sejtekként tűnnek fel. A bekebelezett apoptotikus timociták narancssárgának látszanak, mivel a zöld és a vörös színek átfednek egymással.

Mivel úgy találtuk, hogy a neuropeptid-Y (NPY) csak csekély mértékben fejeződik ki a RetSat-null makrofágokban (1. táblázat), viszont ismert, hogy az NPY segíti a makrofágok fenotípusának M2 irányba történő változását (Buttari és mtsai, 2017) ami fokozott fagocitotikus kapacitást eredményez (Zizzo és mtsai, 2012), megvizsgáltuk, hogy vajon a csökkent NPY-expresszió és az MFG-E8-termelés hiánya is kapcsolatban állhat-e mindezzel. Eredményeink szerint (17c. ábra) az NPY expresszió a vad típusú monocitákban alig fejeződik ki, de differenciálódása során indukálódik, a RetSat-null monociták differenciálódása során viszont meglepő módon downreguláció megy végbe. Ezt a jelenséget a dihidroretinol adása sem másította meg. Azt is megvizsgáltuk, hogy az NPY adása helyreállíthatja-e az MFG-E8 expresszió defektusát a monociták differenciálódása során. Azonban a neuropeptidnek a különféle NPY-receptorok serkentésére három különböző koncentrációban (10^{-10} , 10^{-9} és 10^{-8} M) történő alkalmazása sem változtatott az MFG-E8 kifejeződésén sem a vad típusú, sem a RetSat-null sejtekben.

7.2.4. Az MFG-E8 termelődésének alacsony szintje felelős a RetSat-null makrofágok hosszú távú fagocitózisának defektusáért

Azért, hogy bebizonyíthassuk, hogy az MFG-E8 termelődése felelős a RetSat-null makrofágok hosszú távú efferocitózisának defektusáért, hosszú távú fagocitózisuakat rekombináns MFG-E8 hiányában és jelenlétében is tanulmányoztuk. Ahogyan az a 18a. és b ábrán is látható, a rekombináns MFG-E8 adása helyreállította a hosszú távú fagocitózis defektusát a RetSat-null csontvelői eredetű és peritoneális makrofágok esetében, a vad típusú sejtek efferocitózisára viszont nem volt hatással.



18. ábra A RetSat-null makrofágok hibás efferocitózisa az elégtelen MFG-E8 termeléssel van összefüggésben

A vad típusú és RetSat-null (a) BMDM és (b) peritoneális makrofágok) hosszú távú efferocitózist 2 µg/ml rekombináns MFG-E8 fehérje jelenlétében, illetve hiányában is meghatároztuk. A CFDA-SE-vel jelölt makrofágokat Deep Red festékkel jelölt apoptotikus timocitákkal inkubáltunk 1 órán át úgy, hogy előtte 5 órán keresztül jelöletlen apoptotikus timocitákkal inkubáltuk őket, amely során folyamatosan vettek fel sejteket. A felvett sejtek számát konfokális mikroszkóp segítségével határoztuk meg. A felső panelek egy reprezentatív kísérletet mutatnak be: a felvett összes sejt számát az alsó panelek mutatják átlag ± SD értékként feltüntetve (n = 3). (c) négyhetes egerekbe 6 napon keresztül naponta 1 mg/kg DEX-et injektáltunk intraperitoneálisan, majd 0,5 Gy sugárzásnak tettük ki őket, hogy beindítsuk a timociták apoptózist. Nyolc óra múlva begyűjtöttük a timuszokat és FACS analízissel meghatároztuk a különböző timocita sejtpopulációk számát. Az eredményeket átlag ± SD értékként tüntettük fel (n = 4), * $p < 0,05$.

Ezek az adatok azt jelzik, hogy az apoptotikus sejtek hosszú távú fagocitózisának *in vitro* megfigyelt romlása valóban kapcsolatban áll a RetSat-null makrofágok MFG-E8 termelésében mutatkozó romlással. Korábbi tanulmányok kimutatták, hogy az MFG-E8 a tímusz makrofágjaiban nem termelődik, ezért nagyon kicsi a valószínűsége, hogy szerepet játszana az apoptotikus timociták eltakarításában (Hanayama és mtsai, 2004), ami talán megmagyarázza, miért nem figyeltünk meg efferocitózis zavarra jellemző fenotípust a RetSat-null egerek tímuszában. Arról is beszámoltak azonban, hogy az MFG-E8-null egerek tímuszában efferocitózisra jellemző fenotípus alakul ki, ha a makrofágok MFG-E8 expressziójának kiváltása érdekében egy hétig mindennap alacsony dózisu DEX-szel kezelik az állatokat, majd szigorúan csak azt követően, a tímusz apoptózisának beindítására röntgensugárzásnak teszik ki őket (Lauber és mtsai, 2013). RetSat-null egerek alkalmazásával mi megismételtük ezeket a kísérleteket (18c. ábra), és a besugárzás után jelentős növekedést tapasztaltunk mind a maradék összes sejt, mind az annexin-V pozitív sejtek számában, ami azt jelzi, hogy RetSat hiányában az eltávolításra nem került apoptotikus timociták felhalmozódása következik be, vagy esetleg a sejthalál intenzitása nőhetett meg.

7.2.5. A nőstény RetSat-null egerek hajlamosak enyhe szisztémás lupus erythematosus (SLE)-szerű autoimmunitás kialakulására

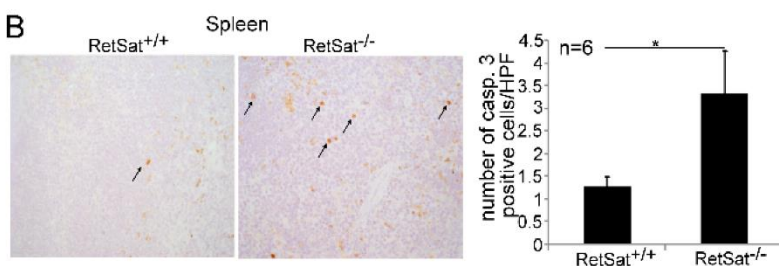
Jól ismert tény, hogy az apoptotikus sejtek eltakarításában mutatkozó romlás összefügg az SLE-szerű autoimmunitás kialakulása iránti fokozott érzékenységgel (Abdolmaleki és mtsai, 2018). Ez kapcsolatban áll azzal, hogy az eltávolításra nem kerülő apoptotikus sejtek szekunder nekrozison mennek keresztül és gyulladást váltanak ki. A belőlük felszabadult autoantigének autoantitestek képződését váltják ki, ahogy azt az egerek apoptotikus sejtekkel való sorozatos beoltása is demonstrálta (Mevorach és mtsai, 1998). Emellett a megfelelően lezajló fagocitózisnak számos gyulladáscsökkentő mechanizmust kellene kiváltania, amelyek zavart szenvednek, ha az efferocitózisban hiba lép fel. Az efferocitózis receptorokkal vagy hídképző molekulákkal nem rendelkező egerekre lépmegnagyobbodás, anti-DNS és antinukleáris autoantitestek jelenléte, valamint immunkomplexeknek a vesében történő, vesegyulladás (glomerulonephritishez) vezető lerakódása jellemző (Abdolmaleki és mtsai, 2018). A humán adatokhoz hasonlóan a nőstény egerek is fogékonyabbak az autoimmunitás kialakulására, mint a hímek (Weckerle és Niewold, 2011). Ha a RetSat hiánya *in vivo* rontja az apoptotikus sejtek makrofágok általi eltávolítását, akkor várhatóan a RetSat-null nőstény egerek is fogékonyabbak

az SLE-szerű autoimmunitás kialakulására. Ezért elhatároztunk, hogy 1 éves nőstény egerekben megvizsgálunk néhány autoimmunitásra utaló paraméter megjelenését.

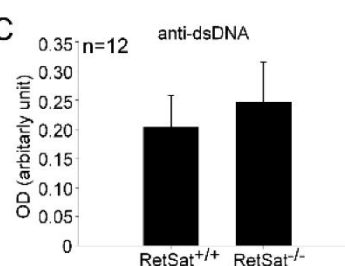
A



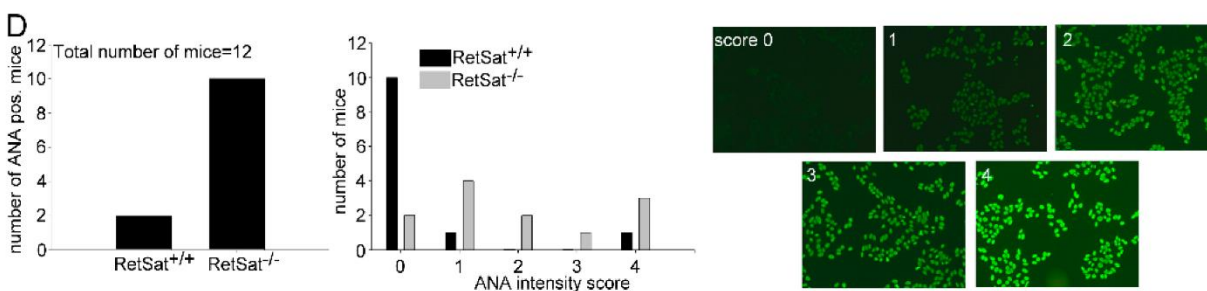
B



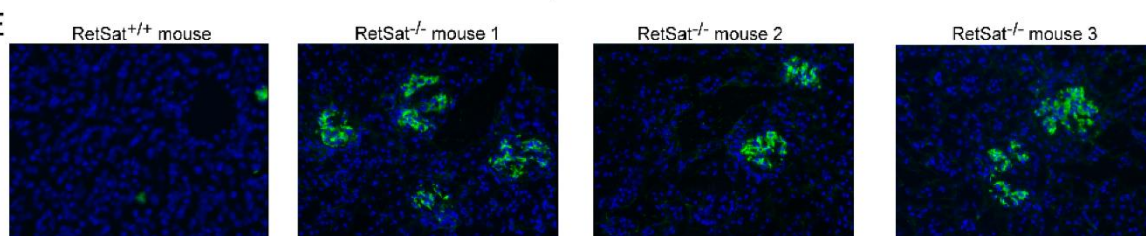
C



D



E



19. ábra Idős nőstény RetSat-null egerekben enyhe autoimmunitás alakul ki

(a) Egy éves nőstény vad típusú és RetSat-null egerek lépének tömege. * $p < 0,05$. (b) A hat-hat meggyobbodott léppel rendelkező vad típusú, illetve RetSat-null egér lépében található aktivált kaszpáz-3-pozitív sejtek immunhisztokémiai kimutatását az Anyagok és módszerek c. részben leírtak szerint hajtottuk végre. Az adatok a nagy nagyítású látóterekben található aktivált kaszpáz-3-pozitív sejtek átlag $\pm$ SD számát prezentálják. (c) A vad típusú és RetSat-null egerek szérumának anti-dsDNS antitestszintjét átlag $\pm$ SD értékként tüntettük fel. OD: optikai denzitás. (d) Antinukleáris antitestek (ANA) 12 vad típusú és 12 RetSat-null egér szérumában. A képek az ANA-kra jellemző fluoreszcencia intenzitást ábrázolják egy 0-tól 4-ig terjedő skálán. (e) Immunkomplex-lerakódások (zöld színnel

jelölve) idős nőstény RetSat-null egerek veséiben. A sejtmagok kék színűek a 4,6-diaminido-2-fenilindol (DAPI) festésnek köszönhetően.

Ahogy az az 19a. ábrán látható, a RetSat-null nőstény egerek lépének átlagos tömege jelentősen magasabb volt, mint a vad típusú nőstényeké, és a 12 RetSat-null egér közül 6 lépének nagyobb volt a tömege a kontrollokra megállapított átlagértéknél. Korábbi tanulmányok kimutatták, hogy az MFG-E8 hiányos egerekre jellemző lépmegnagyobbodás összefügg az apoptotikus sejteknek a csíráközpontok elhaló apoptotikus B-sejtjeit bekebelező, ún. „tingible body” makrofágok általi elégtelen felvételével (Hanayama és mtsai, 2004). Ha az apoptotikus sejteket nem sikerült teljesen eltakarítani, akkor hosszabb ideig is a szövetben maradnak, és az aktivált kaszpáz-3 pozitív sejtek száma megnő. Ezért meghatároztuk az aktivált kaszpáz-3 pozitív sejtek előfordulását a lépben, és a vad típusú kontrollokhoz képest a megnagyobbodott lépekben ennek jelentős növekedését tapasztaltuk a RetSat-null egér esetén (19b. ábra). Míg az anti-dsDNS antitest titereiben nem észleltünk jelentős növekedést (19c. ábra), a 12-ből 10 RetSat-null egér esetén antinukleáris antitestek termelődését mutattuk ki (19d. ábra). Az immunkomplex-lerakódások a megnagyobbodott léppel rendelkező egerek veséjében könnyen észrevehetőek voltak, míg a hat véletlenszerűen kiválasztott vad típusú egér veséjében, egyik esetben sem detektáltunk ilyen lerakódásokat (19e. ábra). A glomeruláris diszfunkciót a megnagyobbodott léppel rendelkező egerekben az urea magas szérumkoncentrációja jelezte (52-től > 100 mM-ig szemben a normál 11 ± 3 mM értékkel).

8. Megbeszélés

Disszertációmban az elhalt sejtek eltakarításának zavarát és a zavar patológiás következményeit vizsgáltam két knock out (TG2 hiányos, illetve RetSat hiányos) egértörzsben. Mivel a hipertrófiás zsírsejtek apoptózisa (Strissel és mtsai, 2007) és azok makrofágok általi eltakarítása (Alkhoury és mtsai, 2010) indítja el a metabolikus szindrómához vezető patológiás történések sorozatát, és a zavart sejteltakarítás alapját képezheti egy krónikus gyulladásnak, kérdésünk, hogy zavart lehet-e a zsírral teli adipociták eltávolítása kövérségben. Ennek a kérdésnek a megválaszolásához első lépésként azt teszteltük TG2 hiányos egerek bevonásával, amelyekben zavart az apoptotikus sejtek eltakarítása (Szondy és mtsai, 2003; Tóth és mtsai, 2009), hogy az eltakarítás genetikai zavara önmagában fokozhatja-e a magas zsírdiéta által indított patológiás folyamatokat. A HSD vagy HFD étrenden tartott egerekben a TG2 hiánya valóban elősegítette az elhízással összefüggő patológiás változások megjelenését, például a zsírszövet gyulladását, az adipociták sejthalálát, a zsírmáj kialakulását és az inzulinrezisztenciát. Kimutattuk, hogy ezt a csontvelői eredetű sejtek TG2-hiánya okozta. Viszont a kísérletek ezen pontján ráébredtünk, hogy nem sokat tudunk az elhalt adipociták eltakarításáról, valamint abban sem lehettünk biztosak, hogy szükséges-e a TG2 az elhalt adipociták eltakarításához is. Mivel a makrofágokról azt publikálták, hogy kizárólag holt adipocitákkal lépnek interakcióba, és a folyamat során aktin polimerizáció zajlik (Haka és mtsai, 2016), arra számítottunk, hogy a TG2 a lehetséges β_3 -integrin/apoptotikus adipocita interakció elősegítése révén kapcsolódhat be a folyamatba, mint ahogy azt a klasszikus efferocitózis folyamat során is teszi. Meglepetésünkre azonban azt tapasztaltuk, hogy az adipociták sejtelhalási programja sajátos módon zajlik. A sejtelhalás során külön választódik az adipocita lipidtartalma, amely foszfatidilszerin pozitív extracelluláris vezikulumokba kerül, és külön alakulnak ki az apoptotikus testek, amelyekben úgy tűnik, nincs tárolt lipid. A makrofágok, először a lipidtartalmú vezikulumokat veszik fel, amelyek a makrofágok lizoszómális exocitózisa során Haka és mtsai szerint akár egyből a lizoszómába is juthatnak (Haka és mtsai, 2016). Az elkészített videók alapján később képződnek és vevődnek fel az apoptotikus testek.

Érdekes módon a TG2 hiányos makrofágok sokkal hatékonyabbak a lipidtartalmú vezikulumok felvételében. Ismert, hogy a foszfatidilszerin pozitív extracelluláris vezikulumok felvétele történhet MFG-E8 és integrin β_3 receptorok segítségével (Morelli és mtsai, 2004), legalábbis dendritikus sejtekben. Mivel a TG2 hiányos makrofágok a TG2 hiányának

kompenzálására több integrin β_3 receptort fejeznek ki (Tóth és mtsai, 2009), elképzelhető, hogy ezek a vezikulumok integrin függő módon vevődnek fel, és a fokozott felvétel a fokozott integrin kifejeződés következménye. Ezt a hipotézist munkacsoportunk a továbbiakban tervezi tesztelni

Nemrégiben megjelent egy publikáció, amelyben arról számoltak be, hogy az élő adipociták is szabadítanak fel lipidtartalmú extracelluláris vezikulákat (exoszómákat), amelyeket a közelben lévő makrofágok felvesznek, metabolizálnak, továbbá ezen exoszómák hozzájárulnak a zsírszöveti makrofágok metabolikus átprogramozásához (Flaherty és mtsai, 2019). Mivel a TG2-null makrofágokban hatékonyabb a lizoszómális exocitózis, a holt adipociták csökkent eltakarítása nem magyarázza a TG2-null egerekben megfigyelt, HFD által kiváltott fenotípust, habár azt nem zárhatjuk ki, hogy a fokozott lipidfelvétel önmagában ne okozna gyulladást. Illetve azt sem, hogy az előre felvett sokkal több lipid nem verseng-e az elhalt sejtek felvételével. Azt azonban kimutattuk, hogy a metabolikusan aktivált TG2-null makrofágok fokozott β_3 -integrin/c-Src szignalizációjuknak (Janiak és mtsai, 2006) (Sarang és mtsai, 2011) köszönhetően több gyulladási citokint termelnek. Megfigyeléseink összhangban állnak más beszámolókkal, amelyek tanúsága szerint az $\alpha\beta_3$ -integrin szignalizáció NF κ B aktivációt válthat ki a makrofágokban (Antonov és mtsai, 2011), és a c-Src aktivitás makrofágokban számos gyulladási válasszal összefüggésben van (Byeon és mtsai, 2012).

Megfigyeléseink alapján a TG2-null makrofágokban mind a gyulladási citokinek termelése, mind a lizoszómális exocitózis fokozott mértékű. E folyamatokról tudjuk, hogy mindkettő TLR2-függő (Coats és mtsai, 2017). A TLR2 ligandjai diacil- és triacilglicerol részekkel rendelkező molekulák (Oliveira-Nascimento és mtsai, 2012). A β_3 -integrin a létrejött TLR2/TLR1 jelátviteli komplexek része, és a vitronektinhez kötött triacil-lipopeptid odatoborzása révén nélkülözhetetlen szerepet játszik a triacil-lipopeptid TLR2-hez kötődésében (Gerold és mtsai, 2008). Az $\alpha\beta_3$ -integrin szignalizáció ráadásul felerősítheti az MYD88-függő TLR2-szignalizációt is (Gianni és Campadelli-Fiume, 2014). Így a fokozott β_3 -integrin kifejeződés és szignalizáció ily módon is magyarázattal szolgálhat a TG2-null makrofágok fokozott lipid vezikulum felvevő képességére.

Mivel eredményeink szerint a TG2 hiányában megfigyelt változások HFD diétának kitett egerekben elsősorban a TG2 hiányos zsírszöveti makrofágok fokozott gyulladási válaszára vezethetők vissza, teszteltük, vajon a gyulladási válasz LXR agonista adásával történő leszorítása, revertálja-e a fenotípust. Az LXR kezelés hatására, valóban hasonló fenotípus alakult ki mint amelyet a klinikai tesztek során leírtak az LXR terápiáról, bár az LXR-nak számos egyéb hatását is detektáltuk mindkét (vad és TG2 hiányos) egerben. Így az LXR-

agonista kezelés mindkét típusú egérben megakadályozta a HFD által kiváltott elhízást. Ezen kívül, ahogyan arról már mások is beszámoltak (Gao és Liu, 2013), az LXR-agonistával kezelt vad típusú egerekben fokozott gWAT adipocita apoptózist és megnövekedett máj szteatózist mutattunk ki. De a szteatózis mértéke, a gyulladásos citokinek termelődése és az inzulin rezisztencia kisebb mértékű volt a TG2 hiányos egerekben, mint a LXR kezelést követően is.

Irodalmi adatok szerint az adipociták az LXR α LXR-agonista által kiváltott aktivációja a gonadális zsír gyarapodása elmaradását okozza. Amiről ismeretes, hogy a zsírszövetben elősegíti a lipolízist és a zsírsavak oxidációját (Zhang és mtsai, 2012), amely végül az adipociták számának csökkenéséhez vezet. Míg azonban az adipociták apoptózisának aránya (a Bid mRNS-expressziós szintjei alapján) nem volt magasabb az LXR-agonistával kezelt vad típusú egerekben mint a TG2 hiányos csontvelővel transzplantált egerekben, a szteatózis mértéke a májukban jelentősen nagyobb volt, mint azokban az LXR-agonistával kezelt egerekben, amelyek csontvelői eredetű sejtjeiből hiányzott a TG2. Korábbi tanulmányok felvetették, hogy az LXR-agonista által kiváltott máj szteatózist a hepatocita LXR α aktivációja eredményezi, amely beindítja a SREBP-c1-függő triacilglicerol-szintézist (Zhang és mtsai, 2012) (Schultz és mtsai, 2000). Megfigyeléseink tehát azt mutatják, hogy a TG2-null makrofágok, nagy valószínűséggel fokozott lipid vezikulum felvételük miatt, jobban meg tudják óvni az anyagcserét végző szöveteket a telített szabad zsírsavak ektópiás felhalmozódása által okozott károsodástól, ha a gyulladás bennük egyidejűleg gátolva van (Fitzgibbons és Czech, 2016).

A laboratóriumunkban korábban végzett kísérletek kimutatták, hogy az apoptotikus sejtek bekebelezése során retinoidok képződnek, mégpedig retinaldehid-dehidrogenázfüggő módon, amely számos efferocitózissal kapcsolatos gén működését fokozza és ezáltal a fagocitotikus kapacitás növekedését eredményezi a hosszú távú efferocitózis során. LC/MS/MS adataink alapján azt is feltételezhettük, hogy a képződött retinoidok a RetSat útvonal termékei lehetnek. A feltételezést alátámasztandó módon a RetSat enzim indukcióját kimutattuk mind *in vivo* az egerek tímuszában, a timociták apoptózisának elindulását követően, mind makrofágokban LXR aktivációját követően (Sarang és mtsai, 2014), habár a makrofágokban az enzim expressziója kb. 60-szor, alacsonyabb volt, mint a májban, illetve 20-szor alacsonyabb volt, mint a vesében, abban a két szervben, amely a legnagyobb mennyiségű RetSatot expresszálja (GeneAtlas). Az alacsony expresszió ellenére, kísérleteink eredményei azt mutatták, hogy a RetSat hiánya nem befolyásolja sem *in vivo*, sem *in vitro* a retinoid-függő fagocita kapcsolt gének indukcióját makrofágokban apoptotikus sejtek felvételét követően.

Ezért megvizsgáltuk, befolyásolja-e egyáltalán a RetSat hiánya egerekben az efferocitózist. Kísérleteinkben azt találtuk, hogy míg a rövid távú efferocitózist nem, a hosszú távú efferocitózist befolyásolja a RetSat hiánya. A RetSat hiányában differenciálódó makrofágok jelentősen kevesebb MFG-E8-at termelnek, mint vad típusú társaik. Az MFG-E8 egy 66 kDa-os glikoprotein, amely egy szekréciós szignálszekvenciát, két N-terminális epidermális növekedési faktor (EGF-et) domént, valamint két C-terminális diszkoidin domént tartalmaz, amelyek az V-ös és a VIII-as véralvadási faktorok C1 és C2 doménjeivel mutatnak homológiát. A második EGF domén egy arginin-glicin-aszparaginsav (RGD) integrinkötő motívumot tartalmaz, amely az $\alpha\beta_3/\alpha\beta_5$ -integrinekhez kapcsolódva elősegíti az integrin-mediált jelátvitelt, míg a C-terminális diszkoidin domének az apoptotikus sejteken lévő PS-hez kötődést közvetítik (Matsuda és mtsai, 2011). Ezáltal az MFG-E8 hídképző molekulaként szolgál az $\alpha\beta_3/\alpha\beta_5$ -integrinek számára az efferocitózis során, a β_3 -integrinhez kötődését pedig a TG2 még tovább segíti, amely koreceptorként szolgál a β_3 -integrin számára (Tóth és mtsai, 2009). Az MFG-E8 hiánya autoimmunitás kialakulásához vezet, amely specifikusan a csíráközpontok „tangible body” makrofágjai általi apoptotikus sejtfevételben fellépő hibának tulajdonítható (Hanayama és mtsai, 2002; 2004). Az általunk bemutatott adatok azt mutatják, hogy a RetSat-null egerekből származó makrofágok az MFG-E8-null makrofágokhoz hasonlóan viselkednek. Egy MFG-E8-null egerekkel kapcsolatos beszámolóval harmóniában (Michalski és mtsai, 2018) a rövid távú efferocitózis kísérletekben nem mutatkozott bennük defektus az efferocitózist illetően, viszont hosszú távon csökkent efferocitózist találtunk.

Úgy véljük, ez azzal magyarázható, hogy mivel a sejt kultúrás folyadékot elmoszuk, rövid távú fagocitózisonál nem érződik az elmosott MFG-E8 molekula hatása. Az MFG-E8 szekréciója azonban felgyorsul az apoptotikus sejtekkel való találkozásakor, ezért hatása érvényesül hosszú távú fagocitózis során. Ezzel összhangban a rekombináns MFG-E8 bejuttatása nem befolyásolta a vad típusú makrofágok általi hosszú távú efferocitózist, de a RetSat-null csontvelői eredetű makrofágok és peritoneális makrofágok esetében is fokozott efferocitózist eredményezett. Az MFG-E8 közvetítő szerepét támasztotta alá az a kísérlet is, amelyben az MFG-E8-expresszió kiváltására a tímuszban egy héten keresztül minden nap alacsony dózisu DEX-et adagoltunk, majd röntgensugárzásnak tettük ki az egereket nagyfokú timocita apoptózis és fagocitózis indításához. A RetSat-null egerek tímuszában – az MFG-E8-null egerekben tapasztaltakhoz hasonlóan – késleltetett efferocitózist detektáltunk (Lauber és mtsai, 2013).

Az MFG-E8-null egerekhez hasonlóan (Hanayama és mtsai, 2002) (Hanayama és mtsai, 2004), az idős nőstény RetSat-null egerekben is kialakul SLE-szerű autoimmunitás, amelyet a lép megnagyobbodása, a lépben az apoptotikus sejtek felhalmozódása, a vesében pedig antinukleáris antitestek és immunkomplex-lerakódások jelenléte jellemez. Irodalmi adatok alapján az elégtelen eltakarítás esetén az autoimmunitás nem csupán a szekunder nekrozison keresztülmenő apoptotikus sejtek felhalmozódása miatt alakul ki, hanem amiatt is, hogy az apoptotikus sejtek felvétele számos gyulladásgátló mechanizmust indít el, ami ilyenkor csorbát szenved. E tekintetben érdemes megemlíteni, hogy a RetSat-null makrofágokban nem termelődő MFG-E8 (Hanayama és mtsai, 2004), és az NPY (Dimitrijević és mtsai, 2008), egyaránt gyulladásgátló tulajdonságokkal bír. Továbbá, a bekebelezést végző makrofágokból származó MFG-E8 erősen hozzájárul a gyulladáskeltő makrofágok M2 polarizációjához (Soki és mtsai, 2014), a makrofágok megfelelő M2 polarizációja pedig szükséges ahhoz, hogy a gyulladás megszüntetésére irányuló folyamatok időben elindulhassanak (Atri és mtsai, 2018; Jinushi és mtsai, 2007). Érdekes módon a RetSat-null makrofágok csak kevés endogén CSF-1-et és Gpr68/OGR1-et fejeznek ki (1. táblázat), és ez ugyancsak csökkentheti az M2 polarizációra való képességüket, mivel a CSF-1 a makrofágok M2 irányú differenciálódását támogatja (Martinez és mtsai, 2006), míg a Gpr68-hiányos makrofágok kevesebb M2 markert fejeznek ki (Yan és mtsai, 2014).

Váratlan módon az MFG-E8 hiány következtében kapcsolatot találtunk a TG2 hiányos egerekkel folytatott kísérletek által kapott eredmények és a RetSat egerek másik fenotípusa, a fokozott kövérségi hajlam (Moise és mtsai, 2010) vonatkozásában is. Növekvő számú bizonyíték utal arra, hogy az $\alpha\beta3/\beta5$ -integrinekhez kötött MFG-E8 nemcsak, hogy az efferocitózist támogatja, de a zsírsavcserével is erősen összefügg. Az MFG-E8 fokozza a zsírsavak felvételét (Khalifeh-Soltani és mtsai, 2014), valamint az enterociták lipidanyagcseréjének szabályozásában is részt vesz (Khalifeh-Soltani és mtsai, 2016). A zsírszövet lipidanyagcseréjének körforgása során a zsírszöveti makrofágok folyamatosan veszik fel és metabolizálják az adipocitákból exoszómák formájában felszabaduló lipideket (Flaherty és mtsai, 2019). A PS-pozitív exoszómákon szintén találunk MFG-E8-at a sejtfelvétel elősegítésére (Raposo és Stoorvogel, 2013), és kísérleteink alapján feltételezzük, hogy az elhalt sejtekből felszabaduló lipid tartalmú vezikulumok is MFG-E8 függő módon vevődhetnek fel. Érdekes lehet eltöprengeni azon, hogy vajon ez a fenotípus összefüggésben állhat-e a zsírszöveti makrofágok csökkent MFG-E8 termelésével, amelyek így kevesebb extravezikuláris lipidet tudnak felvenni és metabolizálni.

Ismert, hogy a granulocita/monocita-stimuláló faktor serkenti a makrofágok MFG-E8 expresszióját (Jinushi és mtsai, 2007). A monociták differenciálódása során mi is tapasztaltuk az MFG-E8 mRNS-expressziójának fokozódását, ám ennek mértéke a RetSat-null makrofágokban csekélyebb volt, mint a vad típusúakban. Emellett megvizsgáltuk a dihidroretinol szerepét is, és azt találtuk, hogy a gén csökkent kifejeződése ebben a késői differenciációs folyamatban nem volt összefüggésbe hozható egy RetSat által mediált dihidroretinol-termeléssel. Adataink arra utalnak, hogy maga a RetSat hozzájárulhat az MFG-E8 általános expressziójának szabályozásához anélkül, hogy befolyásolná annak indukálhatóságát. Ebből a szempontból érdemes megjegyezni, hogy RetSat-null makrofágokban a GATA2 és a C/EBP β jelentősen csökkent expresszióját észleltük (1. táblázat). A GATA2 egy cink-ujj transzkripciós faktor, amely hozzájárul a monocita/makrofág differenciálódási folyamat helyes lezajlásához (Rodrigues és mtsai, 2008). A GATA2-ről kimutatták, hogy szabályozza a C/EBP β expresszióját (Rui és mtsai, 2013), míg a C/EBP β fokozza az MFG-E8 transzkripcióját (Aziz és mtsai, 2008). Mindezek mellett a RetSat hiánya nem csak az MFG-E8-ra, hanem más differenciációval kapcsolatos génekre is hatással van (1. táblázat). Mivel a monocita/makrofág differenciáció során dihidroretinol termelődésének nem láttuk nyomát, úgy véljük, hogy a RetSat vagy annak termékei egy korábbi fázisban befolyásolhatják a makrofágok differenciálódását, és ily módon más monocita-eredetű sejtek differenciálódására is hatással lehetnek. Ebben az összefüggésben érdemes megjegyezni, hogy a RetSat-null makrofágokban a főként dendritikus sejtekre jellemző transzmembrán fehérje (DC-STAMP) expressziója is alacsonyabb (1. táblázat). A DC-STAMP expresszióját nem határoztuk meg a monocita-eredetű dendritikus sejtekben, de a DC-STAMP-null egerek érzékenyebbek az autoimmunitás kialakulására, nagy valószínűséggel dendritikus sejtjeik megváltozott funkcióinak köszönhetően (Sawatani és mtsai, 2008). Ezért nem zárhatjuk ki azt, hogy a dendritikus sejtekben a DC STAMP esetlegesen módosított expressziója hozzájárulhat az autoimmunitás kialakulásához a RetSat-null egerekben.

Összefoglalóan, a disszertációmban bemutatott eredmények további bizonyítékot szolgáltatnak arra, hogy az elhalt sejtek megfelelő eltakarítása szükséges a szöveti homeosztázis fenntartásához, zavarai pedig krónikus gyulladással járó kórképek kialakulásához kapcsolható.

9. Összefoglalás

Korábbi tanulmányok kimutatták, hogy az apoptotikus sejtek eltávolításában mutatkozó zavar számos krónikus gyulladásos betegség kialakulásával kapcsolatba hozható (Fond és Ravichandran, 2016). Disszertációmban a krónikus gyulladások kialakulása és a nem megfelelő efferocitózis közötti kapcsolat több eddig nem ismeret elemét mutatom be két knock out (TG2, RetSat hiányos) egértörzs vizsgálatán keresztül.

A magas zsírdiétán tartott TG2 hiányos egértörzs tanulmányozása azt mutatta, hogy a TG2 hiánya fokozza a magas zsírdiétán tartott állatok patológiás elváltozásait úgy mint, gyulladásos citokin termelés, inzulin rezisztencia, zsírmáj kialakulása. Felfedeztük, hogy a zsírsejtek apoptózisa egyedi módon zajlik: az elhaló zsírsejtek lipidtartalmukat először foszfatidilszerin pozitív membránnal határolt lipid tartalmú extracelluláris vezikulumokba csomagolják és a makrofágok ezt veszik fel először, majd ezután képződnek a klasszikus apoptotikus testek. A TG2 hiányos makrofágok sokkal hatékonyabban veszik fel ezeket a vezikulákat, de lipidfelvétel hatására több gyulladásos citokint is termelnek. Úgy gondoljuk, hogy a fokozott gyulladásos hajlamot az okozza, hogy a TG2 hiányos makrofágok kompenzatórikusan több integrin β_3 receptort expresszálnak, a fokozza a gyulladásos citokinek termelését. A gyulladásos citokinek termelésének LXR agonista általi gátlása esetén magas zsírdiétán tartott TG2 hiányos egerekben a makrofágok általi hatékonyabb lipid vezikula felvétel csökkenti a perifériás szövetek ektópiás zsírterhelését.

Miközben a makrofágok apoptotikus sejteket fagocitálnak, fokozzák egyes fagocita receptoraik kifejeződését a hatékony fagocitózis fenntartására. Ezek egy része a makrofágok által termelt retinoidok hatására indukálódik. Bár előkísérleteink arra utaltak, hogy e retinoidok a RetSat útvonal termékei lehetnek, a RetSat hiánya nem befolyásolta a retinoid függő gének indukcióját. A RetSat hiányos makrofágok azonban mégsem tudják tökéletesen eltakarítani az elhaló sejteket, mert kevesebb a fagocitózisban szerepet játszó hídmolekulát (MFG-E8) termelnek, ami a makrofágok differenciálódási zavarának eredménye. Az MFG-E8 makrofágok általi csökkent termelődése miatt hosszú távon a nőstény egerek egy részében SLE szerű autoimmun betegség alakul ki. Feltételezzük, hogy a csökkent MFG-E8 termelés magyarázhatja ezen egerek másik fenotípusát a fokozott kövérségi hajlamot is, mivel az MFG-E8 esetleg hozzájárul a zsírsejtek által termelt lipid tartalmú vezikulák makrofágok általi felvételéhez és metabolizmusához, így csökkenti az adipociták zsírterhelését.

10. Summary

Previous studies have shown that a disorder in the removal of apoptotic cells is associated with the development of a number of chronic inflammatory diseases (Fond and Ravichandran, 2016). In my dissertation, I present several hitherto unknown elements of the relationship between the development of chronic inflammation and inadequate efferocytosis through the study of two knock out (TG2, RetSat deficient) mouse strains.

A study of the TG2-deficient mouse strain on a high-fat diet showed that TG2-deficient enhances pathological changes in animals on a high-fat diet such as inflammatory cytokine production, insulin resistance, and fatty liver development. We have discovered that the apoptosis of adipocytes occurs in a unique way: dying adipocytes first package their lipid content into lipid-containing extracellular vesicles bounded by a phosphatidylserine-positive membrane and the macrophages first take up this and then form the classical apoptosis. TG2-deficient macrophages take up these vesicles much more efficiently, but they also produce more inflammatory cytokines upon lipid uptake. The increased susceptibility to inflammation is thought to be due to the compensatory expression of multiple integrin $\beta 3$ receptors by TG2-deficient macrophages, which partly increases the production of inflammatory cytokines, partly as part of the TLR1 / 2 complex. In the case of chronic inhibition of inflammatory cytokine production by an LXR agonist, more efficient lipid vesicle uptake by macrophages in TG2-deficient mice maintained on a high-fat diet reduces ectopic fat loading in peripheral tissues. While macrophages phagocytose apoptotic cells, they increase the expression of some of their phagocyte receptors to maintain effective phagocytosis. Some of these are induced by retinoids produced by macrophages. Although our preliminary experiments suggested that these retinoids may be products of the RetSat pathway, the absence of RetSat did not affect the induction of retinoid-dependent genes. However, RetSat-deficient macrophages cannot completely clear dead cells because they produce fewer bridging molecules involved in phagocytosis (MFG-E8), resulting in a disorder of macrophage differentiation. Due to the reduced production of MFG-E8 by macrophages, some female mice develop SLE-like autoimmune disease in the long term. It is hypothesized that decreased MFG-E8 production may explain another phenotype in these mice as increased obesity, as MFG-E8 may contribute to the uptake and metabolism of lipid-containing vesicles produced by adipocytes by macrophages, thus reducing adipocyte fat load.

11. Irodalomjegyzék

Abdolmaleki F, Farahani N, Gheibi Hayat SM, Pirro M, Bianconi V, Barreto GE, Sahebkar A. 2018.

The Role of Efferocytosis in Autoimmune Diseases.

Front Immunol. 20;9:1645.

Abu-Abed S, Dollé P, Metzger D, Beckett B, Chambon P, Petkovich M. 2001.

The retinoic acid-metabolizing enzyme, CYP26A1, is essential for normal hindbrain patterning, vertebral identity, and development of posterior structures.

Genes Dev. 15(2):226-40.

A-Gonzalez N, Bensinger SJ, Hong C, Beceiro S, Bradley MN, Zelcer N, Deniz J, Ramirez C, Díaz 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(2):245-58.

Akakura S, Singh S, Spataro M, Akakura R, Kim JI, Albert ML, Birge RB. 2004.

The opsonin MFG-E8 is a ligand for the α v β 5 integrin and triggers DOCK180-dependent Rac1 activation for the phagocytosis of apoptotic cells.

Exp Cell Res. 292(2):403-16.

Akimov SS, Krylov D, Fleischman LF, Belkin AM. 2000.

Tissue transglutaminase is an integrin-binding adhesion coreceptor for fibronectin.

J Cell Biol. 148(4):825-38.

Alkhouri N, Gornicka A, Berk MP, Thapaliya S, Dixon LJ, Kashyap S, Schauer PR, Feldstein AE. 2010.

Adipocyte apoptosis, a link between obesity, insulin resistance, and hepatic steatosis.

J Biol Chem. 285(5):3428-38.

Amendola A, Gougeon ML, Poccia F, Bondurand A, Fésüs L, Piacentini M. 1996.

Induction of "tissue" transglutaminase in HIV pathogenesis: evidence for high rate of apoptosis of CD4⁺ T lymphocytes and accessory cells in lymphoid tissues.

Proc Natl Acad Sci U S A. 93(20):11057-62.

Antonov AS, Antonova GN, Munn DH, Mivechi N, Lucas R, Catravas JD, Verin AD. 2011.

α V β 3 integrin regulates macrophage inflammatory responses via PI3 kinase/Akt-dependent NF- κ B activation.

J Cell Physiol. 226(2):469-76.

Ashkenazi A, Dixit VM. 1998.

Death receptors: signaling and modulation.

Science. 281(5381):1305-8.

- Atri C, Guerfali FZ, Laouini D. 2018.
Role of Human Macrophage Polarization in Inflammation during Infectious Diseases.
Int J Mol Sci. 19(6).
- Aziz MM, Ishihara S, Rumi MA, Mishima Y, Oshima N, Kadota C, Moriyama I, Li YY, Rahman FB, Otani A, Oka A, Ishimura N, Kadowaki Y, Amano Y, Kinoshita Y. 2008.
Prolactin induces MFG-E8 production in macrophages via transcription factor C/EBP β -dependent pathway.
Apoptosis. 13(5):609-20.
- Barry M, Bleackley RC. 2002.
Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death.
Nat Rev Immunol. 2(6):401-9.
- Boisvert WA, Rose DM, Boullier A, Quehenberger O, Sydlaske A, Johnson KA, Curtiss LK, Terkeltaub R. 2006.
Leukocyte transglutaminase 2 expression limits atherosclerotic lesion size.
Arterioscler Thromb Vasc Biol. 26(3):563-9.
- Botto M. 1998.
C1q knock-out mice for the study of complement deficiency in autoimmune disease.
Exp Clin Immunogenet. 15(4):231-4.
- Budai Z, Ujlaky-Nagy L, Kis GN, Antal M, Bankó C, Bacsó Z, Szondy Z, Sarang Z. 2019.
Macrophages engulf apoptotic and primary necrotic thymocytes through similar phosphatidylserine-dependent mechanisms.
FEBS Open Bio. 9(3):446-456.
- Buttari B, Profumo E, Darcangelo D, Di Raimo T, Businaro R, Capoano R, Salvati B, Saso L, Elenkov I. 2017.
Neuropeptide Y as regulator of macrophage phenotype and functions: A neuroimmune CUE in atherosclerosis regression
Atherosclerosis. 263: e2.
- Byeon SE, Yi YS, Oh J, Yoo BC, Hong S, Cho JY. 2012.
The role of Src kinase in macrophage-mediated inflammatory responses.
Mediators Inflamm. 2012:512926.
- Chen W, Konkel JE. 2015.
Development of thymic Foxp3(+) regulatory T cells: TGF- β matters.
Eur J Immunol. 45(4):958-65.
- Cinti S, Mitchell G, Barbatelli G, Murano I, Ceresi E, Faloia E, Wang S, Fortier M, Greenberg AS, Obin MS. 2005.
Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans.
J Lipid Res. 46(11):2347-55.
- Coats BR, Schoenfelt KQ, Barbosa-Lorenzi VC, Peris E, Cui C, Hoffman A, Zhou G, Fernandez S, Zhai L, Hall BA, Haka AS, Shah AM, Reardon CA, Brady MJ, Rhodes CJ, Maxfield FR, Becker L. 2017.

Metabolically Activated Adipose Tissue Macrophages Perform Detrimental and Beneficial Functions during Diet-Induced Obesity.
Cell Rep. 20(13):3149-3161.

Cohen PL, Caricchio R, Abraham V, Camenisch TD, Jennette JC, Roubey RA, Earp HS, Matsushima G, Reap EA. 2002.
Delayed apoptotic cell clearance and lupus-like autoimmunity in mice lacking the c-mer membrane tyrosine kinase.
J Exp Med. 196(1):135-40.

De Laurenzi V, Melino G. 2001.
Gene disruption of tissue transglutaminase.
Mol Cell Biol. 21(1):148-55.

Devitt A, Parker KG, Ogden CA, Oldreive C, Clay MF, Melville LA, Bellamy CO, Lacy-Hulbert A, Gangloff SC, Goyert SM, Gregory CD. 2004.
Persistence of apoptotic cells without autoimmune disease or inflammation in CD14^{-/-} mice.
J Cell Biol. 167(6):1161-70.

Dib L, Bugge A, Collins S. 2014.
LXR α fuels fatty acid-stimulated oxygen consumption in white adipocytes.
J Lipid Res. 55(2):247-57.

Dimitrijević M, Stanojević S, Mitić K, Kustrimović N, Vujić V, Miletić T, Kovacević-Jovanović V. 2008.
The anti-inflammatory effect of neuropeptide Y (NPY) in rats is dependent on dipeptidyl peptidase 4 (DP4) activity and age.
Peptides. 29(12):2179-87.

Dong D, Ruuska SE, Levinthal DJ, Noy N. 1999.
Distinct roles for cellular retinoic acid-binding proteins I and II in regulating signaling by retinoic acid.
J Biol Chem. 274(34):23695-8.

Dong Y, Xu Z, Zhang Z, Yin X, Lin X, Li H, Zheng F. 2017.
Impaired adipose expansion caused by liver X receptor activation is associated with insulin resistance in mice fed a high-fat diet.
J Mol Endocrinol. 58(3):141-154.

Duester G. 2000.
Families of retinoid dehydrogenases regulating vitamin A function: production of visual pigment and retinoic acid.
Eur J Biochem. 267(14):4315-24.

Eckert RL. 2019.
Transglutaminase 2 takes center stage as a cancer cell survival factor and therapy target.
Mol Carcinog. 58(6):837-853.

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(7261):282-6.
- Elmore, S. 2007.
Apoptosis: a review of programmed cell death.
Toxicologic pathology. 35, 495-516.
- 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(6662):43-50.
- Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, Freed PW, Westcott JY, Henson PM. 1998.
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(4):890-8.
- 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 anti-inflammatory response elicited by apoptotic cell engulfment.
J Immunol. 174(11):7330-40.
- Faulds MH, Zhao C, Dahlman-Wright K. 2010.
Molecular biology and functional genomics of liver X receptors (LXR) in relationship to metabolic diseases.
Curr Opin Pharmacol. 10(6):692-7.
- Fésüs L, Piacentini M. 2002.
Transglutaminase 2: an enigmatic enzyme with diverse functions.
Trends Biochem Sci. 27(10):534-9.
- Fésüs L, Szondy Z. 2005.
Transglutaminase 2 in the balance of cell death and survival.
FEBS Lett. 579(15):3297-302.
- Fésüs L, Thomazy V, Falus A. 1987.
Induction and activation of tissue transglutaminase during programmed cell death.
FEBS Lett. 224(1):104-8.
- Fitzgibbons TP, Czech MP. 2016.
Emerging evidence for beneficial macrophage functions in atherosclerosis and obesity-induced insulin resistance.
J Mol Med (Berl). 94(3):267-75.
- Flaherty SE 3rd, Grijalva A, Xu X, Ables E, Nomani A, Ferrante AW Jr. 2019.
A lipase-independent pathway of lipid release and immune modulation by adipocytes.
Science. 363(6430):989-993.
- Folk JE, Chung SI. 1985.
Transglutaminases.
Methods Enzymol. 113:358-75.

- Fond AM, Ravichandran KS. 2016.
Clearance of Dying Cells by Phagocytes: Mechanisms and Implications for Disease Pathogenesis.
Adv Exp Med Biol. 930:25-49.
- Gao M, Liu D. 2013.
The liver X receptor agonist T0901317 protects mice from high fat diet-induced obesity and insulin resistance.
AAPS J. 15(1):258-66.
- 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(1):235-44.
- GeneAtlas MOE430, gcrma. (accessed on 14 October 2019)
Available online: <http://ds.biogps.org/?dataset=GSE10246&gene=67442>.
- Gerold G, Abu Ajaj K, Bienert M, Laws HJ, Zychlinsky A, de Diego JL. 2008.
A Toll-like receptor 2-integrin beta3 complex senses bacterial lipopeptides via vitronectin.
Nat Immunol. 9(7):761-8.
- Gianni T, Campadelli-Fiume G. 2014.
The epithelial $\alpha\text{v}\beta 3$ -integrin boosts the MYD88-dependent TLR2 signaling in response to viral and bacterial components.
PLoS Pathog. 10(11):e1004477.
- Goossens GH. 2017.
The Metabolic Phenotype in Obesity: Fat Mass, Body Fat Distribution, and Adipose Tissue Function.
Obes Facts. 10(3):207-215.
- Green DR, Oguin TH, Martinez J. 2016.
The clearance of dying cells: table for two.
Cell Death Differ. 23(6):915-26.
- 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(12):2613-25.
- Grenard P, Bresson-Hadni S, El Alaoui S, Chevallier M, Vuitton DA, Ricard-Blum S. 2001.
Transglutaminase-mediated cross-linking is involved in the stabilization of extracellular matrix in human liver fibrosis.
J Hepatol. 35(3):367-75.
- Gullicksen PS, Della-Fera MA, Baile CA. 2003.
Leptin-induced adipose apoptosis: Implications for body weight regulation.
Apoptosis. 8(4):327-35.
- Häcker H, Vabulas RM, Takeuchi O, Hoshino K, Akira S, Wagner H. 2000.
Immune cell activation by bacterial CpG-DNA through myeloid differentiation marker 88 and

- tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)6.
J Exp Med. 192(4):595-600.
- Hait NC, Oskeritzian CA, Paugh SW, Milstien S, Spiegel S. 2006.
Sphingosine kinases, sphingosine 1-phosphate, apoptosis and diseases.
Biochim Biophys Acta. 1758(12):2016-26.
- Haka AS, Barbosa-Lorenzi VC, Lee HJ, Falcone DJ, Hudis CA, Dannenberg AJ, Maxfield FR. 2016.
Exocytosis of macrophage lysosomes leads to digestion of apoptotic adipocytes and foam cell formation.
J Lipid Res. 57(6):980-92.
- Haka AS, Grosheva I, Chiang E, Buxbaum AR, Baird BA, Pierini LM, Maxfield FR. 2009.
Macrophages create an acidic extracellular hydrolytic compartment to digest aggregated lipoproteins.
Mol Biol Cell. 20(23):4932-40.
- 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(6885):182-7.
- Hanayama R, Tanaka M, Miyasaka K, Aozasa K, Koike M, Uchiyama Y, Nagata S. 2004.
Autoimmune disease and impaired uptake of apoptotic cells in MFG-E8-deficient mice.
Science. 304(5674):1147-50.
- Hang J, Zemskov EA, Lorand L, Belkin AM. 2005.
Identification of a novel recognition sequence for fibronectin within the NH2-terminal beta-sandwich domain of tissue transglutaminase.
J Biol Chem. 280(25):23675-83.
- Hasegawa G, Suwa M, Ichikawa Y, Ohtsuka T, Kumagai S, Kikuchi M, Sato Y, Saito Y. 2003.
A novel function of tissue-type transglutaminase: protein disulphide isomerase.
Biochem J. 373(Pt 3):793-803.
- Hausman DB, DiGirolamo M, Bartness TJ, Hausman GJ, Martin RJ. 2001.
The biology of white adipocyte proliferation.
Obes Rev. 2(4):239-54.
- Heidenreich S, Witte N, Weber P, Goehring I, Tolkachov A, von Loeffelholz C, Döcke S, Bauer M, Stockmann M, Pfeiffer AFH, Birkenfeld AL, Pietzke M, Kempa S, Muenzner M, Schupp M. 2017.
Retinol saturase coordinates liver metabolism by regulating ChREBP activity.
Nat Commun. 8(1):384.
- Henson PM, Tudor RM. 2008.
Apoptosis in the lung: induction, clearance and detection.
Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 294(4):L601-11.

- Heyman RA, Mangelsdorf DJ, Dyck JA, Stein RB, Eichele G, Evans RM, Thaller C. 1992. 9-cis retinoic acid is a high affinity ligand for the retinoid X receptor. *Cell*. 68(2):397-406.
- Holzer RG, Park EJ, Li N, Tran H, Chen M, Choi C, Solinas G, Karin M. 2011. Saturated fatty acids induce c-Src clustering within membrane subdomains, leading to JNK activation. *Cell*. 147(1):173-84.
- Hsieh YF, Liu GY, Lee YJ, Yang JJ, Sándor K, Sarang Z, Bononi A, Pinton P, Tretter L, Szondy Z, Tsay GJ. 2013. Transglutaminase 2 contributes to apoptosis induction in Jurkat T cells by modulating Ca²⁺ homeostasis via cross-linking RAP1GDS1. *PLoS One*. 8(12):e81516.
- Ignely, FH, Krammer, PH. 2002. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nature reviews. Cancer*. 2, 277-288.
- Janiak A, Zemskov EA, Belkin AM. 2006. Cell surface transglutaminase promotes RhoA activation via integrin clustering and suppression of the Src-p190RhoGAP signaling pathway. *Mol Biol Cell*. 17(4):1606-19.
- Jeitner TM, Battaile K, Cooper AJ. 2013. γ -Glutamylamines and neurodegenerative diseases. *Amino Acids*. 44(1):129-42.
- Jinushi M, Nakazaki Y, Dougan M, Carrasco DR, Mihm M, Dranoff G. 2007. MFG-E8-mediated uptake of apoptotic cells by APCs links the pro- and antiinflammatory activities of GM-CSF. *J Clin Invest*. 117(7):1902-13.
- Johnson AR, Qin Y, Cozzo AJ, Freemerman AJ, Huang MJ, Zhao L, Sampey BP, Milner JJ, Beck MA, Damania B, Rashid N, Galanko JA, Lee DP, Edin ML, Zeldin DC, Fueger PT, Dietz B, Stahl A, Wu Y, Mohlke KL, Makowski L. 2016. Metabolic reprogramming through fatty acid transport protein 1 (FATP1) regulates macrophage inflammatory potential and adipose inflammation. *Mol Metab*. 5(7):506-526.
- Joós G, Jákím J, Kiss B, Szamosi R, Papp T, Felszeghy S, Sággy T, Nagy G, Szondy Z. 2017. Involvement of adenosine A3 receptors in the chemotactic navigation of macrophages towards apoptotic cells. *Immunol Lett*. 183:62-72.
- Jung UJ, Choi MS. 2014. Obesity and its metabolic complications: the role of adipokines and the relationship between obesity, inflammation, insulin resistance, dyslipidemia and nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Sci*. 15(4):6184-223.

Kanda H, Tateya S, Tamori Y, Kotani K, Hiasa K, Kitazawa R, Kitazawa S, Miyachi H, Maeda S, Egashira K, Kasuga M. 2006.
MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity.
J Clin Invest. 116(6):1494-505.

Kershaw EE, Flier JS. 2004.
Adipose tissue as an endocrine organ.
J Clin Endocrinol Metab. 89(6):2548-56.

Khalifeh-Soltani A, Gupta D, Ha A, Iqbal J, Hussain M, Podolsky MJ, Atabai K. 2016.
Mfge8 regulates enterocyte lipid storage by promoting enterocyte triglyceride hydrolase activity.
JCI Insight. 1(18):e87418.

Khalifeh-Soltani A, McKleroy W, Sakuma S, Cheung YY, Tharp K, Qiu Y, Turner SM, Chawla A, Stahl A, Atabai K. 2014.
Mfge8 promotes obesity by mediating the uptake of dietary fats and serum fatty acids.
Nat Med. 20(2):175-83.

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(7029):93-9.

Kinchen JM, Ravichandran KS. 2008.
Phagosome maturation: going through the acid test.
Nat Rev Mol Cell Biol. 9(10):781-95.

Kliewer SA, Umesono K, Mangelsdorf DJ, Evans RM. 1992.
Retinoid X receptor interacts with nuclear receptors in retinoic acid, thyroid hormone and vitamin D3 signalling.
Nature. 355(6359):446-9.

Kojima S, Nara K, Rifkin DB. 1993.
Requirement for transglutaminase in the activation of latent transforming growth factor-beta in bovine endothelial cells.
J Cell Biol. 121(2):439-48.

Kraakman MJ, Kammoun HL, Allen TL, Deswaerte V, Henstridge DC, Estevez E, Matthews VB, Neill B, White DA, Murphy AJ, Peijs L, Yang C, Risis S, Bruce CR, Du XJ, Bobik A, Lee-Young RS, Kingwell BA, Vasanthakumar A, Shi W, Kallies A, Lancaster GI, Rose-John S, Febbraio MA. 2015.
Blocking IL-6 trans-signaling prevents high-fat diet-induced adipose tissue macrophage recruitment but does not improve insulin resistance.
Cell Metab. 21(3):403-16.

Kratz M, Coats BR, Hisert KB, Hagman D, Mutskov V, Peris E, Schoenfelt KQ, Kuzma JN, Larson I, Billing PS, Landerholm RW, Crouthamel M, Gozal D, Hwang S, Singh PK, Becker L. 2014.

Metabolic dysfunction drives a mechanistically distinct proinflammatory phenotype in adipose tissue macrophages.
Cell Metab. 20(4):614-25.

Krężel W, Rühl R, de Lera AR. 2019.
 Alternative retinoid X receptor (RXR) ligands.
Mol Cell Endocrinol. 491:110436.

Kronlage M, Song J, Sorokin L, Isfort K, Schwerdtle T, Leipziger J, Robaye B, Conley PB, Kim HC, Sargin S, Schön P, Schwab A, Hanley PJ. 2010.
 Autocrine purinergic receptor signaling is essential for macrophage chemotaxis.
Sci Signal. 3(132):ra55.

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(6):717-30.

Lauber K, Keppeler H, Munoz LE, Koppe U, Schröder K, Yamaguchi H, Krönke G, Uderhardt S, Wesselborg S, Belka C, Nagata S, Herrmann M. 2013.
 Milk fat globule-EGF factor 8 mediates the enhancement of apoptotic cell clearance by glucocorticoids.
Cell Death Differ. 20(9):1230-40.

Leventis PA, Grinstein S. 2010.
 The distribution and function of phosphatidylserine in cellular membranes.
Annu Rev Biophys. 39:407-27.

Lewis MJ, Botto M. 2006.
 Complement deficiencies in humans and animals: links to autoimmunity.
Autoimmunity. 39(5):367-78.

Li S, Sun Y, Liang CP, Thorp EB, Han S, Jehle AW, Saraswathi V, Pridgen B, Kanter JE, Li R, Welch CL, Hasty AH, Bornfeldt KE, Breslow JL, Tabas I, Tall AR. 2009.
 Defective phagocytosis of apoptotic cells by macrophages in atherosclerotic lesions of ob/ob mice and reversal by a fish oil diet.
Circ Res. 105(11):1072-82.

Lorand L, Graham RM. 2003.
 Transglutaminases: crosslinking enzymes with pleiotropic functions.
Nat Rev Mol Cell Biol. 4(2):140-56.

Maeda K, Cao H, Kono K, Gorgun CZ, Furuhashi M, Uysal KT, Cao Q, Atsumi G, Malone H, Krishnan B, Minokoshi Y, Kahn BB, Parker RA, Hotamisligil GS. 2005.
 Adipocyte/macrophage fatty acid binding proteins control integrated metabolic responses in obesity and diabetes.
Cell Metab. 1(2):107-19.

- Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schütz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans RM. 1995.
The nuclear receptor superfamily: the second decade.
Cell. 83(6):835-9.
- Martinez FO, Gordon S, Locati M, Mantovani A. 2006.
Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression.
J Immunol. 177(10):7303-11.
- Martinez J. 2017.
Prix Fixe: Efferocytosis as a Four-Course Meal.
Curr Top Microbiol Immunol. 403:1-36.
- Matsuda A, Jacob A, Wu R, Zhou M, Nicastro JM, Coppa GF, Wang P. 2011.
Milk fat globule-EGF factor VIII in sepsis and ischemia-reperfusion injury.
Mol Med. 17(1-2):126-33.
- Mattson MP. 2000.
Apoptosis in neurodegenerative disorders.
Nat Rev Mol Cell Biol. 1(2):120-9.
- Mevorach D, Zhou JL, Song X, Elkon KB. 1998.
Systemic exposure to irradiated apoptotic cells induces autoantibody production.
J Exp Med. 188(2):387-92.
- Michalski MN, Seydel AL, Siismets EM, Zweifler LE, Koh AJ, Sinder BP, Aguirre JI, Atabai K, Roca H, McCauley LK. 2018.
Inflammatory bone loss associated with MFG-E8 deficiency is rescued by teriparatide.
FASEB J. 32(7):3730-3741.
- Miksa M, Amin D, Wu R, Jacob A, Zhou M, Dong W, Yang WL, Ravikumar TS, Wang P. 2008.
Maturation-induced down-regulation of MFG-E8 impairs apoptotic cell clearance and enhances endotoxin response.
Int J Mol Med. 22(6):743-8.
- Mishra S, Melino G, Murphy LJ. 2007.
Transglutaminase 2 kinase activity facilitates protein kinase A-induced phosphorylation of retinoblastoma protein.
J Biol Chem. 282(25):18108-15.
- Miyanishi M, Tada K, Koike M, Uchiyama Y, Kitamura T, Nagata S. 2007.
Identification of Tim4 as a phosphatidylserine receptor.
Nature. 450(7168):435-9.
- Moise AR, Alvarez S, Domínguez M, Alvarez R, Golczak M, Lobo GP, von Lintig J, de Lera AR, Palczewski K. 2009.
Activation of retinoic acid receptors by dihydroretinoids.
Mol Pharmacol. 76(6):1228-37.

- Moise AR, Domínguez M, Alvarez S, Alvarez R, Schupp M, Cristancho AG, Kiser PD, de Lera AR, Lazar MA, Palczewski K. 2008.
Stereospecificity of retinol saturase: absolute configuration, synthesis, and biological evaluation of dihydroretinoids.
J Am Chem Soc. 130(4):1154-5.
- Moise AR, Golczak M, Imanishi Y, Palczewski K. 2007.
Topology and membrane association of lecithin: retinol acyltransferase.
J Biol Chem. 282(3):2081-90.
- Moise AR, Kuksa V, Imanishi Y, Palczewski K. 2004.
Identification of all-trans-retinol:all-trans-13,14-dihydroretinol saturase.
J Biol Chem. 279(48):50230-42.
- Moise AR, Lobo GP, Erokku B, Wilson DL, Peck D, Alvarez S, Domínguez M, Alvarez R, Flask CA, de Lera AR, von Lintig J, Palczewski K. 2010.
Increased adiposity in the retinol saturase-knockout mouse.
FASEB J. 24(4):1261-70.
- Monsonago A, Friedmann I, Shani Y, Eisenstein M, Schwartz M. 1998.
GTP-dependent conformational changes associated with the functional switch between Galpha and cross-linking activities in brain-derived tissue transglutaminase.
J Mol Biol. 282(4):713-20.
- Morelli AE, Larregina AT, Shufesky WJ, Sullivan ML, Stolz DB, Papworth GD, Zahorchak AF, Logar AJ, Wang Z, Watkins SC, Falo LD Jr, Thomson AW. 2004.
Endocytosis, intracellular sorting, and processing of exosomes by dendritic cells.
Blood. 104(10):3257-66.
- Muñoz LE, Janko C, Schulze C, Schorn C, Sarter K, Schett G, Herrmann M. 2010.
Autoimmunity and chronic inflammation - two clearance-related steps in the etiopathogenesis of SLE.
Autoimmun Rev. 10(1):38-42.
- Murano I, Barbatelli G, Parisani V, Latini C, Muzzonigro G, Castellucci M, Cinti S. 2008.
Dead adipocytes, detected as crown-like structures, are prevalent in visceral fat depots of genetically obese mice.
J Lipid Res. 49(7):1562-8.
- Myneni VD, Melino G2, Kaartinen MT1,3. 2015.
Transglutaminase 2--a novel inhibitor of adipogenesis.
Cell Death Dis. 6:e1868.
- Nagy L, Thomázy VA, Chandraratna RA, Heyman RA, Davies PJ. 1996.
Retinoid-regulated expression of BCL-2 and tissue transglutaminase during the differentiation and apoptosis of human myeloid leukemia (HL-60) cells.
Leuk Res. 20(6):499-505.
- Nagy L, Thomázy VA, Saydak MM, Stein JP, Davies PJ. 1997.
The promoter of the mouse tissue transglutaminase gene directs tissue-specific, retinoid-

regulated and apoptosis-linked expression.
Cell Death Differ. 4(7):534-47.

Nakaoka H, Perez DM, Baek KJ, Das T, Husain A, Misono K, Im MJ, Graham RM. 1994.
Gh: a GTP-binding protein with transglutaminase activity and receptor signaling function.
Science. 264(5165):1593-6.

Nakaya M, Tanaka M, Okabe Y, Hanayama R, Nagata S. 2006.
Opposite effects of rho family GTPases on engulfment of apoptotic cells by macrophages.
J Biol Chem. 281(13):8836-42.

Napoli JL. 1999.
Interactions of retinoid binding proteins and enzymes in retinoid metabolism.
Biochim Biophys Acta. 1440(2-3):139-62.

Nardacci R, Lo Iacono O, Ciccocanti F, Falasca L, Addesso M, Amendola A, Antonucci G, Craxì A, Fimia GM, Iadevaia V, Melino G, Ruco L, Tocci G, Ippolito G, Piacentini M. 2003.
Transglutaminase type II plays a protective role in hepatic injury.
Am J Pathol. 162(4):1293-303.

Niesler CU, Ursø B, Prins JB, Siddle K. 2000.
IGF-I inhibits apoptosis induced by serum withdrawal, but potentiates TNF-alpha-induced apoptosis, in 3T3-L1 preadipocytes.
J Endocrinol. 167(1):165-74.

Nishiura H, Shibuya Y, Yamamoto T. 1998.
S19 ribosomal protein cross-linked dimer causes monocyte-predominant infiltration by means of molecular mimicry to complement C5a.
Lab Invest. 78(12):1615-23.

O'Brien BA, Fieldus WE, Field CJ, Finegood DT. 2002.
Clearance of apoptotic beta-cells is reduced in neonatal autoimmune diabetes-prone rats.
Cell Death Differ. 9(4):457-64.

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(6):781-95.

Oliveira-Nascimento L, Massari P, Wetzler LM. 2012.
The Role of TLR2 in Infection and Immunity.
Front Immunol. 3:79.

Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. 2011.
Adipokines in inflammation and metabolic disease.
Nat Rev Immunol. 11(2):85-97.

Pajvani UB, Trujillo ME, Combs TP, Iyengar P, Jelicks L, Roth KA, Kitsis RN, Scherer PE. 2005.
Fat apoptosis through targeted activation of caspase 8: a new mouse model of inducible and

reversible lipoatrophy.
Nat Med. 11(7):797-803.

Park D, Tosello-Tramont AC, Elliott MR, Lu M, Haney LB, Ma Z, Klivanov AL, Mandell JW, Ravichandran KS. 2007.

BAI1 is an engulfment receptor for apoptotic cells upstream of the ELMO/Dock180/Rac module.

Nature. 450(7168):430-4.

Park SY, Jung MY, Kim HJ, Lee SJ, Kim SY, Lee BH, Kwon TH, Park RW, Kim IS. 2008.
Rapid cell corpse clearance by stabilin-2, a membrane phosphatidylserine receptor.
Cell Death Differ. 15(1):192-201.

Piacentini M, Autuori F, Dini L, Farrace MG, Ghibelli L, Piredda L, Fésüs L. 1991.
"Tissue" transglutaminase is specifically expressed in neonatal rat liver cells undergoing apoptosis upon epidermal growth factor-stimulation.
Cell Tissue Res. 263(2):227-35.

Piacentini M, Baiocchi A, Del Nonno F, Melino G, Barlev NA, Rossin F, D'Eletto M, Falasca L. 2018.

Non-alcoholic fatty liver disease severity is modulated by transglutaminase type 2.
Cell Death Dis. 9(3):257.

Piredda L, Amendola A, Colizzi V, Davies PJ, Farrace MG, Fraziano M, Gentile V, Uray I, Piacentini M, Fésüs 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(6):463-72.

Poon IK, Lucas CD, Rossi AG, Ravichandran KS. 2014.
Apoptotic cell clearance: basic biology and therapeutic potential.
Nat Rev Immunol. 14(3):166-80.

Prins JB, Niesler CU, Winterford CM, Bright NA, Siddle K, O'Rahilly S, Walker NI, Cameron DP. 1997.

Tumor necrosis factor- α induces apoptosis of human adipose cells.
Diabetes. 46(12):1939-44.

Qi R, Huang J, Wang Q, Liu H, Wang R, Wang J, Yang F. 2018.
MicroRNA-224-5p regulates adipocyte apoptosis induced by TNF α via controlling NF- κ B activation.
J Cell Physiol. 233(2):1236-1246.

Rahmatullah M, Boyde TR. 1980.
Improvements in the determination of urea using diacetyl monoxime; methods with and without deproteinisation.
Clin Chim Acta. 107(1-2):3-9.

Ramirez-Ortiz ZG, Pendergraft WF 3rd, Prasad A, Byrne MH, Iram T, Blanchette CJ, Luster AD, Hacohen N, El Khoury J, Means TK. 2013.
The scavenger receptor SCARF1 mediates the clearance of apoptotic cells and prevents

- autoimmunity.
Nat Immunol. 14(9):917-26.
- Raposo G, Stoorvogel W. 2013.
Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends.
J Cell Biol. 200(4):373-83.
- Ritter SJ, Davies PJ. 1998.
Identification of a transforming growth factor-beta1/bone morphogenetic protein 4 (TGF-beta1/BMP4) response element within the mouse tissue transglutaminase gene promoter.
J Biol Chem. 273(21):12798-806.
- Rodolfo C, Mormone E, Matarrese P, Ciccocanti F, Farrace MG, Garofano E, Piredda L, Fimia GM, Malorni W, Piacentini M. 2004.
Tissue transglutaminase is a multifunctional BH3-only protein.
J Biol Chem. 279(52):54783-92.
- Rodrigues NP, Boyd AS, Fugazza C, May GE, Guo Y, Tipping AJ, Scadden DT, Vyas P, Enver T. 2008.
GATA-2 regulates granulocyte-macrophage progenitor cell function.
Blood. 112(13):4862-73.
- Rosales C, Uribe-Querol E. 2017.
Phagocytosis: A Fundamental Process in Immunity.
Biomed Res Int. 2017:9042851.
- Rose DM, Fadok VA, Riches DW, Clay KL, Henson PM. 1995.
Autocrine/paracrine involvement of platelet-activating factor and transforming growth factor-beta in the induction of phosphatidylserine recognition by murine macrophages.
J Immunol. 155(12):5819-25.
- Rui W, Jin Z, Zhe G, Song H. 2013.
The methylation of C/EBP β gene promoter and regulated by GATA-2 protein.
Mol Biol Rep. 40(2):797-801.
- Rühl R. 2006.
Method to determine 4-oxo-retinoic acids, retinoic acids and retinol in serum and cell extracts by liquid chromatography/diode-array detection atmospheric pressure chemical ionisation tandem mass spectrometry.
Rapid Commun Mass Spectrom. 20(16):2497-504.
- Sándor K, Daniel B, Kiss B, Kovács F, Szondy Z. 2016.
Transcriptional control of transglutaminase 2 expression in mouse apoptotic thymocytes.
Biochim Biophys Acta. 1859(8):964-74.
- Sándor K, Pallai A, Duró E, Legendre P, Couillin I, Sághy 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. 49(3):671-681.

- Sarang Z, Joós G, Garabuczi É, Rühl R, Gregory CD, Szondy Z. 2014.
Macrophages engulfing apoptotic cells produce nonclassical retinoids to enhance their phagocytic capacity.
J Immunol. 192(12):5730-8.
- 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 $\alpha v \beta 3$ integrin-induced Src tyrosine kinase signaling.
Immunol Lett. 138(1):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(10):1842-4.
- 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(4):1513-22.
- Sawatani Y, Miyamoto T, Nagai S, Maruya M, Imai J, Miyamoto K, Fujita N, Ninomiya K, Suzuki T, Iwasaki R, Toyama Y, Shinohara M, Koyasu S, Suda T. 2008.
The role of DC-STAMP in maintenance of immune tolerance through regulation of dendritic cell function.
Int Immunol. 20(10):1259-68.
- Scaffidi C, Schmitz I, Krammer PH, Peter ME. 1999.
The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis.
J Biol Chem. 274(3):1541-8.
- Schulman IG. 2017.
Liver X receptors link lipid metabolism and inflammation.
FEBS Lett. 591(19):2978-2991.
- Schultz JR, Tu H, Luk A, Repa JJ, Medina JC, Li L, Schwendner S, Wang S, Thoolen M, Mangelsdorf DJ, Lustig KD, Shan B. 2000.
Role of LXRs in control of lipogenesis.
Genes Dev. 14(22):2831-8.
- Schupp M, Lefterova MI, Janke J, Leitner K, Cristancho AG, Mullican SE, Qatanani M, Szwegold N, Steger DJ, Curtin JC, Kim RJ, Suh MJ, Albert MR, Engeli S, Gudas LJ, Lazar MA. 2009.
Retinol saturase promotes adipogenesis and is downregulated in obesity.
Proc Natl Acad Sci U S A. 106(4):1105-10.
- Scott RS, McMahon EJ, Pop SM, Reap EA, Caricchio R, Cohen PL, Earp HS, Matsushima GK. 2001.
Phagocytosis and clearance of apoptotic cells is mediated by MER.
Nature. 411(6834):207-11.

- Seimon T, Tabas I. 2009.
Mechanisms and consequences of macrophage apoptosis in atherosclerosis.
J Lipid Res. S382-7.
- Shi H, Kokoeva MV, Inouye K, Tzameli I, Yin H, Flier JS. 2006.
TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance.
J Clin Invest. 116(11):3015-25.
- Shih TW, Lin TH, Shealy YF, Hill DL. 1997.
Nonenzymatic isomerization of 9-cis-retinoic acid catalyzed by sulfhydryl compounds.
Drug Metab Dispos. 25(1):27-32.
- Shin DJ, Joshi P, Hong SH, Mosure K, Shin DG, Osborne TF. 2012.
Genome-wide analysis of FoxO1 binding in hepatic chromatin: potential involvement of FoxO1 in linking retinoid signaling to hepatic gluconeogenesis.
Nucleic Acids Res. 40(22):11499-509.
- Simon T, Pinioti S, Schellenberger P, Rajeev V, Wendler F, Cutillas PR, King A, Stebbing J, Giamas G. 2018.
Shedding of bevacizumab in tumour cells-derived extracellular vesicles as a new therapeutic escape mechanism in glioblastoma.
Mol Cancer. 17(1):132.
- Slee EA, Adrain C, Martin SJ. 2001.
Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis.
J Biol Chem. 276(10):7320-6.
- Soki FN, Koh AJ, Jones JD, Kim YW, Dai J, Keller ET, Pienta KJ, Atabai K, Roca H, McCauley LK. 2014.
Polarization of prostate cancer-associated macrophages is induced by milk fat globule-EGF factor 8 (MFG-E8)-mediated efferocytosis.
J Biol Chem. 289(35):24560-72.
- Song H, Chang W, Lim S, Seo HS, Shim CY, Park S, Yoo KJ, Kim BS, Min BH, Lee H, Jang Y, Chung N, Hwang KC. 2007.
Tissue transglutaminase is essential for integrin-mediated survival of bone marrow-derived mesenchymal stem cells.
Stem Cells. 25(6):1431-8.
- Starr TK, Jameson SC, Hogquist KA. 2003.
Positive and negative selection of T cells.
Annu Rev Immunol. 139-76.
- Strissel KJ, Stancheva Z, Miyoshi H, Perfield JW 2nd, DeFuria J, Jick Z, Greenberg AS, Obin MS. 2007.
Adipocyte death, adipose tissue remodeling, and obesity complications.
Diabetes. 56(12):2910-8.

- Szegezdi E, Szondy Z, Nagy L, Nemes Z, Friis RR, Davies PJ, Fésüs L. 2000.
Apoptosis-linked *in vivo* regulation of the tissue transglutaminase gene promoter.
Cell Death Differ. 7(12):1225-33.
- Szondy Z, Garabuczi E, Joós G, Tsay GJ, Sarang Z. 2014.
Impaired clearance of apoptotic cells in chronic inflammatory diseases: therapeutic implications.
Front Immunol. 1;5:354.
- Szondy Z, Molnar P, Nemes Z, Boyiadzis M, Kedei N, Tóth R, Fésüs L. 1997.
Differential expression of tissue transglutaminase during *in vivo* apoptosis of thymocytes induced via distinct signalling pathways.
FEBS Lett. 404(2-3):307-13.
- 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, Fésüs L. 2003.
Transglutaminase 2^{-/-} mice reveal a phagocytosis-associated crosstalk between macrophages and apoptotic cells.
Proc Natl Acad Sci U S A. 100(13):7812-7.
- Theodosiou M, Laudet V, Schubert M. 2010.
From carrot to clinic: an overview of the retinoic acid signaling pathway.
Cell Mol Life Sci. 67(9):1423-45.
- Thomázy V, Fésüs L. 1989.
Differential expression of tissue transglutaminase in human cells. An immunohistochemical study.
Cell Tissue Res. 255(1):215-24.
- 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(4):2084-92.
- Tóth B, Sarang Z, Vereb G, Zhang A, Tanaka S, Melino G, Fésüs L, Szondy Z. 2009.
Over-expression of integrin beta3 can partially overcome the defect of integrin beta3 signaling in transglutaminase 2 null macrophages.
Immunol Lett. 126(1-2):22-8.
- Trapani JA, Smyth MJ. 2002.
Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway.
Nat Rev Immunol. 2(10):735-47.

- 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. Blood. 112(13):5026-36.
- Tsujimoto Y1, Shimizu S. 2000. Bcl-2 family: life-or-death switch. FEBS Lett. 466(1):6-10.
- Upchurch HF, Conway E, Patterson MK Jr, Maxwell MD. 1991. Localization of cellular transglutaminase on the extracellular matrix after wounding: characteristics of the matrix bound enzyme. J Cell Physiol. 149(3):375-82.
- Van Herck JL, Schrijvers DM, De Meyer GR, Martinet W, Van Hove CE, Bult H, Vrints CJ, Herman AG. 2010. Transglutaminase 2 deficiency decreases plaque fibrosis and increases plaque inflammation in apolipoprotein-E-deficient mice. J Vasc Res. 47(3):231-40.
- Weckerle CE, Niewold TB. 2011. The unexplained female predominance of systemic lupus erythematosus: clues from genetic and cytokine studies. Clin Rev Allergy Immunol. 40(1):42-9.
- Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr. 2003. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. J Clin Invest. 112(12):1796-808.
- Wellen KE, Hotamisligil GS. 2003. Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. J Clin Invest. 112(12):1785-8.
- Willy PJ, Umesono K, Ong ES, Evans RM, Heyman RA, Mangelsdorf DJ. 1995. LXR, a nuclear receptor that defines a distinct retinoid response pathway. Genes Dev. 9(9):1033-45.
- Wu BX, Moiseyev G, Chen Y, Rohrer B, Crouch RK, Ma JX. 2004. Identification of RDH10, an All-trans Retinol Dehydrogenase, in Retinal Muller Cells. Invest Ophthalmol Vis Sci. 45(11):3857-62.
- Xu X, Grijalva A, Skowronski A, van Eijk M, Serlie MJ, Ferrante AW Jr. 2013. Obesity activates a program of lysosomal-dependent lipid metabolism in adipose tissue macrophages independently of classic activation. Cell Metab. 18(6):816-30.
- Yan L, Singh LS, Zhang L, Xu Y. 2014. Role of OGR1 in myeloid-derived cells in prostate cancer. Oncogene. 33(2):157-64.
- Yoshida H, Kong YY, Yoshida R, Elia AJ, Hakem A, Hakem R, Penninger JM, Mak TW. 1998.

Apaf1 is required for mitochondrial pathways of apoptosis and brain development.
Cell. 94(6):739-50.

Zhang Y, Breevoort SR, Angdisen J, Fu M, Schmidt DR, Holmstrom SR, Kliewer SA, Mangelsdorf DJ, Schulman IG. 2012.

Liver LXR α expression is crucial for whole body cholesterol homeostasis and reverse cholesterol transport in mice.
J Clin Invest. 122(5):1688-99.

Ziouzenkova O, Orasanu G, Sharlach M, Akiyama TE, Berger JP, Viereck J, Hamilton JA, Tang G, Dolnikowski GG, Vogel S, Duester G, Plutzky J. 2007.

Retinaldehyde represses adipogenesis and diet-induced obesity.
Nat Med. 13(6):695-702.

Zizzo G, Hilliard BA, Monestier M, Cohen PL. 2012.

Efficient clearance of early apoptotic cells by human macrophages requires M2c polarization and MerTK induction.
J Immunol. 189(7):3508-20.

12. Tárgyszavak

apoptózis

efferocitózis

fagocitózis

inzulinrezisztencia

krónikus gyulladás

lizoszomális exocitózis

LXR

MFGE-8

obezitás

retinoidok

retinol-szaturáz

SLE

szteatózis

TG2

13. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani **Szondy Zsuzsa** témavezetőmnek, a munkámba vetett bizalmáért, a szakmai és jellemformáló iránymutatásáért.

Hálával és köszönettel tartozom **Köröskényi Krisztinának**, aki barátian támogatott, és akihez bármikor fordulhattam tanácsért, szakmai segítségért. A közös munka nagyon hiányozni fog.

Sarang Zsolt szakmai segítségért és támogatásáért is nagyon hálás vagyok, nélküle nem tarthatnék a doktori disszertációm megírásánál.

Köszönettel tartozom **Kiss Beátának** a szakmai segítségért és a PhD. képzés évei alatt tőle kapott támogatásért.

Budai Zsófiának köszönettel tartozom a kísérletek kivitelezéséhez nyújtott szakmai segítségért és a konferenciák, tanulmányutak során közösen szerzett élményekért.

Bacsó Zsoltnak és **Bankó Csabának** köszönöm a szakmai tanácsokat és az építő jellegű gondolatokat.

Köszönöm **Pap Attilának** és az egész **Kísérleti Állatháznak** a kitartó, támogató munkát.

Hálás vagyok az **Anatómiai Szövet- és Fejlődéstani Intézet munkatársainak** a szövettani vizsgálatokhoz nyújtott segítségért.

Tózsér Józsefnek köszönöm, hogy a Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézetben végezhettem el a disszertációmhoz szükséges kísérleteket.

Ezúton szeretnék köszönetet mondani mindazoknak, akik támogattak abban, hogy ez a munkám létrejöhessen. Köszönöm a páromnak, családomnak, egyetemi barátaimnak, kollégáimnak, tanáraimnak és a szigorlati vizsgabizottság tagjainak, akik emberileg és szakmailag is mellettem álltak.

A szakmai munka anyagi háttérét a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal és **GINOP-2.3.2-15-2016-00006** pályázati forrása biztosította. PhD ösztöndíjamat a Debreceni Egyetem Fogorvosi Doktori Iskolájának PhD programja biztosította.

14. Közlemények



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/72/2020.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Sággy Tibor

Neptun kód: T62TN8

Doktori Iskola: Fogorvostudományi Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Sággy, T.**, Köröskényi, K., Hegedűs, K., Antal, M., Bankó, C., Bacsó, Z., Papp, A., Stienstra, R., Szondy, Z.: Loss of Transglutaminase 2 Sensitizes for DietInduced Obesity-Related Inflammation and Insulin Resistance due to Enhanced Macrophage c-Src Signaling. *Cell Death Dis.* 10, 1-14, 2019.
IF: 5.959 (2018)
2. 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)





További közlemények

3. Sándor, K., Pallai, A., Duró, E., Legendre, P., Couillin, I., **Sághy, T.**, Szondy, Z.: 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. 49 (3), 671-681, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00726-016-2257-5>
IF: 2.906
4. Joós, G., Jakim, J., Kiss, B., Szamosi, R., Papp, T., Felszeghy, S. B., **Sághy, T.**, Szemán-Nagy, G., Szondy, Z.: Involvement of adenosine A3 receptors in the chemotactic navigation of macrophages towards apoptotic cells.
Immunol. Lett. 183, 62-72, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2017.02.002>
IF: 2.436

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 15,995

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
10,653**

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

Debrecen, 2020.03.05.

