

**Az apoptózis és fagocitózis tanulmányozása szöveti
transzglutamináz hiányában**
**Az extracelluláris mátrix fehérjék szerepe a szájüregi
keratinociták növekedésében és migrációjában**

Sarang Zsolt



**Témavezetők: Prof. Szondy Zsuzsa és
Prof. Roland Grafström**

DEBRECENI EGYETEM
Orvos- és Egészségtudományi Centrum
Fogorvostudományi Kar
**BIOKÉMIAI ÉS MOLEKULÁRIS
BIOLÓGIAI INTÉZET**
DEBRECEN, 2005

Első rész

Bevezetés

Az apoptózis jellemzői

Az apoptózis az aktív sejthalál egyik formája jól definiálható morfológiai jellemzőkkel, mint a maganyag és citoplazma kondenzációja, sejtmembrán hullámozása, foszfatidilszerin kifordulás és apoptotikus test képződés. Az apoptotikus testeket a környező sejtek vagy makrofágok felismerik, és gyorsan eltávolítják. Apoptózis kiváltható citotoxikus anyagokkal vagy receptor-közvetített szignálokkal is. Ezek a szignálok különböző szignál utakon keresztül hatnak az emlősökben: külső, receptor-közvetített; a belső, mitokondriális; kaspáz-2 függő és kaspáz független úton. A receptor-közvetített jelátvitel során a receptor kötése a DISC kialakulását és a pro-kaspáz-8 aktiválódását eredményezi. I-es típusú sejtekben a kaspáz-8 a kaspáz-3-at aktiválja, amely a célfehérjék hasításával a sejt halálához vezet. II-es típusú sejtekben a kaspáz-8 a Bid fehérjét hasítja, amely így a mitokondriális sejthalál útvonalat aktiválja. Ezt az útvonalat a Bcl-2 fehérjecsaldó szabályozza. Az apoptózis során a morfológiai változások mellett a sejtek különböző molekulákat jelenítenek meg felszínükön, amelyek mint „egyél meg” szignál szolgálnak a fagocita sejtek számára.

Az apoptotikus sejtek eltávolítása

A keletkező apoptotikus testeket a környező sejtek és makrofágok gyorsan eltávolítják. Az utóbbi időkben számos olyan sejtfelszíni receptort azonosítottak, amely részt vesz az apoptotikus sejt felismerésében és felvételében. Ilyen például a PS receptor. Az apoptotikus sejt felvétele a fagocita sejt citoskeletonjának átalakulásával jár, amelyet a rac fehérjék aktivitása szabályoz. Az apoptotikus sejtek elégtelen felvétele az ártalmas sejtartalom kiszivárgásához és súlyos szöveti károsodáshoz, illetve abban az esetben, ha az apoptotikus sejtet antigén prezentáló dendritikus sejt veszi fel, autoimmunitáshoz vezethet. Továbbá, az

apoptótikus sejtek felvétele fokozza a gyulladás csökkentő és immun-szuppresszáns hatású TGF- β citokin termelődését. Ezzel ellentétben, az immunglobulin G-opszonizált apoptótikus sejtek felvétele gyulladást kiváltó citokinek termelődéséhez vezet makrofágokban és ezáltal az eddigi gyulladáscsökkentő hatás, gyulladást fokozó sejtfelvételre változik.

A szöveti transzglutamináz (TGáz2)

A TGáz2 a tiol- és Ca^{2+} -függő acil-transzferázok családjába tartozik, amelyek ϵ -(γ -glutamil)lizin keresztkötéseket hoznak létre, valamint poliaminokat és hisztamint építenek be fehérjékbe. A keresztkötő funkción túl a TGáz2 ATP-t és GTP-t is hidrolizál. A TGáz2 guanozin nukleotid kötő formája, $\text{G}_{\alpha\text{pha(h)}}$ néven, számos jelátviteli útvonalban vesz részt, beleértve az α_1 -b adrenerg receptor (ADR) szignalizációt is. A TGáz2-ről számos kísérleti modellben kimutatták, hogy képes a sejteket sejthalálra érzékennyé alakítani, és, hogy mind indukálódik mind, pedig aktiválódik az apoptózis során. Ugyanakkor apoptózis lezajlik a TGáz2 indukció hiányában is, sőt a TGáz2 egyes esetekben védelmet is nyújthat az apoptózissal szemben. Ezért a TGáz2 nem szükséges de nem is elégséges az apoptózishoz. Azonban, mivel képes nem oldható formában keresztkötni citoskeletális, intermedier és magi fehérjéket fontos lehet a gyulladásos folyamatok megelőzésében.

A TGáz2 expresszió és aktivitás szabályozása

Habár a TGáz2 promotere mindig aktív, az intakt TGáz2 gén átíródása szigorúan szabályozott és negatív kontroll alatt áll. Számos faktorról ismert, hogy a TGáz2 kifejeződését indukálja, pl.: glükokortikoid, IL-6, RA, TGF- β , TNF- α . Emellett megemelkedett sejten belüli Ca^{2+} koncentráció a protein szintézis fokozása nélkül is bekapcsolja meglévő, látens TGase aktivitást. A GTP, csökkentve a TGáz2 Ca^{2+} iránti affinitását, szintén befolyásolja a keresztkötő aktivitást. Másrésről viszont Ca^{2+} adása megszünteti a GTP gátló hatását azt sugallva, hogy a Ca^{2+} és GTP

koncentrációk együttesen szabályozzák a TGáz2 kétféle katalitikus lépességét.

Apoptózis a tímuszban

Az éretlen timociták mint csontvelőből bevándorolt sejtek kezdik életüket. A tímuszba érkezésükkor ezek a prekurzorok még nem fejeznek ki CD4, CD8 vagy T-sejt receptort (TCR). Amikor az érett TCR megjelenik a felszínükön a dupla pozitív sejtek két szelekciós lépésen mennek keresztül. A T-sejt szelekció során azok a sejtek, amelyek saját MHC-hoz nem kötődő TCR-t hordoznak, elhalnak a kéregben. A negatív szelekció során pedig az úgynevezett autoreaktív klónok, amelyek TCR-ja nagy affinitással kötnek saját antigéneket, halnak el apoptózissal. Számos szignál képes apoptózist indukálni éretlen T-sejtekben: a FasL a sejtfelszíni Fas receptor, glükokortikoidok a glükokortikoid receptor, retinoidok a RAR γ , míg a TCR a nur77 transzkripciós faktort, az ionizáló sugárzás pedig a p53 transzkripciós faktor aktiválásán keresztül.

Apoptózis a májban

A szabályozatlan apoptózis számos májbetegség (mint például a virális hepatitis, hepatocelluláris daganat, alkoholos és epe eredetű májbetegség) kialakulásában is szerepet játszik. A Fas indukált apoptózis meghatározó jelleggel bír ezen betegségek valamennyiében. A májsejtek az úgynevezett II-es típusú sejtek közé tartoznak, amelyekben a FasL vagy agonista anti-Fas antitest által kiváltott apoptózis a mitokondriális útvonalon keresztül zajlik és ez Bcl-2 fehérje család anti-apoptotikus tagjainak túltermelésével gátolható. A cFLIP, egy katalitikusan inaktív kaszpáz-8/-10 homológ, képes megszakítani a Fas-indukált jelátvitelt és gátolni a sejthalált. *In vivo* a Fas-közvetített apoptózis kiváltható egyszeri anti-Fas antitest oltással. Az egerek rendszerint 6 órán belül elpusztulnak halálos dóziszú anti-Fas antitest oltását követően. A legfontosabb érintett szerv a máj és a halál oka a súlyos májsejt apoptózis. Másrészről részleges

májeltávolítás követően, amely a máj azonnali regenerációját vonja maga után, a Fas receptor kötése máj regeneráció fokozódását eredményezi, valószínűleg a cFLIP hosszú formájának sejten belüli szintjének fenntartásán keresztül. Így a Fas rendszernek mind a májsejt apoptózis, mind pedig a regeneráció vonatkozásában szerepe van. A májsejteken kívül májban lévő szinuszoidok endotél sejtjei is érzékenyek a Fas-közvetített apoptózisra ezzel tovább súlyosbítva a máj károsodását.

A TGáz2 szerepe a májsejtek osztódásában és apoptózisában.

A májban mind parenchymális és nem parenchymális sejtek termelnek TGáz2-t, amely az extracelluláris térbe is kikerül. A TGáz2 keresztkötő funkciója által a májsejtek apoptózisában, míg GTP hidrolizáló aktivitása által a sejtek osztódásában játszik szerepet.

Célkitűzés

Jelen tanulmány célja, a TGáz2 hiányában zajló apoptózis program tanulmányozása különös tekintettel tímusz és májsejt halálra.

Kísérleteink során célunk volt:

- meghatározni, hogy van-e különbség a VT és TGáz2^{-/-} egerek timocitáinak *in vivo* és *in vitro* apoptózisában
- vizsgálni, hogy a TGáz2 hiányát más TGase kompenzálja-e
- vizsgálni, hogy a TGáz2 hiánya érinti-e az elhalt sejtek eltávolítását
- meghatározni, hogy a TGáz2 jelenléte a makrofágok vagy a timocitákon belül szükséges a fagocitózishoz
- azonosítani olyan faktorokat, amelyek a VT egerekben szükséges a normális fagocitózishoz de hiányozik, vagy alacsonyabb koncentrációban van jelen a TGáz2^{-/-} egerekben
- tanulmányozni a TGáz2 hiányának hosszú távú hatását
- összehasonlítani a VT és TGáz2^{-/-} májsejtek *in vivo* és *in vitro* Fas-közvetített apoptózisra való érzékenységet
- jellemezni a VT és TGáz2^{-/-} egerek májában az anti-Fas indukált sejthalált
- magyarázatot találni a TGáz2 védő szerepére a Fas-közvetített májsejt elhalásban

Anyagok és módszerek

Kísérleti állatok. A TGáz2^{-/-} egereket és Gerry Melino laborjából, az α_1 -b-adrenoceptor KO (ADR^{-/-}) egereket Susanna Cotecchia laboratóriumából kaptuk. A kísérletek a Debreceni Egyetem Állatkísérletes Etikai Bizottságának beleegyezésével történtek.

Tímusz apoptózis in vivo indukciója. Négyhetes TGáz2^{+/+} és TGáz2^{-/-} egereket kezeltünk anti-CD3-mal, DXM-nal, anti-Fassal illetve γ -sugárzással. Néhány kísérletnél az apoptózis indukció előtt és után neutralizáló anti-TGF- β antitestet adtunk az egereknek. A timocita apoptózis mértékét 24 órával később vizsgáltuk a tímusz tömegének mérésével valamint a sejtek számának és eloszlásának meghatározásával. Az utóbbihoz a timocitákat PE-jelölt anti-CD4-el és FITC-konjugált anti-CD8, vagy FITC-jelölt annexin-V-tel festettük. A fluoreszcenciát áramlási-citométerrel határoztuk meg.

Tímusz apoptózis in vitro indukciója. A timocita szuszpenziót 4 hetes egerek tímuszából preparáltuk. Mosás után a sejteket 10⁶ cells/ml koncentrációra hígítottuk és 37°C / 5% CO₂-on inkubáltuk. Az apoptózist DXM, anti-CD3, etopozid vagy anti-CD95 antitest hozzáadásával váltottuk ki. Néhány kísérletnél rekombináns TGF- β 1-et adtunk a sejtekhez. 6 óra elteltével a sejthalált 7-aminoactinomycin D felvétellel mértük áramlási-citométeren.

A máj apoptózis in vivo indukcióját Mauro Piacentini laboratóriumában végezték a Tor Vergata Egyetemen Rómában. A májsejt apoptózist PbNO₃ intravénás oltásával indukálták. A szövettani vizsgálatokhoz és apoptózis fénymikroszkópos meghatározáshoz kis májdarabokat formalinban fixálták, paraffinba ágyazták és hematoxilin-eozinnal festették.

TGase aktivitás mérése. Tímuszt homogenizáltuk és a TGase aktivitást a [³H]putreszcinnek N,N'-dimetilkazeinbe való beépülésének mérésével

végeztük. Az eredmény nmol [³H]putreszcin beépülés per mg fehérje per órában került feltüntetésre.

TGáz2 western blot. 1 mg/ml fehérjét tartalmazó tímusz homogenizátumot összekevertünk egyenlő térfogatú minta pufferrel. Az elektroforézist 10%-os SDS poliakrilamid gélen végeztük. Az elválasztott fehérjéket PVDF membránra blottoltuk és monoklonális (CUB7402) valamint poliklonális anti-TGáz2 antitestekkel hívtuk elő. A kötött antitesteket ECL kittel vizualizáltuk.

TGase1,2,3,5,7 kifejeződés meghatározása. TGase1,2,3,5,7 enzimek kifejeződést real-time quantitative PCR-ral határozták meg Daniel Aeschlimann laboratóriumában Wales-ben. A minták közötti normalizáláshoz belső standardként a S26 riboszómális fehérje transzkriptjét használták.

Transzmissziós elektronmikroszkópiát a Patológiai Intézetben végezték. A transzmissziós elektronmikroszkópiához tímusz mintákat fixáltak és apró darabokra vágták, dehidrálták és epoxi rezinbe ágyazták. Ultravékony metszeteket uranil-acetáttal és ólom-nitráttal itatták át és Zeiss EM900 elektronmikroszkópon vizsgálták.

Makrofág fagocitózis meghatározás. Hasüregi mosással makrofágokat izoláltunk felnőtt egerekből és ez követően 2%-on zselatinnal bevont 24-lyuku sejtenyésztő edényre szélesztettük őket. 2 óra múlva a nem letapadt sejteket elmostuk. Timocitákat 4 hetes egerekből izoláltuk. A timocitákat anti-CD3 antitesttel opsonizáltuk. Apoptótikus T-sejtekhez, a timocitákat 6 óráig a kalcium ionofor, A23187-mal inkubáltuk. Az apoptótikus sejteket 10⁷ cells/ml koncentrációban adtuk hozzá a makrofágokhoz. 1 óra együtt inkubálás után a fel nem vett sejteket elmostuk, míg a letapadó sejteket glutáraldehiddel fixáltuk. Mosás után a sejteket ozmium tetraoxiddal „festettük” és fázis kontraszt mikroszkóp alatt számoltuk. *Listeria monocytogenes* felvételhez a baktériumokat CellTracker green-nel fluoreszcensen jelöltük és mostuk a makrofágokhoz való hozzáadás előtt. A

sejteket paraformaldehiddel fixáltuk és epifluoreszcens mikroszkópon tanulmányoztuk. *Saccharomyces cerevisiae* felvétele mikroszkóposan a makrofágokon belül lévő, metilén-kék pozitív gomba sejteket számolva történt.

Reuma faktor antitestek meghatározását az egyetemünk Immunológiai Intézetében végezték. Az egér IgG specifikus autoantitestek meghatározása szilárd fázisú ELISA-val történt.

IgM tartalmú immun-komplexek meghatározása. Vesét eltávolították és folyékony nitrogénben izopentán jelenlétében lefagyasztották. A kriometszeteket hideg acetonban fixálták és FITC-jelölt anti-egér IgM-mel inkubálták.

Szérum urea koncentráció meghatározása. Mintákat 1:3 arányban összekevertük szín-reagenssel és 85 °C-on 30 percig majd 12 °C-on 10 percig inkubáltuk. Az abszorbanciát 540nm-en mértük.

In vivo anti-Fas kezelés. 4 hetes TGáz2^{+/+}, TGáz2^{-/-}, ADR^{+/+} és ADR^{-/-} egereket intraperitoneálisan oltottuk anti-Fas antitesttel. Néhány kísérletben a TGáz2^{+/+} egereket egy héten át naponta kloroetilklonidinnel (CEC), egy adrenerg receptor antagonistával oltottuk, hogy meghatározzuk a Bcl-x_L kifejeződésében és az *in vitro* Fas érzékenységekben bekövetkező változásokat.

Májsejt-tenyésztés kísérletek. Májsejteket a SOTE Orvosi Kémiai Intézetben izolálták. Izolált májsejteket 37°C/5% CO₂-ön termosztálva tenyésztették 24 óráig emelkedő koncentrációjú anti-Fas antitest jelenlétében illetve hiányában. A százalékos májsejt apoptózist áramlási-citométerrel határoztuk meg az annexin-V-FITC⁺ és propidium jodid negatív sejteket számolva.

VT és TGáz2^{-/-} egerek májsejtjeinek felszínén lévő Fas mennyiségének meghatározása. Frissen izolált májsejteket mostuk PBS-ben és PE-jelölt anti-Fas antitesttel festettük. A fluoreszcenciát áramlási-citométerrel detektáltuk.

Bcl-x_L és cFLIP(L) szint meghatározása VT és TGáz2^{-/-} egerek májában. 1 mg/ml fehérjeét tartalmazó májhomogenizátumokat összekevertük egyenlő térfogat minta felvivő pufferrel. Az elektroforézist a Bcl-x_L esetében 12%-os míg a FLIP esetében 10%-os SDS-poliakrilamid gélen végeztük. Az elválasztott fehérjéket PVDF membránra blottoltuk és anti-Bcl-x_L valamint anti-FLIP antitestekkel hívtuk elő. A kötött antitesteket ECL kittel tettük láthatóvá.

Májminták szövettani analízise a Patológia Intézetben történt. Májmintákat vettünk anti-Fas antitest oltott és kontroll egerekből. Fixálást követően a mintákat fénymikroszkópos vizsgálatokhoz hematoxin-eozinnal festették. Az elektronmikroszkópiás vizsgálatok a már fentebb leírtak szerint került kivitelezésre.

TUNEL festés. Anti-Fas antitest oltott egerekből eltávolított májakat formalinban fixáltuk. A paraffinos beágyzás után a mintákat APOPTAG *in situ* apoptózis detektáló kittel festettük.

Szérum aszpartát aminotranszferáz (AST) és alanin aminotranszferáz (ALT) szintek meghatározása. Anti-Fas antitestoltást követően az egerekből szérum mintákat gyűjtöttünk. AST és ALT aktivitások meghatározása rutin klinikai módszerrel történt.

Eredmények

Sejthalál a tímuszban a TGáz2 hiányában

Az apoptótikus sejtek felvétele zavart a TGáz2^{-/-} egerek tímuszában. Az *in vivo* timocita sejthalált indukáló anti-CD3 antitest, DXM vagy γ -besugárzás a TGáz2 *in vivo* kifejeződését is váltottuk ki, amelyet a TGáz2 fehérje mennyiségének és a TGase aktivitásának megnövekedése kísért VT egerekben. A csonka TGáz2 mRNS kifejeződött ugyan a TGáz2^{-/-} egerekbe, de a megfelelő fehérje nem volt detektálható. Abból, hogy a TGáz2 mRNS szintjének emelkedése apoptózis indukció után kisebb volt a TGáz2^{-/-} egerben, mint a VT-ben arra következtettünk, hogy annak transzkripció aktivációja TGáz2-függő. Hasonló eredményeket kaptunk más transzglutaminázokkal is. TGáz2^{-/-} egerekben apoptózis indukció után a tímusz tömeg és sejtszám csökkenése kisebb volt a VT tímuszhoz hasonlítva. Apoptózis indukció után az annexin V⁺ (szabad apoptótikus) timociták százalékának és a szövettani metszeteknek a vizsgálata arra engedett következtetni, hogy a kisebb timocita sejtszám csökkenés a TGáz2^{-/-} egerekben csökkent fagocitózisra és apoptótikus sejtek meghosszabbodott jelenlétére vezethető vissza.

A TGáz2^{-/-} egerek májában az apoptótikus sejtek csökkent felvételét gyulladáso reakció kíséri. A májsejtek osztódását majd apoptózist kiváltó PbNO₃-mal kezelt egerek májának szövettani vizsgálata azt mutatta, hogy a csökkent fagocitózis nem korlátozódott a tímuszra. Emellett szövettani képek azt is bizonyítják, hogy TGáz2 hiányában az apoptótikus sejtek felvétele állandóan zavart szenved és ezt gyulladáso reakció kíséri.

Az aktív TGF- β 1 termelődése elősegíti az apoptótikus sejtek felvételét és TGáz2 függő. VT és TGáz2^{-/-} hasüregi makrofágokat és timocitákat használva kimutattuk, hogy a TGáz2 a makrofágokban szükséges a normális fagocitózishoz. Továbbá, a csökkent fagocitózis csak az apoptótikus sejtek

felvételére korlátozódik mivel a TGáz2^{-/-} makrofágok normálisan vettek fel baktériumokat, gombákat és opsonizált, nem apoptótikus timocitákat.

A makrofágokról ismert, hogy TGáz2-t termelnek, amely szükséges a látens TGF-β1 aktiválásához. Sejtkultúrák tápoldat transzfer kísérletekkel bizonyítottuk, hogy a VT makrofágok által termelt TGF-β elősegíti TGáz2^{-/-} makrofágok fagocitotikus képességét.

Az in vivo apoptózis során a TGF-β1 felelős a TGáz2 termelődésért. Hogy teszteljük a hipotézisünket miszerint a TGF-β felelős a TGáz2 szint *in vivo* emelkedéséért, VT egereket oltottunk neutralizáló anti-TGF-β1,2,3 antitesttel. anti-TGF-β antitest jelenlétében a TGáz2 aktivitás emelkedése anti-CD3, DXM kezelés illetve γ-besugárzás után szignifikánsan csökkent.

TGF-β1 elősegíti a timociták apoptózisát. TGF-β1 adása elősegítette a VT timociták DXM, anti-CD3 és etopozid indukálta apoptózisát *in vitro*. A TGF-β1 e hatása nem volt kapcsolható a TGáz2-nek az apoptótikus sejtkben történő felhalmozódásához mivel a TGF-β1 TGáz2^{-/-} egerekben is a VT-hez hasonló mértékben növelte a timociták elhalását.

A TGáz2^{-/-} egerekben autoimmun antitestek, lépmegnagyobbodás és glomerulonephritis alakul ki. Ezek után a TGáz2 hiány hosszú távú következményeit vizsgáltuk. Azt találtuk, hogy az 1 éves TGáz2^{-/-} egerekben, autoantitestek jelentek meg sejtmagi alkotórészek és simaizom sejtek ellen. Az autoantitesttel rendelkező TGáz2^{-/-} egerekben a lép megnagyobbodása is megfigyelhető volt. 15 hónapos korukra néhány TGáz2^{-/-} egérben súlyos, halálos immunkomplex glomerulonephritis fejlődött ki az egerek korai halálát okozva. A rendellenes glomeruláris működés a magas szérum urea koncentráció is megerősítette. Az ugyanilyen korú VT egerek egyike sem mutatta veseelégtelenség jeleit.

A TGáz2^{-/-} egerek érzékenyebbek a Fas-indukált sejthalálra, mint a VT állatok

A TGáz2 hiánya nem befolyásolja a timociták Fas-indukált apoptózisát in vitro, de az in vivo apoptózis kissé lassul. Hasüregi anti-Fas injekciót követően a CD4⁺CD8⁺ timocita populáció mérete lecsökkent a VT és TGáz2^{-/-} egerek tímuszban. A TGáz2^{-/-} timociták eltűnése kissé lassabb volt. Ugyanakkor az *in vitro* anti-Fas antitest indukált timocita elhalásban nem volt különbség a két törzs között. Ezek az adatok arra engednek következtetni, hogy a TGáz2 hiánya nem befolyásolja a timociták Fas érzékenységét. A kísérletek során észrevettük, hogy a TGáz2^{-/-} egerek érzékenyebbek az anti-Fas antitestre, azaz, az amúgy VT egerekre nem halálos dózisú anti-Fas antitest kezelést nem éltek túl. Elhatároztuk, hogy karakterizáljuk ezt a jelenséget.

Vad típusú májsejtek elsősorban nekrozissal, míg TGáz2^{-/-} sejtek apoptózissal halnak el in vivo nem halálos dózisú anti-Fas antitest kezelés követően. Anti-Fas kezelt egerek májaiból származó szövettani metszetek hematoxilin-eozin festése és transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálata kiderítette, hogy a VT egerek májában a sejtek döntően nekrozissal halnak el, míg a TGáz2^{-/-} májban nagy mértékű apoptózis volt megfigyelhető súlyos, az endotél sejtek károsodást jelző, bevérvésekkel együtt. Ezt alátámasztva, nagy számú TUNEL pozitív májsejt látható a TGáz2^{-/-} egerek májában, amíg a VT egerek májában csak az endotél sejtek festődtek. Ezen felül a TGáz2^{-/-} egerek májsejtjeiben, spirális alakban felcsavarodott endoplazmás retikulumra emlékeztető képződmények voltak megfigyelhetők. Ezek a struktúrák májsejtektől elhatárolódva, látható külső membrán nélkül jelentek meg.

A TGáz2^{-/-} májsejtek *in vivo* anti-Fas kezelést követő VT sejtekhez képest fokozott károsodását megerősítette a megnövekedett szérumszintű AST és ALT szint is.

A fenti eredmények az sugallják, hogy a TGáz2^{-/-} májak fokozottan érzékenyek az amúgy VT egerek számára nem halálos dózisu anti-Fas antitest kezelésre, valamint, hogy a kiváltott sejthalál mechanizmus eltérő a két törzs között és hogy a TGáz2, mint fehérje-keresztalkotó enzim szükséges a normális apoptotikus morfológia kialakításához.

A TGáz2^{-/-} májsejtek in vitro fokozottan érzékenyek anti-Fas kezelésre és ez korrelál a csökkent Bcl-x_L szintjükkel. Az izolált TGáz2^{-/-} májsejteknek mind a spontán, mind pedig az anti-Fas antitest által kiváltott elhalása nagyobb volt, mint a VT sejteknek. A megnövekedett érzékenység nem volt visszavezethető nagyobb sejtfelszíni Fas mennyiségre.

Mivel a TGáz2^{-/-} májsejtek spontán is gyorsabban haltak el és a spontán sejtelhalást az anti-apoptotikus fehérjék szintje szabályozza, megvizsgáltuk sejtek Bcl-x_L és cFLIP(L) szintjeit is. Azt találtuk, hogy a TGáz2^{-/-} májsejtekben VT sejtekéhez viszonyítva a cFLIP(L) szintje nem csökkent de a Bcl-x_L-é igen.

Az α₁-b-adrenerg receptor gátlása a Bcl-x_L szint csökkenését és megnövekedett Fas-érzékenységet okoz májsejtekben. In vivo kloroetilklonidin (CEC), adrenerg receptor antagonista, előkezelés VT egerekben csökkentette a májsejtek Bcl-x_L szintjét és a TGáz2^{-/-} sejtekéhez hasonló, fokozott anti-Fas érzékenységet okozott *in vitro*. Ezek az eredmények demonstrálták, hogy TGáz2 hiányában fellépő sérült ADR jelátvitel, a Bcl-x_L szint csökkenéséhez és ezen keresztül fokozott Fas érzékenységhez vezethet.

Hogy bizonyítsuk az ADR jelátvitelnek a májsejtek Fas érzékenységének szabályozásában betöltött szerepét, egy α₁-b adrenoceptor hiányos (ADR^{-/-}) egértörzs Fas érzékenységét is meghatároztuk. Az ADR^{-/-} egér VT párja a C57BL/6 egér, amelyben a májsejteken lévő β₂-adrenerg receptor sűrűsége alacsony. Ebből kifolyólag ezek az egerek eleve

fokozottan érzékenyek a Fas-közvetített sejthalálra. Ennek megfelelően az anti-Fas antitest dózisént csökkentenünk kellett.

Az ADR^{-/-} egerek érzékenyebbek a Fas-kiváltotta halálra mint a VT megfelelőik. Amíg a VT egerek 80% addig az ADR^{-/-} egereknek mindössze 10% élte túl az anti-Fas oltását követő 48 órát.

Az ADR^{-/-} egerek mája számottevően nagyobb károsodást mutatnak anti-Fas kezelést követően, mint a VT májak. Az ADR^{-/-} egerek esetében a májakat a halál időpontjában távolítottuk el, míg a VT egerek esetében, amikor az ADR^{-/-} egerek elpusztultak. Mind a VT mind, pedig az ADR^{-/-} máj szövettani analízise parenchymás degradáció képét mutatta apoptotikus sejtekkel, de ez jóval kifejezettebb volt az ADR^{-/-} májban. Az ADR^{-/-} májak VT-hez képesti fokozott apoptotikus károsodása további megerősítést nyert a TUNEL festéssel az ADR^{-/-} metszeteken látható nagy számú apoptotikus sejttel és a megemelkedett, szérumban mért ALT és AST szintekkel.

A korábbi eredményeinknek megfelelően, miszerint a CEC-kezelés csökkenti Bcl-x_L szintet, az ADR^{-/-} májakban szintén kevesebb Bcl-x_L található, mint a VT párjukban. A C57BL/6 egér szintén kevesebb cFLIP(L)-et és Bcl-x_L-t fejezett ki mint a TGáz2^{+/+} egér ami magyarázhatja a fokozott Fas-érzékenységet. Másrésztől nem volt különbség az ADR^{+/+} és ADR^{-/-} májsejtek cFLIP(L) szintjében.

Megbeszélés

Jelen a tanulmányban a TGáz2 hiányában zajló *in vitro* és *in vivo* apoptózis programot vizsgáltuk. Az irodalmi adatokkal egyezve, azt találtuk, hogy a TGáz2 elvesztése nem befolyásolja a timociták *in vitro* apoptózisát. Ugyanakkor, *in vivo* apoptózis indukciót követően, ahol is a TGáz2 szintje normálisan megemelkedik, csökkent sejthalált észleltünk a TGáz2^{-/-} egerek tímuszában. Ez annak lehet a következménye, hogy a TGáz2 hiányában a timociták lassabban aktiválják az apoptózis programjukat. Egyrészt a TGáz2-ről kimutatták, hogy a mitokondriális úton érzékenyíti a sejteket az apoptózisra. Másodsorban, azt találtuk, hogy a TGF-β sejtkultúrában elősegíti a timociták halálát. Mivel a TGF-β-át az apoptotikus sejtet emésztő makrofágok is elválasztják, az *in vivo* TGF-β termelés hozzájárulhat az *in vivo* apoptózis sebességéhez. A TGáz2 hiányában a TGF-β aktiválása zavart szenvedett és ez az apoptózis sebességének csökkenését eredményezheti.

A sejthalál sebességének megváltozása nemcsak a tímuszra volt jellemző. Az TGáz2^{-/-} egerek mája különösen érzékenynek bizonyult az *in vivo* anti-Fas antitestre, ami súlyos májsejt apoptózist indukált. A TGáz2^{-/-} egerek szérumban megemelkedett AST és ALT szintek igazolták a máj károsodását. A májak szövettani vizsgálata kimutatta, hogy a TGáz2^{-/-} májsejtek a röviddel az anti-Fas antitest oltást követően döntően apoptózissal haltak el. A bevérvések jelenléte endotél sejtek sérülésére is utalt. Ezzel szemben, a VT egerek májában ugyanebben az időpontban csak endotél sejtek apoptózisa volt kimutatható. Később, valószínűsíthetően az endotél sejt károsodás miatt fellépő tápanyag és oxigén ellátás zavara miatt, nektróikus sejtek jelentek meg. A fokozott Fas érzékenység izolált májsejteken is megfigyelhető volt, felvetve annak a lehetőségét, hogy magában a Fas-közvetített jelátviteli útban történt változás. A sejtfelszíni Fas mennyiségét vizsgálva azt találtuk, hogy a fokozott anti-Fas

érzékenység nem a megnövekedett sejtfelszíni Fas mennyiségre vezethető vissza. A cFLIP(L), amely nagy koncentrációban képes blokkolni a Fas által elindított sejthalál utat, szintén azonos mennyiségben volt jelen a két törzs májsejtjeiben. A májsejtek a II-es típusú sejtekhez tartoznak, amelyekben az apoptózis a mitokondriális úton zajlik. Mivel a Bcl-x_L jelen van felnőtt patkányok májában és tenyésztett májsejtjeiben, valamint a fokozott kifejeződéséről leírták, hogy védelmet nyújt a Fas-közvetített sejthalállal szemben, megvizsgáltuk a Bcl-x_L kifejeződését és azt találtuk, hogy a TGáz2^{-/-} májsejtek kevesebb Bcl-x_L-t tartalmaznak, mint a VT sejtek.

A TGáz2, mint G_{αpha(h)} fehérje, vesz részt az ADR jelátvitelben a májban. Adrenerg agonisták nemcsak a májsejtek anyagcseréjét szabályozzák, hanem azok osztódását is. Továbbá, az α₁-adrenerg receptorról leírták, hogy szerepet játszik a májsejtek proliferációjában de arról nincs információnk, hogyan befolyásolja az α-adrenerg jelátvitel a májsejtek Fas-követített sejthalállal szembeni érzékenységét.

Hogy teszteljük a feltevésünket, miszerint a TGáz2^{-/-} hiányos egerekben az ADR jelátvitel hiánya szerepet játszik a Fas-követített apoptózis és halál érzékenység kialakulásában szemben, vizsgáltuk hogy a TGáz2^{-/-} egerek májsejtjeiben megfigyelt csökkent Bcl-x_L szint összefügg-e a hibás ADR jelátvitellel. VT májsejtek egy hétig CEC-nel, egy ADR antagonistával, előkezelve csökkent Bcl-x_L termelést és fokozott *in vitro* anti-Fas érzékenységet mutattak.

Ennek megfelelően, az ADR^{-/-} egerek a TGáz2^{-/-} egerekhez hasonlóan nagyobb elhullást mutattak anti-Fas antitest oltást követően, mint VT társaik. A nagyobb májkárosodást nagyobb szérum AST és ALT szintek és a májmetszetek szövettani vizsgálata is megerősítette. A Bcl-x_L kifejeződés western blottal való vizsgálata kimutatta, hogy az ADR^{-/-} májsejtek a TGáz2^{-/-}-hoz hasonlóan szintén kevesebb Bcl-x_L-t tartalmaznak. A fenti eredmények kiemelik a α₁-b adrenerg jelátvitelnek a májsejtek

halálának szabályozásában betöltött szerepének fontosságát.

Vizsgálódásainknak a legfontosabb eredménye az a megállapítás, hogy a TGáz2 elvesztése nemcsak az apoptózist befolyásolja, hanem a makrofágok fagocitáló képességét is. Szabad apoptótikus sejteket találtunk a TGáz2^{-/-} egerek tímuszában, ami az apoptótikus sejtek csökkent felvételére utalt. A hiba a sejtek felvételében a PbNO₃ indukált máj megnagyobbodást követően is megfigyelhető volt mutatva, hogy a jelenség nem szerv specifikus. A csökkent sejt felvétel csak apoptótikus sejtekre korlátozódott. Egy sor kísérlet után arra a következtetésre jutottunk, hogy a csökkent fagocitózis részben a nem megfelelő TGF- β aktiválásra, amely aktiválás szükséges a PS makrofágok általi felismeréséhez, vezethető vissza.

Az újabb tanulmányok azt feltételezik, hogy a makrofágok és apoptótikus sejtek között zajló intenzív párbeszéd biztosítja az apoptótikus sejtek hatékony eltávolítását és a gyulladásos reakciók megakadályozását. A fagocitákról kimutatták, hogy aktívan részt vesznek a célsejtek apoptózisának indukciójában és végrehajtásában. Amikor egy sejt elkötelezetté válik a halálra, a makrofágok segíthetik ezt FasL, TGF- β vagy nitrogén-monoxid kibocsátásával. Másrésről, olyan, az elhaló sejtekből kiszabaduló makrofág kemotaktikus faktorok is szükségesek a normális fagocitózishoz, mint pl. a lizofoszfatidilkolin, és a keresztkötött S19 riboszómális fehérje. Továbbá, a fagocitákhoz kötődött apoptótikus sejtek átprogramozzák azokat a gyulladásos citokin termelésük leállítására. A TGáz2 ennek a párbeszédnek mindkét oldalán részt vesz. A TGF- β aktiválása, a NO termelése és az S19 riboszómális fehérje keresztkötése mind a TGáz2 enzim aktivitásán múlik. Ezen felül, mint azt jelenleg is zajló kísérleteink mutatják, a TGáz2 úgy tűnik, részt vesz a PS sejt felszínen való megjelenítésében is, mivel a TGáz2^{-/-} egerekben a PS kifordulása késleltetett.

Az autoimmunitás a saját antigénekkal szemben meglévő immuntoleranciának a zavara. Az apoptózisban és fagocitózisban bekövetkező rendellenességek szerepet játszhatnak az autoimmun-betegségekben.

A széteső, szabad apoptotikus sejtek, tartalmukat kieresztve súlyosbítják a helyi gyulladásos választ és további leukocita bevándorlást váltanak ki, amint azt a PbNO_3 kezelt $\text{TG}\alpha\text{z}2^{-/-}$ egerek májmetasztázisain megfigyelhető fehérvérsejt beszivárgás is mutatta. A fokozott gyulladásos válasz a $\text{TG}\alpha\text{z}2^{-/-}$ májban részlegesen magyarázható a kisebb gyulladás-csökkentő $\text{TGF-}\beta$ citokin aktivitással. A csökkent fagocitózis következményeként szabad apoptotikus sejtek gyűltek fel $\text{TG}\alpha\text{z}2^{-/-}$ egerek tüdőszárában és májában. Az apoptotikus sejtek bizonyos sejtmagi antigéneket prezentálnak felszínükön, ezzel a rendes körülmények között láthatatlan antigéneket, potenciálisan káros következményekkel, elérhetővé tesznek az adaptív immunrendszer számára. Az apoptotikus sejtek folyamatos jelenléte az immunrendszer sejtjei számára autoantitestek átmeneti termeléséhez, az elhalt sejtek felvételének zavara pedig autoimmunitáshoz vezet. Valóban, a $\text{TG}\alpha\text{z}2$ enzim funkció hiánya hosszú távon az egerekben autoantitestek megjelenésével, megemelkedett anti-IgG2a antitest szinttel és nagyszámú CD4^+ és B sejttel jellemezhető autoimmunitás kifejlődéséhez vezetett. Ez lépmegnagyobbodással és glomerulonephritissel járt együtt. Mivel a mi modellünkben a timociták apoptózisa is zavart volt, a sérült negatív szelekció miatt autoreaktív T-sejtek is felhalmozódhatnak, hozzájárulva ezzel az autoimmunitás kialakulásához.

Összefoglalva, adataink azt sugallják, hogy a $\text{TG}\alpha\text{z}2$ a fagociták és az apoptotikus sejtek közötti párbeszéd több szintjén is részt véve hozzájárul a normális fagocitózishoz és az autoimmunitás megakadályozásához. Először, a $\text{TG}\alpha\text{z}2$ szint megemelkedése közvetlenül

segíti a célsejtek halálát, azáltal, hogy érzékenyíti őket a sejthalál stimulusokra és gyorsítja az apoptózist. Másodszor, az apoptózis során a TGáz2 gyorsítja a PS megjelenését a sejtfelszínen és az S19 riboszómális fehérje keresztkötésével szerepet játszik a makrofágoknak az apoptótikus sejtekhez való odacsalogatásában. Harmadsorban, a PS felismerése a makrofágokban az aktív TGF- β TGáz2-függő termelődését eredményezi, amely 1.) a TGáz2 termelés elősegítésével tovább gyorsítja a célsejtek halálát; 2.) a makrofágok gyulladásos citokin termelésének csökkentésével elfojtja a gyulladást, valamint 3.) fokozza a fagocitózist és ezáltal az apoptótikus sejtek, mint potenciális hajlamosító és indító faktorok az autoimmunitásban, eltávolításra kerülnek. Összességében, eredményeink további bizonyítékot szolgáltatnak a makrofágok és az elhaló sejtek közötti párbeszédre és bemutatják, hogy a TGáz2 része az apopto-fagocita gépezetnek, amelynek kritikus funkciója van a gyulladás és autoimmunitás megelőzésében.

Összefoglalás

Vizsgáltuk a TGáz2 hiányának az apoptózisra és a makrofágok fagocitótikus képességére gyakorolt hatását.

Eredményeink azt mutatják, hogy az apoptótikus sejtet felvevő makrofágok által kibocsátott TGF- β elősegíti a timociták halálát, és mivel a TGáz2 szükséges a TGF- β aktiválásához, a TGáz2 hiányában a tímuszban az *in vivo* apoptózis késleltetett. A sejthalál sebességének megváltozása nemcsak a tímuszra volt jellemző, mivel, ahogyan azt a szövettani metszetek és a megemelkedett szérumszintek demonstrálták, a TGáz2^{-/-} egerek mája fokozott károsodást és gyulladásos választ mutat anti-Fas antitest kezelést követően. A fokozott Fas-érzékenység csökkent Bcl-x_L szinttel járt együtt a TGáz2^{-/-} májsejtekben. Az α_1 -b-adrenoceptor hiányos egerek hasonló viselkedése bizonyította, hogy a TGáz2, mint

G_{alpha(h)} fehérje az a₁-b-adrenerg jelátvitelben, védelmet nyújt a májsejteknek a Fas-közvetített apoptózissal szemben. Vizsgálódásainknak a legfontosabb eredménye az a megállapítás, hogy a TGáz2 elvesztése nemcsak az apoptózist befolyásolja, hanem a makrofágok fagocitáló képességét is. Az apoptotikus sejtek csökkent fagocitózist tapasztaltuk mind *in vitro* mind, pedig *in vivo* a TGáz2^{-/-} egerek tímuszában és májában. Egy sor kísérlet után arra a következtetésre jutottunk, hogy a csökkent fagocitózis részben a nem megfelelő TGF- β aktiválásra, amely aktiválás szükséges a PS makrofágok általi felismeréséhez, vezethető vissza. Az apoptotikus sejtek nem megfelelő eltávolításának következményeként a TGáz2^{-/-} egerekben autoimmunitás alakult ki idős korban.

Összefoglalva, az adatok arra utalnak, hogy a PS felismerésével egy párbeszéd alakul ki a makrofágok és az elhaló sejtek között. A PS felismerése egy apoptotikus sejt-specifikus makrofág aktivációt eredményez, amely magába foglalja a TGF- β TGáz2-függő aktivációját. Az aktív TGF- β ezután meggátolja a makrofágok gyulladásos citokin termelését és, ahogy az ebben a munkában bemutatásra került, stimulálja a fagocitózist. Ezen felül, a TGF- β elősegíti a timociták apoptózisát és a TGáz2 felhalmozódását a sejtekben az *in vivo* apoptózis során. Összességében, eredményeink további bizonyítékot szolgáltatnak a makrofágok és az elhaló sejtek közötti párbeszédre és bemutatják, hogy a TGáz2 része az apopto-fagocita gépezetnek, amelynek kritikus szerepe van a gyulladás és autoimmunitás megelőzésében.

Második rész

Bevezetés

Az extracelluláris mátrix szerkezete és felépítő fehérjéi

A többsejtes szervezetben a sejtek közötti oldhatatlan, nem-sejtes anyag az extracelluláris mátrix (ECM) néven ismert. Az ECM sejtekből, főleg fibroblasztokból, kiválasztott molekulák bonyolult keverékéből áll, amelyeket három fő csoportba oszthatunk: 1. szerkezeti fehérjék, amelyek szerkezeti támaszt és húzószilárdságot biztosítanak (kollagén, elasztin); 2. specializált fehérjék, amelyek főleg letapadásban és migrációban játszanak szerepet (fibrillin, fibronectin és laminin); 3. proteoglikánok. A kollagének az ECM vázszerkezetét és rugalmasságát adják. és a magasabb rendű állatokban az összes fehérje mennyiségnek körül-belül az egyharmadát ezen fehérjék adják. Családjuk legalább 20 rostos fehérjét foglal magába de a leggyakoribb az I-, II- és III-as típusú. A fibronectin, az első jól körülírt adhezív fehérje, két azonos fehérjéből felépülő dimer. Legalább hat, különböző szubsztátumot, mint például a heparán-szulfát, kollagén, fibrin vagy a sejtfelszíni integrin receptor, nagy affinitással kötő alegységet tartalmaz. Az integrinek a metazoa sejtekben a fő, ECM-hez kapcsolódó, sejt adhéziós receptorok és gerincesekben bizonyos sejt-sejt kapcsolatokban is részt vesznek. A sejt letapadásának biztosítása mellett az integrinek sejtmembránon keresztüli jelátvitelben is részt vesznek. A ligand kötések sejtben belüli olyan jelátviteli utakat aktiválnak, amelyek a sejt proliferációját, túlélését/apoptózist, alakját, polaritását, mozgékonyágát és differenciálódását szabályozzák. A működőképes integrin két sejtmembránon átnyúló glikoprotein alegységből áll, amelyeket alfa és beta-nak hívnak. Mindezekig 18 alfa és 8 beta alegységet azonosítottak, amelyekből 25 különböző integrin épül fel.

Tumor képződés a szájjüregi laphámában

A daganat kialakulása ismereteink szerint többlépcsős folyamat, melyben a normális sejt először iniciáción megy keresztül, amelyet

felszaporodás és rosszindulatú daganattá alakulás követ. Ez a sejt működésében három nagy változást jelent: 1. megváltozott növekedés, halál és hosszú élet; 2. akadálymentes sejtváándorlás; 3. új érpályák kialakulása (angiogenezis). A szájüregi laphám és más daganatok kialakulását jellegzetes gének, mint például a p53, p27, p16 és ciklin D-1 megváltozása kíséri. A szájüregi nyálkahártyában etiológiai okokról, különösen a dohányzásról, alkoholfogyasztásról és valószínűleg néhány vírusról, ismert, hogy sejtciklus szabályozásban részt vevő gének megváltozását eredményezik, ezzel hozzájárulva szájüregi diszpláziák és laphám tumorok kialakulásához.

A daganatok kialakulása és a keratinociták *in vitro* transzformálása gyakran érinti a sejt-mátrix kapcsolatokat is. Az emberi sejtenyészetek mind a normális sejt működés, mind pedig a daganat kialakulás *in vitro* tanulmányozásához fontos eszközt nyújtanak. Transzformált sejtvonalakat gyakran használnak, mint könnyen tenyészhető pótlék, a normál sejtek helyett. Ezen felül, halhatatlan és rosszindulatú tumor sejteket, mint jól leírható modellek használhatunk a tumor képződés korai és késői fázisának jellemzésére. Normál (NOK), SV40 T antigénnel immortalizált (SVpgC2a) és a malignus (SqCC/Y1) emberi szájüregi keratinociták a szájüregi daganat kialakulás egy-egy fázisát jelenítik meg azáltal, hogy modellezik a halhatatlanság megszerzését, p53 tumor elnyomó funkció elvesztését és végül a daganatos fenotípus megjelenését. Ennek megfelelően, a NOK, SVpgC2a és SqCC/Y1 sejtekből felépülő organotipikus epitéliumok keratin kifejeződése hasonló volt a normál, diszpláziás és jól-differenciálódott laphám-rák szöveteiben tapasztalt keratin kifejeződéshez. Továbbá, SVpgC2a sejtek a pre-neopláziás léziókhöz hasonlóan megelkedett osztódást és apoptózist mutatnak. Azonban meg kell említeni, hogy az SqCC/Y1 sejtvonal nem az immortalizált sejtekből keletkezett ezért ez a modell egy nem folytonos három-lépcsős tumor kialakulást mutat be.

Célkitűzés

Célkitűzésünk volt, hogy vizsgáljuk az ECM molekulák kifejeződését, valamint a növekedésre és migrációra kifejtett hatásukat *in vitro* emberi szájüregi keratinocita tenyészetekben.

Kíséleteink során célunk volt:

- Affymetrix oligonukleotid microarray technikával meghatározni a fibronectin, kollagén és integrin kifejeződés mértékét normál, SV40 T transformált és rosszindulatú daganatos emberi szájüregi keratinocitákban
- meghatározni az extracelluláris fibronectin és kollagén normál, SV40 T transformált és rosszindulatú daganatos emberi szájüregi keratinociták növekedésére, kolónia-képző hatékonyságra és migrációjára kifejtett hatását.

Anyagok és módszerek

Sejttenyésztés. Normális szájüregi keratinocitákat klinikailag egészséges szájüregi szövetből izoláltuk tripszines emésztéssel a Karolinska Intézet etikai bizottságának beleegyezésével. A primer sejteket szérummentes tápoldatban (EMHA) fibronectin- és kollagén- (FN-COL) borított sejttenyésztő edényre szélesztettük. Az SV40 T antigén transzfekcióval előállított halhatatlan SVpgC2a sejtvonalat és az SqCC/Y1 szájüregi laphám-rák sejtvonalat szintén EMHA-ban tenyésztettük.

Jelölt cRNS előállítása. RNeasy kittel minden sejttypusból teljes RNS-t preparáltunk. Erről duplaszálú cDNS-t készítettünk majd ezt templátként használva *in vitro* biotinált CTP-t és UTP-t tartalmazó, jelölt cRNS-t írtunk át. A cRNS-t RNeasy affinitás oszloppal tisztítottuk.

Array hibridizáció. A génexpresszió meghatározására 12000 emberi traszkriptet tartalmazó microarray csippek kerültek hibridizálásra a NOK, SVpgC2a és SqCC/Y1 sejtekből származó jelölt cRNS-ekkel. A hibridizáció után a csippeket mosták és streptavidin-fikoeritrinnel festették, majd HP array leolvasóval 570nm-en leolvasták. A microarray adatokat GeneChip®4.0 programmal analizáltuk, Microsoft Excel-be importáltuk és rendeztük és TreeView programmal ábrázoltuk.

Növekedés meghatározása sejt kultúrában. Az össz-sejtszámmal jelzett nettó növekedést Nikon fordított mikroszkóp alatt határoztuk meg naponta számolva a mm^2 -re eső sejtek számát 10 véletlenszerűen kiválasztott látótérben.

Kolónia-képző hatékonyság (CFE). A sejteket kiszélesztettük és 8 napig tenyésztettük EMHA-ban. A tenyészeteket ezután formalinban fixáltuk és kristály-ibolyával festettük. CFE-t két párhuzamos tenyészetből a 12-nél több sejtet tartalmazó kolóniák mikroszkópos számolásával határoztuk meg.

Eredmények

Oligonukleotid microarray. Míg a fibronectin transzkriptje minden sejttípusban egységesen nagy mennyiségben jelen volt addig a különböző kollagén és integrin láncok változóan fejeződtek ki a három sejttípusban. Az immortalizált SVpgC2a sejtekben megnövekedett kollagén és csökkent integrin termelést, míg a malignus SqCC/Y1 sejtek ebben a tekintetben inkább a normális sejtekre hasonlítottak. Összességében, 20 gén (11 kollagén lánc és 9 integrin alegység) mutatott eltérő kifejeződést, míg 18 kollagén lánc és 15 integrin alegység nem volt detektálható vagy azonos kifejeződést mutatott a SVpgC2a és/vagy SqCC/Y1 sejtekben a NOK-hoz hasonlítva.

Fibronectin-kollagén hatása a sejtnövekedésre. A NOK sejtekhez hasonlítva nagyobb sejtszám/tenyészedény volt tapasztalható a SVpgC2a és SqCC/Y1 sejtek esetében. Mindhárom sejttípusnál kis, nem szignifikáns különbség volt tapasztalható a sejtszámban, amikor a tenyészedényt FN-COL-nel borítottuk be.

Fibronectin-kollagén hatása a CFE-re. A SVpgC2a CFE-je kétszerese volt a NOK és SqCC/Y1 CFE-jénél. A CFE mindhárom sejtnél nagyobb volt FN-COL hiányában de a különbség nem volt szignifikáns.

Fibronectin-kollagén hatása a migrációra. A kolóniák minden sejttípus esetben reprodukálhatóan szétszórtabbak voltak FN-COL-borított felszíneken nagyobb felszín/kolónia aránnyal.

Megbeszélés

NOK, SVpgC2a és SqCC/Y1 sejtek szérummentes tenyészetait használtuk, hogy vizsgáljuk az ECM fehérjék (fibronektin és kollagén) és ECM receptor (integrinek) kifejeződését és a külsőleg adott ECM molekulák hatását a keratinociták növekedésére és migrációjára. Azt találtuk, hogy a megnövekedett kollagén és lecsökkent integrin termelést tekintve az immortalizált, tumort nem kialakító SVpgC2a sejtvonal jobban különbözött a normál sejtektől, mint a malignus SqCC/Y1 sejtek. A szájüregi laphám-rák kialakulása jelentős változásokkal járhat a sejtek integrin és ECM molekula termelésében. A jól differenciálódott szájüregi laphám-rákból származó SqCC/Y1 sejtek kollagén kifejeződése a csökkent COL7A1 és COL17A1 és a megnövekedett COL6A1 kivételével, a NOK sejtekéhez hasonló mintázatot adott. Laphám-rák kialakulhat a jellemzően a COL7A1 és COL17A1 kollagének elvesztésével járó, öröklött epidermolízis bulloza betegség komplikációjaként. A COL7A1 elvesztését, mint az invazivitás jele, szintén gyakran leírták a jól differenciálódott laphám-rák sejtekben. Ezzel összhangban, SqCC/Y1 sejtek képesek invazívan növekedni organotipikus tenyészetben. Minőségi szempontból a NOK sejtek integrin mintázata hasonló volt az eddigi *in vitro* és *in vivo* szájüregi hámsejteken végzett tanulmányokéban találtakhoz. A gyengén differenciálódott laphám-rákokban gyakran megváltozik az integrin kifejeződés mintázata. Ennek megfelelően, az SqCC/Y1 sejtek integrin mintázata a normál sejtekéhez volt hasonlatos. Az SVpgC2a sejtekben nem, illetve rendkívül lecsökkent integrin és számos kollagén lánc fokozott kifejeződését találtuk. Az SVpgC2a sejtekben az $\alpha\beta 1$ integrin RNS-ének NOK és SqCC/Y1 sejtekhez viszonyított alacsony szintje hasonló volt a pre-malignus íny-keratinocitákban találhatóéhoz. Ezek a változások hozzájárulhatnak az SVpgC2a sejtek gyengén differenciálódott bazaloid fenotípusához, a belőlük regenerált hámban a sejtek között megfigyelt

gyenge kohézióhoz és a sejteknek a tenyészedényhez való gyenge tapadásához. A normál és transzformált sejteken végzett kísérletes irodalmi adatoknak megfelelően mindhárom sejttypusban nagy mennyiségben előforduló fibronektint találtunk.

A keratinociták proliferációja és migrációja gyakran egymáshoz kapcsolt de előfordulhat elkülönülten is. Előző munkáink kimutatták, hogy a tenyészedény FN-COL borítása a tenyésztés kezdetén megnöveli a NOK tenyészetekben a sejthozamot. A sejtszám emelkedés megnövekedett CFE-vel és sejtmigrációval járt együtt. A fokozott migráció a sejtvonalakban is kimutatható volt FN-COL borítás jelenlétében de sejtszám növekedés fokozódás nélkül. Az FN-COL kezdő NOK tenyészetekre gyakorolt serkentő hatása abból eredhet, hogy az ECM fehérjék elősegítik a letapadást, migrációt és gátolják a szuszpenzió indukált terminális differenciálódást. Ezzel szemben az ECM molekulák és receptoraik aktív szintézise a mesterséges FN-COL borítástól függetlenné teheti a sejtek tenyésztését. Az, hogy az FN-COL mindhárom sejttypusban az eltérő integrin mintázatuk ellenére fokozott migrációt váltott ki azt az elképzelést támasztja alá, amely szerint a különböző integrin alegységek az adott élettani hatás tekintetében képesek együttműködni és egymást helyettesíteni. Az eredményeink azt mutatják, hogy a vizsgált sejttypusokban a növekedés és migráció elkülönülten is előfordulhat és, hogy rutin sejttenyésztés során a standardizált protokoll leegyszerűsíthető a szabványos, nem FN-COL borított sejttenyésztő edények használatával.

Összefoglalva, microarray analízissel és növekedési kísérletekkel vizsgáltuk a fibronektin, kollagén láncok és integrin receptorok kifejeződését és hatását egy három lépcsős, előrehaladó daganat modellben. A kapott transzkripciós profilok tükrözik a szájuégri tumor kialakulás során az ECM és sejt között lezajló összetett változásokat, beleértve az immortalizált, nem malignus SVpgC2a sejtekben tapasztalt integrin szintézisétől kollagén szintézis irányába való eltolódást. Eszerint az

integrinek elvesztése társítható a differenciálódás malignitás nélküli elvesztésével. A vizsgált sejtek, jóllehet különböző növekedési jellegzetességekkel és gén kifejeződési mintázattal, de migráció kivételével hasonlóan viselkedtek FN-COL-t tartalmazó ECM jelenlétében, illetve hiányában, azt sugallva, hogy a keratinociták tenyésztése az FN-COL elhagyásával egyszerűsíthető. Ezen felül, amint az bemutatásra került, szigorúan meghatározott feltételek között több sejttípussal megvalósítható a daganat kialakulás különböző fázisainak az *in vitro* modellezése.

Összefoglalás

Jelen tanulmányban NOK, SVpgC2a és SqCC/Y1 sejtek szérummentes tenyészeit használtuk, hogy vizsgáljuk az ECM fehérjék (fibronektin és kollagén) és ECM receptor (integrinek) kifejeződését és a külsőleg adott ECM molekulák hatását a keratinociták növekedésére és migrációjára.

Eredményeink azt mutatják, hogy a megnövekedett kollagén és lecsökkent integrin termelést tekintve az immortalizált, tumort nem kialakító SVpgC2a sejtvonal jobban különbözött a normál sejtektől, mint a malignus SqCC/Y1 sejtek. Azt is találtuk, hogy az SVpgC2a sejtek rendelkeztek a legnagyobb CFE értékkel és növekedési sebességgel. Az ECM molekulák jelenléte vagy hiánya egyik sejttípus növekedését illetve a CFE értékét sem befolyásolta. Ugyanakkor, a tény hogy az FN-COL mindhárom sejttípusban az eltérő integrin mintázatuk ellenére fokozott migrációt váltott ki azt sugallva, hogy a különböző integrin alegységek az adott élet-tani hatás tekintetében képesek együttműködni és egymást helyettesíteni.

Mivel a vizsgált sejtek növekedését nem befolyásolta az FN-COL-t tartalmazó ECM jelenléte, illetve hiánya, ezért a keratinociták tenyésztése az FN-COL borítás elhagyásával a jövőben egyszerűsíthető. Ezen felül, amint az bemutatásra került, szigorúan meghatározott feltételek között több sejttípussal megvalósítható a daganat kialakulás különböző fázisainak az *in vitro* modellezése.

A tézisek alapjául szolgáló in extenso közlemények:

1. Szondy Z*, **Sarang Z***, Molnar P, Nemeth T, Piacentini M, Mastroberardino PG, Falasca L, Aeschlimann D, Kovacs J, Kiss I, Szegezdi E, Lakos G, Rajnavolgyi E, Birckbichler PJ, Melino G, Fesus L (2003) Transglutaminase 2^{-/-} mice reveal a phagocytosis-associated crosstalk between macrophages and apoptotic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 100(13):7812-7 IF: 10,7

*: ezen szerzők egyenlően vettek részt a munkában

2. **Sarang Z**, Molnar P, Nemeth T, Gomba S, Kardon T, Melino G, Cotecchia, Fesus L, Szondy Z Tissue transglutaminase (TG2) acting as G protein protects hepatocytes against Fas-mediated cell death

Átdolgozás alatt (Hepatology)

IF: 9,503

3. **Sarang Z**, Haig Y, Hansson A, Vondracek M, Warngard L, Grafstrom RC (2003) Microarray assessment of fibronectin, collagen and integrin expression and role of fibronectin/collagen-coating for groVTh of normal, SV40 T antigen-immortalized and malignant human oral keratinocytes. *Alternatives to Laboratory Animals* (31):575-585 IF: 2,022

Egyéb in extenso közlemények:

1. Hedberg JJ, Grafstrom RC, Vondracek M, **Sarang Z**, Warngard L, Hoog JO (2001) Micro-array chip analysis of carbonyl-metabolising enzymes in normal, immortalised and malignant human oral keratinocytes. *Cellular and Molecular Life Sciences* 58(11):1719-26 IF: 4,539

2. Dressler D*, **Sarang Z***, Szondy Z, Engelhart K, Grafstrom RC (2002) Expression of retinoid-related genes in serum-free cultures of normal, immortalized and malignant human oral keratinocytes. *International Journal of Oncology* 20(5):897-903 IF: 2,931

*: ezen szerzők egyenlően vettek részt a munkában

3. Vondracek M, Weaver DA, **Sarang Z**, Hedberg JJ, Willey JC, Warngard L, Grafstrom RC (2002) Transcript profiling of enzymes involved in detoxification of xenobiotics and reactive oxygen in human normal and simian virus 40 T antigen-immortalized oral keratinocytes. *International Journal of Cancer* 99(6):776-82 IF: 4,056

4. Hansson A, Bloor BK, **Sarang Z**, Haig Y, Morgan PR, Stark HJ, Fusenig NE, Ekstrand J, Grafstrom RC (2003) Analysis of proliferation, apoptosis and keratin expression in cultured normal and immortalized human buccal keratinocytes. *European Journal of Oral Sciences* 111(1):34-41 IF: 1,218

Megjelent közlemények összes impakt faktor: 25,466

Fontosabb konferenciák

Studies of toxicity, gene expression and transformation-potential of formaldehyde in cultured normal and immortalized human oral keratinocytes

Zs. Sarang, J. A. Nilsson, J. Hedberg and RC. Grafström

43. International Meeting of the European Tissue Culture Society, Granada, Spanyolország, 2001 (poszter prezentáció)

Influences of retinoic acid and related derivatives on proliferation, apoptosis and differentiation of cultured human oral keratinocyte lines

Zs. Sarang, Zs. Szondy and R. C. Grafström

44. International Meeting of the European Tissue Culture Society, Oxford, Anglia, 2002 (előadás)

Retinoid-kapcsolt gének expressziója normál, immortalizált és malignus keratinociták szérummentes sejtenyészeiben

Sarang Zsolt, Dirk Dressler, Roland Grafström és Szondy Zsuzsa

A Magyar Biokémia Társaság éves konferenciája, Tihany, Magyarország, 2003 (poszter prezentáció)

Influences of retinoic acid and related derivatives on proliferation, apoptosis and differentiation of cultured human oral keratinocyte lines

Z. Sarang, Z. Szondy and RC. Grafström

11. Euroconference on Apoptosis, Ghent, Belgium 2003 (poszter prezentáció)

A szöveti transzglutamináz védelmet nyújt a májsejteknek a Fas receptor közvetítette sejthalállal szemben

Sarang Zsolt, Molnár Péter, Németh Tamás, Gomba Szabolcs, Kardon Tamás, Gerry Melino, Susanna Cotecchia, Fésüs László és Szondy Zsuzsa

A Magyar Biokémia Társaság éves konferenciája, Sopron, Magyarország, 2004 (poszter prezentáció)

Tissue transglutaminase protects hepatocytes against Fas-mediated cell death

Zsolt Sarang, Péter Molnár, Tamás Németh, Szabolcs Gomba, Tamás Kardon, Gerry Melino, Susanna Cotecchia, László Fésüs and Zsuzsa Szondy

12. Euroconference on Apoptosis, Chania, Görögország 2004 (poszter prezentáció)