

KUTATÁSI ZÁRÓJELENTÉS

A pályázat címe: Reaktív oxigén származékok szerepe a fibrózis kialakulásában

A pályázat OTKA azonosítója: NF 72669

Időtartama: 2008.07.01-2011.12.31

Témavezetője: Dr Geiszt Miklós, Semmelweis Egyetem Élettani Intézet

1. Publikált eredmények ismertetése

1.1 A peroxidazin (PXDN) fehérje vizsgálata

A peroxidazin fehérje (PXDN) az emlős peroxidázok családjába tartozik, pontos funkciója azonban jelenleg ismeretlen. Kísérleteinkben kimutattuk, hogy a PXDN a sejtek endoplazmás retikulumában található. Azt is kimutattuk, hogy humán fibroblasztok, miofibroblasztá váló átalakulása során a PXDN expressziója emelkedik és a fehérje szekretálódik az extracelluláris térbe. Az extracelluláris térbe kerülve a PXDN jellegzetes, kábel-szerű struktúrákban található és kolokalizációt mutat más extracelluláris fehérjékkel, például a fibronektinnel. Megállapítottuk, hogy a vese fibrotikus átalakulása során felszaporodik a PXDN mennyisége a peritubuláris térben.

Publikáció: Péterfi Z, Donkó A, Orient A, Sum A, Prókai A, Molnár B, Veréb Z, Rajnavölgyi E, Kovács KJ, Müller V, Szabó AJ, Geiszt M. Peroxidasin is secreted and incorporated into the extracellular matrix of myofibroblasts and fibrotic kidney. *Am. J. Pathol.* 2009, 175(2):725-35. IF: 5.673

1.2 A laktoperoxidáz enzime (LPO) ditirozinképző aktivitásának jellemzése

Alacsonyabb rendű élőlényekben a peroxidázok fontos szerepet játszanak az extracelluláris mátrix stabilizációjában. Fontos kérdés, hogy vajon az emlős peroxidázoknak van-e hasonló funkciójuk. E kérdés vizsgálata a peroxidazin fehérje esetében lenne a legindokoltabb, azonban a peroxidazin rekombináns formában történő előállítását egyelőre nem sikerült megoldanunk. Kísérleteinkben az LPO ditirozin-képző aktivitását jellemeztük és megállapítottuk, hogy az enzim igen hatékonyan katalizálja H_2O_2 jelenlétében a ditirozin kötések kialakulását. Azt is megállapítottuk, hogy az enzimek ez az aktivitása lehetőséget teremt a H_2O_2 koncentrációjának mérésére is.

Publikáció: Donkó A, Orient A, Szabó PT, Németh G, Vántus T, Kéri G, Orfi L, Hunyady L, Buday L, Geiszt M. Detection of hydrogen peroxide by lactoperoxidase-mediated dityrosine formation. *Free. Radic. Res.* 2009, 43(5):440-5. IF:2.215

1.3 Az endoplazmás retikulum (ER) redox állapotának jellemzése fluoreszcens technikával

Az endoplazmás retikulum redox állapotának alakulása nagyon izgalmas kérdés a Nox enzimek szempontjából, ugyanis a Nox4 fehérje valószínűleg ebben a kompartmentben található. Kísérleteink során egy fluoreszcens, H₂O₂-érzékeny fehérje, a Hyper segítségével sikerült megmérnünk a H₂O₂ szintjét különböző intracelluláris kompartmentekben. Speciális target szekvenciák felhasználásával különböző sejtalkotókban expresszáltuk a Hypert és így sikerült megmérnünk a H₂O₂ koncentrációját a citoszolban, a mitokondriumokban, az endoplazmás retikulumban, a sejtmagban és a plazmamembrán szintjén is. Kimutattuk, hogy az endoplazmás retikulum lumenében a legmagasabb a H₂O₂ koncentráció, ami valószínűleg az Ero1-L enzim aktivitásának a következménye. Azt is kimutattuk, hogy ha az endoplazmás retikulum lumenének kalcium tartalma csökken, akkor ezzel párhuzamosan csökken a H₂O₂ koncentráció is a lumenben. Kísérleteink során azt is kimutattuk, hogy az endoplazmás retikulum oxidatív környezete valószínűleg független a Nox enzimek expressziójától, ugyanis a Nox1-4 enzimek aktivitásához elengedhetetlen p22^{phox} expressziójának gátlása nem befolyásolta az ER redox állapotát.

Publikáció: Enyedi B, Várnai P, Geiszt M. Redox state of the endoplasmic reticulum is controlled by Ero1L-alpha and intraluminal calcium. *Antioxid. Redox. Signal.* 2010, 13(6):721-9. IF: 8.209

1.4 A Duox1 enzim szerepének vizsgálata urotél sejtekben

A Duox1 NADPH oxidáz funkciója jelenleg ismeretlen. Primer urotél sejteket vizsgálva kimutattuk, hogy a kalcium szignált kialakító thapsigargin H₂O₂-termelést stimulál, ami gátolható volt DPI-vel, a NADPH oxidázok gátlószerével. Azt is kimutattuk, hogy az urotéliumban a Duox1 mRNS nagy mennyiségben, a Duox2 pedig alacsony szinten fejeződik ki. Annak vizsgálatára, hogy az urotélium által termelt H₂O₂-ot valóban a Duox1 termeli, Duox1 knockout egerek urotéliumának H₂O₂ termelését tanulmányoztuk. Kimutattuk, hogy a Duox1 knockout sejtek bazális H₂O₂ -termelését - a vad típusú sejtekkel ellentétben - thapsigarginnal, vagy a TRPV4 (tranziens receptor potenciál vanilloid 4) csatorna aktiválásán keresztül nem lehetett stimulálni. Cisztometriás kísérletekben azt is megállapítottuk, hogy a Duox1 genetikus hiánya megváltozott hólyag kontrakciókat eredményez.

Publikáció: Donkó A, Ruisanchez E, Orient A, Enyedi B, Kapui R, Péterfi Z, de Deken X, Benyó Z, Geiszt M. Urothelial cells produce hydrogen peroxide through the activation of Duox1. *Free. Radic. Biol. Med.* 2010, 49(12):2040-8. IF:5.707

1.5 Az SH3PXD2B fehérje azonosítása és jellemzése

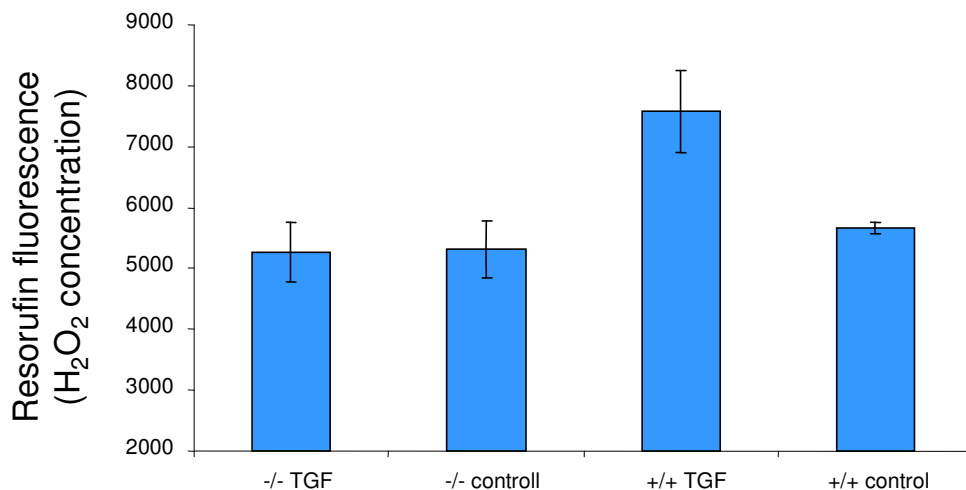
Az SH3PXD2B fehérjét elsők között azonosítottuk, azonban a fehérje funkciójának megismerése és az eredmények publikálása nem bizonyult könnyű feladatnak. A korábban nem ismert fehérjével azért kezdtünk el foglalkozni, mert az nagyfokú homológiát mutat a p47^{phox} és NOXO1 fehérjékhez, amelyek a fagocita, illetve a colon oxidáz komponensei. Mivel a Nox4 fehérjének nem ismert citoszolikus regulátora ezért megvizsgáltuk annak lehetőséget, hogy esetleg az SH3PXD2B fehérje szabályozná a Nox4 működését. Az SH3PXD2B és a Nox fehérjék együttműködésére azonban nem találtunk bizonyítékot, annak ellenére, hogy más munkacsoportok leírták a fehérje Nox1-et szabályozó működését. Megfigyeltük viszont, hogy a fehérje számos sejtben és szövetben megtalálható, míg a Nox fehérjékre inkább a szövetspecifikus expresszió a jellemző. Megállapítottuk, hogy az SH3PXD2B fontos szerepet játszik a lamellipódiumok kialakulásában és a sejtek szétterülésében.

Publikáció: Lányi Á, Baráth M, Péterfi Z, Bogel G, Orient A, Simon T, Petrovszki E, Kis-Tóth K, Sirokmány G, Rajnavölgyi É, Terhorst C, Buday L, Geiszt M. The homolog of the five SH3-domain protein (HOFI/SH3PXD2B) regulates lamellipodia formation and cell spreading. *PLoS. One.* 2011;6(8):e23653 IF:4.411

2. Még nem publikált kísérleti munka és eredmények ismertetése

2.1 A Nox4 szerepének vizsgálata differenciálódó miofibroblasztok H₂O₂ termelésében

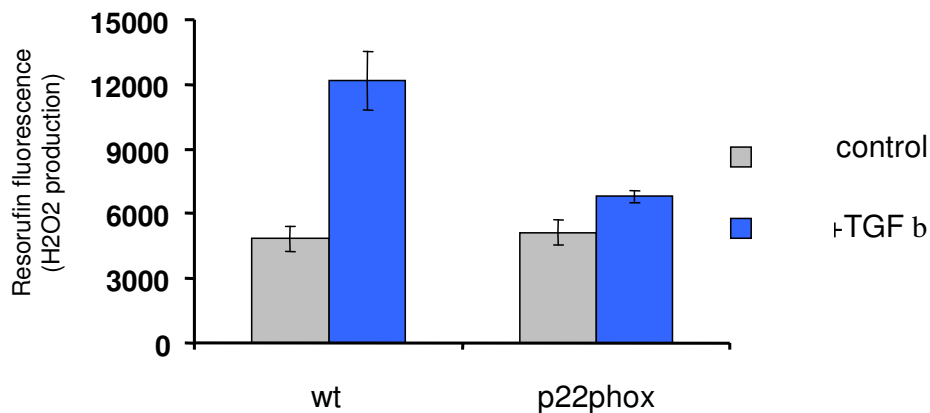
TGFβ-val stimulált fibroblasztokban jelentősen növekszik a Nox4 enzim szintje. Ezt eddig csak szív és tüdő fibroblasztokon mutatták ki és azt találták, hogy a Nox4 enzim által termelt H₂O₂ szükséges a miofibroblaszt irányba történő differenciálódáshoz. Saját kísérleteinkben Nox4 KO egerek segítségével vizsgáltuk, hogy mi lehet a Nox4 szerepe a differenciálódási folyamatban. Kísérleti modellünk az egér farokból preparált fibroblaszt sejt volt, amely TGFβ hatására három nap alatt miofibroblaszttá differenciálódik. Kísérleteink során megállapítottuk, hogy a farok fibroblaszt sejtek Nox4 expressziója TGFβ hatására jelentősen fokozódik és a sejtek H₂O₂ termelése is nő. Nox4 KO egerekből preparált sejteken végzett kísérletekben az találtuk, hogy a fokozódó H₂O₂ termelésért a Nox4 enzim a felelős (**1. ábra**). Ezzel a kísérlettel elsőként igazoltuk genetikai modell segítségével a Nox4 enzim szerepét miofibroblaszttá differenciálódó sejtek H₂O₂ termelésében.



1. ábra Nox4 KO (-/-) és vad típusú (+/+) fibroblasztok TGFbeta-val stimulált H₂O₂ termelése

2.2 A p22^{phox} szerepének vizsgálata differenciálódó miofibroblasztok H₂O₂ termelésében

Heterológ expressziós rendszerekben végzett kísérletek alapján feltételezik, hogy a Nox4 enzim komplexet képez a p22^{phox} fehérjével. Mivel a TGFβ-val stimulált fibroblasztok endogén módon expresszálják a Nox4-et, ezért kíváncsiak voltunk, hogy ebben a rendszerben is szükséges a p22^{phox} expressziója a Nox4 enzim aktivitásához. A kérdést p22^{phox} KO egerekből preparált fibroblasztokon végzett kísérletekkel sikerült megválaszolnunk. Azt találtuk, hogy a p22^{phox} KO egerekből preparált fibroblasztok H₂O₂ termelése – hasonlóan a Nox4 KO sejtekhez – nem fokozódik TGFβ hatására, ami arra utal, hogy a p22^{phox} fehérje szükséges a Nox4 működéséhez (**2. ábra**). A Nox4 tehát ebből a szempontból hasonlít a Nox család azon tagjaihoz, amelyek működéséhez szintén elengedhetetlen a p22^{phox} jelenléte.

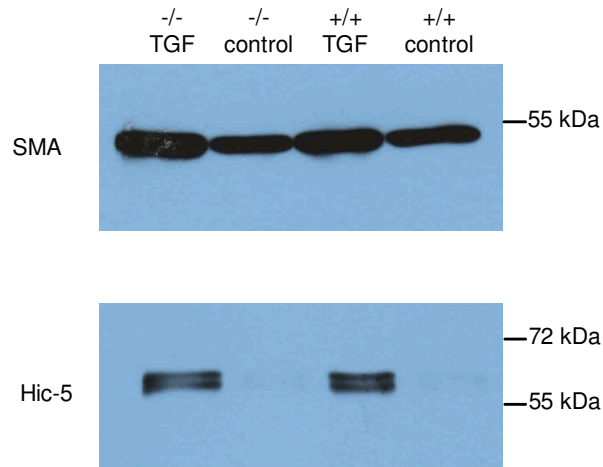


2. ábra P22^{phox} KO és vad típusú fibroblasztok TGFβ-val stimulált H₂O₂ termelése

2.3 A Nox4 szerepének vizsgálata a miofibroblasztá történő differenciálódásban

A következőkben azt vizsgáltuk, hogy a Nox4 KO fibroblasztok képesek-e TGFβ hatására miofibroblasztokká differenciálódni. A miofibroblasztá történő átalakulás markere a simaizom aktin (smooth muscle actin, SMA), amely nagy mennyiségben található a miofibroblasztokban. Megállapítottuk, hogy a Nox4-deficiens fibroblasztok SMA expressziója, TGFβ hatására, a vad típusú sejtekhez hasonlóan fokozódik (**3. ábra**). Egy másik, szintén differenciálódást jelző markert vizsgálva (Hic-5) hasonló eredményre jutottunk.

Eddigi eredményeink alapján tehát azt látjuk, hogy Nox4 hiányában a miofibroblaszt irányba történő differenciálódás létrejön, azonban nem tudjuk hogy a Nox4 hiányos sejtekből differenciálódó miofibroblasztok mennyire funkcióképesek, ezért a jövőben további differenciálódási markereket és miofibroblaszt funkciót is tervezünk vizsgálni. Ezek az eredményeink különböznek a közelmúltban a Hecker és munkatársai által publikált eredményektől, akik siRNS technika felhasználásával azt találták, hogy a Nox4 expresszió gátlása megakadályozza a TGFβ-val stimulált miofibroblaszt differenciálódást (Hecker *et al.* Nature Med., 2009, 1077-1081) Úgy gondoljuk azonban, hogy az általunk alkalmazott kísérleti megközelítés, vagyis a KO sejtek vizsgálata, alkalmasabb módszer a probléma vizsgálatára mint az siRNS technika.



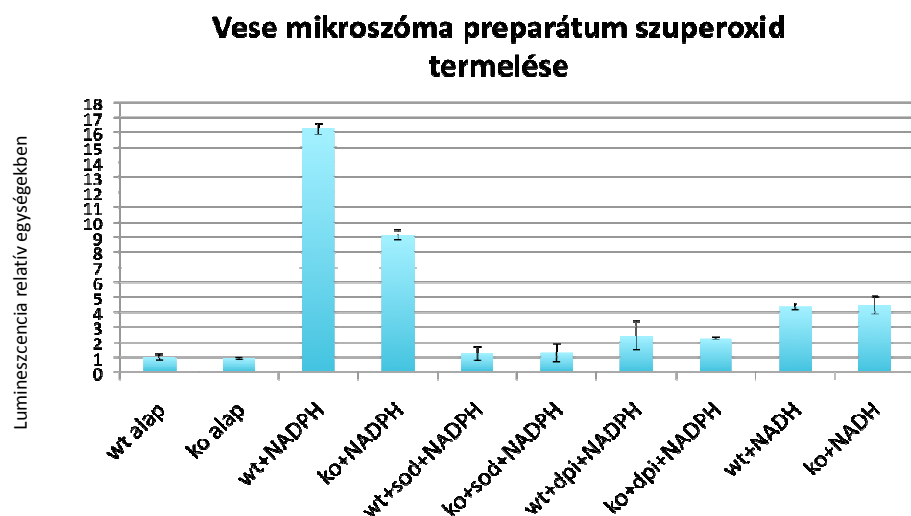
3. ábra Miofibroblaszt differenciálódás vizsgálata Nox4 KO (-/-) és vad típusú (+/+) fibroblasztokban

Az *in vivo* fibrózis modellekben (bleomycinnel kiváltott tüdő és ureter ligálással kiváltott vese fibrózis) nem láttunk különbséget a vad típusú és KO egerek között, ami összhangban van a sejt kultúrában végzett kísérletek eredményével.

2.4 A Nox4 intracelluláris lokalizációjának vizsgálata

A Nox4 fehérje működésének kutatását jelentősen megnehezíti, hogy nem állnak rendelkezésünkre megfelelő minőségű, immunfestésre alkalmas Nox4 ellenes antitestek. Megfelelő antitest hiányában sajnos nehéz meghatározni a fehérje intracelluláris lokalizációját, ami kulcsfontosságú volna a Nox4 funkciójának megfejtéséhez. A mi laboratóriumunk is többször megpróbálkozott Nox4 ellenes antitest előállításával, azonban az általunk kifejlesztett antitestek sem voltak alkalmasak immunfestésre. A sejten belüli elhelyezkedés meghatározására egy másik megközelítés lehet a sejtfrakcionálás és a különböző sejtfrakciók H₂O₂ termelésének vizsgálata, VT és KO egerekből származó szövetek felhasználásával. Egy amerikai munkacsoport a közelmúltban publikált közleményében azt mutatta, hogy a Nox4 a vese hámsejtek mitokondriumjaiban helyezkedik el. A túlnyomórészt Western blot kísérletekre támaszkodó közleményük problémája, hogy Nox4 KO egér hiányában csak korlátozottan tudták vizsgálni a kísérletekben használt, Nox4-ellenes antitest specifitását. Az év folyamán sikerült megmérnünk a Nox4 enzim aktivitását egér veséből preparált különböző sejtfrakciókban. Nox4-deficiens (KO) és vad típusú (VT) egerek veséjéből készült preparátumok ROS termelését összehasonlítva azt találtuk, hogy a VT vesékből preparált mikroszómális frakció jelentős szuperoxid-termelést mutat és a KO állatokból származó preparátumok aktivitása jóval alacsonyabb (**4. ábra**). A mikroszómális frakcióban Western blot technikával is detektáltuk a Nox4-et, A későbbiekben,

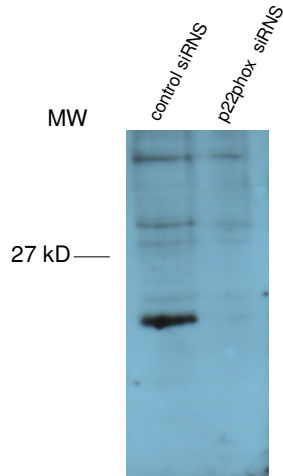
differenciálódó miofibroblaszt sejtekkel is szeretnénk megismételni ezeket a kísérleteket.



4. ábra Vese mikroszóma preparátum szuperoxid termelése

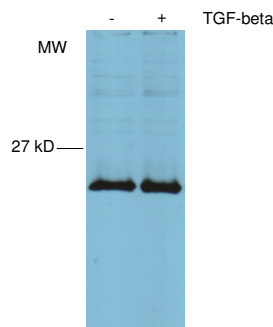
A Nox4 fehérje intracelluláris lokalizációjának meghatározására további lehetőség lehet a p22^{phox} elhelyezkedésének vizsgálata. Saját kísérleteink és irodalmi adatok is arra utalnak, hogy a Nox4 komplexben található a p22^{phox} fehérjével. Ez azt jelenti, hogy ha a p22^{phox} fehérjét lokalizációját sikerülne kimutatni, akkor az nagy valószínűséggel megmutatná a Nox4 elhelyezkedését is. A beszámolási periódusban p22^{phox} ellenes antitestek szisztematikus tesztelésébe kezdtünk. A p22^{phox} fehérjéről már régóta ismert, hogy az része a fagocita oxidáz komplexnek. Ezzel magyarázható, hogy a fehérje ellen számos (köztük monoklonális) antitestet fejlesztettek ki. Egy francia kutatócsoporttól több olyan p22^{phox} - ellenes monoklonális antitestet kaptunk, amelyeknél azt is meghatározták, hogy a célfehérje mely régiójához kötődik

Az antitestek tesztelése során azt tapasztaltuk, hogy a 16G7 jelű antitest nagy érzékenységgel és specifitással ismeri fel a p22^{phox} fehérjét. Azt is sikerült kimutatnunk, a p22^{phox} primer humán fibroblasztokban is expresszálódik (**5. ábra**)



5. ábra a p22^{phox} fehérje kimutatása humán, tüdő eredetű fibroblasztokban

Az antitest specifitását siRNS kísérletekkel is ellenőriztük. A p22^{phox} fehérje expressziója primer fibroblasztokban azért nagyon érdekes, mert ezek a sejtek még nem expresszálják a Nox4 fehérjét és csak TGFβ hatására fokozódik a Nox4 expressziójuk és ezzel párhuzamosan a H₂O₂ termelésük. A következőkben azt is megvizsgáltuk, hogy a myofibroblaszt differenciálódása folyamán fokozódik-e a p22^{phox} expresszió. Ez azért tűnt valószínűnek, mert a fehérvérsejtekben expresszálódó fagocita oxidáz esetében leírták, hogy a Nox2 (gp91^{phox}) expressziójával párhuzamosan növekszik a p22^{phox} expresszió is és a két fehérje komplexet alkotva stabilizálja egymást. Érdekes módon azt találtuk, hogy TGFβ hatására nem nőtt a p22^{phox} szintje (**6. ábra**), annak ellenére, hogy a Nox4 expresszió megjelent és a H₂O₂ termelés is fokozódott.



6. ábra A TGFβ nem befolyásolja a p22^{phox} expressziós szintjét

Ezek a kísérletek arra utalnak, hogy a p22^{phox} fehérje már eleve jelen van a fibroblaszt sejtekben és a fehérje stabilitásához nem szükséges a Nox4 jelenléte. Felmerült bennünk a lehetőség, hogy a Nox4 hiányában valamilyen másik Nox izoforma stabilizálná a p22^{phox}-ot, azonban QPCR kísérletekben nem tudtunk kimutatni más Nox izoforma expresszióját ezekben a sejtekben.

Következő kísérleteinkben immuncitokémia segítségével próbáltuk kimutatni a p22^{phox} expresszióját TGF β -val differenciált fibroblasztokban. Ezekben a kísérletekben humán és egér primer fibroblasztokat egyaránt használtunk. A humán fibroblasztokon végzett kísérletekben olyan kontroll sejteket használtunk ahol p22^{phox}-specifikus siRNS előkezeléssel gátoltuk a fehérje expresszióját. Az egér fibroblasztokkal végzett kísérletekben p22^{phox} génhiányos egerekből preparált sejteket használtunk negatív kontrollként. Sajnos a Western blot kísérletekben sikeresen használt antitest, immunfestésre nem bizonyult alkalmasnak. Ennek oka lehet, hogy az az epitóp amit a 16G7 felismer, valamilyen okból a sejten belül nem hozzáférhető az antitest számára. Jelenleg további monoklonális antitesteket és egy poliklonális antitestet tesztelünk immunfestésre.

2.5 PXDN knockout egér előállítása

A PXDN KO egér előállítását a Biotalentum Kft.-vel együttműködésben kíséreltük meg. A PXDN targetáló vektort az International Knockout Mouse Consortium-tól szereztük be. A Biotalentum Kft által elvégzett ES sejtekben történő géntargetálás sikeres volt és kiméra egereket is sikerült létrehozni, azonban a targetált allél örökítése – ismeretlen okból – nem történt meg. A jövőben a PXDN gén targetálását más technikával tervezzük elvégezni.