

A naponta nagy tömegben apoptózissal elhalt sejtek eltávolítása a szövetekből igen hatékony molekuláris mechanizmusok igénybevételével történik. Az utóbbiak egy részének, elsősorban a fehérjéket keresztkötő szöveti transzglutamináz (TG2) ezen folyamatokban betöltött szerepének tisztázása volt pályázatunk alapvető célkitűzése. A négy év alatt elért eredményeink a következők:

1. Egér és egy humán apopto-fagocita sejt kultúra rendszerek beállítására került sor. Az egér rendszerben peritoneális makrofágokat izolálunk, azok a tenyésztőedény felszínéhez tapadnak, majd erre rétegezzük az egér tímuszból izolált, majd különböző módon apoptózissal elölt timocitákat. Egy óra elteltével a nem fagocitált sejteket lemoszuk, majd fixálás után fáziskontraszt mikroszkóp segítségével számoljuk hogy a makrofágok hány %-a vett fel apoptótikus sejteket, illetve mennyi az átlagos bekebelezett sejt szám az egyes makrofágokban. A felvétel igen hatékony, általában több mint 200 apoptótikus sejtet vesz fel 100 makrofág. A humán rendszerben monocitákat izolálunk a véradó állomástól kapott fehérvérsejt preparátumból, ezeket 5 napig tenyésztjük amíg makrofágokká alakulnak, majd erre rétegezzük az újabb fehérvérsejt preparátumból nyert apoptózissal elhalt neutrofil sejteket, melyek tisztításuk után 24 órán át spontán haltak el a tenyésztőedényben. Fél óra eltelte után mossuk le a be nem kebelezett sejteket, majd fixálás után mieloperoxidáz reakcióval mutatjuk ki az elhalt és bekebelezett neutrofil granulocitákat számolva hogy mennyi ilyen sejt lett bekebelezve. Ebben a humán rendszerben a bekebelezés hatékonysága viszonylag alacsony, hiszen általában a makrofágok 15-25%-a vesz fel elhalt granulocitákat.

A fagocitózis mérésére új típusú FACS analízist dolgoztunk ki. Ennek lényege, hogy mind az elhaló mind a fagocitáló sejteket fluoreszcens festékkel jelezzük (ezek nem befolyásolták sem a elhalást sem az elhalt sejtek felvételét), majd a fagocitózis után mérni tudtuk a kettősen fluoreszkáló makrofágokat. A módszert hagyományos (de sokkal munkaigényesebb és ezért kiváltandó) technikákkal validáltuk.

2. Az egér rendszer segítségével tudtuk tisztázni, hogy az apopto-fagocita rendszer hatékony működéséhez elengedhetetlen a fehérjéket keresztkötő szöveti transzglutamináz (TG2) aktivitása, részvétele a folyamatban. TG2 K.O. egerekben ugyanis mind a tímuszban mind a májban az apoptózis fokozásával megfigyelhető az elhalt sejtek bekebelezésének késleltetettsége (*Szondy et al., PNAS. USA., 2003*). A sejt kultúra rendszerben is megfigyelhető volt a jelenség és itt tisztázni lehetett, hogy a jelenségért részben a makrofágokban termelődő TGFβ citokin aktiválódásának az elmaradása felelős.

3. Megállapítottuk, hogy a fagocitózis elősegítéséhez az aktív TG2 jelenléte az apoptótikus sejtekben is fontos: az elhaló vörösvértesteket használva modellként azonosítottuk a TG2 által módosított szubsztrátokat és azok között megtaláltuk a kalpain is, amely TG2 hatására gyorsabban aktiválódik és segíti elő az elhalás folyamatát (*Sarang et al., közlés alatt, 2007*). Rekonstrukciós kísérleteket is elkezdtünk és közel állunk azok befejezéséhez: a TG2 hiányos egerek makrofágjaiba vírus vektorral visszajuttatjuk a TG2-t, pontosabban annak különböző deléciós mutánsait (transzamidációs aktív hely, GTP kötő hely, fibronektin kötő hely mutánsok) annak tisztázására, hogy a multifunkciós TG2 mely aktivitásai vesznek részt a fagocitózis elősegítésében (*Tóth et al., közlésre előkészítve, 2007*). Ez a kérdés azért is előtérbe került, mert kiderült, hogy a TG2 a sejt típusától és a sejt elhalás formájától függően

lehet sejthalált elősegítő és azt gátló is (*Fésüs és Szondy, FEBS Letters, 2005*); az utóbbi magyarázza, hogy a TG2 hiányos egerek májsejtjei jóval érzékenyebbek in vivo Fas-indukálta elhalásra mint a normál máj és a nagyfokú elhalással képtelen lépést tartani a fagocitózis, gyulladás alakul ki (*Sarang et al., Hepatology, 2005*). A TG2 ezen védő hatását az enzim G fehérje funkciója magyarázza, amely részt vesz apoptózissal szemben védő molekulák fokozott aktivitása kiváltásában.

4. A TG2 transzamidációt létrehozó aktivitása Ca-függő, a Ca egyben gátolja az enzim G fehérje funkcióját. Szisztematikus mutagenézis vizsgálatokba kezdtünk a TG2 Ca-kötő helyeinek azonosítására. Eddig 5 Ca-kötő helyet találtunk, elvégeztük ezek külön-külön deléciója következményeinek tisztázását beleértve a transzamidációs és GTPáz aktivitásra kifejtett hatást (*Király et al., közlés alatt, 2007*). A transzglutamináz coeliákias betegekben autoantigénként viselkedik, az antitestek növelik az enzim aktivitását fokozva a betegség előrehaladását (*Király et al., Autoimmunity, 2006*).

5. NB4 promyelociták leukémia sejteket használva eredményeink szerint reténsav hatására bekövetkező humán neutrofil granulocitáváérésük során (amelynek egyik eredménye hogy amennyiben nincs szükség rájuk spontán apoptózissal elhalnak) indukálódik a TG2, bevándorol a sejtmagba ahol fehérjét módosítva gének kifejeződését szabályozza (többek között a neutrofil sejtek oxidatív ölé kapacitásának kialakításában résztvevő fehérjék génjeit). TG2 hiányában vagy gátlása esetén a neutrofil sejtek baktériumölő képessége és vándorlási aktivitása jelentősen csökken (*Balajthy et al., Blood, 2006*) Az elmúlt év során biotinált pentilamint alkalmazva az intakt sejtekben létrejött TG2 módosításokat kerestük affinitás kromatográfiával izolálva a módosított fehérjéket. Kétdimenziós gélelektroforézissal elválasztva a módosított fehérjéket azokat emésztése után MALDI/MS analízisnek vetettük alá: a TG2 módosított fehérjék között transzkripciós faktorokat, kromatin szerkezetet módosító fehérjéket, hősokk fehérjéket találtunk. A kísérletek következő szakaszában célunk annak bizonyítása volt, hogy a TG2 által létrehozott módosítások hatására változik a génexpresszió, illetve hogy mely gének kifejeződését módosíthatja a TG2 hatás. Sikerült az NB4 sejtekből olyan sejt vonal generálása, amelyben „silencing” RNS segítségével a TG2 knock down állapotban van, igen alacsony a kifejeződése differenciálódás során; összehasonlítva, a teljes emberi génállományt lefedő DNS chip technikával bizonyítottuk, hogy igen nagy számú gén kifejeződése nő vagy csökken a TG2 hiányában (*Csomós et al., közlésre előkészítve, 2007*).

6. Az apopto-fagocita rendszer vizsgálatának klasszikus modellje a *Caenorhabditis elegans* fonálféregben zajló programozott sejt elhalás és eltakarítás tanulmányozása. Emlős transzglutamináz homológ nem található a *C. elegans* genomban figyelmünk a fehérje diszulfid izomeráz (PDI) felé fordult; ennek az enzimnek már mutattak ki transzglutamináz aktivitását más specíesekben. Megállapítottuk, hogy a *C. elegans* PDI is rendelkezik transzglutamináz aktivitással, meghatároztuk hogy ezért a PDI tioredoxin doménja a felelős, mutagenézissal tisztáztuk hogy az TG aktivitást megvalósító katalitikus triádban mely aminosavak vesznek részt (*Blaskó et al., BBRC, 2003*). A *C. elegans*ban szisztematikus analízissel keressük az endogén transzglutamináz szubsztrátokat. A TG fehérjék megfelelő környezetben lévő glutaminjai és lizinjei között hoz létre keresztkötést. Új típusú kis molekulásúlyú jelölt szubsztrátokkal a korábban már megtalált glutamin szubsztrátok (enoláz, mitokondriális ATPáz), mellett lizin donor szubsztrátokat is azonosítottunk (glutamát dehidrogenáz, PDI) a *C. elegans*ban (*Mádi et al., BBRC, 2004*).

7. Új, nagy áteresztőképességű transzglutamináz módszert dolgoztunk ki, hogy különböző betegcsoportok esetében (ahol felvetődhet az apopto-fagocita rendszer defektusa a kialakuló kórkép pathomechanizmusában) vérből izolált mintákban tudjuk mérni az enzim aktivitását. Az új assay lényege, hogy triciált putreszcint építünk szcincillációs vékony réteggel is bevont ELISA lemezre amelyhez TG2 specifikus glutamin szubsztrát peptid van kitapadva; amikor a TG2 beköti a jelzett putreszcint detektálható és mérhető fényjelet kapunk (*Mádi et al., Analytical Biochemistry, 2005*).

8. Feltételeztük, hogy humán neurodegeneratív kórképekben jelentős sejtelhalás zajlik TG2 részvétellel. Mivel a központi idegrendszerben a neuronok elhalása nem természetes, az eltakarításuk nem hatékony. Így fennmaradhatnak akár félig elhalt sejtek is, amelyekben transzglutamináz keresztkötött fehérje polimerek találhatóak. Humán agymintákból sikerült ezeket izolálnunk és nem csak azt tudtuk meghatározni, hogy mely fehérjék lettek keresztkötve (ubiquitin, parkin, alpha-synuclein, HSP27), hanem hogy a szekvenciájukban melyik specifikus Gln vagy és Liz vesz részt a kötésekben. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a neurodegenerációs folyamatok lényeges eleme a TG2-mediált kovalens fehérje polimerizáció (*Nemes et al., FASEB J., 2004*). A neurodegeneratív kórképekben zajló TG2-függő sejtelhalást elősegítő folyamatok közül azt is tanulmányoztuk hogy a poliglutamin darabot kóros méretben tartalmazó huntingtin fehérje túlzott sejtbeli kifejeztetésének mi a következménye. Az eredmények azt mutatják, hogy a huntingtin glutaminjai deamidálódnak és a fehérje nem-kovalens kölcsönhatásba lép a laminnal és ennek következtében magi inklúziós testként jelenik meg. A citoplazmatikus huntingtin zárványok ezzel szemben kovalensen ubikvitinnel és HSP27 fehérjével keresztkötöttek. A TG2 tehát különböző mechanizmussal segíti elő magi, illetve citoplazmatikus inklúziós testek kialakulását és ezzel a neurodegenerációs folyamatokat (*Nemes et al., közlésre előkészítve, 2007*).

9. Az apopto-fagocita rendszer transzkripciós szabályozása részleteinek megismerésére Taqman Low Density Array-t (TLDA) terveztünk és készítettünk, amely egyszerre 94 apoptotikus sejtek eltávolításában résztvevő génnek nézi adott RNS mintából a kifejeződését pontosan meghatározva az adott gének RNS-ének koncentrációját. A vizsgált gének kiválasztását szisztematikus munka előzte meg figyelemmel ezen géntermékek gyulladásban játszott szerepének vizsgálatára is (*Májai et al., Immunology Letters, 2005*). A TLDA-t több apopto-fagocita kísérleti rendszerben hasznosítottuk. Ezek közül kiemelkedik az a kísérlet sorozat, amelynek során autofágiával elhaló sejtek fagocitózist tanulmányoztuk. Az emberi emlő epitheliális sejtek (MCF-7) éheztetés és tamoxifen hatására hatására jelentős mértékű autofágiát és következményes sejtelhalást mutatnak. Amikor ugyanezek a sejtek nem adhezív szubsztrátra kerülnek anoikisz-szel halnak el, amely felgyorsítja az autofágiát mind tamoxifen jelenlétében mind anélkül. Jelentős új megfigyelésünk, hogy mind a *de novo* mind az anoikisz eredetű autofágiás sejteket fagocitálni tudják mind a humán makrofágok mind a nem elhaló MCF-7 sejtek (*Petrovski et al., Cell Death and Differ. 2007, közlésre elfogadva*). Ugyanakkor csak az előbbieket fagocitózist lehet gátolni az autofágia blokkolásával. A különbség megnyilvánul génkifejeződési mintázatokban is. Míg az autofágiával elhaló sejtek fagocitózisa során a makrofágokban a pentraxin, az adozin 2 receptor, az oxidált LDL, az aszialoglikoprotein receptor és a trombospondin indukálódik, addig az anoikisz-szel elhaló sejtek bekebelezésekor a C1q receptor, az MFGE8 molekula, a rac-1 és a DNáz I. Ez azt jelenti, hogy az apopto-fagocita szinapszisban a bekebelezett elhaló sejttől függően más és más fagocitózis mechanizmusok indukálódhatnak, vagyis új lehetőségek nyílhatnak többek között a gyulladásos folyamatok (amely végül a granulociták fagocitózisával „tisztul fel”) terápiás befolyásolására .

