

A neutrofil granulociták alapvető szerepet játszanak a szervezet mikroorganizmusokkal szembeni védekező reakcióiban. Kemotaktikus ingerek hatására a keringő granulociták elhagyják az érpályát és a szövetek között a mikroba megjelenési helyére vándorolnak. Aktiválódásukat szuperoxid (O_2^-) és további toxikus oxigén metabolitok termelése, valamint a granulomokban raktározott enzimek felszabadulása kíséri. Ezzel párhuzamosan történik a mikroorganizmus bekebelezése (fagocitózis). A folyamatok összessége végülis a mikroba elpusztítását (killing) és lebontását eredményezi. A behatoló mikroorganizmus elpusztításához mindegyik részfolyamat létfontosságú; mind a vándorlási (integrin) defektus, mind a szuperoxid termelés hiánya (krónikus granulomatózis, CGD), mind a granulomok keletkezésének zavara egyformán súlyos fertőzésekkel járó, gyakran korai életkorban halálos megbetegedéseket idéz elő.

A O_2^- -termelésért a granulocita jellegzetes enzime, a NADPH oxidáz felelős. Ez a több alegységből (gp91, p22, p47, p67, Rac) álló enzimkomplex aktiv állapotában a plazmamembránban valamint a kialakuló fagoszóma membránjában helyezkedik el. Nyugvó sejtekben az alegységek egymástól elkülönülten találhatóak és aktiválódáskor a citoszolikus fehérjék (p47, p67, Rac) áthelyeződnek a membránba és kötődnek a gp97 és p22 által képzett dimérhez. Az aktív enzim egy elektront visz át a citoszolikus NADPH-ról az extracelluláris vagy intrafagoszómális O_2^- -re, tehát elektrogén működésű. A folyamatos O_2^- termelés alapfeltétele a megfelelő töltéskompenzálás.

Bár az enzimkomplexben résztvevő molekulák ismertek és azok egymás közötti interakcióiról igen sok információ jelent meg az elmúlt 10 évben, számos kérdés nyitott maradt. Nem eldöntött, hogy milyen ionok vesznek részt a töltéskompenzálásban, milyen mértékben szerepel a baktériumok elpusztításában maga a O_2^- anion, ill. a termelését kísérő ionmozgások; nem ismert az aktív enzim sorsa, az aktivitás finom szabályozásának részletei, valamint ismeretlen, hogy milyen tényezők vezetnek a O_2^- -termelés megszűnéséhez. **Kísérleti programunk célja a NADPH oxidáz enzim szabályozásának valamint a baktériumölésben játszott szerepének részletes vizsgálata volt.** Elért eredményeinket három problémakör köré csoportosítva foglalom össze.

1. A NADPH OXIDÁZ ELEKTROGÉN MŰKÖDÉSÉNEK KÖVETKEZMÉNYEI

1.1. *A NADPH oxidáz aktivitása megváltoztatja a granulocita Ca^{2+} háztartását.* Korábbi években gátlószerekkel nyert kísérleti eredményeinket most genetikailag módosított sejtvonalakon erősítettük meg. A következő megállapításokat tettük:

- Normál PLB-sejtek valamint vad-típusú gp91-el retranszfektált sejtek PMA hatására intenzív O_2^- -termelést végeznek és plazmamembránpotenciáljuk ezzel párhuzamos csökkenést mutat.
 - gp91 hiányos vagy elektron-transzportra képtelen mutáns gp91-et tartalmazó sejt vonal PMA-stimulálásra nem termel O_2^- -t és benne nem jön létre depolarizáció.
 - Az intracelluláris Ca^{2+} -raktárak kiürítése intenzív Ca^{2+} -beáramlást indít el, amelyet a normál sejtek PMA-kezelése gátol. Mutáns gp91-t tartalmazó valamint a gp91-hiányos sejt vonalban ilyen gátlás nem mutatható ki.
 - A Ca^{2+} -belépésben észlelt különbségeket a Mn^{2+} ionok fluoreszcencia-elnyelő hatása alapján is egyértelműen demonstráltuk
 - A kemoattraktáns peptiddel (fMLP) kiváltott Ca^{2+} -szignál gp-91 hiányos sejtekben jelentős emelkedést mutatott, főként a jel fenntartott fázisában
 - Egészséges egyénekből származó perifériás granulocitákban az fMLP-vel kiváltott Ca^{2+} -szignál fenntartott fázisában mérhető emelkedést idézett elő a NADPH oxidáz gátlása.
- Következtetésünk: a O_2^- -termelés következtében létrejövő depolarizáció erőlyesen gátolja a Ca^{2+} -belépést. CGD-s betegekben a O_2^- -termelés hiányában állandósul az intracelluláris

kalcium koncentráció emelkedése, ami hozzájárulhat a jellegzetes granulómák kialakulásához. (Rada et al., Clinical and Experimental Immunology, 2003)

1.2. *A NADPH oxidáz mind végterméke, a O_2^- , mind elektrogen működése révén hozzájárul a baktériumölési folyamathoz.* A NADPH oxidáz elektrogen működése következtében a szuperoxid-termelés intenzitását a kompenzáló töltésmozgás lehetősége határozza meg. Az enzim aktiválódását a sejtmembrán jelentős depolarizációja kíséri, jelezve a töltéskompenzálás limitáló hatását. A depolarizáció másodlagos ion-mozgásokat indít, amelyek meghatározzák a kialakuló fagoszóma elektrolit-összetételét és pH-ját. Kísérleteinkben az oxidáz aktivitását kis lépésekben változtattuk, és mértük párhuzamosan a membrán potenciál, a K^+ leadás, valamint a baktériumölés változásait. Megállapításaink:

- mind a membrán depolarizáció, mind a K^+ kiáramlás nem-lináris kapcsolatban van a szuperoxid termeléssel: alacsony intenzitásnál jelentős a változás, míg a maximális sebesség 20%-t meghaladó enzimaktivitásnál stabilizálódik a membránpotenciál és elenyésző mértékűvé válik a K^+ kiáramlás.

- E. coli esetében a baktériumölés gyakorlatilag független a szuperoxid termelés mértékétől

- S. aureus esetében lineáris összefüggést tapasztaltunk mind a depolarizáció, mind a K^+ kiáramlás és a baktériumölés között

- teljes mértékű baktériumölés csak maximális intenzitású O_2^- termelés mellett következett be

Következtetésünk: a NADPH oxidáz kettős szerepet játszik a baktériumölésben: mind az elektrogen működése következtében létrejövő ionvándorlások, mind az enzimreakció végterméke, a szuperoxid kémiai hatása érvényesül. (Rada et al., Blood, 2004)

1.3. *A O_2^- termelés csökkenését a depolarizáció növekedése részlegesen kompenzálni képes.*

- A kompenzáló H^+ -efflux gátlása Zn^{2+} ionokkal a szuperoxid termelés csökkenését, viszont a depolarizáció és a K^+ kiáramlás fokozódását eredményezi

- Zn^{2+} ionok jelenlétében – az alacsonyabb szuperoxidtermelés ellenére - a baktériumölés nem csökkent.

Következtetésünk: ion-csatornák aktivitásának módosításával esetleg befolyásolni lehet a O_2^- termelés mértékét és a baktériumölés intenzitását. (Rada et al. Philosophical Transactions of the Royal Society, 2005)

2. A NADPH OXIDÁZ MOLEKULAKOMPLEX KIALAKULÁSA

2.1. *A NADPH oxidáz molekuláris kapcsolatai a sejtmembránban.* Egyre több szignál átviteli folyamatban válik nyilvánvalóvá, hogy az együttműködő partnerek a sejt valamely részén, gyakran a sejtmembránban szoros molekulakomplexet alkotnak, amelynek kialakításában - és esetleg stabilizálásában is - specifikus lipidek vesznek részt. Kísérleteinkben a neutrofil granulociták előfutáraiban, PLB-985 sejtekben vizsgáltuk meg a koleszterin-kivonás hatását a kemotaktikus receptorokon keresztül kiváltott sejtválaszokra. Megállapításaink:

- a koleszterinben gazdag szigetek intakt szerkezete elengedhetetlen mind az alacsony, mind a magas affinitású fMLP-receptorok stimulálásával kiváltott degranulációhoz - a kemotaktikus receptorok által aktivált O_2^- -termeléshez ugyancsak szükséges a koleszterinben dús szigetek intakt szerkezete

- forból észter alkalmazásával kimutattuk, hogy az aktív NADPH oxidáz enzimkomplex kialakulása elmarad a koleszterin-dús szigetek elroncsolásakor

- neutrofil granulocitában a koleszterinben gazdag mikrodomének fenntartásához a mikrofilamentumok is hozzájárulnak. (Káldi et al., Biochemical Biophysical Research Communication, 2003)

2.2. Kimutattuk, hogy a kemoattraktáns fMLP receptorból kiinduló és az aktív NADPH oxidáz enzimkomplex kialakulását eredményező jelpályában egy brefeldin-A érzékeny ARF fehérje szerepel, amely viszont nem vesz részt a kemoattraktáns receptortól a degranulációhoz vezető szignalizációs úton. (Káldi et al., Journal of Leukocyte Biology, 2002)

2.3. *A NADPH oxidáz molekulakomplex kialakulását glukocerebrozid gátolja.* Gaucher kórban a lebontó enzim hiánya miatt glukocerebrozid halmozódik fel a sejtekben, és korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy ilyen betegekben mind a O_2^- -termelés mind a baktérium ölési képesség csökkent. Saját kísérleteinkben megállapítottuk, hogy

- a glukocerebrozid koncentráció-függő módon gátolja a NADPH molekulakomplex és ezzel az elektrontranszportra képes enzim kialakulását
- a glukocerebrozid nem gátolja a már kialakult komplex katalitikus aktivitását
- izolált rendszerekben végzett kísérleteinkkel alátámasztottuk, hogy a glukocerebrozid támadáspontja a két, fagocitára specifikus oxidáz alkotórész, a p47 valamint p67.

Következtetésünk: A NADPH oxidáz molekulakomplex kialakulásának defektusa hozzájárul a Gaucher kórban észlelt immundeficienciához. (Moskwa et al., Biochimica et Biophysica Acta, 2004)

3. A NADPH OXIDÁZ ENZIM DEAKTIVÁLÁSA

3.1. *Az oxidáz-komplexben részt vevő Rac monomer G-fehérje GTP-kötött állapota elengedhetetlen a folyamatos enzimaktivitás fenntartásához.* Megállapításunkat a következő megfigyelésekre alapoztuk:

- GDP hozzáadása az összeállt, aktív enzimkomplexhez kiszorítja az aktiváláshoz alkalmazott GTP[S]-t és időben párhuzamosan gátolja a szuperoxid termelést.
- Az oxidáz-komplex esszenciális alegysége, a p67 gátolja a Rac fehérje GTP-hidrolitikus aktivitását, a többi alegység viszont nem befolyásolja azt
- A Rac GTPáz aktivitását fokozó szabályozó fehérje (Rac-GAP) jelenléte az aktiválási fázisban csökkenti a szuperoxid termelést
- Az enzimkomplex kialakulása után azonban egyetlen Rac-al reagáló fehérje (Rac-GAP, Rho-GDI, PAK domén) szolubilis formája sem képes befolyásolni a szuperoxid termelést
- Membránhoz kötött Rac-GAP fehérjék a kialakult enzimkomplexben is képesek fokozni a Rac GTP-hidrolízist és ezáltal csökkenteni a NADPH oxidáz aktivitását.

Következtetésünk: a Rac GTPáz aktivitását fokozó fehérjék (Rac-GAPok) lényeges szerepet játszanak a NADPH oxidáz szabályozásában. (Moskwa et al. Biochemistry, 2002; DeCoursey and Ligeti, Cellular and Molecular Life Sciences, 2005)

3.2. *A membrán lipid-összetétele szabályozza Rac/Rho-GAP fehérjék szubsztrát specifitását.* Izolált fehérjékkel végzett kísérleteinkben megállapítottuk, hogy

- foszfatidilszerin gátolja a p190GAP (GTPáz aktiváló protein) molekula Rho-GAP aktivitását, fokozza viszont Rac-GAP aktivitását
- hasonló hatást fejt ki a PI és a PIP_2 is, míg a PC és PE teljesen hatástalan
- SDS párhuzamosan gátolja a p190 Rac-GAP és a Rho-GAP aktivitását

- a p50GAP, amely szintén kifejt GAP hatást mind a Rac, mind a Rho kis G-fehérjén, nem mutat semmilyen lipid-függő aktivitás-változást.

Kísérleteinkkel egy alapvetően új, a G-fehérjék területén eddig egyáltalán nem ismert mechanizmusra világítottunk rá.

Következtetésünk: a lipid környezet változása a GAP aktivitás módosításán keresztül a NADPH oxidáz aktivitás lényeges szabályozó tényezője lehet. (Ligeti et al. Journal of Biological Chemistry, 2004; Ligeti and Settleman, Methods in Enzymology, 2006)

3.3. *A p50GAP fehérje aktivitását intramolekuláris interakciók gátolják.* A p50GAP fehérje a neutrofil granulocitákban legnagyobb mennyiségben jelenlevő, Rac/Rho családra specifikus GAP.

- Élesztő két-hibrid rendszert alkalmazva a p50RhoGAP molekulán belül interakciót tapasztaltunk az N-terminális szakasz (1-255 aminosavak) valamint a C-terminális GAP domén között.

- Ebben az interakcióban kitüntetett szerepet játszott az N-terminális végi 48 aminosav. Ugyanez a szakasz a kis G-fehérje prenil csoportját is felismerte.

- Radioaktív GAP aktivitás mérésekben kimutattuk, hogy a molekula N-terminális végén két aminosav szakasz, az 1-48 és a 168-186 régió felelős a molekulán belüli interakcióért.

- A GAP esszében nyert adatainkat sikerült a NADPH oxidáz teljesen tisztított rendszerben történő aktiválásával, azaz egy, a RacGTP mennyiségét tükröző komplex enzimreakcióban is megerősíteni.

- Tehát a p50RhoGAP molekula nativ formában zárt (autoinhibited) konformációban van jelen, amit a reagáló kis G-fehérje prenil csoportja nyit ki és teszi a GAP domént hozzáférhetővé szubsztrátja számára.

Következtetés: a prenil csoport nemcsak a kis G fehérje membránhoz kapcsolásában, hanem a szabályozó fehérjével való interakcióban is jelentős szerepet játszik. Sejten belül a preniltranszferázok aktivitásának csökkenése a GAP hatás csökkentése útján fokozhatja a NADPH oxidáz aktivitását. (Moskwa et al. Journal of Biological Chemistry, 2005)

3.4. *A p50RhoGAP intracelluláris eloszlása.* Ezeket a vizsgálatokat neutrofil granulocitákon kezdtük, de az itt mutatkozó nehézségek miatt egy könnyebben manipulálható modell sejtet, a HeLa sejteket választottuk. Saját fejlesztésű antitestjeink segítségével kimutattuk, hogy

- a p50RhoGAP a sejtmag körüli, sapka szerű elhelyezkedést mutat, ami nyugalomban mutat kolokalizációt feltételezett szubsztrátjával, a Cdc42-vel, de a Golgi rendszert érő behatásokra a két fehérje eltérő módon vándorol

- immunfluoreszcens mikroszkópiával vizsgálva a p50GAP kolokalizációt mutat az endosomákon mind a transzferin- mind az EGF receptorokkal

- a p50GAP lokalizációjáért a molekula Sec14 doménje felelős

- megnövelve a p50GAP mennyiségét, vagy az izolált Sec14 domén kifejezésekor a transzferrin felvétel lelassul

- a p50GAP ugyancsak mutat kolokalizációt a Rab11 és a Rab5 fehérjékkel

- in vitro körülmények között a p50GAP nem serkenti a Rab molekulák GTP hidrolízisét

- BRET-technikát alkalmazva sikerült egyértelmű interakciót kimutatni a p50GAP valamint a Rab7 között, a molekulakomplex lokalizációjában a Sec14 domén szerepel.

Következtetésünk: a p50GAP kapcsolatot teremt a Rho valamint a Rab kis G-fehérjék között. (Sirokmány et al., Journal of Biological Chemistry, 2006)

A kutatási téma két PhD hallgató (Rada Balázs és Patryk Moskwa) értekezésének elkészítését és két további PhD hallgató (Molnár Gergely, Sirokmány Gábor) értekezésének befejezését tette lehetővé. A kísérletek elvégzésében további 4 egyetemi hallgató (Tímár Csaba, Kalocsai

Ágnes, Erdős Melinda, Szeberényi Júlia) működött közre, ők társszerzőként szerepelnek egy-egy publikációban.