

Hisztaminreceptor expresszió vizsgálata egér lépből izolált dendritikus sejteken

A dendritikus sejtek (DC) az immunrendszer professzionális antigénprezentáló sejtei, amelyek a szervezetben viszonylag kis számban, de számtalan helyen vannak jelen, és kifejezetten heterogén sejtpopulációt alkotnak. A periférián felveszik az antigéneket, majd a szekunder nyirokszervekbe vándorolva a feldolgozott antigént bemutatják a T-sejteknek, és aktiválják a naiv T-limfocitákat, valamint stimulálják a B-sejtek osztódását és differenciálódását is. Működésüket a környezetükben található citokinek és egyéb gyulladáshoz közvetlenül kapcsolódó mediátorok szabályozzák. Ez utóbbiak közé tartozik a hízósejtekből és/vagy bazofil granulocitákból felszabaduló hisztamin, amint azt kutatócsoportunk részben humán, részben pedig hisztamin hiányos egerekből származó dendritikus sejteken végzett kísérleteinek eredményei is igazolták¹.

Kérdésselvetés: Ismert, hogy a hisztamin változatos élettani hatásait négy különböző (H1, H2, H3, H4), G-proteinhez kapcsolt receptoron keresztül fejti ki. A negyedik receptort csak a közelmúltban azonosították. Célul tűztük ki az egér DC-k hisztamin receptor expressziójának RNS és fehérje szintű vizsgálatát, mivel erről igen ellentmondásos irodalmi adatok állnak rendelkezésre.

Módszerek: A DC-eket egér lépből kollagenázzal történő emésztés után, CD11c-specifikus mágneses gyöngyökkel szeparáltuk. CD11c festés után áramlási citometriával ellenőriztük a sejt populáció tisztaságát, ami 90% felettinek bizonyult. A sejtekből izolált RNS-ből reverz transzkripcióval készített cDNS-mintából hisztaminreceptor specifikus primerek segítségével real-time PCR mérést végeztünk. A fehérje szintű expressziós vizsgálatokban kétféle módszert alkalmaztunk. Az áramlási citometriás mérésekhez a sejteket fixálást és permeabilizálást követően először az egyes hisztaminreceptorokra specifikus primer antitesttel, majd biotinilált szekunder antitesttel, végül Streptavidinnel jelöltük meg. Mivel az áramlási citometria nem ad információt a detektált fehérjék molekulatömegéről, ezért Western-blot eljárással is megvizsgáltuk a fehérje szintű expressziót. Irodalmi adatok szerint más sejtek (pl. hízósejtek és eozinofil granulociták) esetében a hisztamin H4 receptoron keresztül hat a migrációra, ezért kézenfekvőnek tűnt ennek a vizsgálat a DC-k esetében is. A migrációt Transwell rendszerben mértük és az 5 µm pórusátmérőjű szűrőn átvándorolt sejtek számát áramlási citométerrel határoztuk meg.

Eredmények: Real-time PCR mérési eredményeink, valamint az áramlási citometriás fehérje expressziós adataink szerint az egér lépből izolált dendritikus sejtek H1, H2 valamint H4 receptort expresszálnak. A Western vizsgálatok még folyamatban vannak, az azonban már bebizonyosodott, hogy a H4 receptor ezzel a módszerrel is kimutatható a DC-ken. A dendritikus sejtek Transwell rendszerben történő vándorlásának vizsgálata azt mutatta, hogy a H4 agonista 4-metil-hisztamin nem hatott a sejtek migrációjára.

Következtetések: Eddigi eredményeink szerint az egér lép dendritikus sejtek expresszálnak a H4 receptort mind RNS, mind fehérje szinten, ugyanakkor kimutattuk, hogy ezeknek a sejteknek migrációs képességére nincs hatással a H4 receptor agonista kezelés.

Témavezető: Dr. László Valéria

¹ Szeberényi J.B et al.: *Immunol Lett.* 76. 172-182. (2001).

László V. et al.: *Inflammation Research* 50. 428-434. 2001

Szeberényi J.B. et al.: *Inflamm Res.* 50. S2 S112-S113 (2001).

Jelinek I. et al.: *International Immunology* 19, No. 1. 51-58. (2007)

Herediter angioneuroticus oedema-ban a C1rC1sC1-INH komplexek mennyisége emelkedett, és korrelál a betegség súlyosságával

Bevezetés: Az autoszomális domináns módon öröklődő, a C1-inhibitor (C1-INH) hiányában kialakuló hereditár angioneuroticus oedema (HANO) súlyosságának becslése kiemelt fontosságú. Erre jelenleg egyetlen score-rendszer létezik, amelynek hátránya, hogy a tünetek mellett a kezelést is figyelembe veszi, de laboratóriumi paramétereket nem, így a besorolás csak hosszabb megfigyelési idő után lehetséges. Célunk az volt, hogy a HANO súlyosságát a meglevőnél jobban jellemző, objektív elemeket is tartalmazó leírást dolgozzunk ki, ezért laboratóriumi paramétereket kerestünk. A HANO-ra jellemző, hogy a funkcionális C1-INH (C1-INH_f) szint csökkent, továbbá a klasszikus komplement aktiváció szabályozatlansága miatt a C4 elhasználódik, ezért szintje szintén csökkent. Egy korábbi tanulmány szerint HANO-ban a C1-C1-inhibitor komplex (C1C1-INH) szint emelkedett. Előzőleg munkacsoportunk szignifikáns kapcsolatot talált a diagnóziskori C1-INH_f szintek és a betegség súlyossága között (1), azonban a C1C1-INH-ral való összefüggést még nem vizsgálták.

Módszerek: A betegek állapotát évről-évre egy új kiértékelési rendszer segítségével kategorizáltuk, amely a rohamok gyakoriságának és lokalizációjának pontozásán alapul (2). 102 tünetmentes HANO-beteg és 94 egészséges kontroll egyén vérplazmájában a következő komplement paramétereket vizsgáltuk: C1-INH_f (ELISA, QUIEDEL), C1C1-INH (ELISA), C4 (radiális immundiffúzió) és C4d (a C4 hasításakor keletkező termék, ELISA, QUIEDEL). Összehasonlítottuk a fenti paramétereket a betegekben és a kontrollokban, illetve a HAE-betegekben összevetettük a komplement paraméterek szintjét az évről-évre kiszámított súlyossági score-okkal.

Eredmények: Nagyobb beteg és kontroll csoport bevonásával megerősítettük, hogy a C1C1-INH szintje HANO-ban lényegesen magasabb a kontrollokhoz képest [32.6 U/ml(18.2U/ml-50.7U/ml) vs 3.4 U/ml(2,8 U/ml-3.9 U/ml); p<0.0001]. Bár a C4d szint alacsonyabb volt a HANO-betegekben [0.9 mg/l(0.4 mg/l-1.6mg/l) vs 4.3 mg/l(3.3 mg/l-6.2mg/l); (p<0,0001)], a C4d/C4 arány azonban szignifikánsan magasabb volt a kontrollokhoz képest [0.022(0.011-0.043) vs 0.015(0.013-0.020); p=0.003]. HANO-betegek plazmájában a C1C1-INH koncentrációja (Spearman r=0.319; p=0.002) és a C4d/C4 arány pozitívan (Spearman r=0.3149; p=0.009), míg a C1-INH_f (Spearman r= -0.220; p= -0.038) és a C4 (Spearman r= -0.256; p=0.015) negatívan korrelált a betegség súlyosságát mutató score-okkal. A betegeket két csoportba osztottuk a C1C1-INH szint alapján. A súlyosabb betegek száma szignifikánsan magasabb volt az emelkedett C1C1-INH szintű csoportban, az alacsony C1C1-INH szintű csoporthoz képest (22/46 vs 9/43; OR=3,46 (1.35-8.829); p=0.013). Hasonló összefüggést kaptunk a C4d/C4 paraméter kapcsán is: szignifikánsan több súlyos beteg tartozott a magas C4d/C4 arányú csoportba (19/35 vs 5/32; OR=6.4 (2.0-20.5), p=0.0019).

Következtetések: A magas C1C1-INH szint és a magas C4d/C4 arány egyaránt prognosztikai jelentőségű: ezekben a betegekben 3,5-szer, illetve 6-szor nagyobb eséllyel alakul ki súlyos kórkép. Eredményeink szerint olyan objektív paramétereket találtunk, amelyek akár már a diagnózis felállításakor is felhasználhatók a betegség súlyosságának megbecslésére és segítséget nyújthatnak a megfelelő, egyénre szabott terápia kidolgozásában.

1. *L.Varga et al. Complement levels in hereditary angioedema, 2007, Molecular Immunology*
2. *G. Füst et al. Longitudinal analysis of the new severity score system in Hungarian patients with hereditary angioneurotic edema (HAE) (JACI, közlésre elküldve)*

Témavezetők: dr. Varga Lilian, dr. Farkas Henriette

Korai vérképzés madárembryoban

A klasszikus monophyletikus hemopoiezis szerint a hemopoietikus őssejt (HSC) extraembryonálisan a szikhólyag és allantois falába képződik és az extra- és intraembryonális keringés összekapcsolódása után kerül az embryo májába és telepszik meg a csontvelőbe. Ezzel a HSC vándorlási folyamattal azonban nehéz magyarázni a klinikai gyakorlatba jól ismert primitív (embryonális) és felnőtt (definitív) vérképzést. Mai felfogásunk szerint a monophyletikus hemopoiezis elmélete módosul, amennyiben az extraembryonális vagy primitív vérképzés őssejtjei a szikhólyagból jönnek és csak az embryo vörösvérsejtjeit képezik, míg az intraembryonális vérképzés őssejtje az aorta ventrolaterális redőibe képződve kilépnek a paraaortikus régióba, mely az első intraembryonális vérképző helynek tekintendő. A definitív HSC innen vándorol a májba-lépbe és végül a csontvelőbe.

A jelen vizsgálat célja volt tanulmányozni az intraembryonális vérképzés korai szakaszait, azaz a HSC megjelenését térbe és időben, valamint differenciálódását lymphoid, myeloid, erythroid és thrombocytoid nyomon követni. Az aorta ventrolaterális redője, mint az intraembryonális HSC „niche” a 3 embryonális nap végén jelenik meg, mellyel szinte azonos időben mutatható ki a paraaortikus régióba is a CD45+ HSC. Az inkubáció 5 napján már az egyes sejtvonalak is fellépnek, amelyeket (Bu-1, CD3) B sejt és T sejt; (Grl-1 és Lamp-1) granulocytá-makrofág; CD41/CD61 thrombocytá és az erythrocitákra jellemző hemoglobin termelést jelző endogén peroxidáz reakció mutat.

A CD45+ HSC sejtek száma messze meghaladja a lymphoid, myeloid, erythroid és thrombocytoid sejtek összességét. Ez a megfigyelés fölveti annak a lehetőségét, hogy a CD45 hemopoietikus marker nemcsak a felsorolt sejtvonalakat, hanem ezen kívül más sejtípust is felismer, amelynek további differenciálódási útvonalát nem ismerjük. A jelen tanulmány ennek a hemopoietikus sejtnek a létrehozására hívja fel a figyelmet.

Témavezető: Dr. Nagy Nándor

Katz Sándor ÁOK V. évf.

Semmelweis Egyetem, Humánmorfológiai és Fejlődésbiológiai Intézet, Budapest

Mire képes a mesothel?

A mesothelium szabályozó szerepet tölt be a savós hárták transzport folyamataiban, a gyulladási folyamatok kialakulásában és lefolyásában, a szövetregenerációban, az adhéziók kialakítása során különböző anyagok feloldásában és a fibrin depositok keletkezésében, ill. a mikroorganizmusok elleni védelemben és minden valószínűség szerint a tumoros folyamatok tovaterjedésében. Előzetes vizsgálataink alapján úgy tűnik, hogy a hashártya mesothel sejtjei leválhatnak a hashártya felszínéről, és lekerekedve phagocytá sejtekké válhatnak.

Munkánk során a patkányok vékonybél mesenteriumának mesothel sejtjeit vizsgálva kerestünk bizonyítékot arra, hogy bizonyos stimulusok hatására ezek a sejtek valóban képesek-e macrophággá differenciálódni. Kísérleteink során a mesothel sejtek aktivitásának fokozására a komplett Freund adjuvánsal történő elicitálást választottuk. A Freund adjuvánst intraperitoneális injekció formájában juttatuk a hasüregbe. A hashártyából származó mintákat 24 és 48 óra eltelte után hagyományos fény-, és elektronmikroszkópos vizsgálatok céljára 2%-os glutáraldehiddel fixáltuk. A macrophag és mesothel sejtek azonosítására immuncitokémiai vizsgálatokat végeztünk macrophag markerekkel (ED1 és OX-43), valamint mesotelin ellen termeltetett ellenanyaggal. Ezekhez a vizsgálatokhoz a mintákat 4%-os paraformaldehiddel fixáltuk, majd 2,3M-os cukorral végzett krioprotekció után folyékony nitrogénben lefagyasztottuk és ultramikrotómmal fagyasztott félvékony metszeteket készítettünk. Az első ellenanyag kimutatására Alexával jelölt második ellenanyagot használtunk. A mintákat konfokális lézer mikroszkópban vizsgáltuk.

Eredményeink azt mutatják, hogy elicitálás hatására a mesothel sejtek alakja megváltozik, legömbölyödnek, számos közülük valóban leválik a hashártya felszínéről. A levált sejtek membránján erőteljes mesotelin jel detektálható. Előzetes vizsgálataink alapján úgy tűnik, hogy ezen sejtek macrophag markerekkel is jelölődnek.

Témavezető: Dr. L. Kiss Anna

Intestinalis baktériumok hatásának vizsgálata az immuntoleranciára

Az orális tolerancia (OT) jelensége szisztémás immunológiai válaszképtelenséget biztosít a gastrointestinalis traktusban jelen lévő ártalmatlan antigénekre. Munkánk során arra kerestük a választ, hogy a commensalis baktériumokra kialakuló orális tolerancia – molekuláris mimikri révén – védelmet biztosít-e azon saját antigének részére is, amelyek nagyfokú immunológiai hasonlóságot mutatnak a normál flórával. Az OT alapvető feltétele a kérdéses antigén veszélytelensége, így baktériumok esetében többek között a non-invazív viselkedés. A mucosális védőgát elégtelensége ezért természetesen együtt jár az OT csökkent működésével. Tekintettel arra, hogy ezen védőgát működése igen energiaigényes folyamat, a splanchnicus terület keringészavarai (például általános szöveti ischaemia vagy elhúzódó keringéscentralizáció) mellett elvben számíthatunk intestinalis baktériumok mikroinváziójára, a velük szemben kialakult orális tolerancia csökkenésére, és következményes (molekuláris mimikri talaján kialakuló) autoimmun reakciókra. Vizsgálataink másik része ezért annak tisztázására irányult, hogy kritikus állapotú betegek ellátása során számolhatunk-e egy bakteriális mimotópokból álló intestinalis homunculus klinikai képet módosító hatásával. Munkánk során két ismert humán kórképet vettünk alapul, az autoimmun polyendocrin syndroma I. típusát (APS1) és a HELLP syndromát („hemolysis, elevated liver enzymes, low platelet counts syndrome”). Előbbi esetben az AIRE fehérje hiányzó vagy csökkent működése felfüggeszti egyes szövetspecifikus antigénekkal szemben a centrális toleranciát, és ilyen módon „zavaró háttér” nélkül válik vizsgálhatóvá az intestinalis normál flóra és ezen autoantigének közötti potenciális tolerogén mimikri. A HELLP syndroma egy terheséget komplikáló életveszélyes kórkép, amely jellegzetes autoantitestek átmeneti megjelenésével és súlyos szöveti ischaemiával jár, lehetővé téve az orális tolerancia elégtelen működésének vizsgálatát. A munkánk során felhasznált nyers adatok széleskörű klinikai vizsgálatok publikált eredményeiből származnak. A kérdéses autoantigének és az intestinalis baktériumflóra közötti mimikri várható mértékét egy kísérletesen validált matematikai algoritmus segítségével számítottuk ki. A kapott értékek (MI, „mimikri index”) és a két betegcsoportban észlelt specifikus autoantitest-képződés mértéke között rangkorrelációs próbával vizsgáltuk az összefüggést. Tekintettel arra, hogy a lánchossz a potenciális epitópok számát meghatározva nem specifikus összetevője egy fehérje mimikrikészségének, megvizsgáltuk a fehérjehossz és az autoantitest-képződés közötti korrelációt is annak eldöntésére, hogy *in vivo* a jól ismert patogén-autoantigén keresztreakciókból eredő destruktív, vagy az orális tolerancia talaján kialakuló tolerogén mimikri jelentősebb-e. Az MI értékek és az APS1 betegek körében észlelt specifikus autoantitest-képződés mértéke között igen erős negatív ($R=-0.70$; $P=0.002$), HELLP syndromások esetében pozitív korrelációt találtunk ($R=0.94$; $P=0.005$). Az egészséges kontroll terhesek autoantitest-termelése nem különbözött a nem terhes normál populációtól. APS1-ben az antigénhossz negatívan korrelált a specifikus autoantitest-termelés mértékével ($R=-0.68$; $P=0.004$). Eredményeink arra utalnak, hogy egy bakteriális mimotópokból álló homunculus OT révén erős védelmet nyújt legalább a fő humán szövetspecifikus autoantigének részére, és hatékonyan ellensúlyozza a kórokozó–autoantigén keresztreakciókból eredő destruktív mimikrit. Eredményeink alapján felmerül ezen bakteriális homunculus potenciális szerepe az elhúzódó keringészavarokhoz társuló, részben autoimmun háttérűnek gondolt szövődmények (pl. critical illness polyneuropathia) pathomechanizmusában. Jelen munkánk egyenes folytatása korábbi közleményünknek, ahol az orális toleranciát, mint a sajáttolerancia lehetséges új mechanizmusát hipotetikus modellként mutattuk be (Kristof et al., *Autoimmun Rev.* 2008 Feb;7(4):278-83.).

Témavezető: Dr. Bajtay Zsuzsa

Lázár Enikő ÁOK IV.

Semmelweis Egyetem, Élettani Intézet, Budapest

A fehérvérsejt-specifikus ARHGAP25, mint a fagocita-funkciók egyik lehetséges szabályozója

A monomer (kis) G fehérjék számos sejtfunkcióban résztvevő, fontos szabályozó proteinek. GTP kötött formájuk aktív, GDP-t kötve pedig inaktívvá válnak. Ezen két állapot közötti átmenet egyik szabályozója a GTPáz aktiváló protein (GAP), mely serkenti a kis G fehérjék GTP hidrolízisét, ezáltal inaktiválja őket. A monomer G fehérjék egyik csoportját képező Rac/Rho család tagjai főként a citoszkeleton-átrendeződés, sejtmozgás és fagocita funkciók jelátvitelében játszanak szerepet. Ezek működését mintegy hetven Rac/RhoGAP szabályozza, melyek a szervezetben széles körben expresszálódnak. Az ARHGAP25 GTPáz aktiváló protein *in silico* adatok, és saját eredményeink alapján fehérvérsejt-specifikusnak bizonyult. Kimutattuk, hogy nagy mennyiségben expresszálódik neutrofil granulocitákban, valamint ezen sejtek modelljeként szolgáló PLB985 sejtvonalban. *In vitro*, sejtmentes közegben a Rac kis G fehérje GTPáz aktivitását fokozza, a Rho-ra és Cdc42-re nincs hatással [1.,2.]. Funkciójáról eddig semmiféle irodalmi adat nem áll rendelkezésre, munkacsoportunk ezért célul tűzte ki a neutrofilek működésében (fagocitózis, szuperoxid-termelés, aktin-átrendeződés, baktérium-ölés) betöltött lehetséges szerepének vizsgálatát.

A funkcionális tesztekhez PLB985 sejteket transzfektáltunk vektor alapú siRNS-sel, melyekből stabil klónokat hoztunk létre. Kontrollként a hatékony siRNS szekvencia minimális módosítását hordozó klónokat készítettünk [1.,2.]. Előzetes kísérletek során a PLB985 sejtvonalra optimalizáltunk egy áramlási citometrián alapuló módszert, melynek segítségével fluoreszcensen jelölt élesztők fagocitózisát vizsgáltuk. A szuperoxid-termelést citokrom c redukcióján alapuló eljárással [1.,2.], ill. luminometriásan mértük. Az aktin átrendeződés vizsgálatához Alexa488-konjugált phalloidint használtunk. A baktérium-ölés mértékét a laborunkban már korábban beállított teszttel határoztuk meg.

Eddigi eredményeink azt mutatják, hogy az ARHGAP25 expressziós szintjének csökkentése fokozza a PLB sejtek fagocitózisát, ugyanakkor PMA stimulusra adott szuperoxid-termelésüket nem befolyásolja [3.]. A PLB sejtek baktérium-ölő kapacitása, ill az aktin-citoszkeleton átrendeződés az siRNS kezelés hatására – eddigi kísérleteink alapján – nem változott. További terveink között szerepel az ARHGAP25 overexpressziójának fagocita funkciókra gyakorolt hatásának vizsgálata, valamint GFP-vel jelölt konstruktjaink segítségével a fehérje sejten belüli lokalizációjának felderítése.

Témavezetők: Csépanyi-Kömi Roland, Prof. Dr. Ligeti Erzsébet

A dexamethasone jelentősen fokozza a Tribbles1 expresszióját humán T sejtekben

Jóllehet a széles indikációs területű szteroidok hatására létrejövő molekuláris történések fő lépései ismertek, kiterjedt használatuk és nagy valószínűséggel jelentkező mellékhatásaik indokolják az általuk beindított folyamatok minél részletesebb tanulmányozását. Munkánk során glükokortikoid hatásra végbemenő, korábban nem ismert génexpressziós változásokat vizsgáltunk T limfocitákban.

Munkacsoportunk microarray vizsgálati eredményei alapján dexamethasone kezelés hatására a CCRF T sejt vonal esetében megfigyelhető egyik legjelentősebb génexpressziós változás a Trib1 gén esetében figyelhető meg. Jelen munkánk során a Tribbles1 expresszióját CCRF-CEM és Jurkat humán T sejt vonalakon, valamint normál perifériás vérből mágneses szeparálással (negatív szelekcióval) izolált humán T sejteken vizsgáltuk. A sejteket két órán keresztül inkubáltuk különböző dexamethasone koncentrációk mellett. Megvizsgáltuk továbbá a Tribbles1 expresszió változását más immunosuppresszív (Cyclosporin A, TGF β) és immunstimuláns szerek (PMA, ConA) hatására. A Tribbles1 génexpressziót realtime PCR segítségével mértük.

Eredményeink alapján a Tribbles1 kifejeződik nyugvó humán T sejtekben és a CCRF CEM humán T sejt vonalban. Ezeket a sejteket mitotikus hatásnak kitéve a Tribbles1 szintje nem nő, míg immunosuppresszív szerek hatására expressziójuk fokozódik. Eredményeink szerint a dexamethason kezelés hatására CCRF CEM sejtekben 3-3,5-szeres, frissen izolált perifériás T sejtekben 2-szeres Tribbles1 génexpresszió növekedés volt megfigyelhető.

Adataink összhangban állnak azokkal a korábbi eredményekkel, melyek szerint mind a CCRF sejteken, mind pedig az akut blasztos leukémiában alkalmazott szteroid kezelés többek között a p38 kináz aktivációjához is vezet, mely utóbbi szabályozásában a Tribbles fehérjék fontos szerepet játszanak. A Tribbles a szteroid kezelés immunosuppresszív hatásait egyrészt az NF κ B útvonalon hatva, az AP1 kialakulását gátolva, másrészt a T sejtek apoptózisának facilitálása révén közvetítheti.

A munkacsoportnak a fenti témában nem jelent meg közleménye.

Témavezető: dr. Buzás Edit

Az Fc-receptor γ -lánc intracelluláris tirozinjainak szerepe egér neutrofil granulocitákban

A neutrofil granulociták alapvető fontosságúak a szervezet kórokozók elleni védelmi reakcióiban és jelentős szerephez jutnak egyes autoimmun betegségek, így a rheumatoid arthritis vagy az autoimmun nephritis patogenezisében is. Az említett folyamatok igen fontos résztvevői a neutrofilek felszínén található Fc-receptorok, amelyek az antigént kötött antitestek (immunkomplexek, IC) Fc-részét megkötve a kórokozók eliminálását indukálják, de kóros esetben szövetkárosító folyamatokhoz is vezethetnek. Egér neutrofil granulociták valamennyi Fc γ -receptora (Fc γ R) az elsőként az Fc ϵ -receptornál leírt segédlánccal –az Fc-receptor γ -láncsal (a továbbiakban FcR γ)- asszociálódik, melynek jelenléte elengedhetetlen a receptorok sejt felszíni expressziójához, és melyről ismert, hogy intracelluláris részén megtalálható az úgynevezett immunreceptor tirozin alapú aktivációs elem (ITAM). FcR γ hiányában az Fc γ -receptor-mediált sejt válaszok megszűnnek. Kísérleteink során arra kerestük a választ, hogy mi a pontos szerepe az Fc-receptor γ -láncnak: egyszerű Fc γ -receptort kihorgonyzó chaperon, vagy ITAM-tirozinjai révén a jelátviteli folyamatokban is megjelenő, azokban nélkülözhetetlen szignalizációs molekula.

Vizsgálatainkhoz olyan FcR γ -hiányos (knockout, KO) egereket használtunk, melyekbe transzgenikus úton az FcR γ olyan módosított formáját, az ún. „YF mutációt” vitték be, amelyben az ITAM motívum két foszforilálható tirozinja helyére fenilalaninek (Y65F, Y76F) kerültek. Kontrollként FcR γ knockout háttéren a vad típusú FcR γ -t transzgeniként hordozó neutrofilek szolgáltak. Eredményeinket minden esetben összehasonlítottuk γ -lánc-hiányos, illetve vad típusú sejteken tapasztaltakkal is. Méréseinkhez tehát négyféle genotípusú (vad típus, FcR γ KO, FcR γ KO háttérű vad típusú, valamint YF FcR γ transzgén) egér csontvelőjéből preparáltunk neutrofil granulocitákat. Sejtjeinket immobilizált immunkomplex-felszínen stimulálva a létrejövő sejt válaszok közül a szuperoxid-termelést citokrom-c redukció alapján fotométerrel, a sejt szétterülést fáziskontraszt mikroszkóppal, a degranulációt a folyamat során felszabaduló proteolitikus enzim –a szekunder és terciér granulummárker zselatináz- szubsztrátemésztése segítségével detektáltuk.

A γ -láncot nem hordozó neutrofilek immobilizált immunkomplex-felszínen nem képesek reaktív oxigéngyökök termelésére, degranulációra, valamint sejt szétterülésre. Ezzel ellentétben az FcR γ knockout háttéren vad típusú γ -láncot transzgeniként hordozó granulociták minden tekintetben a vad típusú sejtekhez hasonlóan viselkedtek, mind oxigéngyök-termelésük, szétterülésük és degranulációjuk is összevethető volt az utóbbiakéval. Az YF-típusú transzgént hordozó sejtek vizsgálata során a sejt válaszok teljes mértékű károsodását tapasztaltuk, a fenotípus lényegében nem különbözött az FcR γ KO fehérvérsejtékétől.

Összefoglalásként elmondhatjuk, hogy a vizsgált kísérleti rendszerekben a vad típusú FcR γ transzgén jelenléte képes helyreállítani a γ -lánc hiányából adódó károsodást. Az YF-mutáns ezt nem teszi lehetővé, mutatva, hogy az Fc-receptor γ -lánc az Fc γ -receptorok sejt felszíni expresszióját meghatározó funkcióján túl intracelluláris ITAM-tirozinjai révén a jelátviteli folyamat egyik főszereplője.

(A témavezetők és a munkacsoport más tagjai e témában eddig nem közöltek eredményeket.)

Témavezető: Dr. Németh Tamás, Dr. Mócsai Attila

Vályi Nagy Anna ÁOK V., Lőrincz Márton Ákos VI.
Semmelweis Egyetem, Élettani Intézet, Budapest

A neutrofil granulocitákból származó vezikulák baktériumölő mechanizmusának jellemzése

Munkacsoportunk korábbi megfigyelései szerint a neutrofil granulociták (PMN) aktivációja során foszfolipid membránból és fehérjékből álló extracelluláris vezikulák képződnek. Ezek az úgynevezett mikropartikulumok (MP-ok) *in vitro* baktériumölő hatást mutatnak. Eddig nem volt megfelelően kidolgozott eljárásunk a MP keletkezés tényének, a keletkezett MP-ok mennyiségének, illetve a MP-ok baktériumölő hatásának külön-külön vizsgálatára.

Jelenlegi kísérleteim célja egyrészt a MP termelés mennyiségi jellemzésének kidolgozása, másrészt a keletkezett MP-ok baktériumölő hatásának tanulmányozása volt.

Opszonizált *Staphylococcus aureus*-szal húsz percig aktiváltuk a neutrofileket. Ezután (500, majd 15000G-s) centrifugálással szeparáltunk egy sejtektől és szolubilis fehérjéktől mentes frakciót, mely feltételezéseink szerint a MP-okat tartalmazza.

A keletkezett MP-ok mennyiségének meghatározására az áramlási citometria - a MP-ok nagy méretbeli szórása miatt - nem volt megbízható, illetve megfelelően reprodukálható, ezért a keletkezett MP-ok mennyiségére a frakció Bradford eljárással meghatározott fehérjetartamából következtettünk. Az opszonizált *S.aureus*-szal aktivált neutrofilekből centrifugálással szeparált frakció fehérjetartalma nagyobb, mint a nem aktivált neutrofilekből, illetve opszonizált *S.aureus*-ból hasonló centrifugálással nyert frakciók együttes fehérje tartalma. Tehát az opszonizált *S.aureus* hatására a neutrofilekből fehérje tartalmú részecskék képződnek, amelyek feltételezéseink szerint a MP-oknak felelnek meg. A keletkezett MP frakció fehérje tartalma és baktériumölése között lineáris összefüggést találtunk. A továbbiakban ezt az eljárást vezettük be az egy adott kísérletben keletkező MP-ok rutinszerű mennyiségi meghatározására.

A MP-ok baktériumölő mechanizmusának lehetséges hátterének felderítésére gátlószereket alkalmaztunk, úgy mint a NADPH-oxidáz gátló diphenyliodonium (DPI) és az aktin polimerizációját gátló cytochalasin B. Vizsgáltuk továbbá a MP-ok baktériumölését glükóz mentes médiumban. Mind a glükóz mentes médium, mind a NADPH-oxidáz gátlása DPI-vel, mind az aktin polimerizáció gátlása cytochalasin B-vel csökkentette a MP-ok baktériumölő kapacitását. Tehát azt feltételezzük, hogy a MP-ok baktériumöléséhez szervezett membrán struktúra illetve működő NADPH-oxidáz szükséges.

Témavezetők: Prof. Dr. Ligeti Erzsébet, Dr. Timár Csaba István

Tudományos publikációk:

Kongresszusi poszterek:

1. Possible role of cell-free particles in elimination of bacteria.

Cs. Timar, M.A. Lorincz, A. Valyi-Nagy, G. Lakatos, Gy. Nagy, E. Buzas, A. Kittel, E. Ligeti

EUROPEAN SOCIETY FOR CLINICAL INVESTIGATION

42nd Annual Scientific Meeting. Geneva - Switzerland, 26 – 29 March 2008

Presented in: Eur. J. Clin. Invest. 38. Suppl.1. p.65. (2008)

2. Neutrofil eredetű mikropartikulák lehetséges szerepe a baktériumölésben

Timár Csaba István, Vályi Nagy Anna, Lakatos Gergő, Lőrincz Ákos, Ligeti Erzsébet
A Magyar Élettani Társaság LXXII. Vándorgyűlése, 2008. június, Debrecen

3. Neutrofil granulociták életképességének, illetve a baktériumölési kapacitás kvantitatív jellemzése

Vályi-Nagy Anna, Lakatos Gergő, Timár Csaba István, Lőrinc Ákos, Ligeti Erzsébet
A Magyar Élettani Társaság LXXII. Vándorgyűlése, 2008. június, Debrecen

Szisztémás lupus erythematosusban észlelhető obstruktív ventilációs zavar gyakorisága és kezelésének új aspektusai

A szisztémás lupus erythematosus (SLE) multifaktoriális autoimmun megbetegedés, mely elsősorban fertilis korban lévő nők betegsége. Az autoimmun megbetegedések közül az SLE-nél nagyon gyakori a tüdőérintettség. Jellegzetes pulmonalis manifesztáció az ismétlődő pleuritis, a restriktív ventilációs zavarral járó diffúz interstitialis tüdőbetegség, acut lupus pneumonitis, diffúz alveolaris hemorrhagia, zsugorodó tüdő (shrinking lung), pulmonalis hypertonia és az obstruktív ventilációs zavarral járó bronchiolitis obliterans. Mivel az irodalomban rendkívül kevés adat áll rendelkezésre az SLE obstruktív ventilációs zavarral járó pulmonológiai manifesztációjáról, ezért ez irányú felmérést végeztünk a SE Pulmonológia Klinikán a légzőszervi panaszokkal megjelenő SLE-s betegek körében.

2005 óta klinikánkon pulmonológia panaszok miatt 10 SLE-s beteg került felvételre (átlag életkor: $50,8 \pm 20,0$ év, nő: férfi arány: 9: 1, SLE diagnózisa $8,2 \pm 9,5$ éve). A pulmonalis érintettség karakterizálásához fizikális vizsgálat, mellkas röntgen, testpletysmográfias és diffúziós kapacitás, valamint mellkasi HRCT vizsgálatot végeztünk, valamint értékeltük az SLE kezelésre adott pulmonalis választ.

A pulmonalis eltérések közül leggyakrabban reverzibilitást mutató obstruktív és kevert típusú ventilációs zavart észleltünk (70%), melyet a serositis (50%) és a shrinkig lung (20%) követett. A légúti obstrukció steroid, illetve cyclophosphamid kezelésre jelentősen csökkent.

Adataink alapján SLE-ben gyakori pulmonalis manifesztáció az obstruktív ventilációs zavarral járó bronchiolitis obliterans, mely megfelelő immunszuppresszív kezeléssel csökkenthető. A reverzibilitást mutató légúti obstrukció hátterében autoimmun megbetegedésre is gondolni kell.

Témavezető: Dr. Müller Veronika