

Szabályozási mechanizmusok az állatorvosi alapkutatásban, a molekuláktól a szervrendszerekig

A kutatási téma előzményei

A támogatott pályázat megvalósítása során a munkatervnek megfelelően öt kutatólaboratórium együttműködése valósult meg. Az **endokrinológiai** munkacsoport néhai Rudas Péter és Bartha Tibor és Frenyó V. László vezetésével, a **neuromorfológiai** munkacsoport Sótonyi Péter, Halasy Katalin irányításával, a **biokémiai** munkacsoport Gálfi Péter és Neogrády Zsuzsa részvételével, a **szaporodásbiológiai** laboratórium Huszenicza Gyula irányításával, a **neuroimmunfiziológiai** munkacsoport Kacs Kovics Imre, Frenyó V. László és Jancsik Vera irányításával, három tématerületre fókuszálva végzett intenzív kutatásokat. A kutatás eredményeit a fentieknek megfelelő felosztásban tárgyaljuk.

Megjegyezni kívánjuk, hogy a kutatási témák szerteágazó karaktere és a megcélzott területek komplexitása következtében egyes résztemák kidolgozása során a munkacsoportok egyes tagjai - kofinanszírozási jelleggel – limitált mértékben igénybe vettek egyéb kutatási keretből rendelkezésre álló forrásokat is, tekintettel a témák szoros kapcsolódására és ezzel a várható eredmények értékének növelésére. A publikációk természetesen említést tesznek valamennyi támogatási forrásról (pl. OTKA 46914; OMFB 1605-1606/2002).

A tudományos eredmények bemutatását követően összefoglaljuk az együttműködés további fontos missziójaként végzett tudományos utánpótlás képzés területén vállalt feladatunk eredményeit, amelyek egy **állatorvosi alapkutatási tréning centrum** (VBS-TC: Veterinary Basic Science – Training Center) alapjainak lerakását célozták.

A három kutatási csomópont a következő volt:

I. Az energia-metabolizmus szabályozásának hormonális és neuromorfológiai vonatkozásai

II. Az endotélsejtek egyes struktúrális és IgG homeosztázisban résztvevő génjének expressziós elemzése

III. Molekuláris szintű vizsgálatok kérődzőkben

A KUTATÁS EREDMÉNYEI

I. Az energia-metabolizmus szabályozásának hormonális és neuromorfológiai vonatkozásai

Az endokrin rendszer területén három hormont vizsgálatát terveztük a takarmányfelvétel és ennek szabályozása függvényében: a pajzsmirigy hormonokon kívül a leptin és a ghrelin fenti összefüggésekben játszott szerepének elemzése volt a cél. E hormonok (számos más hormonnal együtt) a peptiderg neuronokon keresztül befolyásolják a hypothalamust. A hypothalamusban a GABA és a neuropeptidok kapcsolatának a vizsgálata során többek között a leu-enkephalin, a galanin és a neuropeptid-Y is immunhisztokémiai eljárásokkal kimutathatóvá vált. A tervezett hormonanalízisek közül a ghrelinre vonatkozó vizsgálatokat metodikai nehézségek miatt nem sikerült a rendelkezésre álló idő alatt elvégeznünk, kiegészítettük ugyanakkor a kutatásokat a téma szempontjából igen fontos addicionális neuromorfológiai, neurofiziológiai vizsgálatokkal.

A vizsgálatokat csirke, lúd, patkány és szarvasmarha fajokban végeztük. A kísérleti állatokat alapértelmezésben visszafogott takarmányozásban részesítjük: az *ad libitum* takarmányozott társaikhoz képest a felvett energia 60-70-85%-át biztosítjuk számukra. A kísérleteket thyroidectomisalt és ovariectomisalt csoportokkal, illetve pajzsmirigyhormon-túladagolt és lúd esetében különféle tömési eljárásokkal hizlalt csoportokkal egészítjük ki.

A szervezet anyagcseréjét befolyásoló hormonok körében a pajzsmirigyhormonok szerepe ma már triviális. Nagy jelentőségű lépés volt ugyanakkor a pajzsmirigy hormonok perifériás metabolizmusával és annak jelentőségével kapcsolatos ismeretek bővítése, amely területen az élettani és biokémiai tanszék is végzett úttörő munkákat az elmúlt évtizedek során. Különösen jelentős felismerés volt a dehidrogénáz enzimek szerepe a pajzsmirigyhormon aktiválásban és inaktiválásban. Az egyes és kettes-típusú dehidrogénázok (D1 és D2) a hormonaktiválásban, míg a hármas típus (D3) az inaktiválásban vesz részt. Tisztázódott tehát, hogy az egyes szövetek önálló pajzsmirigyhormon szabályozó képességgel rendelkeznek, ami egyfajta szöveti automatizációt biztosít. Korábbi eredményeink azt mutatták, hogy a D1 működésének szabályozásában a szervezet energia-felvétele az egyik legfontosabb szabályozó tényező, amíg az agyi D2 – a hormonszintektől és az energetikai állapottól függetlenül - az idegszövet folytonos T₃ ellátását tartja fenn. Érdekes faji sajátosság, hogy csirkében a máj is tartalmaz D2-t, míg más állatfajokban a D2 nincs jelen a májban. Ezek az eredményeink irányították figyelmünket a máj és a központi idegrendszer közötti kapcsolat elemzése irányába.

Az elsősorban a fehér zsírszövetben termelődő leptin a hypothalamus neuronjain fejt ki a hatásait. Részt vesz a táplálékfelvétel szabályozásában, hatással van az energiatermelő folyamatokra és befolyásolja a nem-működést is, vagyis egyidejűleg játszik szerepet az anyagcsere és szaporodásbiológiai folyamatokat irányításában. Minthogy felvetődik a parakrin hatás a leptin esetében is, így úgy tűnik, hogy a pajzsmirigyhormon háztartáshoz hasonlóan a leptin háztartás is rendelkezik lokális szöveti autonómiával.

A különböző energia szinten takarmányozott csirkék májából mindhárom dehidrogénáz enzim aktivitását mértük. A méréseket hagyományos enzimkinetikai módszereken kívül kvantitatív és real time PCR metodikával végeztük. A csökkent energia-felvétel esetén a D3 aktivitás és a D3 transzkripció is jelentősen megnő. A D1 enzim esetében kimutattuk, hogy az energia bevitel változásai sem mRNS, sem aktivitás szinten nem érintik a szabályozását. Új

megfigyelés, hogy relatív energiahiányban a D2 aktivitása csökken, ugyanakkor szignifikánsan kevesebb D2 mRNS is termelődik. Korábbi – vitatottnak tekintett – állításunk, amely szerint ilyen kísérleti elrendezésben a májbeli hormonaktiválás csökken, most beigazolódott, azal az új felismeréssel, hogy a csirkék májbeli hormonaktiválása nem a D1, hanem a D2 enzimnek tudható be (Györffy et al. 2006, Somogyi et al. (2008)).

Mínt hogy a pajzsmirigyhormonok egyik legfontosabb tulajdonsága, az oxigénfogyasztás növelése, respirációs kamrás kísérletekkel vizsgáltuk patkányokban azt, hogy az etetett tápanyag hogyan befolyásolja a dehidrogénáz aktivitásokat az energiatermeléssel összefüggésben. A kísérletsorozat summája, hogy az energiaháztartás szabályozása több hormon összehangolt működésének eredménye (pajzsmirigyhormonok, leptin, inzulin). E komplex kísérletsorozat eredményeként világossá vált, hogy a takarmány energiataralma hogyan hat a májbeli enzim mRNS termelésére, a fehérje aktivitására, a hormonszintekre és végül jelentős oxigénfogyasztásbeli különbségeket eredményez. A rendkívül gazdag eredményeket részletesen egy közvetlen védés előtt álló PhD értekezés tárgyalja (Györffy, A. 2008).

Az eredmények alapján olyan specieresre is kiterjesztettük vizsgálatainkat, ahol élettani alapon jön létre energiahiányos állapot, amit szénhidrátok etetésével kívántunk befolyásolni. Frissen ellett teheneket májvédő propliénglikollal (PPG) kezeltünk, ami a glükoneogenetikus folyamatok révén növeli a máj szénhidrát tartalmát. Vizsgáltuk, hogy a PPG adagolás hatására hogyan változik a leptin és a pajzsmirigyhormonok háztartása. Megállapítottuk, hogy a PPG adagolás mind pre-, mind poszttranszlációs szinten növelte a D1 enzim aktivitását. A megemelkedett T₃ szintet háttérben a negatív energia egyensúllyal összefüggő csökkent energia-metabolizmus áll, amelynek háttérben alacsonyabb T₃-szintek állnak. Megmértük továbbá a májbeli leptin és leptin receptorok termelődésének ütemét is. Elsőként tudtuk kimutatni, hogy mind a leptin, mind a rövid leptin receptorok (Ob-Ra) mennyisége szignifikánsan megnövekedett PPG adagolás hatására. Leptin esetében a növekedés közel négyszeres, az Ob-Ra esetében több mint kilencszeres. A teljes méretű leptin receptor (Ob-Rb) esetében nem találtunk különbséget a kezelt és a kontroll csoportok között. Végeredményben az ellés körüli PPG adagolás hatással van a fontosabb energia-metabolizmust befolyásoló hormonok háztartására és figyelembe vehető májvédő hatással rendelkezik (Györffy et al. (2007)).

Vizsgáltuk a liba májának elzsírosodását is, mivel a liba egy olyan állatfaj, amelynek mája szintén mutat élettani elzsírosodást. Elemeztük, hogy az egyes hormonális paraméterek milyen módon befolyásolják a libamáj elzsírosodásának mértékét. Megállapítottuk, hogy a máj elzsírosodása nem hypothyroid állapot következménye, hanem éppen a máj megnövekedett metabolizmusa következtében történik az elzsírosodás (Györffy et al. (2008)).

A leptin szaporodásbiológiai folyamatokban játszott szerepének elemzése céljából a leptin hím patkányok járulékos nemi mirigyeinek fejlődésében és működésében betöltött szerepét elemeztük. Az adatok alapján mind a prosztata, mind az ondóhólyag termel leptint. Eredményeink kiemelik a leptin termelés és felhasználás lokális szabályozó hatását, a parakrin hatások jelentőségét (Sayed-Ahmed A et al. (2008)).

A leptin szaporodásbiológiai szerepére utalnak azok az eredményeink is, amelyeket a magzatok számával összefüggésben tapasztaltunk a plazma leptin szintek vonatkozásában (Kulcsár et al. (2006)).

A reprodukciós endokrinológiai összefüggések további tanulmányozása céljából vizsgáltuk a tenyésztés-szezon kezdetének előbbre hozatala céljából alkalmazott hosszú hatású melatonin

készítmények (Melovin, Regulin) hatását juhok esetében. Vizsgáltuk, hogy befolyásolja-e a hosszú hatású melatonin kezelés a plazma IGF-I valamint T₄ szintjét. A hosszú hatású melatonin kezelés a 45-70. nap között negatív hatással van a plazma IGF-I szintjére. Ez felveti annak a lehetőségét, hogy a laktáció ideje alatt ciklusindukció céljára alkalmazott melatonin kezelés csökkentheti az állatok tejtermelését. Ugyanakkor a tejtermelés szempontjából is jelentős T₄ szintekben nem tapasztaltunk eltérést, amiből arra következtetünk, hogy a pajzsmirigy-hormonok szezonális változását elsősorban nem a fotoperiódus, hanem a hőmérséklet határozza meg (Cseh S et al. (2007)).

Az energiametabolizmussal összefüggő neuromorfológiai vizsgálatok

A fentiekben tárgyalt hormonok (számos más hormonnal együtt) a peptiderg neuronokon keresztül befolyásolják a hypothalamust. A hypothalamusban a GABA és a neuropeptidok kapcsolatának a vizsgálata során többek között a leu-enkephalin, a galanin és a neuropeptid-Y is immunhisztokémiai eljárásokkal kimutathatóvá vált.

A támogatott periódus kezdetén néhány orexigén és anorexigén neuropeptid (CART, galanin /gal/, enkephalin /enk/, NPY) rostrocaudalis megoszlását és denzitásbeli változásait vizsgáltuk normál, éhezett hím, nőstény és ovariectomizált Wistar patkányok lateralis septumában (LS). A peptid-GABA kölcsönhatásra vonatkozó morfológiai adatokat GFP-GAD-65 transzgenikus egerek lateralis septumán végzett immunfluoreszcens vizsgálatokkal kerestünk. Eredményeink:

Kontroll patkányokban megállapítottuk, hogy az egyes neuropeptidok megoszlása eltérő a LS rostrocaudalis tengelye mentén (Kovács ÉG et al. (2005)).

Elektronmikroszkópos vizsgálataink szerint a CART és NPY axodendritikus, ill. tüsszeszinapszisokat létesítenek, míg a gal- és enk- terminálisok gyakran képeznek más sejtek körül pericelluláris kosárszerű képleteket (Janzó G et al. (2007)).

A transzgenikus egereken végzett immunfluoreszcens és konfokális mikroszkópos vizsgálatok a fentiekkel összhangban a GAD-GFP (GABAerg) sejteken is hasonló kapcsolatok meglétét igazolták. Az NPY-pozitív sejtek részlegesen átfednek a GAD-GFP sejtekkel (Janzó G et al. (2007)).

Négy hetes részleges éhezés hatására hím patkányok LS-ában a gal és NPY hasonló változásokat mutatott: az 1. és 2. héten a rostok denzitása nőtt, a 3. hétre a kontroll értékre csökkent, majd a 4. héten ez alá süllyedt. A leu-enk ezzel ellentétben hétről-hétre fokozatos csökkenést mutatott, a 4. hétre csak a kontroll érték felét érte el (Kovács ÉG et al. (2005)).

Intakt nőstény és ovariectomizált patkányok esetében az 1 hetes részleges éhezés mindkét csoportban szignifikánsan növelte az NPY denzitását saját kontrolljához képest. Ezek a változások a 4. hétre lecsengeni látszottak. Gal esetében mind a részleges éhezés, mind az ovariectomia csökkentette a rostok denzitását, míg az enk esetében az éhezés csökkentette, viszont az ovariectomia önmagában növelte a denzitást. Mindezen eredmények arra utalnak, hogy a LS peptiderg rendszerei egyaránt érzékenyen reagálnak nemcsak az éhezés, de egyes gonadális hormonok, ill. ezek kiesésének hatására is (Kovács ÉG et al. (2007)).

Vizsgálatainkat később kiterjesztettük egy erősen anorexigén peptidre, amely szintén nagy mennyiségben van jelen a lateralis septumban: a CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript) peptidre vonatkozó eredményeink szerint:

A hímekben és az intakt nőstényekben egy hetes részleges táplálékmevonas hatására szignifikánsan lecsökkent a CART-immunpozitív elemek detektálható mennyisége (Janzó G et al. (2008); Janzó G et al. (2006).

Az ovariectomizált nőstényekben csökkent a CART-tartalmú elemek denzitása, ugyanakkor az éhezõ csoportban enyhe növekedés volt megfigyelhetõ. Az ovariectomizált nõstényeknél ez az eredmény abból adódhatott, hogy a petefészkek eltávolítása utáni gyógyulási idõszakban jelentõs súlytöbbletre tettek szert (az ovariectomia orexigén hatású volt), így az egy hetes részleges éheztetés nem bizonyult elegendõnek ahhoz, hogy a CART-peptidet tartalmazó elemek denzitásában számottevõ csökkenést figyelhessünk meg.

Kettõs jelöléses vizsgálataink eredményei arra engednek következtetni, hogy a LS területén is van morfológiai - és ennek alapján feltehetõen funkcionális - kapcsolat a két peptiderg (CART-NPY) rendszer között.

A késõbbieken egy gliális marker, a GFAP denzitásbeli változásaira fókuszáltunk, minthogy az agyban lezajló plasztikus változások egyik megbízható indikátora az asztrogliá sejt kiterjedésének megváltozása, hiszen ezen sejt nyúlványai fontos szerepet játszanak a szinapszisok szigetelésében. Eredményeink szerint:

Kontroll állatokban a lateralis septum rostrocaudalis tengelye mentén nagyjából egyenletes immunreaktivitási szintet detektáltunk.

A részleges táplálékmevonas hatására jelentõs denzitásbeli növekedés, azaz a GFAP-immunreaktív elemek mennyiségének megnövekedése volt tapasztalható a septum területén mind a hímek, mind az intakt és ovariectomizált nõstények esetén is.

Ez a jelenség csak a lateralis septum területén volt észlelhetõ, mivel hímek esetén referencia-területként megvizsgáltuk a frontális kéreg területét is, de ott éhezés indukálta változások a GFAP denzitásában nem voltak tapasztalhatók.

Megállapítottuk továbbá, hogy a GFAP immunreaktivitás denzitása nõstényekben ezen az agyterületen nem függ a gonadalis hormonok mennyiségétõl (Halasy K et al. (2008).

Eredményeink szerint a hypothalamussal kölcsönös idegi kapcsolatban álló lateralis septum is neurokémiai változásokkal reagál a táplálékmevonasra. Ezek a változások egyaránt érintik a neuronális és gliális elemeket. Az asztrogliáról köztudott, hogy nyúlványrendszerét változtatni képes. Feltételezzük, hogy a denzitásbeli növekedés mögött is a nyúlványrendszer kiterjedése, bizonyos szinapszisok idõleges lezárása, leszigetelése állhat.

A fentieket kiegészítetük egy, az utóbbi egy évben felfedezett ATP- (adenozin trifoszfát) bontó enzim, az ektonukleozid trifoszfát difoszfahidroláz 3 (NTPDáz3) hypothalamic szerepének felderítésére fókuszáló kutatásokkal (Zsarnovszky et al. (2007), Zsarnovszky et al. (2008)). Immunhisztokémiai-neuromorfológiai vizsgálataink arra engednek következtetni, hogy az NTPDáz3 szerepet játszik az agyi purinerg szignálórészek szabályozásában. Megállapítottuk, hogy az NTPDáz3 kizárólag idegi elemekben fordul elõ és heterogén agyi lokalizációt mutat. A lokalizációra vonatkozó edigi eredményeink alapján feltételezzük, hogy

az NTPDáz3 szerepet játszhat a hypothalamus által szabályozott reprodukciós folyamatokban, az energiaháztartás szabályozásában, valamint az alvás-ébrenlét szabályozásában.

II. Az endotélsejtek egyes struktúrális és IgG homeosztázisban résztvevő génjének expressziós elemzése

A kutatás célja volt felderíteni azokat a génregulációs mechanizmusokat, melyek az endotél sejtek környezetükhöz való kihorgonyzásában, valamint az e sejtekben lejátszódó transzsepitheliális IgG transzportban és katabolizmusban szerepet játszanak. Ismert, hogy a vérerek endotél sejtrétege szelektíven választja el a vért annak környezetétől, amely egyfelől szövet specifikus, illetve a fejlődés és élettani állapot által szabályozott folyamat. Az endotélsejtek és az alattuk levő lamina basalis kapcsolata elsőrendű fontossággal bír e sejtek funkciójára. Vizsgálatainkban célul tűztük ki, olyan gének expressziójának vizsgálatát, amelyek e komplex struktúra kialakításban részt vesznek (disztroglikán), illetve befolyásolják az IgG homeosztázisát (FcRn). Munkahipotézisünkben feltételeztük e két folyamat kölcsönhatását.

A disztroglikán, mint sejtadhéziós receptor szerepe az endothel sejtek működésében.

A disztrofin-disztroglikán komplex (DGC) egyike azon sejtadhéziós receptoroknak, melyek az extracelluláris mátrix egyes tagjaival, elsősorban a különféle laminin formákkal kölcsönhatásba lépve biztosítják a sejtek kihorgonyzását a lamina basalisra. Az adhézió a sejtek integritásának megőrzésében betöltött szerepén túl befolyásolja egyes sejten belüli folyamatok lefolyását is. A DGC fehérje összetétele sejt- és fejlődési állapot függő, azonban kulcsfontosságú eleme, a transzmembrán lokalizációjú disztroglikán minden esetben jelen van. A komplex intracelluláris tagjának, a disztrofinnak a hiánya következtében vaszkuláris anomáliák lépnek fel modell állatokban, illetve disztrofin-hiányban szenvedő emberekben, ami arra utal, hogy az endothel sejtek fiziológiás működéséhez szükség van a DGC jelenlétére.

Munkánk célja az volt, hogy megállapítsuk, hogy a komplex központi fehérjéjének, **a dystroglycannak az expressziója milyen módon befolyásolja az endothel sejtek viselkedését laminin, illetve kollagén jelenlétében.** Vizsgálatainkban modellként egy szarvasmarha mellékvesekéreg-kapillárisból származó endothel sejtvonalat (BCE) használtunk. Összehasonlításként HC11 (egér emlő epithel sejtvonal) és primer asztrogliá sejtenyészeteket (egér agyból) is tanulmányoztuk.

A sejtek lamininnal és kollagénnel borított felszíneken történő letapadásának időfüggését vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy az minden esetben egy késleltetési szakasz után indult be. Ezután a HC11 sejtek és az asztrogliá sejtek szignifikánsan nagyobb mértékben tapadtak le laminin szubsztrátra, mint kollagénre, míg a BCE esetében a kollagénen való letapadás volt szignifikánsan nagyobb mértékű. Ez arra utal, hogy a laminin receptorok (DAPC) szerepe a BCE sejtekben kisebb, mint a másik két sejt típusban

A sejtek motilitását számítógéppel vezérelt videomikroszkópban vizsgáltuk, 20-40 órán keresztül ugyanezek a felszíneken. Az átlagsebességek összehasonlítása megerősítette előző eredményünket, mivel a laminin – bár mindhárom sejt típus gyorsabban mozgott ezen a szubsztráton - a legkisebb mértékben a BCE sejtek átlagsebességét növelte meg. A nettó elmozdulás és az átlagsebesség összevetéséből megállapítható irányváltoztatási gyakoriság mindhárom sejt esetében nagyobb lamininon. Ez munkahipotézisünk szerint a laminin

lamellipódium-képződést elősegítő hatásán alapul, melyben aktív szerepet játszik a laminin-DAPC kölcsönhatás.

Mindezek alapján **igazoltunk láttuk azt a feltevésünket, hogy a DAPC az általunk megvizsgált sejttípusokban befolyásolja a sejt és az extracelluláris mátrix kölcsönhatását**, ezért megkíséreltük a dystroglycan fehérje expresszióját sepcifikus siRNS segítségével végzett géncsendesítés segítségével lecsökkenteni. A génextpresszió csökkentése asztroglia sejtek esetében sikeres volt, amit egyrészt immunhisztokémiai módszerrel, másrészt a laminin motilitásnövelő hatásának vizsgálatával igazoltunk. Az endothel és az epithel sejtek esetében a dystroglycan szintjének ezzel a módszerrel történő csökkentése még további erőfeszítéseket kíván.

Mivel a specifikus siRNS segítségével lecsökkentett dystroglycan expressziót mutató sejt kultúrák esetében a laminin motilitásnövelő hatása nem érvényesül, az asztroglia sejtek esetében megerősítést nyert a laminin-DAPC kölcsönhatás funkcionális jelentőségéről felállított hipotézisünk. (Kiss A. et al. (2007); Kiss A. (2008))

Az IgG homeosztázisban résztvevő FcRn expressziós elemzése endotélsejtekben

A szérum megfelelő mértékű ellenanyag szintjének fenntartása egyfelől folyamatos immunoglobulin termelést, másfelől az ellenanyagok gyors kiürülése elleni védelmet igényel. Míg az IgM, IgA és IgE hamar kiürül a szervezetből (felezési idő: 3-5 nap), addig az IgG felezési ideje jelentősen hosszabb (17-20 nap).

A neonatalis Fc receptor (FcRn) megvédi az IgG molekulákat a lebomlástól, és ezzel meghosszabbítja a felezési idejüket. Bár korábban ezt a folyamatot a kapilláris endothel sejtekben figyelték meg, újabb vizsgálatok más, fagocitózisra képes sejtekben is leírták a jelenséget. Ezekben a sejtekben az FcRn elsődlegesen a korai endoszómákban található, ahol a pinocitózissal bekebelezett IgG molekulákkal találkozik. Az itt uralkodó enyhén savas kémhatású környezet hatására a két molekula kapcsolódik egymással. A megkötött IgG a sejtfelszínre kerül, ahonnan felszabadul, míg az FcRn által meg nem kötött molekula a lizoszómában lebomlik. A funkcionális FcRn egy olyan heterodimer molekula, amely egy MHC-I típusú nehéz láncból és egy béta2-mikroglobulinból (b2m) áll. Ez a receptor savas közegben megköti az IgG és az albumin molekulákat, bár a kötésben az FcRn különböző motívumai vesznek részt.

Korábbi *in vitro* luciferáz vizsgálatainkkal igazoltuk, hogy a szarvasmarha FcRn (bFcRn) nehéz láncának génje és a b2m indukálható az NFkB transzkripció faktorral (**1/a,b,c ábra**), amelyet az ún. electromobility shift assay-el (EMSA) is megerősítettünk (**2 ábra**). Ezeket az eredményeket egy szarvasmarha kapilláris endothel sejt vonalban (BCE, Y. Cao, Karolinska Institute) és primer szarvasmarha arterialis endothel sejtekben (BAEC, Cambrex) is validálni kívántuk.

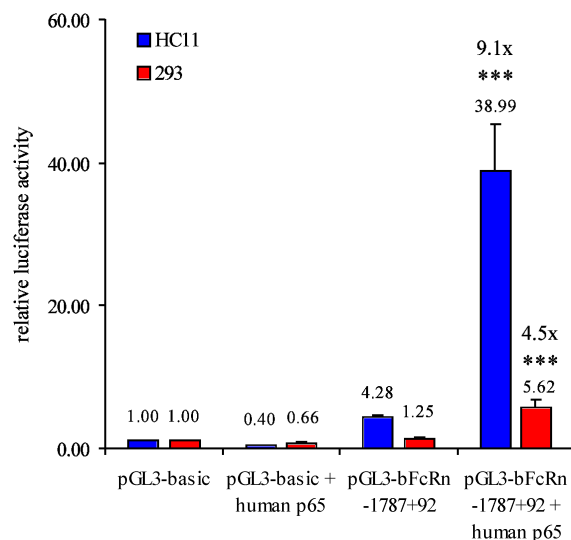
Először klónoztuk a szarvasmarha NFkB p65 alegységét és elemeztük ennek szarvasmarha endothel sejtekre gyakorolt hatását (Doleschall et al., 2007). Ezt követően, RT-PCR módszerrel kimutattuk a BCE és BAEC sejtek endogén FcRn expresszióját (**3. ábra**). E két sejtmodellben először ellenőriztük, hogy az LPS (elsődlegesen NFkB transzkripció faktoron indukál) hatására kialakul-e a p65 alegység citoplazmából sejtmagba történő áthelyeződése. Számos kísérlet kapcsán arra jutottunk, hogy a BAEC sejtek esetén csak akkor tudjuk e jelenséget kimutatni, ha a sejtmediumban drasztikusan csökkentjük a borjú savó koncentrációját, míg a BCE sejtek esetén ebben az esetben sem működött az assay. Immuncitokémiai kísérleteinket eredeti LPS mentes Cambrex mediumban is megismételtük, és ebben az assay pozitívnak bizonyult abban az esetben is, ha a sejtek számára megfelelő borjú savót (5%) adtunk (**4. ábra**). Ezt követően a BAEC sejteket kezeletlen felületű és

zselatinnal bevont sejtkultúra lemezen tenyésztettük és így kezeltük azokat LPS-el. A tenyésztést követően a sejtek bFcRn nehéz lánc, b2m és E-szelektin (pozitív kontroll) expressziós szintjét vizsgáltuk egy kvantitatív, real-time PCR technika alkalmazásával (**5. ábra**). Méréseink azt mutatták, hogy a sejtek bFcRn nehéz lánc expressziója a kezletlen felületen nem koherens, míg a zselatinnal bevont felületen enyhe mértékű, kb. 1.8-szoros emelkedést kaptunk, a kezelést követő 2 óra múlva. Másfelől, a b2m és az E-szelektin expressziója mindkét esetben jelentős mértékben indukálódott a különböző kezelések hatására (kezletlen és zselatinnal kezelt felület esetén). További kísérleteinkben egy másik extracelluláris mátrixot, a kollagént is alkalmaztuk, de ebben az esetben a sejtek nem tapadtak le és ezért ezeket a kísérleteket felfüggesztettük.

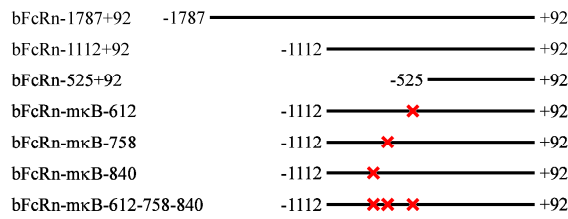
Ezek az eredmények arra utaltak, hogy a bFcRn nehéz-lánc expressziója enyhén reagál az LPS mediált NFkB stimulusra, és az LPS stimuláció megfelelő volt. Ezt követően az NFkB hatását a bFcRn expressziójára olyan transzgenikus egerekben elemeztük, amelyek több kópiaszámban expresszálják a bFcRn nehéz láncát (ezeket az állatokat egy másik pályázatunk - OMFB 1605-1606/2002 – Dr. Bösze Zsuzsanna és munkacsoportjával (Genetikai Módosítás Program Csoport, Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont, Gödöllő) közösen hoztuk létre (Bender et al., 2007). Ezekben a kísérletekben LPS injektáltunk az állatok hasüregébe és Northern blot segítségével elemeztük a lép és a máj bFcRn expresszióját. Ezek az eredmények egyértelműen megerősítették, hogy korábbi vizsgálati eredményeinket, azaz az LPS jelentős mértékben indukálta a lép (**6. ábra**) és kisebb mértékben a máj bFcRn expressziós szintjét. Ez az eredményünk jól korrelál Liu és mtsai. által a humán FcRn NFkB indukálhatóságát leíró 2007-ben megjelent publikációjával (*J Immunol* **179**, 2999-3011). 2008-ban eredményeinket több ízben validáltuk és azokat a közeljövőben kívánjuk publikálásra elküldeni (**Cervenak et al., 2008**).

Összefoglalásként megállapíthatjuk, hogy a bFcRn nehézlánc promotere több NFkB transzkripciós kötőhelyet is tartalmaz, ill. a LPS kezelés hatására mind *in vitro*, mind *in vivo* emelkedik e gén expressziójának mértéke. Ezek az eredmények további vizsgálatokat sürgetnek e hatások funkcionális értelmezésével kapcsolatban.

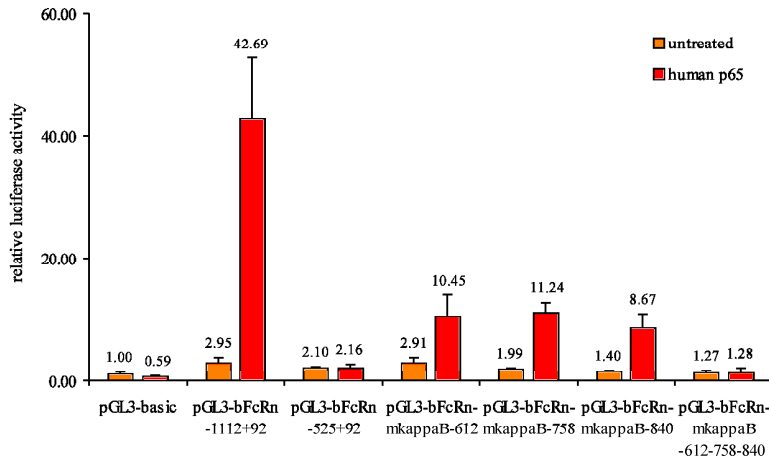
Ábrák



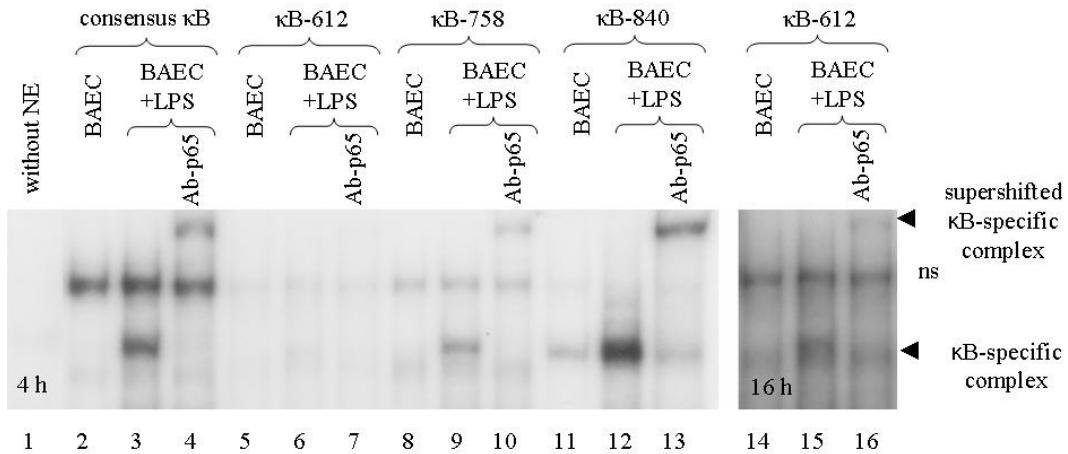
1/a. ábra. A humán p65 indukció bFcRn promoterre gyakorolt hatása luciferáz reporter elemzésben. A luciferáz aktivitás jelentősen ($p < 0.001$) emelkedett a pGL3-bFcRn-1787+92 konstrukció vonatkozásában, míg az indukálatlan sejtek, illetve az üres vector (pGL3-basic) nem mutatott eltérést. A három független kísérlet eredményeinek átlagértékét az oszlopok fölött tüntettük fel, míg az SD értékeket az oszlopra illesztett vonalak jelzik.



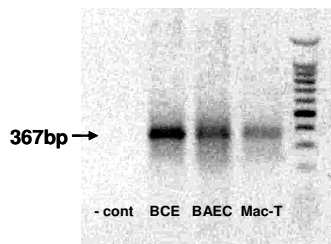
1/b. ábra. A bFcRn promotor NFκB transzkripciós faktor kötőhelyeinek in vitro mutációval létrehozott változatait piros X –el jelöltük; ezeket a konstrukciókat alkalmaztuk a luciferáz elemzéseinkben.



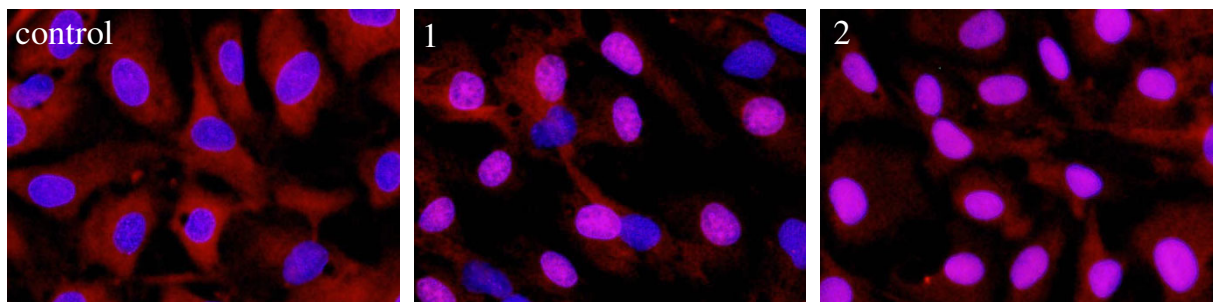
1/c. ábra. Az eredeti és mutált bFcRn luciferáz konstrukciókat a humán NFκB p65 alegység ko-transzfekeciójával indukáltuk HC11 sejtekben. A mutált változatok (pGL3-bFcRn-κB-612, pGL3-bFcRn-κB-758 és pGL3-bFcRn-κB-840) indukálhatósága lényegesen alacsonyabb volt az eredeti konstrukcióval (pGL3-bFcRn-1112+92) összehasonlítva, de teljesen nem tűnt el. A mindhárom kötőhely mutált változatát tartalmazó konstrukció (pGL3-bFcRn-κB-612-758-840) nem volt indukálható p65-el, ami arra utal, hogy mindhárom kötőhely szerepet játszik a bFcRn promotor p65 indukálhatóságában. A három független kísérlet eredményeinek átlagértékét az oszlopok fölött tüntették fel, míg az SD értékeket az oszlopra illesztett vonalak jelzik.



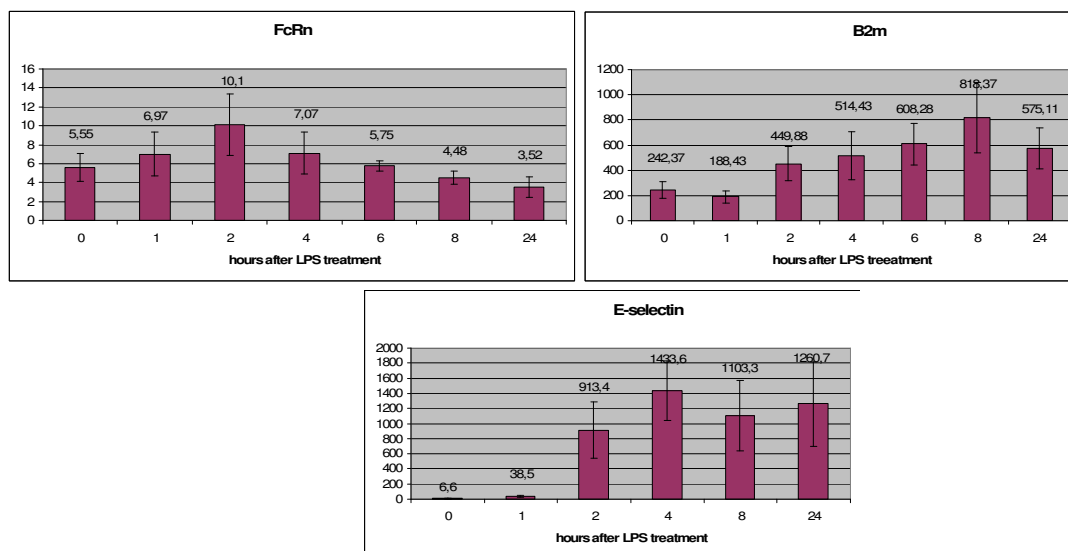
2. ábra. Electromobility assay (EMSA) a bFcRn NFκB (κB) kötőhelyeinek elemzésére. Sejtmag kivonatok (NE) készítettünk kezeletlen primer szarvasmarha aorta endothel sejtekből (BAEC) és LPS-kezelt BAEC (BAEC +LPS) sejtekből, majd ezeket jelölt oligonukleotidokkal (κB-612, κB-758, κB-840 és konszenzus κB kötőhelyek) inkubáltuk és futtattuk p65 specifikus ellenanyag (Ab-p65) hiányában és jelenlétében. Jól elkülönülő κB-specifikus fehérje-DNA komplexeket (alsó nyíl, κB-specifikus komplex) detektáltunk az LPS kezelt BAEC sejtekben (3, 9, 12 csíkok), és ezeket a komplexeket még tovább el lehetett mozdítani p65 ellenanyag hozzáadásával (felső nyíl, supershift κB-specifikus komplexek, 4, 10, 13 csíkok). A κB-612 oligonukleotid esetében a NFκB-specifikus komplex és ennek supershift eltolt változata csak a 16 órás expozíciót követően vált láthatóvá (15, 16 csíkok). κB-specifikus komplexeket nem lehetett megfigyelni, ha a sejtmagkivonatot kezeletlen BAEC sejtekből nyertük (2, 8, 11, 14 csíkok). "ns" nem specifikus csík.



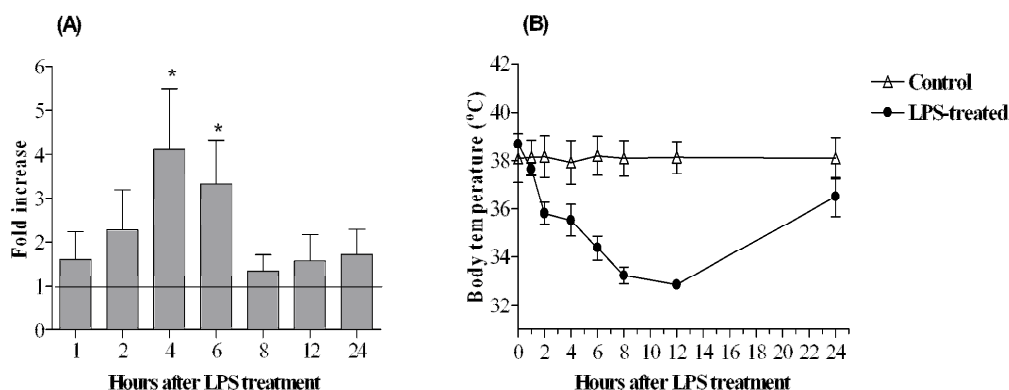
3. ábra. RT-PCR elemzéssel igazoltuk, hogy a BCE és BAEC sejtek expresszálják a bFcRn gént. Pozitív kontrollként a Mac-T sejtekből (bovine mammary acinus epithelial sejtvonal) izoláltunk total RNS-t.



4. ábra. Immuncitokémiai elemzés az NFkB sejtmagba történő transzlokációjára BAEC sejtekben, LPS stimulusra. A BAEC sejteket LPS kezeltük 1 és 2 óra időtartamban, fixáltuk az NFkB p65 alegységet egy p65 specifikus ellenanyaggal detektáltuk (a p65 primer ellenanyagot egy Alexa 568 konjugált másodlagos ellenanyaggal vizualizáltuk (piros szín). A DNS-t a Hoechst 33342 festékkel jelöltük (kék szín).



5. ábra. Az LPS kezelés hatása FcRn, beta2-mikroglobulin (b2m) és E-szelektin expressziós szintjére. A méréseket kvantitatív, real-time PCR elemzéssel végeztük LPS kezelt és kezeletlen sejtekből kivont total RNS felhasználásával. Az LPS kezelés 1, 2, 4, 6, 8 és 24 órát tartott. A vizsgálatok alapján arra következtettünk, hogy mindhárom gén, de különösen a b2m és az E-szelektin expressziója emelkedett az LPS stimulus hatására. A rendszer “normalizálását” az ubiquitin génre végeztük el. Az oszlopok a három független vizsgálat átlagát és SEM értékeit mutatják.



6. ábra. A bFcRn nehézlánc expressziója emelkedik a bFcRn transzgenikus egerek (Bender et al., 2007) lépében LPS stimulus hatására. Az egereket hasüregébe 250 µg/100 g LPS-t injektáltunk. (A) 1, 2, 4, 6, 8, 12 és 24 órával az LPS kezelést követően meghatároztuk az egerek lépének bFcRn génexpressziós szintjét (Northern blot) a kezeltetlen kontrollokhoz (vízszintes vonal) hasonlítva (* = $p < 0.05$). (B) az állatok rektális hőmérséklete jól tükrözi a kezelés hatékonyságát.

III. Molekuláris szintű vizsgálatok kérődzőkben

Ellés után az involúció folyamatában a vemhes méh mintegy 90%-át elvesztve nyeri vissza vemhesség előtti állapotát. Az endometrium le- és átépülésében elsősorban a sejtek a programozott sejthalállal (apoptosis) való pusztulása játszik szerepet. Az apoptosis előnye a necrosis szemben, hogy a sejtek szétesése nélkül történik meg a szövet lebontása, mely így nem indukál gyulladást a környezetben. Nem megfelelő energiaellátottság esetén azonban az apoptosis képes necrosisba átmenni, s ezáltal fokozhatja az involúciós szövődmények előfordulását. Az ellés utáni időszakban az állat energiaigényének a fokozódásával (növekvő tejtermelés és az involúció energiaigénye) könnyen negatív energiaegyensúly, NEB alakulhat ki, mely ha ketonanyagok jelentős mértékű felhalmozódásával is párosul, ketózisról beszélhetünk.

Munkánk során 49 tehenet kísértünk figyelemmel az ellés utáni időszakban. Az ellést követő 4-14. napon endometrium-biopsziát végeztünk, a nyert mintát szövettani és immunhisztokémiai módszerekkel vizsgáltuk és célunk volt összefüggést találni a beta-hidroxibutirát (BHB) vérbeli koncentrációjának változásával, mely a sejtek energetikai statusának jó jellemzője..

A méhbiopsziák paraffinba ágyazott metszetek készültek, melyeken az apoptosist hármassal festéssel mutattuk ki. Egyrészt az apoptotikus sejtek fragmentálódott DNS-ét FITC-cel konjugált nukleotidokkal jelöltük terminális-deoxynukleotid-transzferáz enzim

segítségével (TUNEL módszer). Másrészt az apoptózis folyamatában kaszpáz-hasított 85kDa nagyságú Poli-ADP-ribóz-polimeráz (PARP) fragmentumát direkt jelzett tercier ellenanyaggal. Végül a sejtek DNS-ét DAPI-val is megfestettük, ami lehetővé tette valamennyi sejtmag (élő, elpusztult) megfigyelését. Szükség volt még egyidejű anti-CD45 (humán leukocita antigén) ellenanyag használatára is, mivel a pyelometritisszel terhelt mintákban tapasztalható erős gyulladáshoz besűrűsödés értékelhetetlenné tenné az apoptotikus index meghatározását. Az immunhisztokémiai festés során a PARP festés nagyon kevés metszeten adott értékelhető eredményt, ezért a teljes értékelésből kizártuk a módszert. Apoptotikusnak azokat az endometrium sejteket fogadtuk el, melyek egyidejű TUNEL és DAPI pozitivitást adtak.

Kísérleteinket számos esetben megismételtük és kiegészítettük gastrointestinalis sejtvonalakon (CaCo-2, HT-29) végzett vizsgálatokkal (Gálfi et al. (2005), Németh et al (2007), Németh et al. (2007a), Szekér et al. (2007)).

Mindezek mellett számos olyan vizsgálatot is végeztünk sejttenyészetben, melynek során a nem megfelelő energia ellátottság esetén a sejthalált kedvező irányba kívántuk befolyásolni. polifenolok és más szabadgyökfogó anyagok sejttenyészetben történő alkalmazása segítségével (Domokos et al (2008), Gálfi et al. (2007)).

Vizsgálataink eredményei azt mutatják, hogy az egészséges kontrollokhoz illetve beteg, normoketonaemiás egyedekhez viszonyítva (51,7%±0,8) a magas BHB szinttel rendelkező állatok méhbioptátumaiban az össz-sejtszámhoz viszonyítva százalékosan kevesebb az apoptotikus sejtek aránya (24,5%±7,3). Eredményeinkből arra következtethetünk, hogy ketózis esetén az endometrium sejtjei kisebb arányban pusztulnak el apoptosissal, ami fokozhatja a necrosis veszélyét és a gyulladáshoz vezető folyamatok kialakulását (Gálfi et al. (2007)).

IV. Az állatorvosi alapkutatási tréning centrum (VBS-TC: Veterinary Basic Science – Training Center) alapjainak lerakását célzó törekvések.

A jelen pályázat keretében folyó tudományos munka kivitelezése során kiemelten fontosnak tartottuk a szakmai-tudományos utánpótlás képzésének megújítását, hatékonyabbá tételét. Ennek érdekében az öt csatlakozó laboratórium által felvállalt három kutatási terület művelése során a rendszerbe bevont doktoranduszok, szakdolgozati munkát készítő hallgatók és kiemelkedő Tudományos Diákköri munkát végző fiatalok egy szervezett rendszerben szerezhettek elmélyült ismereteket és gyakorlatot a modern élettudományi metodikák területén.

Valamennyi együttműködő laboratórium ún. vendégkutatói periódus eltöltésére adott lehetőséget. A vendégkutatói időszak során a doktorandusz vagy szakdolgozatot készítő hallgató az általa nem művelt terület laboratóriumában tett szert alapos ismeretekre.

Az alapvető koncepció alapján a résztvevők a gén – sejt – szövet – és teljes szervezet alapos tanulmányozását biztosító metodikákkal ismerkedtek meg. Lehetőségük nyílt a legújabb molekuláris biológiai, endokrinológiai, enzim-kinetikai, receptor-kinetikai, immunológiai és neuromorfológiai metodikák széles spektrumának elsajátítására.

A kutatási időszak lezárásának évével bezárólag öt PhD munka került megvédésre, további öt PhD értekezés kerül benyújtásra 2008 folyamán, hat további szakdolgozat született és az értékes munkák eredményeként három végzett hallgató felvételt nyert a doktori iskolába.

A rendelkezésre álló infrastruktúra és know-how hatékony alkalmazása eredményeként az öt kutató laboratórium minden korábbinál intenzívebb együttműködése jött létre, ami különlegesen kedvező feltételeket biztosít az alapkutatási doktori programokba bekapcsolódó fiatal munkatársak hatékony képzéséhez.