

Doktori (PhD) értekezés tézisei

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

A KRÓNIKUS GYULLADÁSOK KIALAKULÁSA ÉS A NEM MEGFELELŐ EFFEROCITÓZIS KÖZÖTTI KAPCSOLAT VIZSGÁLATA KÉT EGÉRMODELLBEN

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
a klinikai orvostudományok tudományágban

Írta: **Sághy Tibor**

okleveles molekuláris biológus

Készült a Debreceni Egyetem Fogorvostudományi doktori iskola keretében

Témavezető: Prof. Dr. Szondy Zsuzsa az MTA doktora

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Matesz Klára, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Dombrádi Viktor, az MTA doktora
Ifj. Prof. Dr. Gallyas Ferenc, az MTA doktora

A doktori szigorlat időpontja:

Debreceni Egyetem FOK, Konzerváló Fogászati Tanszék
2018. december 13. 13 óra

Az értekezés bírálói: Prof. Dr. Berki Tímea, az MTA doktora
Dr. Lányi Árpád, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Nánási Péter, az MTA doktora
tagok: Ifj. Prof. Dr. Gallyas Ferenc, az MTA doktora
Prof. Dr. Dombrádi Viktor, az MTA doktora

Az értekezés védésének (online formátumban) időpontja:

2020.11.06. 13:00

A nyilvánosságot online módon biztosítjuk. Amennyiben részt kíván venni, úgy jelezze a saghy.tibor@med.unideb.hu e-mail címre küldött üzenetben a vitát megelőző munkanap (2020. november 5.) 16 óráig.

1. Bevezetés

Apoptotikus mechanizmusok eredményeképpen naponta több millió 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 (autoimmunitás, 2-es típusú diabétesz és az elhízás). Az elmúlt évtizedekben az elhalt sejtek eltakarításáról kialakult látásmódunk nagyban kibővült. Jelentős számú közlemény született, amely az efferocitózis összetett jelátviteli folyamatait tárta fel. Ennek ellenére még mindig számos eleme ismeretlen maradt. 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. Laborunk korábbi eredményeit összegezve 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, hogy a retinol szaturáz enzim hiánya befolyásolja-e az efferocitózis folyamatát retinol szaturáz hiányos egerekben, amelyek egyébként fokozottan halmoznak fel zsírt normál diétán tartva is.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. 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 túl nagy sejtekben élettani jelentőségű, hiszen a program lehetővé teszi, hogy az elhaló sejt szabályozottan membránnal határolt kis darabokra essen szét és így bekebeleződhessen. 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 mediált citotoxicitás mechanizmusával működő 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 tartalmazznak 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 receptorához 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, a kaszpáz-8 vagy a kaszpáz-10 molekulákból épül fel. A kaszpáz-8 autokatalízisével a folyamat csatlakozik a terminális útvonalhoz. Az extrinsic útvonalat a cFLIP fehérje szabályozza a FADD és kaszpáz-8 molekulához kötődve (Scaffidi és mtsai, 1999).

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

A különböző ingerek hatására a mitokondriális pórusok kinyílnak és pro-apoptotikus fehérjék szabadulnak ki a mitokondriumból. Az egyik ilyen fehérjecsoport tagja a citokróm C, a Smac/DIABLO (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 Smac/DIABLO és a HtrA2/Omi az IAP apoptózis inhibitorokat gátolják ezzel indukálva a sejthalált (Yoshida és mtsai, 1998).

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 szenitizált CD8⁺ T sejtek képesek megölni az antigéneket hordozó sejteket. Ezek a sejtek nemcsak extrinsic útvonalon halálreceptorok aktivációjával, hanem egy az eddiektől 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) (Alkhouiri és mtsai, 2010), de ehhez hozzájárulhat a metabolikusan aktivált makrofágok által termelt TNF α is (Kratz és mtsai, 2014).

2.2. 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 eliminálja az sejttesteket és limitálja a potenciálisan károsító anyagok kibocsátását 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 receptorokhoz kötődve (Kronlage és mtsai, 2010; Joós és mtsai, 2017). A nukleotidok kibocsátásához szükséges a pannexin 1 csatorna kaspáz-3 általi aktiválódása az apoptotikus sejteken. Az apoptotikus sejtek lizofoszfatidil-kolin és a szfingozin-1-foszfát molekulák szekretálásával képesek monocitákat apoptotikus sejtekhez vonzani (Lauber és mtsai, 2003; Hait és mtsai, 2006). Bizonyos molekulák, köztük az intercelluláris adhézios molekula 3 (ICAM3) és a CX3C-kemokin-ligandum 1 proteolitikusan hasított formája (CX3CL1) 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 megakadályozza a neutrofil kemotaxist és aktivációt, valamint több sejtípusnál megfigyelték megemelkedett expresszióját apoptózis indukcióját követően (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 foszfatidil-szerin plazmamembrán külső felszínére történő expozíciója, mely a nekrozissal ellentétben aktív enzimatis kaszpáz-függő mechanizmussal valósul meg (Leventis és Grinstein, 2010). Az externalizált foszfatidilszerint 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-al (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 „egyél meg” molekulákat is (CD31, a CD47 és a CD61), melyek gátolják a bekebelezést. Ezek apoptotikus sejtekről hiányoznak (Martinez, 2017). A receptorok némelyike, például a Tim-4 vagy a CD14 (Devitt és mtsai, 2004), az elhaló sejtekkel való összekapcsolódásban játszik 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 $\beta3$ 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 (Miyanishi 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 serleg, 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. A membrán a kontaktus helyén benyomódik, ezáltal létrejön a fagocitikus serleg. 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. 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 mannoz-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).

2.3. Az efferocitózis zavara és a betegségek kapcsolata

Az efferocitózis zavara egyes autoimmun kórképek tekintetében vált a leginkább ismertté. Egyes 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) tüneteirehasonló 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 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 sejtartalmuk a szövetekbe kikerülve gyulladást indít, másrészt a zavart efferocitózis gyakran társul valamely az efferocitózissal aktivált gyulladásos folyamatot gátló mechanizmus zavarával is (Szondy és mtsai, 2014).

2.4. 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 hisztamin 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.

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 (Monsonog 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 integrinekkel is; közvetlen nemkovalens kölcsönhatást alakít ki ugyanis az integrin β_1 és β_3 alegységeivel, valamint stabil hármas komplexeket képez az integrinekkel 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 klaszterekbe történő rendeződését és módosíthatja az integrin jelátviteli útvonalat (Akimov és mtsai, 2000).

2.5. 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 indítója 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-limfocitáiban 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, vagy túlaktiválása indította az apoptózis programot, azáltal, hogy bizonyos fehérjéket keresztkötött (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 sejtben 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 tünetet nem mutatott

(Boisvert és mtsai 2006). Saját laborunk megfigyelései szerint ez várható is volt, mivel egér timociták olyan szignálokra, amelyek indítják *in vivo* mind a TG2 kifejeződését, mind az apoptózist, elhaltak *in vitro* is. Ugyanakkor *in vitro* bennük a TG2 nem indukálódott (Szegezdi és mtsai, 2000).

A TG2 null egereken laborunkban végzett vizsgálatok azonban kimutatták, hogy bár a TG2 egyértelműen nem szükséges az apoptotikus program elindulásához, az apoptotikus sejtek helyesen lezajló fagocitóziséhez igenis szükség van rá. Noha az apoptotikus sejtek részéről a TG2 hozzájárulhat a fagocitózishoz a foszfatidilszerin sejt felszínre kihelyeződésének elősegítése (Sarang és mtsai, 2007), illetve a makrofágok számára kemotaktikus faktorként szolgáló S19 ribonukleáris fehérje keresztkötése révén (Nishiura és mtsai, 1998), a fő defektust a makrofágokban találjuk. Ez részben a TGF- β 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 sejt felszínén 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 citoskeletális újrendeződését. 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 keresztkötése 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 gyulladást okozó 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 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).

2.6. A TG2 kifejeződésének szabályozása egér timocitákban

A TG2 *in vivo* expressziója az elhaló timocitákban transzkripciós szinten szabályozott, amelyet az bizonyít, hogy olyan egerekben, amelyek a béta-galaktozidáz riporter gént hordozzák a TG2 promóter egy 3,8 kb nagyságú fragmentjének 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) efferocitózis 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 laborunk megtalálja és karakterizálja 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).

2.7. Az A vitamin anyagcseréje

Az A-vitamin homeosztázist a retinoidok szállításában, termelésében 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 e két fehérje kifejeződésének aránya is szabályozza, hogy az egyes sejtek válaszolnak-e retinsav szignálra (Dong és mtsai, 1999).

A retinsavak fiziológiás hatásaikat 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 transzkripció faktorok, amelyek a célgénnek 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 képes nem enzim katalizálta módon 9cRA-vá átalakulni (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 laborunk is ki tudta biológiailag mutatni egér apoptózisba lépő tímuszban 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 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).

2.8. 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).

2.9. Retinoidok és az apoptotikus sejtek fagocitózisa

Bár az apoptotikus sejteket felvevő makrofágok által termelt retinoidok résztvesznek a TG2 kifejeződésének szabályozásában 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 5 (köztük a TG2 is) fagocitózishoz kapcsolt fehérje 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.

2.10. Az obezitás- egy komplex immun-metabolikus kórkép

Az elhízás olyan anyagcserezavar, melynek során különböző hatásokra (genetikai, idegrendszeri, endokrin vagy környezeti) 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, rákos 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 patológias 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 (Alkhoury és mtsai, 2010). Ugyanakkor a kaszpáz 8 zsírsejt specifikus aktiválása gyorsítja e 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 zsírtelhelésüket, 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, foszfatazok és proteázok (Lipa, Acp5 és Ctsk) génjei, savas pH kialakításához szükséges pumpák 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.

2.11. 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 létre (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 exocitózissnak 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 (Oliveira-Nascimento és mtsai, 2012), tehát felszabadulhatnak elhaló zsírsejtekből. Ezen kísérletek közlöi feltételezték, hogy a zsírsejt teljes emésztése lizoszómális exocitózis útján történik meg. Eredményeimben majd bemutatom, hogy mi egy kicsit átértelmeztük ezt a lizoszómális exocitózis folyamatot.

3. 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. Laborunk 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, hogy a retinol szaturáz enzim hiánya befolyásolja-e az efferocitózis folyamatát retinol szaturáz hiányos egerekben, amelyek egyébként fokozottan halmoznak fel zsírt normál diétán tartva is.

4. Anyagok és módszerek

4.1. Reagensok és vegyszerek

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

4.2. 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 szűrőtetes 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 túladozásával 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

4.3. 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 combcsontijából, sípcsontijából és felkarcsontijából (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.

4.4. 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-os, 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.

4.5. 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 hozzáadásával differenciációt váltottunk ki. 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).

4.6. 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.

4.7. 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 (tenyésztőlyuk)

Ezen felül minden reakció 5µl cDNS mintát tartalmazott, tehát a reakció végtérfogata 10µl. 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.

4.8. 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.

4.9. 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. Szövetani 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°C -ra eltároltuk.

4.10. 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°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°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°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, sejttálmányának 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 a 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-karboxifluoreszcein-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 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. A β -aktint a feltöltési protokollhoz használtuk. 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 (Pharmlingen, 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 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 (lézererősség, 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-dsDNS antitest ELISA

A mintákat anti-dsDNS antitestek kimutatása céljából is megvizsgáltuk, még hozzá 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 varianciájú 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 varianciájú 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 zsírsejtek eltakarításra 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.

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, de a TNF α , MCP-1 és leptin elhízás által kiváltott expressziója a TG2-null állatok gWAT adipocitában jelentősen fokozódott a vad típusúakhoz képest. A HSD és a HFD jelentősen beindította a zsírszöveti makrofágok gyulladásos citokinjeinek mRNS-expresszióját is, amely TG2 hiányában még kifejezettebb volt. Ezek az adatok mind azt mutatják, hogy bár a TG2 hiánya nem befolyásolja a súlygyarapodást, a TG2-null állatok gWAT-jában az étrend által kiváltott elhízás során sokkal nagyobb mértékű a gyulladás.

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.

A gWAT adipocitákban nem csak a proapoptotikus Bid, hanem a proapoptotikus Bim expressziója is 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. 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, a TG2 expressziója nem változott a TG2-null egerek gWAT adipocitáiban az étrend által kiváltott elhízás során. Ezek az adatok együttesen azt 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.

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 termelésének 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 a HFD étrenden tartott TG2-null egerekben a máj tömege és a máj triacilglicerol-tartalma is jelentősen magasabb volt, mint a HFD étrenden tartott vad típusú egerekben. Ez azt jelzi, hogy a gonadális zsírszövetből több lipid szállítódik a májba. A máj szövetmetszeteinek hematoxin-eozinnal való megfestése megerősítette ezeket az eredményeket.

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. Az inzulintolerancia-vizsgálatok alapján viszont a HFD étrenden tartott TG2-hiányos egerekben az inzulinrezisztencia mértéke fokozottabb. Ezeket az eredményeket alátámasztotta az éhgyomri plazma inzulinszint emelkedése a vad típusú egerekkel szemben. 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.

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 citometria analízist végeztünk, amelyek 95% fölötti leukocita-repopulációt mutattak. A 16 hétig tartó etetés végéig a besugárzott CD57BL/6 egerek jelentősen kevesebb súlygyarapodást mutattak, mint sugárzásnak ki nem tett társaik.

7.1.5. 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 citometria 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 sugárásnak ki nem tett társaik, ami összhangban áll más, korábban publikált megfigyelésekkel (Maeda és mtsai, 2005; Johnson és mtsai, 2016). A vad típusú egerekkel szemben 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 triacilglicerol-tartalmát, de a TNF- α kivételével az adipocitákban a gyulladásos citokinek és adipokinek mRNS-expresszióját sem. 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. Ráadásul inzulintolerancia-vizsgálat segítségével fokozott inzulinrezisztenciát, valamint az éhgyomri plazma-inzulinszint emelkedését mutattuk ki a keringésben.

7.1.6. 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. Emellett a TG2-hiányos csontvelővel rendelkező állatokban jelentősen nagyobb tömegű gonadális zsírt, megnövekedett máj tömeget és TAG tartalmat regisztráltunk. A szteatózis fokozódását a májszövet metszeteinek haematoxin-eozin festése is igazolta. Ezekkel az adatokkal összhangban, a csontvelői eredetű sejtek TG2-hiányának fennállása esetén a zsírszövet TNF- α , IL-6, MCP-1, leptin és Bid mRNS-expressziójának jelentős fokozódását detektáltuk a HFD étrenden tartott egerekben. TG2 hiányában a gWAT makrofágok IL-6, MCP-1 és TNF α mRNS expressziójában is jelentős emelkedést tapasztaltunk. 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.

7.1.7. A TG2 hiánya a makrofágokban hatékonyabb lizoszómális exocitózist eredményez

Mivel eredeti hipotézisünk az volt, hogy a fokozott elhízáshoz köthető gyulladást 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. 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, 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. A makrofágok hozzákapcsolódnak az elhalt adipocitákhoz, és folyamatosan bekebelezik ezeket a lipiddartalmú vezikulákat. Az 5 órás videófelvétel teljes ideje alatt az egyik elhalt adipocitára kapcsolódó vad típusú makrofág egyik vezikulát a másik után veszi fel, de

nem végez az eltakarítással. A TG2-null makrofágok azonban sokkal gyorsabban veszik fel ezeket a lipiddtartalmú vezikulákat 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 sejtanyagot is megemésztik. A vad típusú makrofágok közül viszont a videó végéig egy sem volt képes eljutni a bekebelezésnek eddig a befejező lépéséig.

7.1.8. 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 MMe 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. 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. Ehhez hasonlóan TG2 hiányában az MMe makrofágok β 3-integrin szintjében is jelentősen megnövekedett expressziót mutattunk ki. 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. 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 $\beta 3$ -integrin/c-Src jelátvitel következménye.

7.1.9. 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

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 kezeléssel 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 és a gonádok zsírtömegének 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. Ha azonban a csontvelői eredetű sejtekből hiányzott a TG2, az LXR-rel kezelt egerek gonadális zsírszövetéből származó szövetmetszeteken a holt adipociták százalékos arányának csökkenését figyeltük meg, amely talán a hatékonyabb eltakarításnak volt köszönhető. Ehhez hasonlóan a májban jelentősen megnövekedett, LXR aktivációhoz köthető szteatózist csak vad típusú egerekben mutattunk ki. Az LXR-agonistával kezelt TG2-null gWAT makrofágok lényegesen kevesebb MCP-1-et és rezisztint termeltek, mint vad típusú társaik, míg az ugyanabból az egerből származó gWAT adipociták jelentősen több adiponektint, ami javuló inzulinérzékenységet tükröz. Bár a plazmában keringő éhgyomri inzulinszintekben nem volt

különbség az LXR-agonistával kezelt egerek között, a TG2-hiányos csontvelői eredetű sejtekkel rendelkező állatok fokozott inzulinérzékenységet mutattak.

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, méghozzá retinoidfüggő módon. Ezeknek a géneknek az expressziója fokozódik apoptotizáló tímuszban is, ám klasszikus retinsavakat nem találtunk, hanem 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. RetSat hiányában a vizsgált gének közül egyiknek az expressziója sem módosult az apoptotizáló tímuszban. Az apoptotizáló tímuszban ráadásul ugyanaz az azonosítatlan retinaldehid-dehidrogenáz függő retinoid csúcs, amely sejteink szerint egy dihidroretinol-származék lett volna, szintén megjelent (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 laborunkban 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 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. 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, ami azt jelzi, hogy a timocitáknak *in vivo* sem az apoptózisát, sem a fagocitózist nem befolyásolja jelentősen a RetSat hiánya.

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.

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 efferocitózisaához.

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

Az eredmények igazolása érdekében qRT-PCR segítségével meghatároztuk az MFG-E8 mRNS-expresszióját csontvelői eredetű, peritoneális és tioglikolát által stimulált RetSat-null makrofágokban, és a vad típusú sejtekhez képest csökkent expressziót figyeltünk meg. 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.

Mivel az induláskor végzett elemzésünk azt jelezte, hogy néhány differenciációval összefüggő gén expressziója megváltozik a RetSat-null makrofágokban, elhatároztuk, hogy megvizsgáljuk, változik-e az MFG-E8 expressziója a monociták differenciálódása során, és a dihidroretinol adása módosítja-e ezt. 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, kimutattuk, hogy dihidroretinol adása hatást gyakorol expressziójukra differenciálódásuk során. 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. 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. Mivel azonban dihidroretinol adása nélkül nem 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.

Mivel úgy találtuk, hogy a neuropeptid-Y (NPY) csak csekély mértékben fejeződik ki a RetSat-null makrofágokban, 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 az NPY-expresszió és az MFG-E8-termelés hiánya is kapcsolatban állhat-e mindezzel. Eredményeink szerint az NPY expresszió a vad típusú monociták differenciálódása során is 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. Érdekes módon más vizsgált szövetekben nem mutattuk ki az NPY-expresszió defektusát.

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 fagocitózisukat rekombináns MFG-E8 hiányában és jelenlétében is tanulmányoztuk. 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. 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 efferocitózisra 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 dózisú 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, 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.

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, vesegyulladásához (glomerulonephritishez) vezető lerakódása jellemző (Abdolmaleki és mtsai, 2018). Mint ahogy a nők, 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.

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, és 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 lipiddartalma, amely foszfatidilserin pozitív extracelluláris vezikulumokba kerül, és külön alakulnak ki az apoptotikus testek, amelyekben úgy tűnik, nincs tárolt lipid. A makrofágok, először a lipiddartalmú vezikulumokat veszik fel, amelyek a makrofágok lizoszómális exocitózisa során Haka és mtsai szerint akár egyből a lizoszómába is juthatnak (Haka és mtsai, 2016). Majd később képződnek és vevődnek fel az apoptotikus testek.

Érdekes módon a TG2 hiányos makrofágok sokkal hatékonyabbak a lipiddartalmú vezikulumok felvételében. Ismert, hogy a foszfatidilserin 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 laborunk tervezi a továbbiakban 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, bár az LXR-nak számos egyéb hatását is detektáltuk mindkét (vad és TG2 hiányos) egérben. 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 steatózis mértéke, a gyulladásos citokinek termelődése és az inzulin rezisztencia kisebb mértékű volt a TG2 hiányos egerekben.

Irodalmi adatok szerint a gonadális zsírnak az LXR-rel történő kezelés következtében elmaradt gyarapodását az adipocita LXR α LXR-agonista által kiváltott aktivációja okozza, amelyről 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, 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). Az általunk vizsgált egerekben azonban nem mutatkozott különbség a hepatociták genotípusát illetően. 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). Ennek 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 szekréción 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 $\alpha\text{v}\beta_3/\alpha\text{v}\beta_5$ -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 $\alpha\text{v}\beta_3/\alpha\text{v}\beta_5$ -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 sejt felvételben 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 szekréciónja azonban felgyorsul az apoptotikus sejtekkel való találkozáskor, 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 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 dózisú 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. 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 mind az MFG-E8 (Hanayama és mtsai, 2004), mind az NPY (Dimitrijević és mtsai, 2008), amely a RetSat-null makrofágokban nem termelődik, 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 $\alpha\beta_3/\beta_5$ -integrinekhez kötött MFG-E8 nemcsak, hogy az efferocitózist támogatja, de a zsíryanycserével 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 exoszómák szintén használnak 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 vagy korábbi aktivitása

a monocitáig jutó differenciáció során 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 transzkripció 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 termelésének 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 dendritikus sejtekre specifikus 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, amely részben a TLR1/2 komplex részeként, részben önmagában fokozza a gyulladásos citokinek termelését. A gyulladásos citokinek termelésének LXR agonista általi krónikus 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. Köszönetnyilvánítás

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

Hálával és köszönettel tartozom **Köröskényi Krisztinának**, aki baráttan 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 éve 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.

11. 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.

