

## RÉSZLETES SZAKMAI BESZÁMOLÓ

### 1. A Renox (Nox4)-deficiens egérmódel létrehozása

Az OTKA pályázat keretében végzett kutatások egyik legfontosabb eredménye, hogy sikerült létrehozni egy Nox4 (Renox)-deficiens egértörzset. Ezt a munkát Dr Thomas Leto (NIH) laboratóriumával együttműködésben végeztük. A Nox4-deficiens állatok fenotípusának analízise jelenleg is folyamatban van és egyelőre még nem tudtuk azonosítani a kieső Nox4 működés következményét. A Nox4-deficiens állatok életképesek és jól szaporodnak ami alapján kimondhatjuk, hogy a Nox4 enzim nem elengedhetetlen az élethez. Az OTKA pályázatom munkatervében vázoltam azt a hipotézist, hogy a vesében expresszáldó Nox4 oxigénérzékelőként működhet és fontos szerepe lehet az eritropoetin (EPO) termelés szabályozásában. Ezt az elképzelésünket arra alapoztuk, hogy korábban számos kísérleti adat utalt arra, hogy az EPO termelést szabályozó oxigén-érzékelő egy szabadgyök-termelő hemoprotein lehet. A Nox4-deficiens állatok hematológiai paramétereit vizsgálva megállapítottuk, hogy azok normálisak. Ez alapján elmondhatjuk, hogy a Nox4 nem játszik szerepet a konstitutív vérképzés szabályozásában. Fontos azonban megjegyezni, hogy a vesében folyó EPO termelés nyugalmi körülmények között szinte kimutathatalan, azonban különböző stressz helyzetekben (pl. hipoxia, vérzés) jelentősen fokozódik. Következő kísérleteinkben azt szeretnénk vizsgálni, hogy a Nox4-nek szerepe van-e ilyen körülmények között a vérképzés szabályozásában. Az elmúlt években kimutatták, hogy a Nox4 fehérje a vesén kívül még számos szervben, szövetben megfigyelhető. Ezek közül különösen izgalmasnak tűnik az endothel, ahol számos megfigyelés szerint a Nox4 tűnik az elsődleges reaktív oxigén forrásnak. Dr Benyó Zoltánnal (SE, Klinikai Kísérleti Kutató- és Humánéletani Intézet) együttműködésben azt kezdtük vizsgálni, hogy a Nox4 vajon szerepet játszik-e az artériás vérnyomás szabályozásában. Munkahipotézisünk szerint ugyanis az endothel sejtekben Nox4 által termelt szuperoxid anion reagálhat a nitrogen monoxiddal és mérsékelheti annak értágító hatását.

A NADPH oxidázok kutatásában nagy nehézséget okoz a megfelelő antitestek hiánya. A Nox4 enzim ellen sem ismert olyan antitest amely alkalmas lenne a fehérje detektálására. Jelenleg több különböző stratégiával próbálunk olyan Nox4-ellenes antitestet előállítani amely megbízhatóan működhet Western blot kísérletekben és immunfestésre is alkalmas lehet. A Nox4-deficiens egér az antitest fejlesztésben is komoly segítséget nyújt, ugyanis az

állatokból származó szövetek kontrollként szerepelhetnek az antitest specificitását vizsgáló kísérletekben.

## **2. A p50 RhoGAP fehérje funkciójának jellemzése**

Rho GTPázok számos különböző sejtfolyamatban vesznek részt, mint például a sejtmozgás, génátírás, membránforgalom, szuperoxid termelés. A humán genom adatai alapján a Rho GTPázok számát 20-25 közöttire becsülhetjük, ugyanakkor szabályozó fehérjék száma, mint pl. a kicserélő faktorok és a GTPáz aktiváló proteinek (GAP), legalább háromszorosa ennek. Ez a különbség azt sugallja, hogy egy GTPáz minden egyes sejten belüli funkcióját egy bizonyos szubcelluláris környezetben a szabályozó fehérjék egy adott, külön csoportja irányítja. Az ilyen szabályozó molekula komplexek kialakulása fehérje-fehérje és fehérje-lipid interakciókon keresztül jön létre.

Célunk a számos szövetben expresszálandó p50RhoGAP fehérje tanulmányozása volt, mely N-terminálisan tartalmaz egy igen érdekes, ismeretlen funkciójú Sec14 homológ domént. A sejten belüli lokalizáció megállapításához poliklonális antitestet termeltünk a fehérje ellen és GFP-fúziós formáját állítottuk elő. Azt találtuk, hogy erős kolokalizációt mutatott a korai és a reciklizáló endoszóma markerekkel (transzferrin-receptor és Rab11) és ezt a lokalizációt egyértelműen a Sec14 homológ domén határozta meg. A p50RhoGAP és a Rab11 között mért biolumineszcens rezonancia energia transzfer alapján úgy tűnik, hogy az endoszómális membránokon molekuláris komplexet képez a Rab11 kis G fehérjével és ez a kapcsolat is a Sec14 doméntől függ. Mindazonáltal – in vitro GTPáz méréseink alapján – a p50 egyértelműen nem hat GAP-ként a Rab fehérjékre. Immunfluoreszcencia jelöléses kísérleteket is végeztünk a p50RhoGAP és a Rho család tagjai lokalizációjának összevetésére. Eredményeink szerint a p50RhoGAP kapcsolatot teremthet a Rho és Rab család GTPázai között. Az endoszómális membránforgalomban részt vevő fehérjék funkciójának tanulmányozására széles körben alkalmazott a transzferrin felvétel és reciklizáció mérése, ezért fluoreszcens transzferrin assay-eket alkalmaztunk abból a célból, hogy a p50RhoGAP overexpressziójának hatásait vizsgáljuk az endoszómális körforgás folyamataiban.

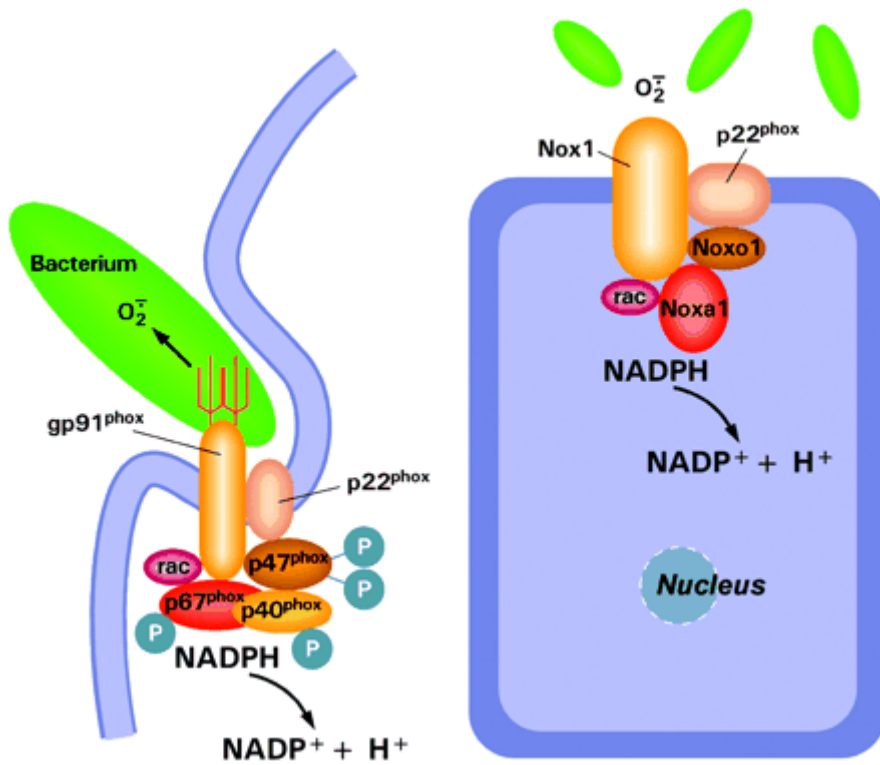
Összefoglalva eredményeink a GTPáz aktiváló fehérjék egyéb doménjeinek jelentőségét hangsúlyozzák, melyek meghatározóak lehetnek a GAP aktivitás tér- és időbeli szabályozásában.

## **3. A Rac1 fehérje szerepe a Nox enzimek szabályozásában**

A fagocita sejtekben található NADPH oxidáz enzimkomplex fontos része a Rac kismólsúlyú GTP-kötő fehérje. Kísérleteinkben azt vizsgáltuk, hogy vajon a nem-fagocita sejtekben található NADPH oxidáz enzimek szabályozásában is szerepet játszhat-e a Rac1. A Nox1 és Nox3 fehérjékre azért esett a választásunk mert, részben saját eredményeink alapján, tudjuk, hogy ezek a membránfehérjék kölcsönhatásba lépnek citoszolikus szabályozó fehérjékkel. A Nox1 citoszolikus regulátorai a NOXO1 (Nox Organizer 1) és NOXA1 (Nox Activator 1). A Nox3 aktivitása kevésbé függ a citoszolikus fehérjétől de valószínű, hogy a NOXO1 a Nox3-nak is fontos partnere.

Kísérleteinkben Rac1 mutánsok és Rac1 expressziót specifikusan csökkentő siRNS technika segítségével kimutattuk, hogy a Rac1 szerepet játszik a Nox1 és a Nox3 aktivitásának szabályozásában. Azt is kimutattuk, hogy a Rac1 ezt a hatását a NOXA1 fehérjéhez kötve fejt ki és a kötődés mechanizmusa nagyon hasonló a Rac1 fehérje p67<sup>phox</sup>-hoz való kötődéséhez, amely a fagocita oxidáz aktiválódásának fontos mozzanata. További kísérletekben azt találtuk, hogy ha a NOXA1-et egy irányító szekvencia segítségével a plazmamembránhoz visszük akkor a Nox1 szuperoxidtermelése függetlenné válik a NOXO1-től, vagyis a NOXO1 szerepe elsősorban a NOXA1 membránhoz történő irányítása. Érdekes módon azonban még ilyen körülmények között is függ a szuperoxidtermelés a Rac1-től, ami arra utal, hogy a Rac1 fehérjének szerepe van az enzim aktiválódás folyamatának végső lépéseiben is.

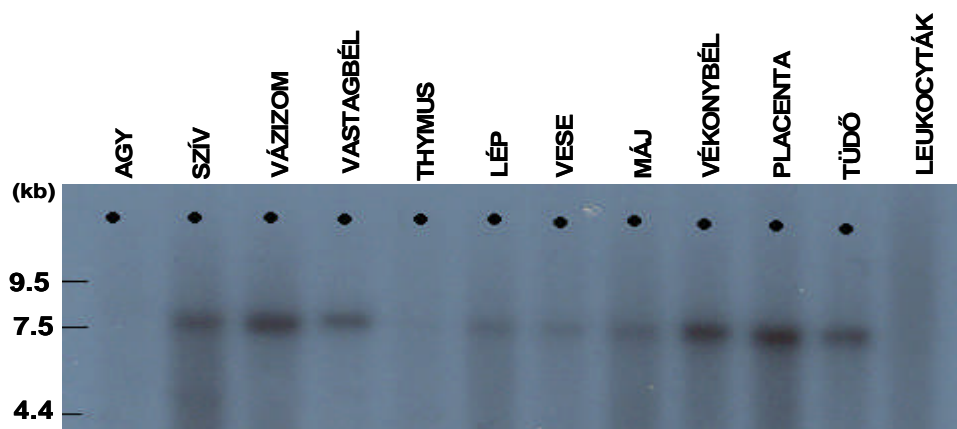
Eredményeink arra utalnak, hogy a vastagbél epithel sejtjeiben funkcionáló Nox1 szabályozása nagyon hasonló a fagocita oxidáz szabályozásához (**1. ábra**), ami felveti annak a lehetőségét is hogy a két rendszer funkciója is igen hasonló lehet.



1. ábra A fagocita- és colon oxidáz aktivációjának mechanizmusa

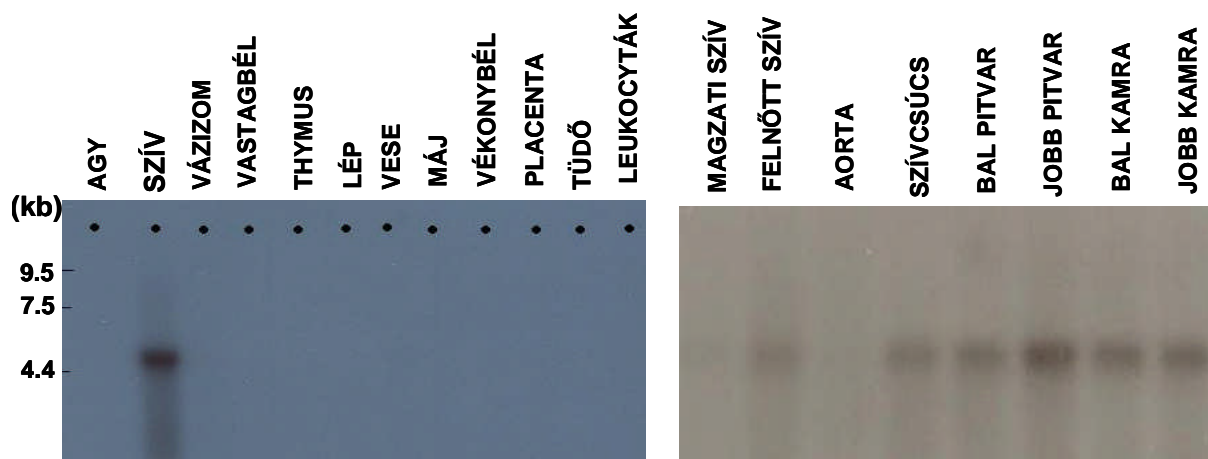
#### 4. Egy új emberi peroxidáz azonosítása

A humán peroxidazin egy ismeretlen funkciójú peroxidáz, amely számos szövetben expresszálódik (2. ábra).



2. ábra A peroxidazin mRNA expressziója különböző humán szövetekben

A humán peroxidazinnal nagymértékben homológ, új emberi peroxidázt azonosítottunk, amelyet peroxidazin 2-nek, vagy szív peroxidáznak (cardiac peroxidase, CPO) neveztünk el (Génbank szám: [AAX70929](#)). Ennek egy részét kódoló humán DNS-szekvenciát génbankban történt homológiakeresés során találtuk. Ennek a szekvenciának egy darabját próbaként felhasználva Northern blot analízist végeztünk. Ugyanazokat a szöveteket vizsgáltuk, mint a humán peroxidazin 1 esetében, és meglepő eredményt kaptunk. Amint az ennek nyomán adott név is mutatja, a CPO mRNS-ét kizárólag a szívben detektáltuk (**3. ábra**). Nem volt megtalálható a vázizomban, a vastagbélben, a thymusban, a lépben, a vesében, a májban, a vékonybélben, a placentában, a tüdőben, az agyban és a fehérvérsejtekben sem. További Northern blottal végzett vizsgálataink alapján a peroxidazin 2 az aortát kivéve a felnőtt humán szív minden részében megtalálható, azaz a szívcsúcsban, a bal és jobb pitvarban, a bal és a jobb kamrában. A magzati teljes szívből származó mintában is detektálható a peroxidazin2 mRNS-e, azonban sokkal kisebb mennyiségben (ábra). A kísérletek alapján a teljes mRNS valószínű mérete kb. 4,5 kb-nak adódott.



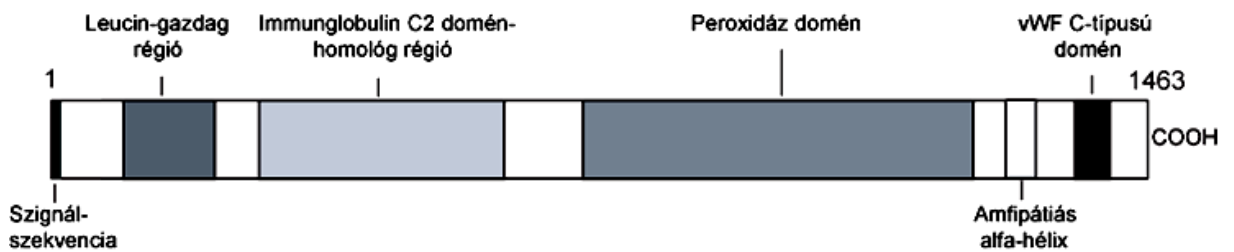
**3. ábra** A peroxidazin 2 (CPO) mRNS expressziója humán szövetekben

A legnagyobb, ehhez a génhez tartozó cDNS-darab is, amelyet az adatbázisokban találtunk, jóval kisebb volt ennél a feltételezett méretnél. Az így talált szekvenciárészlet az mRNS 3', azaz a fehérje C-terminálisan található darabját kódolta, tartalmazta a peroxidáz domén nagy részét és a stop kodont is. Az 5'-vég keresése során az addig ismert szekvencia

helyét a humán genomon belül a 8. kromoszómán azonosítottuk. Itt az 5'véget feltételezhetően kódoló régiót minden lehetséges leolvasási keretben lefordítva kapott aminosavsorrendet homológiába állítottuk a peroxidazin1-vel. A homológ részek nagy valószínűséggel kódoló szekvenciaszigeteketnek felelnek meg. Ezek peroxidazin 1-en belüli elhelyezkedése és konzervált doménekhez való viszonya alapján azonosítottuk a peroxidáz domén hiányzó részét, és további, az 5' vég irányába eső doménrészeket.

A teljes kódoló szekvenciát SMART RACE (= rapid amplification of cDNA ends) technika segítségével azonosítottuk.

A kódoló szekvencia alapján meghatároztuk az aminosavsorrendet, majd ennek segítségével a fehérje másodlagos szerkezetét ( **4. ábra**).



#### 4. ábra A peroxidazin 2 (CPO) szerkezete

Ez a szerkezet nagymértékben hasonló a peroxidazin 1 felépítéséhez, szintén tartalmazza az arra jellemző fő doméneket: az extracelluláris szignál peptidet, a leucin-gazdag-régiót, a négy Ig-hurkot, a peroxidáz domént és a C-terminális cisztein-gazdag részt. Az ezekre a peroxidazin 1 esetében leírt jellemzők és valószínűsített szerepek a peroxidazin 2-re is érvényesek. A fehérje ellen antitestet termeltettünk és jelenleg a fehérje szíven belüli lokalizációját vizsgáljuk.