

A transzformáló növekedési faktor béta fehérjék a központi idegrendszerben

Doktori értekezés

dr. Vincze Csilla

Semmelweis Egyetem
Szentágotthai János Idegtudományi Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Dobolyi Árpád tudományos főmunkatárs, Ph.D.

Hivatalos bírálók: Dr. Kittel Ágnes tudományos tanácsadó, az MTA doktora
Dr. Vastagh Ildikó egyetemi adjunktus, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Molnár Mária Judit egyetemi tanár, az MTA doktora

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Fejér Zsolt egyetemi adjunktus, Ph.D.
Dr. Pánczél Gyula, osztályvezető főorvos, Ph.D.

Budapest
2014

TARTALOMJEGYZÉK

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	4
2. BEVEZETÉS	7
2.1. <i>A TGF-β fehérjék biokémiája</i>	9
2.1.1. <i>A TGF-β fehérjék szintézise és szekréciója</i>	9
2.1.2. <i>A látens TGF-β kötő fehérjék (LTBP-k) és az aktiváció</i>	11
2.1.3. <i>A TGF-β receptorai és a szignáltranszdukciós útvonal</i>	13
2.2. <i>A TGF-β fehérjék, receptoraik, valamint a látens TGF-β kötő fehérjék eloszlása a központi idegrendszerben</i>	14
2.3. <i>A TGF-β-k fiziológiai szerepe a központi idegrendszerben</i>	15
2.3.1. <i>A TGF-β-k szerepe a neuronok fejlődésében és differenciálódásában...</i>	15
2.3.2. <i>A TGF-β-k a szinaptikus neurotranszmisszióban és a szinaptikus plaszticitásban</i>	18
2.3.3. <i>A TGF-β szerepe a neuroendokrin funkciókban</i>	18
2.4. <i>A TGF-β-k patofiziológiai szerepe a központi idegrendszerben</i>	19
2.4.1. <i>A TGF-β-k szerepe agyi iszkémia során</i>	19
2.4.2. <i>A TGF-β szerepe a gliaheg képződésében</i>	22
2.4.3. <i>A TGF-β-k szerepe az agytumorokban</i>	23
2.4.4. <i>A TGF-β neuroprotektív hatása egyéb neurológiai betegségekben</i>	24
3. CÉLKITŰZÉSEK	26
4. MÓDSZEREK	27
4.1. <i>A kísérleti állatok</i>	27
4.2. <i>Az artéria cerebri media okklúziós modell (MCAO)</i>	27
4.3. <i>A 2,3,5-triphenyltetrazolium chlorid (TTC) festés</i>	29
4.4. <i>A hibridizációs próba készítése</i>	29
4.4.1. <i>Az mRNS izolálása</i>	29
4.4.2. <i>A cDNS előállítás reverz transzkripcióval</i>	30
4.4.3. <i>A TGF-β-altípusokra specifikus DNS próbák előállítása PCR-ral</i>	30
4.4.4. <i>A DNS próbák felszaporítása klónozó vektorokkal</i>	31
4.5. <i>A radioaktív in situ hibridizáció</i>	32
4.5.1. <i>A metszetek készítése és előkezelése</i>	32
4.5.2. <i>A próba radioaktív jelölése</i>	32
4.5.3. <i>A hibridizáció</i>	33
4.6. <i>Mikroszkópia és fényképezés</i>	34
5. EREDMÉNYEK	35
5.1. <i>Az in situ hibridizációs próbák előállítása</i>	35
5.2. <i>A TGF-β expressziójának topográfiai eloszlása intakt patkány agyban</i>	36
5.3. <i>A TGF-β fehérjék mRNS eloszlásának változása MCAO esetén</i>	49
5.3.1. <i>Tranziens MCAO után 3 órával</i>	49
5.3.2. <i>Tranziens MCAO után 24 órával</i>	51
5.3.3. <i>Permanens 24 órás MCAO után</i>	53
5.3.4. <i>Tranziens MCAO után 72 órával</i>	55
5.3.5. <i>Tranziens MCAO után 1 hónappal</i>	57
6. MEGBESZÉLÉS	59
6.1. <i>A TGF-β1, -β2 és -β3 mRNS expressziójának összehasonlítása a TGF-β immunreaktivitással intakt patkány agyban</i>	59
6.2. <i>A TGF-β1, -β2 és -β3 mRNS expressziójának eloszlása a LTBP-hez viszonyítva</i>	63
6.3. <i>Az egyes TGF-β fehérjék mRNS expressziójának idő- és térbeli változása fokális agyi ischémiát követően</i>	66
6.4. <i>A TGF-β-k mRNS indukciójának lehetséges mechanizmusai</i>	67

6.5. <i>A TGF-β-k eloszlása alapján feltételezhető funkcióik</i>	67
7. KÖVETKEZTETÉSEK	69
8. ÖSSZEFOGLALÁS	70
9. SUMMARY	71
10. IRODALOMJEGYZÉK	72
11. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE	88
<i>11.1. Az értekezés alapjául szolgáló saját közlemények</i>	88
<i>11.2. A disszertációhoz nem kapcsolódó tudományos cikkek</i>	88
12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	89

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

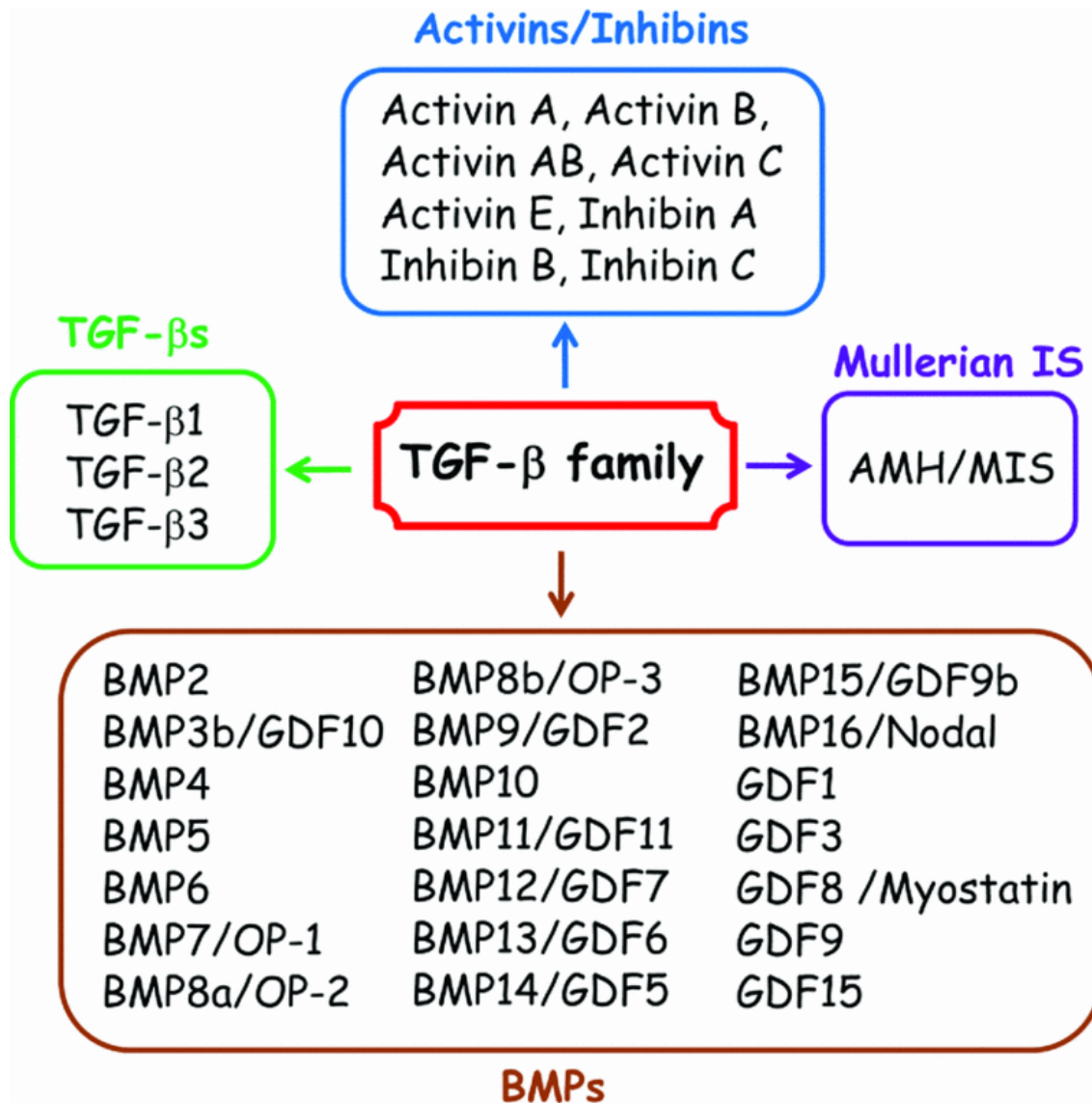
Rövidítés	Angol elnevezés	Latin elnevezés
Ac	anterior commissure	commissura anterior
AD	anterodorsal thalamic nucleus	nucleus anterodorsalis thalami
Amb	ambiguus nucleus	nucleus ambiguus
AP	area postrema	
Aq	cerebral aqueduct	aqueductus cerebri
Arc	arcuate nucleus	nucleus arcuatus
ATF-3	activating transcribing factor--3	
BA	basal amygdaloid nuclei	corpus amygdaloideum, pars basalis
BLA	basolateral amygdaloid nucleus	corpus amygdaloideum, pars basolateralis
BNST	bed nucleus of the stria terminalis	nucleus interstitialis striae terminalis
CA	central amygdaloid nucleus	nucleus amygdaloideum, pars centralis
CA1, 2, 3	CA1, 2, 3 area of the hippocampus	
Cb	Cerebellum	cerebellum
Cc	corpus callosum	corpus callosum
CC	central canal	canalis centralis
Chp	choroid plexus	plexus choroideus
CL	central lateral thalamic nucleus	nucleus centralis lateralis thalami
CM	central median thalamic nucleus	nucleus centralis medialis thalami
CN	cochlear nuclei	nuclei cochleares
CP	caudate putamen	nucleus caudatus, putamen
Cx	cerebral cortex	cortex cerebri
DB	diagonal band of Broca	Broca area
DG	dentate gyrus	gyrus dentatus
DR	dorsal raphe nucleus	nucleus dorsalis raphe
Fr	fasciculus retroflexus	fasciculus retroflexus
Hipp	Hippocampus	hippocampus
Ic	internal capsule	capsula interna
Gi	gigantocellular reticular nucleus	nucleus reticularis, pars gigantocellularis
IAM	interanteromedial thalamic nucleus	nucleus interanteromedial thalami
IC	inferior colliculus	colliculus inferior
IO	inferior olive	oliva inferior
IRt	intermedial reticular nucleus	nucleus intermedialis reticularis
LA	lateral amygdaloid nucleus	nucleus amygdaloideum, pars lateralis
LC	locus coeruleus	locus coeruleus
LS	lateral septal nucleus	nucleus septalis, pars lateralis
MCAO	middle cerebral artery occlusion	

Me5	mesencephalic trigeminal nucleus	nucleus mesencephali nervi trigemini
MGB	medial geniculate body	corpus geniculatum mediale
ML	medial mamillary nucleus, lateral part	nucleus mamillarius medialis, pars lateralis
MM	medial mamillary nucleus, medial part	nucleus mamillarius medialis, pars medialis
MnR	median raphe nucleus	nucleus medianus raphe
MPN	medial preoptic nucleus	nucleus preopticus medialis
MRe	intramamillary recess of the third ventricle	recessus intramamillaris
MS	medial septal nucleus	nucleus septalis, pars medialis
M5	motor trigeminal nucleus	nucleus motorius nervi trigemini
Och	optic chiasm	chiasma opticum
Ot	optic tract	tractus opticus
PAG	periaqueductal gray	substantia grisea centralis
PBM	medial parabrachial nucleus	nucleus parabrachialis medialis
Pc	posterior commissure	commissura posterior
PC	paracentral thalamic nucleus	nucleus paracentralis thalami
PDTg	posterodorsal tegmental nucleus	nucleus tegmentalis, pars posterodorsalis
PCR	polymerase chain reaction	
PF	parafascicular thalamic nucleus	nucleus parafascicularis thalami
Pn	pontine nuclei	nuclei pontis
PnO	pontine reticular nucleus, oral part	nucleus reticularis pontis oralis
PVN	paraventricular hypothalamic nucleus	nucleus paraventricularis hypothalami
PVT	paraventricular thalamic nucleus	nucleus paraventricularis thalami
Py	pyramidal tract	tractus corticospinalis
Re	reuniens thalamic nucleus	nucleus reuniens thalami
RN	red nucleus	nucleus ruber
Rt	reticular thalamic nucleus	nucleus reticularis thalami
RtTg	reticulotegmental nucleus	nucleus reticulotegmentalis
SC	superior colliculus	colliculus superior
Scp	superior cerebellar peduncle	pedunculus cerebellaris superior
Sm	stria medullaris	stria medullaris
SN	substantia nigra	substantia nigra
SO	superior olive	oliva superior
Sol	nucleus of the solitary tract	nucleus tractus solitarii
Sp5	spinal trigeminal nucleus	nucleus spinalis nervi trigemini
s5	sensory root of the trigeminal nerve	radix sensorius nervi trigemini
SuM	supramamillary nucleus	nucleus supramamillarius
SuMM	supramamillary nucleus, medial subdivision	
II.	2 nd layer of the cerebral cortex	

V.	5 th layer of the cerebral cortex	
VI.	6 th layer of the cerebral cortex	
TGF- β	transforming growth factor beta	
VS	ventral subiculum	
3N	oculomotor nucleus	nucleus nervi oculomotorii
3V	third ventricle	ventriculus tertius
7N	facial nucleus	nucleus motorius nervi facialis
10N	dorsal motor nucleus of the vagal nerve	nucleus dorsalis nervi vagi
12N	hypoglossal nucleus	nucleus nervi hypoglossi

2. BEVEZETÉS

A növekedési faktorok olyan polipeptidek, amelyek az emlős sejtek proliferációját már kis koncentrációban szabályozni képesek. Az 1980-as években egy ilyen nagy, szekretált szignál molekula családot fedeztek fel (Roberts és mtsai 1980; Kingsley 1994): elsőként Roberts és munkatársai izoláltak egér tumorsejtekből sav/etanol kivonással olyan polipeptideket, melyek normál patkány vese fibroblasztsejtek fenotípusát megváltoztatták, így azok agar tenyészetben kolóniák létrehozására lettek képesek. Ezeket az intracelluláris, kis molekulású, hő- és saválló polipeptideket ezen onkogenikus, transzformáló tulajdonság alapján transzformáló növekedési faktoroknak (TGF) nevezték el (Roberts és mtsai 1980). Ezután 1981-ben Moses és munkatársai kémiaiilag transzformált sejtek tenyészetében mutattak ki transzformáló növekedési faktorokat (Moses és mtsai 1981). A tumorsejtekből és az in vitro sejtvonalakból való izolálás után egyéb, különböző fajok nem neoplasztikus szöveteiből és szerveiből is kimutatták a TGF-et: izom-, máj-, agyszövetből, a glandula submaxillárisból, szívből (Roberts és mtsai 1981). Szerkezetük alapján a transzformáló növekedési faktorokat alfa és béta csoportokra osztották. Előbbiek az epidermális növekedési faktorok családjába tartoznak, míg utóbbiak egy önálló növekedési faktor szuperfamilának lettek a tagjai, melyet az elsőként izolált transzformáló növekedési faktor $\beta 1$ után transzformáló növekedési faktor béta szuperfamilának neveztek el (Massague 1990; Burt és Law 1994). A transzformáló növekedési faktorok szuperfamilájába ma már több mint 25 gén terméke tartozik (Massague 1990). A géntermékeket emlősökben, madarakban, kétélűekben és rovarokban is kimutatták, amely a szuperfamilád ősi eredetét mutatja (Burt és Law 1994). A polipeptidek karboxi végéhez eső aminosav párok szekvenciája alapján a szuperfamiládon belül több főbb csoportot különböztetünk meg: a transzformáló növekedési faktor β családot, a csont morfogénikus proteinek (bone morphogenic protein, BMP), az aktivinek és inhibinek családját, az anti-Müller hormont, a növekedési-differenciálódási hormont (growth differentiation factor, GDF) a Drosophilában jelen levő decapentaplegikus proteinek, valamint a Xenopusban a vegetal-1 proteinek (Massague 1990; Burt és Law 1994; Kingsley 1994; Bottner és mtsai 2000) (1.ábra).



1. ábra

A transzformáló növekedési faktor béta (TGF- β) szupercsalád tagjainak bemutatása (Santibañez és mtsai 2011).

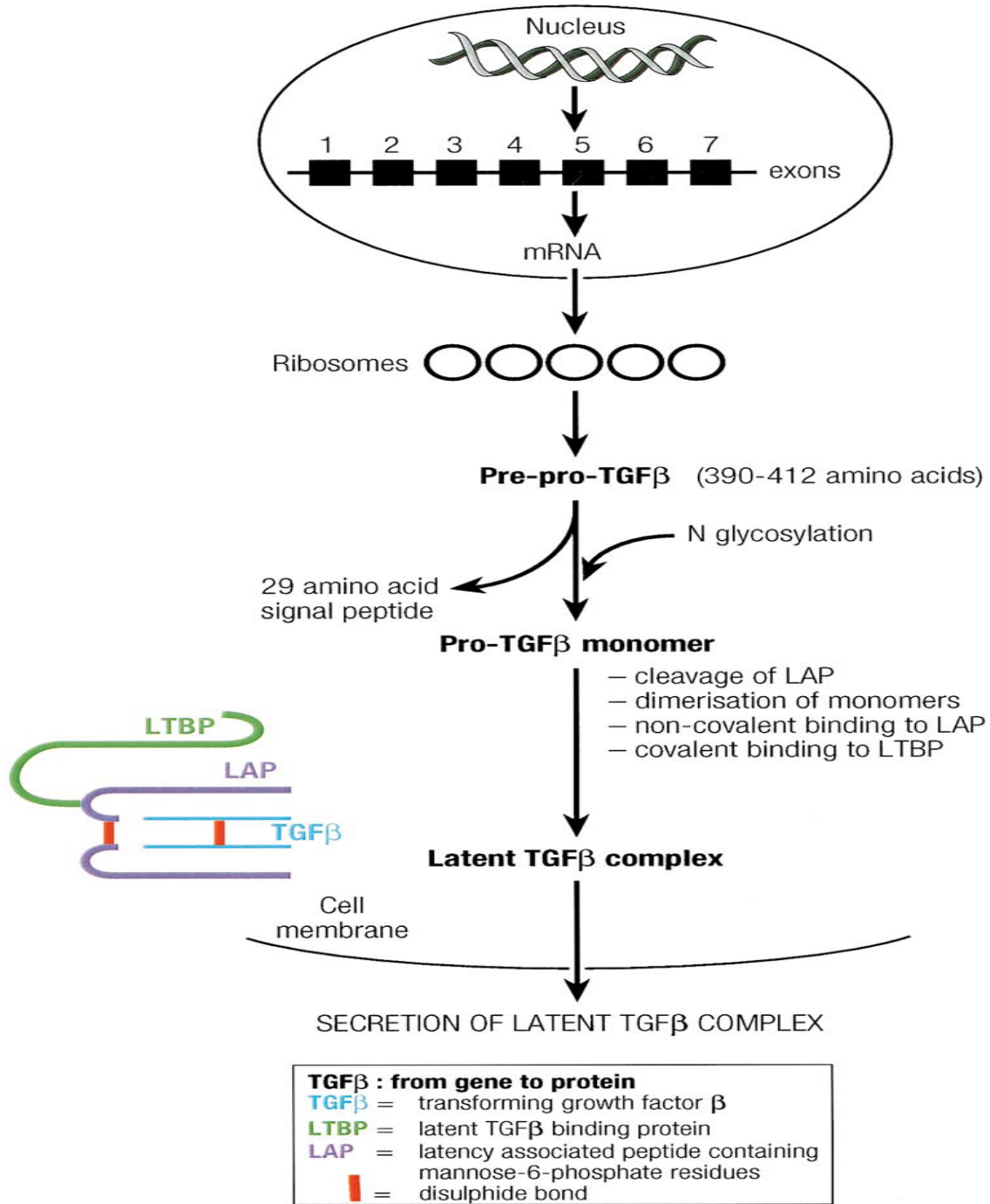
Ez az osztályozás törzsfejlődési és funkcióbeli kapcsolatot feltételez a proteinek között (Burt és Law 1994). A három emlős TGF- β fehérjét (TGF- β 1,- β 2,- β 3) különböző kromoszómákon elhelyezkedő három elkülönülő gén kódolja (Lawrence 1996). A TGF- β fehérjék a sejtek proliferációját, differenciálódását és túlélését szabályozzák, valamint a sejtek migrációját is befolyásolják (Moses és mtsai 1990). A TGF- β -k periférián kifejtett

hatásai már az 1980-as évek második felében ismertté váltak: részt vesznek a hemopoezisben (Ishibashi és mtsai 1987), az angiogenezisben (Roberts és mtsai 1986), kemotaxisban (Postlethwaite és mtsai 1987), valamint különböző immunológiai folyamatokban (Palladino és mtsai 1990). Immunológiai hatásai miatt a TGF- β -k citokineknek is tekinthetők (Kiefer és mtsai 1995). A TGF- β -k központi idegrendszerben kifejtett hatásai viszont csak az 1990-es években váltak ismertté (Flanders és mtsai 1991; Finch és mtsai 1993; Krieglstein és mtsai 1995). Ezek a 2.3 és 2.4 fejezetben kerülnek ismertetésre.

2.1. A TGF- β fehérjék biokémiája

2.1.1. A TGF- β fehérjék szintézise és szekréciója

A TGF- β -k különböző gének termékeként, nagy, 390-412 aminosav nagyságú prekursor proteinekként szintetizálódnak, majd intracelluláris módosítások után inaktív, ún. látens formában szekretálódnak (Gentry és Nash 1990; ten Dijke és mtsai 1990; Schlunegger és Grutter 1992; Khalil 1999; Bottner és mtsai 2000) (2.ábra). A prekursor proteint a Golgi apparátusban egy furin típusú proteáz hasítja, az "érett" TGF- β -t tartalmazó C-terminális vég azonban nem kovalens kötéssel továbbra is kapcsolatban marad az N-terminális propeptiddel, melyet LAP-nek (latency associated protein) neveznek (Kingsley 1994; Gleizes és mtsai 1997; Clark és Coker 1998). Ezek a monomerek diszulfid kötésekkel dimerizálódnak és így létrehozzák az ún. kis látens komplexet (Clark és Coker 1998). Az LAP jelenléte segíti elő a TGF- β sejtből való transzportját és inaktív állapotban tartja a TGF- β -t (Khalil 1999). A kis látens komplexben 3 db aszparagin is N-glikozilált, érdekes módon kettő közülük mannóz 6-foszfátot tartalmaz (Purchio és mtsai 1988). A mannóz 6-foszfát nagyon ritkán található extracelluláris fehérjékben, normál esetben a mannóz-6 foszfát receptorokon keresztül a lizoszómális lebontás szignálja (Gleizes és mtsai 1997). Hogy a látens TGF- β hogyan kerül el a lizoszómális lebontást még nem teljesen tisztázott.



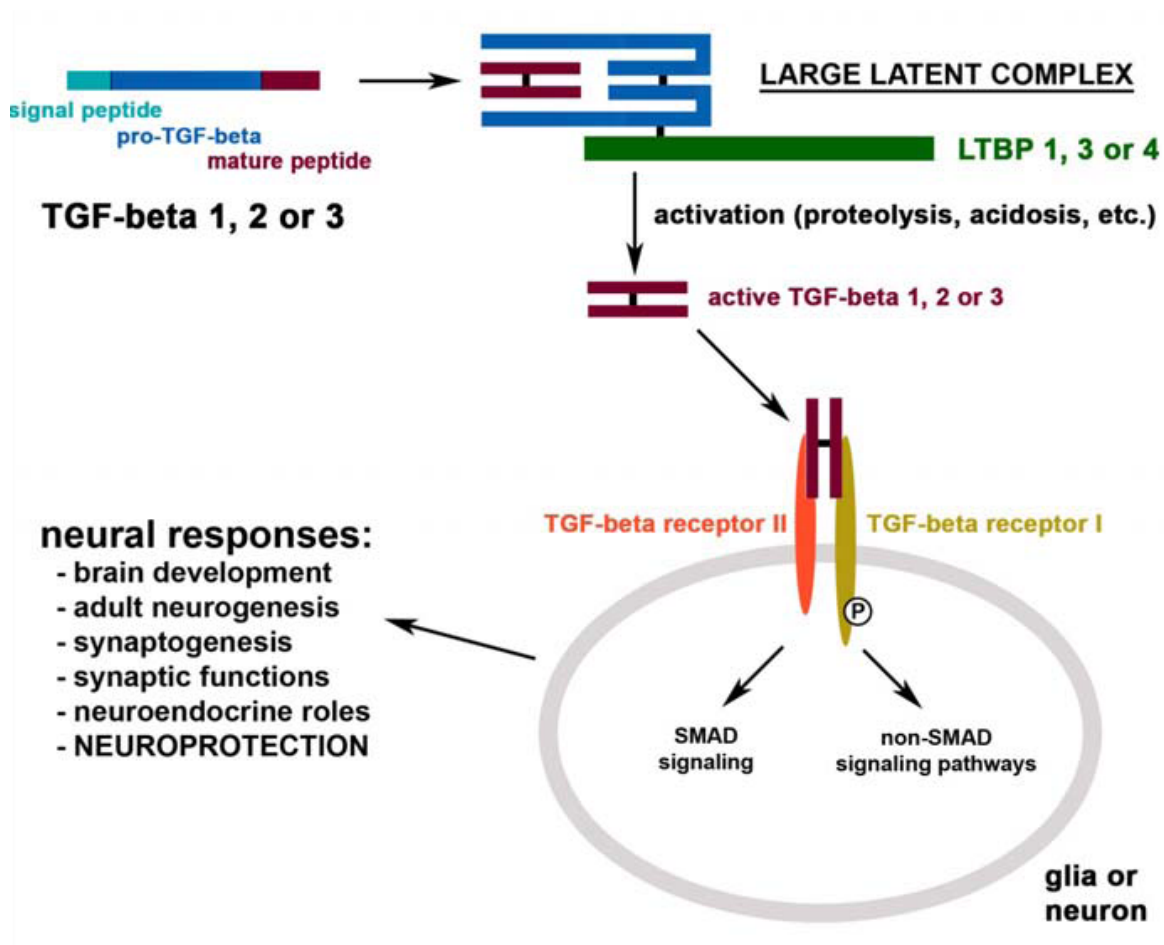
2. ábra

A TGF- β -k szintézise és szekréciója (Clark és Coker 1998).

A kis látens komplexhez továbbá kovalensen kapcsolódnak a 120-240 kDa nagyságú, látens TGF- β kötő proteinek (latent TGF- β binding protein, LTBP), létrehozva az ún. TGF- β nagy látens komplexet (Koli és mtsai 2001). A TGF- β fehérjék ebben a formában, inaktív állapotban vannak jelen az extracelluláris térben vagy tárolódnak a szinaptikus vezikulákban (Saharinen és mtsai 1999; Koli és mtsai 2001; Sasaki és mtsai 2001). A szekréciót kromaffin neuron sejt modellben vizsgálták: a kolinerg stimuláció a tároló vezikulák kiürüléséhez vezetett (Krieglstein és Unsicker 1995). A kiürült vezikulák csak TGF- β -t tartalmaztak, a TGF- β szupercsalád egyéb tagját azonban nem, amely azt mutatta, hogy a TGF- β -k a kromaffin granulátumokban tárolódnak és exocitózissal ürülnek, míg egyéb hasonló növekedési faktorokra ez nem volt jellemző (Krieglstein és Unsicker 1995). Továbbá, egér hippokampusz primer sejt kultúrában különböző kezelések megnövekedett neuronális aktivációhoz vezettek, amely az aktív TGF- β szint emelkedését okozta (Lacmann és mtsai 2007). Ezekben a kísérletekben a TGF- β -k szintjének meghatározására olyan analitikai eszközöket használtak, ami a 3 altípust megkülönböztetését nem tette lehetővé, így csak valószínűsíthető, hogy a TGF- β 1, β 2, és β 3 egyaránt fel tud neuronokból szabadulni megfelelő ingerlésre.

2.1.2. *A látens TGF- β kötő fehérjék (LTBP-k) és az aktiváció*

Az LTBP-k az extracelluláris mátrixproteinek családjába tartozó, fibillin típusú, nagy, multidomén fehérjék (Annes és mtsai 2003). Szerkezetükre jellemző, hogy 17 epidermális növekedési faktor-szerű doménnel, valamint 8 ciszteint tartalmazó modullal rendelkeznek (Rifkin 2005). Az LTBP-k a TGF- β -k szekréciójához és a megfelelő térbeli szerkezet felvételéhez szükségesek (Sinha és mtsai 1998; Todorovic és mtsai 2005). A 4 különböző emlős LTBP-t (LTPB1, 2, 3, 4 valamint ezek különböző splice variánsait) eltérő gének kódolják (Mangasser-Stephan és Gressner 1999; Oklu és Hesketh 2000). Az egyes LTBP-k feltételezett szelektív kötődése az egyes TGF- β fehérjékhez még nem teljesen feltérképezett. In vitro kísérletek arra utalnak, hogy az LTBP1 és LTBP4 mindhárom TGF- β -hoz képes kötődni, míg az LTBP3 csak a TGF- β 1-et köti, azonban az LTBP2 egyáltalán nem köt TGF- β -t (Saharinen és Keski-Oja 2000). A TGF- β aktiválása a TGF- β nagy látens komplexből való kilépésével szabályozódik (3. ábra)



3. ábra

Összefoglaló ábra a TGF- β -k aktivációjáról és hatásairól a központi idegrendszerben (Dobolyi és mtsai 2012)

A leginkább tanulmányozott aktivációs modell az endotél sejt-simaizomsejt kokultúra (Antonelli-Orlidge és mtsai 1989; Sato és Rifkin 1989): ezek a sejtek egyenként konstitutíven termelnek nagy látens TGF- β -t, de a médiumukban aktív TGF- β nem volt található, viszont kokultúrában gyorsan aktív TGF- β jelenik meg. Ezek a kísérletek az aktivációban a plazmin szerepét hangsúlyozzák. A TGF- β aktiváció további módja, ha a nagy látens komplex konformációs változáson megy keresztül, mely felfedi a TGF- β receptorkötő helyét: ennek során az LTBP egy proteolitikus hasítás eredményeként csonkolódik, ennek eredményeként az LAP-n új receptor kötő helyek szabadulhatnak fel

(Gleizes és mtsai 1997). Az extracelluláris TGF- β -nak több aktivátora ismert: különböző proteázok, a thrombospondin-1, integrinek, reaktív oxigéngyökök, és a pH csökkenése (Gumienny és Padgett 2002; Annes és mtsai 2003).

2.1.3. *A TGF- β receptorai és a szignáltranszdukciós útvonal*

A szerkezeti és a funkcionális tulajdonságok alapján az I-es, II-es és III-as típusú TGF- β receptorokat különíthetők el (Massague 1992). A III-as típusú receptor nagy affinitással képes a TGF- β fehérjék megkötésére, de mivel extracellulárisan helyezkedik el, emiatt a ligand kötése nem aktiválja a szignáltranszdukciós útvonalat, a TGF- β funkciókban negatív szabályzó szerepet játszhat (Chu és mtsai 2011). A TGF- β receptorok olyan transzmembrán proteinek, amelyek a plazmamembrán citoplazmatikus oldalán szerin/treonin kináz doménnel rendelkeznek (Massague 1998). A legtöbb sejtben a TGF- β szignáltranszdukció a TGF- β I típusú/Alk5 (activin-like kinase receptor 5) receptoron valósul meg, de ezen kívül endotheliális sejtekben és neuronokban egy másik I típusú TGF- β receptoron, az Alk1-n keresztül is indulhat a jelátvitel (Konig és mtsai 2005). A szabad TGF- β hetero- vagy homodimer bekötése indukálja a receptorok komplexekké történő összeszerelését. A receptor komplex valószínűleg egy 2 db I-es és 2 db II-es típusú receptort tartalmazó heterotetramer. Az aktivációt követően a II-es típusú receptorok foszforilálják a I-es típusú receptorokat (Dennler és mtsai 2002). Ez a foszforilációs lépés a legfontosabb a TGF- β mediált szignál megindításához (ten Dijke és Hill 2004). Az aktivált I-es típusú receptor kináz továbbítja a szignált a sejtben belülről a receptor- szabályozott Smad fehérjék (R-Smad-fehérjék: Smad1, Smad2, Smad3, Smad5 and Smad8) foszforilációjával (Miyazono és mtsai 2000). Az R-Smad fehérje I-es típusú receptorhoz való kötődését egyéb fehérjék segítik elő, mint például a Smad horgonyzó fehérje, mely a receptor aktivációhoz szükséges (Zhu és Burgess 2001). Az aktivált R-Smad heteromér komplexet alkotnak a Smad4 fehérjével. Ezek a komplexek a sejtben akkumulálódnak, ahol sejttípus és a ligand mennyiségétől függően befolyásolják a génexpressziót. A gátló Smad fehérjék (I-Smad fehérjék: Smad6 és Smad7) az R-Smad fehérjékkel szemben a szignáltranszdukciós útvonalra nézve antagonisták hatásúak (Padgett és mtsai 1998; Schmierer és Hill 2007). A TGF- β szignáltranszdukció az újabb eredmények szerint

nemcsak a kanonikus Smad szignál útvonalon keresztül valósulhat meg, hanem a p38, a Jun N-terminális kináz (JNK) és a mitogén aktivált protein kináz (MAPK) által mediált útvonalon is, de leírták ezen kívül a foszfoinozítid 3-kináz-Akt-mTOR, a kis GTP-áz Rho, Rac, Cdc42 és a Ras-Erk-MAPK útvonalat is (Mu és mtsai 2011).

2.2. A TGF- β fehérjék, receptoraik, valamint a látens TGF- β kötő fehérjék eloszlása a központi idegrendszerben

A TGF- β -k eloszlását a központi idegrendszerben fehérje szinten, immunhisztokémiai módszerekkel már tanulmányozták (Unsicker és mtsai 1991). A TGF- β 1 immunreaktivitást csak a meningeális sejtekben és a plexus choroideus epitheliális sejtjeiben írtak le (Unsicker és mtsai 1991; Komuta és mtsai 2009). A TGF- β 2 és- β 3 immunpozitív sejteket a II, III és V kortikális rétegben, a hippocampusban, a hypothalamusban és az amigdalában, az agytörzsi monoaminerg neuronokban és motoros agyidegmagvakban írtak le (Unsicker és mtsai 1991). Ezzel szemben a striatum, a legtöbb thalamikus mag, a colliculus superior nem mutatott TGF- β 2 és- β 3 immunreaktivitást. Az immunhisztokémiai tanulmányokban a TGF- β 2 és- β 3 immunreaktivitása nagyrészt átfedett és általánosságban kijelenthető, hogy főleg a nagy multipoláris neuronokban jelentkezett (Unsicker és mtsai), valamint, hogy a TGF- β 2 mennyisége nagyobb volt (Bottner és mtsai 2000). Azt, hogy mely sejtek expresszálnak TGF- β -t, főleg indukciós modelleken vizsgálták. Különböző lézióknál és egyéb patológiás körülmények között a TGF- β 1 mennyiségének növekedését találták astrocytáknál és mikrogliaiban (Krohn 1999; Wu és mtsai 2007; Wu és mtsai 2008), mely a sejtek fenotípusának megváltozásához, ún. reaktív fenotípus megjelenéséhez vezetett (Morgan és mtsai 1993; Flanders és mtsai 1998). Normál körülmények között a preoptikus area astrocytái is termelnek TGF- β 1-et (Dhandapani és Brann 2003; Bouret és mtsai 2004). Viszont a TGF- β 1 kifejeződik neuronokban is (Lacmann és mtsai 2007; Wu és mtsai 2007; Battaglia és mtsai 2011). A többi TGF- β sejt-specifikus expressziójára vonatkozó irodalmi adatok hiányosak, eloszlásuk dominánsan neuronális kifejeződésre utalt (Unsicker, és mtsai 1991).

A 4 LTBP altípusának mRNS expressziója altípusonként különböző eloszlást mutatott az agyban (Dobolyi és Palkovits 2008). A domináns altípus az LTPB3, de az

LTPB4 jelentősen expresszálódik az agykéreg különböző területein. Az LTPB1 jelentős mértékben expresszálódik a plexus choroideusban, a kortexben, a hippocampusban, és a laterális hypothalamusban (Dobolyi és Palkovits 2008). Néhány mag, így az oliva inferior és a nucleus arcuatus mind LTPB1-et, mind pedig LTPB4-et is tartalmaz.

A TGF- β receptorok eloszlása szisztematikusan még nem került leírásra, a rendelkezésre álló irodalom alapján széleskörű eloszlás valószínű. Patkányban különböző fejlődési stádiumokban az agy különböző részein, a kortexben, a középagyban, a kisagyban, az agytörzsben valamint a hippocampusban RT-PCR-rel mutattak ki TGF- β receptorokat (Bottner és mtsai 1996).

2.3. A TGF- β -k fiziológiai szerepe a központi idegrendszerben

2.3.1. A TGF- β -k szerepe a neuronok fejlődésében és differenciálódásában

A központi idegrendszer fejlődése során a TGF- β immunpozitivitás azokon a helyeken a legkifejezettebb, ahol a neuronális differenciálódás zajlik, míg az aktívan proliferálódó sejteknél jóval alacsonyabb immunpozitivitás jelentkezik (Flanders és mtsai 1991). A TGF- β a neuronális őssejtek proliferációját gátolja (Aigner és Bogdahn 2008). In vitro kísérletek fűj velőcső sejteken azt mutatták, hogy a TGF- β gátolja a velőcsősejtek proliferációját, viszont TGF- β jelenlétében a neurogenesis mértéke szignifikánsan megnő (Zhang és mtsai 1997). Fejlődő egér hippocampus és kortex primer sejt kultúrában a TGF- β a progenitor sejtekre antimitotikus hatású, valamint a sejteken a neuronális markerek kifejeződését serkenti (Vogel és mtsai 2010). Ezek a hatások Smad4-hez kötöttek. In vivo TGF- β 2(-/-)/TGF- β 3(-/-) dupla knock out állaton végzett funkcióvesztéses vizsgálatok az antiproliferatív és differenciációt elősegítő hatást igazolva, megnövekedett sejtproliferációt azonban a kortikális és hippocampalis neuronok számának csökkenését mutatta (Vogel és mtsai 2010), bár az interpretációt megnehezítette, hogy ezen egerek a születés környékig élnek csak. A TGF- β a felnőtt neurogenesis szabályozásában is szerepet játszhat: pro-neurogenikus hatással van az adrenalektomia által serkentett neurogenesis modellben a gyrus dentatus sejtjeire, valamint a TGF- β -t expresszáló adenovírus kezelés során a subventrikuláris zóna sejtjeire (Mathieu és mtsai 2011). Továbbá, az adrenalektomia megnövelte a gyrus dentatus TGF- β szintjét, míg TGF- β II receptor gátló antitesttel a TGF-

β biológiai aktivitását felfüggesztve a neurogenesis mértéke csökken (Battista és mtsai 2006).

Az egyedfejlődés során a TGF- β a neuronális sejt típusának differenciálódására is hatással van: a fejlődő csirke gerincvelőben a TGF- β -k Smad3-hoz kötötten segítik elő az elülső és az intermedier domén között a ventrális interneuronok differenciációját a motoneuron generáció kárára. Továbbá a velőcső formálódásánál a Smad3 expressziójának hiánya a motoneuron progenitor sejtek spinális motoneuronokká való korrekt fejlődésének előfeltétele (Garcia-Campmany és Marti 2007). A motoneuronok túlélése az izomrostokból felszabaduló, folyamatos trófikus hatású TGF- β -hoz kötött. Tisztított csirke embrió motoneuron kultúrában a TGF- β szinergisztikus hatású a motoneuronok életben tartásához szükséges fibroblaszt növekedési faktorról (Gouin és mtsai 1996). A motoneuronok csakugyan szintetizálnak és anterográd úton transzportálnak TGF- β receptorokat (Jiang és mtsai 2000). Továbbá, TGF- β 2-t mutattak ki a neuromuszkuláris junkcióban, a motoneuronokban, valamint sértett idegben, mely azt mutatja, hogy a motoneuronok különböző és potenciálisan redundáns TGF- β 2 forrásnak vannak kitéve (Jiang és mtsai 2000). Axon kettős lekötéses kísérletek igazolták azt is, hogy a motoneuronok a TGF- β 2 axonális transzportját mind antero- mind retrográd irányban képesek végezni (Jiang és mtsai 2000). A TGF- β 2 hatását in vivo motoneuronokra úgy vizsgálták, hogy patkány nucleus nervi hypoglossijába a nervus hypoglossus sértése után TGF- β 2-t injektáltak, amely a motoneuronok elhalásának csökkenését okozta (Jiang és mtsai). A TGF- β 2 viszont nem volt képes az axotómia indukálta kolin acetiltransferáz csökkenést felfüggeszteni, amely azt mutatta, hogy a TGF- β 2 az egyetlen növekedési faktor, amely a motoneuronok homeosztázisát regulálja (Jiang és mtsai 2000). A motoneuronokhoz hasonlóan, a TGF- β szükséges a közepagi dopaminerg neuronok differenciálódásához, amelyek a motoros aktivitásra, az érzelmi viselkedésre és a kognitív funkciókra is hatással vannak, valamint a Parkinson-kór patológiájában is meghatározó szereppel bírnak (Markus 2007). 12 napos patkány embrió közepagyhólyagjából nyert sejteket TGF- β -val kezelve a tirozin hidroxiláz pozitív dopaminerg sejtek száma 24 órán belül megnő, valamint a TGF- β in vitro neutralizálása viszont teljesen megszüntette a dopaminerg neuronok fejlődésének indukcióját (Farkas és mtsai 2003). Ezeket a hatásokat a TGF- β a sonic hedgehog

proteinnel együtt fejti ki (Markus 2007). Nemcsak a dopaminerg neuronok differenciálódásához szükséges TGF- β , hanem egyéb faktorokon keresztül kifejtett kölcsönhatásaikon a már kifejtett dopaminerg neuronok további túléléséhez is. Például a gliasejt eredetű neurotrófikus faktor (GDNF) sejt kultúrában a dopaminerg neuronok túlélő faktora, mely hatását a TGF- β nagymértékben elősegíti (Poulsen és mtsai 1994). A TGF- β és a GDNF receptorok kolokalizáltak a központi idegrendszerben, valamint a kromaffin sejtek szekretoros vezikuláiban a TGF- β és a GDNF együtt tárolódott és aktivitástól függően szabadult fel, mely a TGF- β /GDNF szoros szinergizmusára utal (Krieglstein és mtsai 1998). A TGF- β hatást antagonizáló antitest adása kiiktatta a GDNF neurotrófikus hatását, amely azt sugallja, hogy a TGF- β fontos szerepet játszik abban, hogy az exogén GDNF neuroprotektív szerepét kifejtse (Schober és mtsai). Viszont a GDNF meggátolta a TGF- β hatás semlegesítéséből adódó tirozin-hidroxiláz pozitív sejtek elvesztését *in vitro*, tehát valószínű, hogy a TGF- β a dopaminerg sejtek indukciójáért, a GDNF a differenciált fenotípus fenntartásáért és a szabályozásáért szükséges (Roussa és mtsai 2004). A TGF- β a neurturinnal és a persephinnel is kölcsönhatásban van, melyek képesek a dopaminerg neuronok tranziens indukcióját kiváltani (Roussa és mtsai). *In vitro*, a TGF- β /persephin kezelés 20%-kal több, N-metil-4-fenilpiridinium ion (MPP+) toxicitásra ellenállóbb tirozin hidroxiláz pozitív sejtet eredményezett, mely azt mutatja, hogy a TGF- β /persephin erős induktív "koktél" a dopaminerg neuronoknak (Roussa és mtsai 2009). Ezt megerősíti, hogy a TGF- β 2 és - β 3 picomolaris mennyiségű adása már csökkentette patkány embrió közepagi dopaminerg neuron kultúrában a sejthalál mértékét (Poulsen és mtsai 1994).

A TGF- β -k az apoptózis folyamatában is szerepet játszanak. Az apoptózis fiziológiásan az embrionális fejlődés során a sejtek programozott sejthalál általi tervezett eliminálását szabályozza (Raff és mtsai 1993). Patológiás körülmények, gyulladás vagy egyéb sejtkárosító körülmények (pl. trauma, iszkémia) is vezethetnek apoptózishoz (Buisson és mtsai 2003). TGF- β jelenlegi ismereteink szerint antiapoptotikus hatású, a staurosporin-indukált neuronális sejthalál modellen vizsgálva az antiapoptotikus hatás az extracelluláris szignál regulált kináz 1/2 (Erk 1/2) aktiválásán és a Bad5 antiapoptotikus fehérje foszforilálásának fokozásán keresztül valósul meg (Zhu és mtsai). A TGF- β ezen hatása is a neuroprotektív szerepét támasztja alá.

2.3.2. *A TGF- β -k a szinaptikus neurotranszmisszióban és a szinaptikus plaszticitásban*

A TGF- β 2 a központi idegrendszeri szinapszisokban a szinaptikus transzmisszót befolyásolja, a szinaptogenezist kevésbé (Heupel és mtsai 2008). A TGF- β 2 nélkülözhetetlen a pre-Böttinger komplex (nyúltvelőben elhelyezkedő interneuron csoport, mely a légzési ritmus generátora) helyes szinaptikus feladatainak ellátásához, viszont a rekeszizom neuromuszkuláris junkciójának morfológiájához és működéséhez nem nélkülözhetetlen. A TGF- β 2 deléciója egerekben erősen befolyásolta a pre-Böttinger area GABA/glicinerg és glutamaterg szinaptikus transzmisszióját, viszont a knock out egerekben a 18. embrionális napon a centrális szinapszisok száma és morfológiája nem különbözött a vad típusú egerekéhez viszonyítva (Heupel és mtsai 2008). A TGF- β -k szinaptikus transzmisszióban betöltött szerepe képezheti az alapját a szinaptikus facilitációban feltételezett funkciónak. A TGF- β 2-vel hosszabb ideig kezelt hippocampális neuronokban a kiváltott posztzinaptikus áram facilitálása indukálódott, azt sugallva, hogy a TGF- β -nak szerepe lehet a hosszú távú szinaptikus facilitáláshoz vezető sorozatos eseményekben (Fukushima és mtsai 2007). A TGF- β -k kisebb mértékben, de a szinaptogenezisre is hatással vannak. A TGF- β 1-et azonosították *Xenopus* izom-ideg kokultúrában a szinaptogenezist elősegítő molekulaként, valamint a TGF- β 1 serkenti a neuromuszkuláris junkció kialakulásához szükséges agrin expresszióját (Feng és Ko 2008). Ugyanebben a kísérletben TGF- β 1 gátló antitestet adva a médiumhoz a szinaptogenezis gyakorlatilag megszűnt. Ezek a kísérletek azt mutatják, hogy a TGF- β 1 lehet a szignál, amely a neuronokat a "növekedési" állapotból a "szinaptogenikus" állapotba hozza.

2.3.3. *A TGF- β szerepe a neuroendokrin funkciókban*

A TGF- β -k szerepét különböző neuroendokrin funkciókban feltételezik. A reprodukció központi idegrendszeri szabályozásában játszott szerepüket valószínűsíti, hogy a preoptikus areában elhelyezkedő gonadotropin releasing hormont (GnRH) termelő neuronok TGF- β receptort is kifejeznek (Prevot és mtsai 2000). További dupla jelöléssel végzett kísérletek azt mutatták, hogy a preoptikus area astrocytái expresszálnak TGF- β 1 mRNS-t valamint a GnRH pozitív perikarionok gyakran közeli kapcsolatban vannak a

TGF- β 1 mRNS-t expresszáló sejtekkel (Bouret és mtsai 2004). Preoptikus area sejteket TGF- β 1-el inkubálva szignifikánsan, dózisfüggő módon csökkent a GnRH expresszió. Ezt a hatást az inkubációs médiumhoz adott szolubilis TGF- β II receptor adása gátolta (Bouret és mtsai 2004). Ezek az adatok azt jelzik, hogy az astrocytákból származó TGF- β 1 a GnRH neuronok perikarionján hatva in vivo direkt befolyásolhatja a GnRH expresszióját ill. szekrécióját. A TGF- β 1 és- β 3 a nucleus supraopticus és nucleus paraventricularis magnocelluláris sejtjeiben az antidiuretikus hormonnal kolokalizál (Fevre-Montange és mtsai 2004). A TGF- β hormonszabályozó, géntranszkripció szabályozó és sejtnövekedést szabályozó szerepét a prolaktintermelő sejteken is tanulmányozták. A TGF- β gátolja az ösztrogén receptor transzkripció aktivitását, míg az ösztrogéneknek nincs hatása a TGF- β specifikus Smad fehérje transzkripció aktivitására (Giacomini és mtsai 2009). A fiatal egerek a nucleus suprachiasmaticusában és paraventricularisában a TGF- β és a Smad3 diurnális expresszióját írták le, míg öregebb egereken a diurnális ritmus már nem volt megfigyelhető, amely a TGF- β korfüggő funkcióját mutatja ezekben a magokban (Beynon és mtsai 2009).

2.4. A TGF- β -k patofiziológiai szerepe a központi idegrendszerben

2.4.1. A TGF- β -k szerepe agyi iszkémia során

A TGF- β szint emelkedéséről különböző módon létrehozott kísérletes agyi iszkémia során már beszámoltak. 21 napos patkányokban a jobb artéria carotis interna egyoldali lekötése utáni inhalációs hypoxia szelektív neuronelhalást okozott a lekötéssel ipszilaterális 3-as kortikális rétegben és a hippocampusban, melyet ezeken a helyeken a hypoxia után 72 órával a TGF- β 1 expressziója követett (Klempt és mtsai 1992). Tranziens globális iszkémia a felnőtt hippocampusban is okozott TGF- β 1 emelkedést. 6 órával globális iszkémia után TGF- β 1 mRNS diffúz expressziója volt kimutatható az agy egészében, mely az iszkémia utáni 2. napig tovább fokozódott majd utána csökkent. Ezzel párhuzamosan, a szignál jelentős emelkedése volt megfigyelhető a gyrus dentatus hilusában és a CA1 régióban. A TGF- β 1 mRNS maximális szintjét a hilusban az iszkémia utáni 4. napon érte el, míg a CA1 régióban a 21. nap után is perzisztált (Lehrmann és mtsai 1995). A többi TGF- β altípus szintjének agyi iszkémia során bekövetkező változása kevésbé ismert. Egy tanulmány a

TGF- β 1 tranziens előagyi iszkémia során bekövetkező indukcióját megerősítette, viszont a TGF- β 2 és- β 3 szintjének csökkenését írta le a CA1 régióban (Knuckey és mtsai 1996), míg más tanulmányok a TGF- β 2 és - β 3 valamint receptoraik és az LTBP-k szintjének emelkedését mutatták (Ata és mtsai 1999; Zhu és mtsai 2001). A TGF- β 1 indukcióját fokális agyi iszkémia során is bemutatták. Mind patkányban, mind páviánban MCAO esetén az iszkémia körüli penumbrában a TGF- β 1 jelentős expresszióját mutatták ki (Ali és mtsai 2001; Doyle és mtsai 2010; Vincze és mtsai 2010). Tény, hogy a TGF- β 1 emelkedését mutatták ki emberi agyban iszkémiás stroke esetén (Krupinski és mtsai 1996). Agyi iszkémia során a lézióra adott meghatározó válasz az asztociták és a mikroglia TGF- β 1 upregulációja (Krohn 1999; Wu és mtsai 2007; Wu és mtsai 2008), melynek következtében ezen sejtek reaktív fenotípusának indukciója következik be (Morgan, és mtsai 1993; Flanders és mtsai 1998). Azt is kimutatták, hogy normál körülmények között bizonyos agyi régiókban az asztociták expresszálják TGF- β 1-et (Dhandapani és Brann 2003; Bouret és mtsai 2004). Mindamellet a TGF- β 1 neuronális expressziójáról is beszámoltak (Lacmann és mtsai 2007; Wu és mtsai 2007; Battaglia és mtsai 2011). A többi TGF- β altípus sejt-specifikus expressziójára vonatkozó adat kevés, eloszlásuk azonban főleg neuronális expresszióra utal (Unsicker és mtsai 1991; Vincze és mtsai 2010). MCAO után, dupla festéssel készített tanulmányok azt mutatták, hogy a TGF- β 1 mRNS fő forrása fokális agyi iszkémia esetén az aktivált mikroglia és makrofágok (Lehrmann és mtsai 1998; Doyle és mtsai 2010). Azonban kettős jelölésű kísérletek mindhárom TGF- β atípust kimutatták asztrocitákban, mely azt mutatja, hogy az asztrocitákban jelen lévő TGF- β -k az iszkémiát követő penumbrai reakció fontos endogén mediátorai (Knuckey és mtsai 1996). Valamint iszkémia után túlélő CA1 piramis sejtekben a TGF- β 1 gyors felregulálását és perzisztáló expresszióját találták, mely azt sugallja, hogy neuronok is hozzájárulhatnak az agyi iszkémiát követő TGF- β szint emelkedéséhez (Zhu és mtsai 2001). Az iszkémiát követő TGF- β 1 indukció neuroprotektív szerepét az indukció és az infarktus területének csökkenésének viszonya mutatja. Clenbuterol, egy β (2)-adrenoreceptor agonista, a hippocampusban neuroprotektív hatást fejtett ki és nem iszkémiás patkányokban megemelte a TGF- β 1 expresszióját, valamint tranziens előagyi iszkémia után a TGF- β 1 protein szintet emelték patkány CA1 piramis sejtjeiben (Knuckey és mtsai 1996). Nyúl

thromboembóliás stroke modellben autológ vérrögöt injektálnak intrakraniálisan. Az autológ vérrög embolizáció előtt az a. carotis internába adott TGF- β 1 bólus az infarktus nagyságát csökkentette (Gross és mtsai 1993). Ehhez hasonlóan patkány MCAO-ban beadott TGF- β 1 is neuroprotektív hatású volt (Henrich-Noack és mtsai 1994; McNeill és mtsai 1994). Valamint adenovírus géntranszferrel kiváltott TGF- β 1 túlexpresszió csökkentette az infarktus nagyságát 30 perces MCAO utáni 1. és 7. napon (Pang és mtsai 2001). A TGF- β -k potenciális klinikai alkalmazásra inkább alkalmas noninvazív, a vér-agy gátat elkerülő, intranazális beadása egér MCAO-ban csökkentette az infarktus nagyságát és javította a funkcionális kimenetelt (Ma és mtsai 2008). Közvetlenebb bizonyítéka a TGF- β -k endogén neuroprotektív hatásának bizonyítására a TGF- β hatás antagonizálásával készült tanulmányok. A TGF- β -t antagonizáló szolubilis TGF- β II-es receptor agyba történő injektálása megnöveli az infarktus területének nagyságát 30 perces reverzibilis fokális agyi iszkémia során (Ruocco és mtsai 1999). Bár a legtöbb kísérletben nem differenciáltak a TGF- β altípusok között, a TGF- β 2 és - β 3 neuroprotektív hatása is valószínű. A lehetséges mechanizmusok között az anti-inflammatorikus hatás, a heg képződés és az angiogenezis elősegítése, az antiapoptotikus hatás, az excitotoxicitással szembeni védelem valamint a neuroregeneráció elősegítése mind szerepet játszhat. Továbbá, bár a bizonyítékok még hiányosak, a TGF- β -k mint endogén neuroprotektív proteinek az iszkémiás prekondicionálásban is részt vesznek (Lenzlinger és mtsai 2001; Pera és mtsai 2004). A TGF- β -k szignál transzdukciós útvonalának eddig ismert részleteivel ez a protektív hatás nem teljesen magyarázható. A TGF- β 1-el kezelt agyban a Bad fehérje mennyisége és a kaszpáz-3 aktivációja csökken, emiatt csökken a DNS fragmentáció, az iszkémia nagysága és a neurológiai deficit súlyossága, továbbá, a MAPK szignál transzdukciós útvonal inhibitorai staurosporin indukált apoptózis modellben felfüggesztik a TGF- β 1 neuroprotektív hatását, tehát a MAPK aktiválása szükséges ahhoz, hogy a TGF- β 1 neuroprotektív hatását kifejezze (Zhu és mtsai 2002). Az adatokból következik, hogy a TGF- β 1 szabályozza az apoptotikus (Bad) és az antiapoptotikus fehérjék expresszióját, ezzel a sejtek túléléséhez kedvező feltételeket teremt inzultus esetén (Dhandapani és Brann 2003).

2.4.2. *A TGF- β szerepe a gliaheg képződésében*

Az agy sérülése sejtes és molekuláris mechanizmusok sorozatán keresztül másodlagos károsodásokhoz vezet. A sérült szövet izolálása hegszövet képződésén keresztül valósul meg. Az asztrogliosis fiziológiai szerepe vitatott abban a tekintetben, hogy a reaktív asztociták mennyire hasznosak vagy károsak a központi idegrendszer gyógyulásában, felépülésében (Hatten és mtsai 1984; Wilson 1997). Egyrészt, a reaktív asztociták által létrehozott gliahegben lejátszódó folyamatok izoláló és védő funkciót láthatnak el a károsodást övező intakt szövetben, amelyből ezen védelem nélkül toxikus molekulák szabadulhatnak fel (Giaume és mtsai 2007; Fitch és Silver 2008). Azonban a gliahegben expresszált molekulák gátolhatják a neuronális regenerációt és a sérült terület reinnervációját. Mindazonáltal a heg képződése a központi idegrendszert ért trauma után pár órával már megkezdődik: a reaktív asztociták proteoglikánokat szabadítanak fel, amelyek a neuronok regenerációja ellen hatnak (Nieto-Sampedro 1999). A TGF- β a heg képződését indító szignál molekula lehet (da Cunha és mtsai 1993; Lippa és mtsai 1995). Az agy sértése után lokálisan adott TGF- β antagonistá a gliális hegesedést csökkenti (Lagord és mtsai 2002). A TGF- β a keratin szulfát és a kondroitin szulfát bioszintézisét fokozza (Yin és mtsai 2009). A TGF- β receptor útvonal gátlása in vivo és in vitro is felfüggeszti a fibrinogénnek a hegszövet képződésére gyakorolt hatását (Schachtrup és mtsai 2011). A fibrinogén hiánya egerekben redukálja az aktív TGF- β szintjét valamint a Smad2 foszforilációját és a glia sejtek aktivációját az agy sérülése során, továbbá sztereotaktikus injekciója asztrogliozist indukál (Schachtrup és mtsai 2011).

Továbbá, a TGF- β expressziója az idegrendszert ért traumás károsodás után azonnal növekszik (Wang és mtsai 2009), viszont az egyes TGF- β altípusok különböző expressziós mintázatot mutatnak: a TGF- β 1 mRNS szintje a leginkább a gerincvelő hátsó gyökérének átvágása utáni akut gyulladós szakaszban után nő meg, a TGF- β 2 mRNS szintje lokálisan a seb körül, főleg az asztocitákban és a neovasculáris endothel sejtekben nő, főleg a hegesedés szubakut szakaszában. A TGF- β termelése a fehérje szinten is megjelenik. Mind a TGF- β 1 mind a TGF- β 2 fehérjét megtalálták hematogén gyulladós sejtekben, a TGF- β 1 inkább a neuronokban jelent meg, addig a TGF- β 2 a seb különböző sejtjeiben volt megtalálható, pl. a glia/kollagén hegképződés alatt a reaktív asztrocitákban (Lagord és

mtsai 2002). A TGF- β jelenlétét igazolták traumás sérülés után a gerincvelőben: 4 kontroll, ill. 14 gerincvelői sérülést szenvedett páciens gerincvelőjét vizsgálták postmortem immunhisztokémiai módszerekkel (Buss és mtsai 2008). A kontroll esetekben a TGF- β 1 a vérerekben, az intravaszkuláris monocitákban és egyes motoneuronokban volt megtalálható, míg a TGF- β 2 csak az intravaszkuláris monocitákban volt kimutatható. A gerincvelői trauma után a TGF- β 1 immunreaktivitás fokozódását a trauma utáni 2. napon mutatták ki, az immunpozitivitás a neuronokban, az asztrocitákban és a betörő makrofágokban is kimutatható volt. Az immunjel az első hetekben volt a legerősebb, és 1 éven belül fokozatosan csökkent. A TGF- β 2 immunoreaktivitás 24 órával a trauma után jelentkezett, a makrofágokban, asztrocitákban, a jel 1 éven túl is emelkedett volt. A trauma után a Waller-féle degeneráción áteső fehérállományban egyik izoforma sem indukálódott. Ezekből a tanulmányokból következik, hogy a TGF- β 1 modulálja az akut gyulladást és neurális választ, valamint a gliaszövet képződését, míg a TGF- β 2 a hegyszövet fenntartásában játszhat szerepet traumás gerincvelői sérülés során.

2.4.3. *A TGF- β -k szerepe az agytumороkban*

A TGF- β anti-proliferatív hatású, így az asztrociták proliferációját is gátolja: patkány primer asztrocita sejt kultúrát TGF- β -val kezelve a sejtek DNS szintézise csökken, a sejt ciklus a G(1) fázisban megáll, a ciklin-dependens kináz inhibitor (CdkI) és a p15(INK4B) expressziója növekedik (Rich és mtsai 1999). Paradox módon az agytumороk nagy része "megmenekül" a TGF- β sejtproliferációt gátló hatása alól: például a high grade gliómák TGF- β -t szekretálnak valamint képesek aktiválni a látens TGF- β -t (Sasaki és mtsai 2001). Továbbá a tumороk olyan mechanizmusokat fejlesztenek ki, amely a TGF- β anti-proliferatív hatását onkogenikus hatássá változtatják (Aigner és Bogdahn 2008). A konverzió mechanizmusa egyrészt magyarázható azzal, hogy egy feltételezett, a TGF- β növekedést gátló hatású mediáló tumorszuppresszor gén veszik el, vagy azzal, hogy egy onkogenikus útvonal aktiválódik. Kísérleti bizonyítékok támasztják alá, hogy a malignus transzformációban a TGF- β II-es típusú receptor inaktiváló/funkcióvesztő mutációja, a szignáltranszmisszió, valamint a ciklin/ciklin dependens kináz rendszer változásai játszanak szerepet (Zhang és mtsai 2006). A p15(INK4B) fehérje elvesztése ugyancsak a növekedést

gátló tulajdonság elvesztéséhez vezet, amely az agresszív fenotípus kialakulását okozza (Rich és mtsai 1999). A TGF- β szignáltranszdukciójának gátlása a glioblasztóma sejtek tumorogenitását nagymértékben csökkenti (Ikushima és mtsai 2009). A malignus gliómák progresszióját meghatározó tényezők közül a TGF- β 2 bizonyult a legfontosabbnak, mivel először "glioblasztóma eredetű T-sejt szupresszor faktorként" írták le, mert a glioblasztómás betegek immunszupresszált státuszával járt együtt. A tumorok és a betegek plazmájának emelkedett TGF- β 2 szintje rosszabb prognózissal és előrehaladottabb állapottal járt együtt (Hau és mtsai 2011). Mióta ismert, hogy a TGF- β érintett a tumorsejtek excesszív proliferációjában, az infiltratív növekedésben, a tumor vérellátásához szükséges angiogenezisben valamint a tumorsejtek immunrendszer előli elrejtésében, azóta a TGF- β a gliómák kezelésének új célpontjává vált (Platten és mtsai 2001). Rágcsáló glióma sejteken végzett in vitro kísérletek mutatják, hogy a TGF- β antagonizálása, például antiszenz stratégiával, a proTGF- β gátlásával, a TGF- β decorinnal történő eltakarításával vagy a TGF- β aktivitás TGF- β I-es receptor gátlásával ígéretes a glioblasztóma kezelésében (Wick és mtsai 2006; Naumann és mtsai 2008). Ezen kísérletek alapján került kifejlesztésre a TGF- β 2 mRNS-re antiszenz oligonukleotid trapedersen (AP12009), amely a TGF- β 2 mRNS-t megkötve gátolja a TGF- β hatást (Hau és mtsai 2011). Három, I/II fázisvizsgálat és egy randomizált, aktiv-kontrollált dózismeghatározó IIb fázisvizsgálat során a trapedersennel kezelt rekurrens vagy refrakter high grade gliómás betegekben hosszú távú tumorválaszt és ezzel javuló életkilátásokat mértek. Ezekon az adatokon alapuló III-as fázisvizsgálat, a SAPHIRRE indult (Hau és mtsai 2011). Továbbá, a TGF- β gátlása glióma-asszociált ellenanyag terápia során kiegészítő kezelésként is szóba jön (Ueda és mtsai 2009).

2.4.4. A TGF- β neuroprotektív hatása egyéb neurológiai betegségekben

A TGF- β több neurodegeneratív betegségben is szerepet játszik (Morgan és mtsai 1993). Az Alzheimer-demenciában az amyloid plakkok képződése, a neurofibrilláris kötegek megjelenésének és a neuronok számának csökkenése mutatható ki. A betegségben egyéb cerebrovaszkuláris változások is kimutathatóak, úgy mint a perivaszkuláris asztocitózis, amyloid lerakódás és a mikrovaszkuláris degeneráció, de az nem világos, hogy ezek a patológiai változások korrelálnak-e az Alzheimer betegek tüneteivel. Transzgenikus

egerek asztrocitáiban expresszált TGF- β 1 perivaszkuláris asztrocitózist indukál, mely után a kiserekben megfigyelhető a membránproteinek akkumulációja, a kapillárisok bazális membránjának elvékonyodása, majd később az egerek kb. 6 hónapos korában az amyloid lerakódása az agyi erekben. 9 hónapos korban különböző, az Alzheimer betegségben megfigyelt változásokhoz hasonló elváltozásokat figyeltek meg az endothelsejtekben és a pericitákban. Ez azt jelenti, hogy a TGF- β 1 krónikus túltermelése egy patológiás kaszkádot indít el, amely Alzheimer-szerű cerebrovaszkuláris amyloidózist, kísér degenerációt és lokális metabolikus változásokat okoz (Wyss-Coray és mtsai 2000). Alzheimer kórban a TGF- β szignáltranszdukciós útvonal zavarát is kimutatták, amely az amyloid béta lerakódásához és az amyloid indukált neurodegenerációhoz vezet. A TGF- β szignáltranszdukciós útvonal funkcióvesztése is hozzájárul a tau-patológiához és a neurofibrilláris kötegek képződéséhez (Caraci és mtsai 2009). In vitro és in vivo kísérletek sora támasztja alá, hogy a TGF- β 1 az amyloid okozta neurotoxicitással szemben protektív hatású. A kombinált amyloid-béta és TGF- β 1 közvetítette patológia megismerése új terápiás lehetőségeket nyit a betegség kezelésében (Ongali és mtsai 2011).

Aszimptomás Huntington beteg perifériás vérében csökkent a TGF- β 1 szint, amely a trinukleotid ismétlődés hosszával és a nucleus caudatus glükózfelhasználásával korrelált, valamint posztmortem immunhisztokémiával a TGF- β 1 csökkent expresszióját mutatták ki a neuronokban. Humán mutáns huntingtin gén 1-es exonjával transzfektált asztrocita sejt kultúrában a TGF- β 1 mRNS szintje csökken (Battaglia és mtsai 2011). Ezek az adatok azt mutatják, hogy a szérum TGF- β 1 szintje a Huntington kórban lehetséges biomarkerként kezelhető, és emiatt a TGF- β 1 szintjének emelését célzó terápiák befolyásolhatják a betegség kimenetelét.

Immunohisztokémiai festéssel a TGF- β 2 a neurofibrilláris kötegeket tartalmazó neuronokban és gliasejtekben jelent meg progresszív szupranukleáris bénulásnál (Lippa és mtsai 1995). A vizsgált többi neurodegeneratív betegségben (Lewy testes demencia, amyotrófiás lateral sclerosis, Pick demencia) is TGF- β 2 pozitív asztrocitákat azonosítottak. A TGF- β 1 és- β 3 jelölődés nem változott ezekben a betegségekben. Ezek az adatok azt mutatják, hogy a TGF- β 2 indukciója lehet az intrinsic faktor a neurofibrilláris kötegek és a reaktív gliosis kialakulásához a neurodegeneratív betegségekben (Lippa és mtsai 1995).

3. CÉLKITŰZÉSEK

- A mRNS expresszió térbeli eloszlása még nem került vizsgálatra annak ellenére sem, hogy a TGF- β fehérjék agyi funkciókban játszott jelentőségére egyre több bizonyíték áll rendelkezésre. A TGF- β 1, - β 2 és - β 3 eloszlást eddig csak fehérje szinten, immunhisztokémiával vizsgálták, ezért elsődleges célom ép patkány agyban az eloszlás mRNS szintű vizsgálata radioaktív in situ hibridizációs hisztokémiával. Továbbá,
 - a fehérjék mRNS eloszlásának összehasonlítása az irodalomból ismert, immunhisztokémiai módszerekkel leírt TGF- β eloszlásokkal.
 - a TGF- β -k és kötőfehérjék, az LTBP-k mRNS eloszlásának összehasonlítása, az altípus-specifikus ko-expresszió vizsgálata.
- A neuroprotektív hatás megértése céljából ezután kísérleti agyi iszkémiát követően vizsgáljuk a TGF- β -k mRNS expressziójának változásait. Kísérleti agyi iszkémiát MCAO-moddal hozunk létre. Kérdéseink:
 - fokális agyi iszkémia során változik-e a túlélési idő hosszával a TGF- β 1,- β 2 és - β 3 mRNS indukciója? Ezt a kérdést megválaszolando 1 órás MCAO-t követően 3, 24, 72 órás és 1 hónapos túlélés után vizsgáltuk a TGF- β 1, - β 2 és - β 3 mRNS expressziójának változását.
 - az indukciót az iszkémia vagy a reperfüzió váltja ki? Ehhez 1 órás és permanens (24 órás) MCAO-t követően 24 órás túlélési idő után vizsgáltuk meg a TGF- β 1,- β 2 és - β 3 mRNS eloszlását.

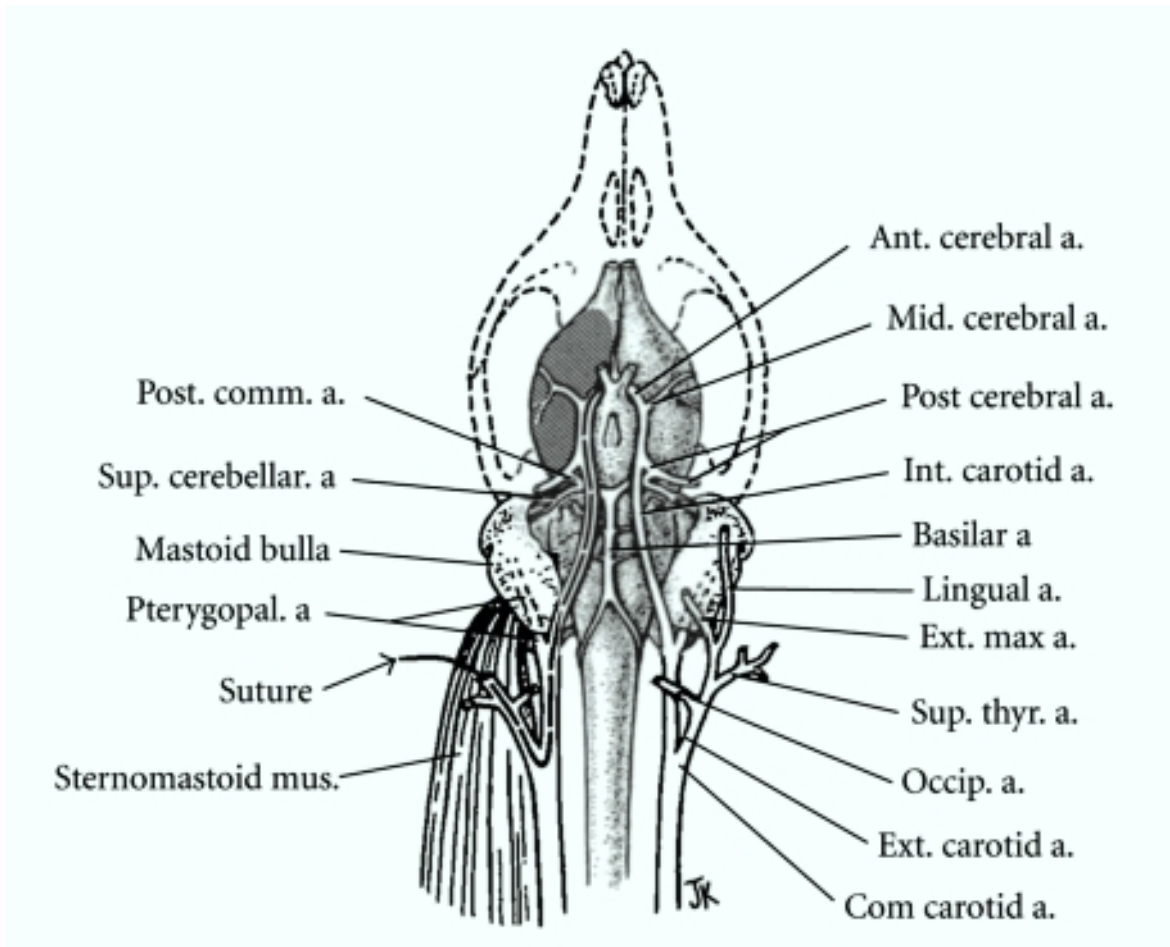
4. MÓDSZEREK

4.1. *A kísérleti állatok*

Az állatkísérleteket a Semmelweis Egyetem Állatkísérleti Bizottságának engedélyével, valamint "Az állatok védelméről és kíméletéről" szóló 1998. évi XXVIII. törvény rendelkezései szerint, a Földművelésügyi és Vidékfejlesztési Minisztérium Állat és Élelmiszerhigiénés Osztályának ajánlása alapján végeztük. A kísérletekhez 250-330 grammos Wistar patkányokat használtunk (Charles Rivers Laboratórium, Magyarország). Az állatokat standard laboratóriumi körülmények között, 12-12 órás sötét-világos fényciklusú (a világos időtartam kezdete reggel 6:00) állatházban tartottuk, a száraz patkánytáphoz, ill. vízhez szabadon hozzáférhettek. Az állatokat a műtétekhez ill. leölés előtt ketamint (60 mg/ml) és xylazint (8 mg/ml) tartalmazó intramuskuláris injekcióval (0,2 ml/300 g testsúly) altattuk el. Az in situ hibridizációra szánt állatokat dekapitáltuk, az agyat kireparáltuk és a felhasználásig -80 °C-on tartottuk.

4.2. *Az artéria cerebri media okklúziós modell (MCAO)*

Fokális agyi iszkémiát Longa által leírt (Longa és mtsai 1989) intralumináris fonaltechnika módszer módosításával hoztunk létre. Mediális nyaki metszésből kireparáltuk a bal artéria carotis communist, az artéria carotis internát és externát. Az externa és a communis leköttése után 3-0 szilikon monofilamentumot (Doccol, Redlands, CA) vezettünk az artéria carotis communison ejtett metszésből az internába, a bifurcatio fölé 18-20 mm-re, egészen az artéria cerebri media eredéséig. Az artéria pterygopalatinát (carotis interna-ág) már a fonál bevezetése előtt kireparáltuk és leköttöttük, így kontrolláltuk, hogy a fonál ne forduljon ebbe az artériába. Egy atraumatikus aneurysmaklippet (Codman, Johnson and Johnson, Le Locle, NE, Switzerland) helyeztünk az artéria carotis internára a circulus arteriosus Willisin történő visszavérzés és a fonál elmozdulásának megelőzése céljából (4. ábra).



4. ábra

MCAO modell létrehozása a Longa-féle intralumináris fonaltechnikával (Longa és mtsai 1989)

Kísérleteink egy részében az átmeneti iszkémia vizsgálatokor a klippet és a monofilamentumot 1 óra múlva eltávolítottuk, a permanens média okklúzió vizsgálatánál nem távolítottuk el. Ezután a műtéti metszést elvarrtuk. Az iszkémiát követően a szükséges túlélési idő (1 órás MCAO után 3, 24, 72 órával valamint 1 hónappal, permanens elzárás esetén 24 órával) után az állatok agyát in situ hibridizációs hisztokémiához disszektáltuk. Az agyakat a bregmától 1 mm-rel rostrális irányba két részre metszettük. Az iszkémia létrejöttének bizonyításához az agy elülső részét 2,3,5-triphenyltetrazolium chloriddal (TTC) megfestettük, a hátsó felét pedig lefagyasztottuk és a felhasználásig $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk.

4.3. A 2,3,5-triphenyltetrazolium chlorid (TTC) festés

Ez a hisztopatológiai festés az agyi iszkémia létrejöttének kimutatására szolgál (Bederson és mtsai 1986). A módszer alapja a TTC redukciója. A redukció az ép sejtek mitokondriumában jelen lévő szukcinát-dehidrogenáz (és egyéb dehidrogenázok) hatására jön létre, mely során a TTC trifenil-formazánná alakul. A trifenil-formazán vörös színű, vízben oldhatatlan csapadékot képez az agy ép, iszkémiától mentes területein, míg az iszkémia területe csaknem fehér marad. Az agy elülső részét 1%-os TTC oldatban 30 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk majd 4 %-os paraformaldehid oldatban fixáltuk.

4.4. A hibridizációs próba készítése

4.4.1. Az mRNS izolálása

A frissen kiproparált patkányagyból kéregdarabokat metszettünk, majd a mintákat szöveti homogenizátorral homogenizáltuk. Ez után a lizátumot 1 ml Trizol reagenssel (Invitrogen, Carlsbad, CA) 5 percig szobahőn inkubáltuk, hogy a nukleinsav komplexek teljes disszociációját elérjük. Majd 0,2 ml kloroformot és 50 µl 4-brómanizolt adtunk az izoláló csőbe, és kézzel ráztuk 15 másodpercig. 2-3 perces inkubálás következett szobahőmérsékleten, majd a mintát 12000 xg-n 15 percig 4 °C-on centrifugáltuk. A centrifugálás után az izoláló csőben a minta két fázisra vált szét, az alsó vörös színű fenol-kloroform fázisra és egy felső, az RNS-t tartalmazó, átlátszó, vizes, fázisra. A vizes fázis térfogata kb. 600 µl volt, melyből 400 µl-t pipettával új, ribonukleáz mentes csőbe helyeztünk át. Ehhez azonos mennyiségű 70%-os etanolt adtunk és a mintát vortexeltük. Az alkoholt tartalmazó felülúszót eltávolítottuk. 700 µl mintát Spin Cartridge-ba pipettáztunk át, majd 15 percig szobahőfokon centrifugáltuk, a felülúszót ismét eltávolítottuk. Ezt a lépést még 2x ismételtük. Ezután a mintát mostuk, és ismételten centrifugáltuk. Centrifugálás után a felülúszót eltávolítottuk, a mintát 1 percig szobahőfokon centrifugáltuk, hogy a tisztított RNS a csőben lévő membránra "száradjon". Ezután a reszuszpendáláshoz ribonukleáz mentes vizet adtunk a mintákhoz. A teljes RNS izolátumot a maradék DNS teljes eltávolítása érdekében 2 µg/µl-es hígítás után Amplification Grade DNase I-gyel (Invitrogen) kezeltük.

4.4.2. A cDNS előállítása reverz transzkripcióval

A DNS mentes RNS izolátumból ezután reverz transzkripcióval (Superscript II reverz transzkriptáz kittel (Invitrogen)) cDNS-t szintetizáltunk. Ehhez nukleáz mentes mikrocentrifuga csőbe primerként 1 µl oligo(dT)-t, 5 µg mRNS-t, 1 µl dNTP mixet tettünk, melyet 12 µl össztérfogatra steril desztillált vízzel töltöttünk fel. A keveréket 65 °C-on 5 percig tartottunk majd rövid időre szárazjégre tettük. Ezután rövid centrifugálás után 2 µl 0,1M DTT-t, 4 µl 5x First-Strand Buffer-t adtunk a mintához, majd 42 °C-on 2 percig inkubáltuk. Majd 1 µl Superscript II RT enzimet adtunk hozzá, és a mintát 20 µl össztérfogatig steril desztillált vízzel töltöttük fel. 42 °C-on 50 percig inkubáltuk, majd a reakciót a minta 75 °C-ra történő 15 perces melegítésével állítottuk le.

4.4.3. A TGF- β -altípusokra specifikus DNS próbák előállítása PCR-ral

Az előzőleg előállított cDNS 10x hígítása után abból 2.5 µl-t templátként használtunk egy PCR reakcióhoz, melyet iTaq DNS polimerázzal (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), 12.5 µl összvolumennel végeztünk el, a következő körülmények között: az iniciáció (95 °C fokon 3 perc) után 35 cikluson keresztül a denaturációs lépés 95 °C fokon 0.5 perc, a kapcsolódási lépés 60 °C fokon 0.5 perc majd a meghosszabbítási lépés 72 °C fokon 1 perc. Primerként 300 nM végkoncentrációban TGF- β 1-et ("A" primer pár: GACTCTCCACCTGCAAGACC és CGTGTTGCTCCACAGTTGAC, "B" primer pár: TGAGTGGCTGTCTTTTGACG and TGGTTGTAGAGGGCAAGGAC), TGF- β 2-t ("A" primer pár: GAGTGGCTGAACAACGGATT és CCATCGATACCTGCGAATCT, "B" primer pár: CTCCACATATGCCAGTGGTG és AGGATGGTCAGTGGTTCCAG), és TGF- β 3-at ("A" primer pár: GTCCAACCTGGGTCTGGAAA és GCAGTTCTCCTCCAAGTTGC, "B" primer pár: AGAAGAGGGTGGAAGCCATT és GCTGCTTGCTATGTGTTCA) használtunk. A PCR termékek számított hossza TGF- β 1 esetén 417 és 456 bázispár, (231-647 és 724-1179 bázispár, GenBank accession number NM_021578.2), a TGF- β 2 esetén 286 és 405 bázispár (870-1155 és 1159-1563 bázispár, GenBank accession number NM_031131.1) valamint TGF- β 3 esetén 298 és 441 bázispár (1046-1343 and 508-948 bázispár, GenBank accession number NM_013174.1). A primereket úgy választottuk, hogy az általuk generált próbák felismerjék az a keresett gén

messenger RNS-ének összes ismert típusát. Emellett a primereket úgy terveztük, hogy 2 különböző exonon helyezkedjenek el. Így a genomikus DNS szennyezés felismerhető, mivel a belőle keletkező PCR termék az intron beékelődése miatt hosszabb, mint amelynek a templátja a cDNS volt. A keletkezett PCR termékeket gélelektroforézissel megfuttattuk, így kontrolláltuk, hogy a keletkezett termék bázispárhossza megfelel e számított értéknek.

4.4.4. *A DNS próbák felszaporítása klónozó vektorokkal*

Az előzőekben előállított majd poliakrilamid gélen megfuttatott DNS próbákat ezután kivágtuk a gélből majd etanol precipitációs tisztítás után TOPO TA klónozó vektorokba ültettük, melyeket kémiai transzformálással alkalmassá tett *E. coli* baktériumokba juttattunk (TOPO TA Cloning kit, Invitrogen). Az eljárás során a klónozó reagensekhez 4 µl PCR terméket, 1 µl sóoldatot (200 mM NaCl; 10 mM MgCl₂) és 1 µl TOPO vektort kevertünk össze, az elegyet 5 percig szobahőn inkubáltuk, majd a reakciót az elegy szárazjégre tevésével állítottuk le. Ezután az klónozó reagensekből 2 µl-t az *E. coli* tartalmazó kémcsőbe tettünk, melyet 10 percig jégen inkubáltuk. Majd 42 °C-os melegítés következett 30 másodpercig, ezután a hősokkolást a minták ismételt jégre helyezésével fejeztük be. A mintákhoz ezután 250 µl szobahőmérsékletű S.O.C médiumot adtunk, majd folyamatos horizontális rázás mellett 37 °C-on 1 órán át inkubáltuk. Az inkubálás után a transzformált baktériumokat tartalmazó mintákból 50 µl-t az előmelegített, LB (Luria-Bertani) agart, 50 µg/ml ampicillint, valamint 40 mg/ml X-gal-t (5-bróm-4-klór-3-indoxyl-galaktopiranozid) Petri csészékbe helyeztünk, melyeket ezután egy éjszakán át inkubáltuk. A sikeresen transzformált baktériumkolóniák fehér színűek lettek, mivel a transzformált DNS szakasz a baktérium β-galaktozidáz aminoterminális kódoló szekvenciájához kapcsolódik, meggátolva ezzel a β-galaktozidáz enzim termelését, amely az agarban lévő X-galt így nem képes bontani, ezzel a kék színű bomlástermék nem termelődik. A fehér, sikeresen transzformált baktériumkolóniák közül 5-7 baktériumkolóniát választottunk ki, melyből a próbákat tartalmazó plazmidokat tisztítottunk PureLink Plasmid Miniprep kit (Invitrogen) segítségével.

A tisztított plazmidokat egy következő PCR reakció templátjaként használtuk, melyben specifikus primerpárokkal választottuk ki a specifikus inzerteket tartalmazó plazmidokat. A

próbákra specifikus plazmid templátként szerepel a PCR reakciókban, amelyek primerpárjai specifikusak a próbára valamint T7 RNS felismerő helyet (GTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGTA) is tartalmaznak. Legvégül a cDNS próbák azonosságát szekvenálással igazoltuk. Az így elkészített próbákat a radioaktív in situ hibridizációig $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tartottuk.

4.5. A radioaktív in situ hibridizáció

4.5.1. A metszetek készítése és előkezelése

A frissen kivett patkányanyagokat szárazjeges gyors fagyasztás után a metszésig $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk. Kriosztáttal $12\text{ }\mu\text{m}$ vékonyságú koronális, a bregmához viszonyítva $+4\text{ mm}$ -től -15 mm -ig (Paxinos és Watson 2005) tartó sorozatmetszeteket készítettünk. A metszeteket pozitív töltésű tárgylemezekre (SuperfrostPlus®, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) juttattuk, melyeket szárítás után felhasználásig $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tartottuk. Az egyes TGF- β alegységek mRNA eloszlásának feltérképezéséhez egymástól $240\text{ }\mu\text{m}$ távolságra lévő koronális metszeteket használtunk. Az in situ hibridizációhoz a fixáláshoz 5 percig 4%-os formaldehiddel kezeltük a metszeteket, melyet 2×5 perces mosás követett PBS-ben. Ezután 10 percig 500 ml trietanolaminba tettük a metszeteket melybe 1,25 ml ecetsavat is tettünk. Majd $2\times$ SSC-ben mostuk a metszeteket, ezután desztillált vízbe mártottuk majd alkoholsorban dehydráltuk (70%-os alkoholban 1 perc, 80%-os alkoholban 1 perc, 95%-os alkoholban 2 perc, abszolút alkoholban 1 perc majd ismét 95%-os alkoholban 1 perc). Ezután szobahőn szárítottuk ki az előkészített metszeteket.

4.5.2. A próba radioaktív jelölése

A próbakészítés során előzőleg leírt DNS próbákat templátként használtuk egy in vitro transzkripció lépéshez, melyet MAXIscript transzkripció kittel (Ambion, Austin, TX) végeztünk el. Az in vitro transzkripció során $[^{35}\text{S}]\text{UTP}$ -tal jelölt ribopróbákat készítettünk, melyek T7 polimeráz felismerő helyet is tartalmaztak. Ehhez $1\text{ }\mu\text{l}$ próbát, $1\text{ }\mu\text{l}$ 100 mM DTT-t, $1,5\text{ }\mu\text{l}$ dNTP mixet (ATP-t, CTP-t és GTP-t tartalmaz), $2\text{ }\mu\text{l}$ $[^{35}\text{S}]\text{UTP}$ -t, $1\text{ }\mu\text{l}$ transzkripció puffert és $3\text{ }\mu\text{l}$ steril vizet kevertünk össze. A vortexelés után adtuk hozzá a DNS függő T7 RNS polimerázt, mely 5'-3' irányban, a DNS próba antiszenz száláról kezdi

meg az ribopróbák szintézisét. 37 °C-os 1 órás inkubálás után a templát DNS-t 1 µl DN-áz hozzáadásával bontottuk le. 15 perces 37 °C-os inkubálás után a reakciót 90 µl TEA puffer és 350 µl 100%-os alkohol hozzáadásával valamint a minta 30 percig történő szárazjégre helyezésével állítottuk le. Ezután a minták tisztítását 4 °C-on 13000 rpm-en 30 perces centrifugálással folytattuk, majd az alkoholos felülúszó leöntése után 500 µl jéghideg 95%-os alkoholt adtunk a mintákhoz. Ismételt 5 perces centrifugálás után a felülúszót ismét leöntöttük és a maradék alkoholt leszívtuk a mintákról. A megtisztított mintákat ezután 50 µl TE pufferben reszuszpendáltuk. A ribopróbák radioaktivitását megmértük, ehhez 5 ml szcintillációs folyadékot és 1 µl-nyi jelölt ribopróbát kevertünk össze. Metszetenként 1 millió DPM aktivitással rendelkező jelölt próbát használtunk.

4.5.3. *A hibridizáció*

A radioaktívan jelölt ribopróbát, DEPC kezelt vizet, a nukleinsav mixet összekevertük és 5 percig 65 °C-on melegítettük. Ezután 5M-os DTT-t, 10%-os SDS-t, 10 %-os NTS-t valamint a hibridizációs puffert (1M TRIS-HCl, 250mM EDTA, 4M NaCl, 100% formamid, 50% dextranszulfát, 50x Denhardt oldat) adtunk a hibridizációs elegyünkhöz. A hibridizációs elegyből 80 µl-t tettünk a tárgylemezre, lefedtük őket és formamidot tartalmazó nedveskamrában hibridizáltattuk 65 °C-on egy éjszakán át. Következő nap a fedőlemezeket 4xSSC-ben oldottuk le, majd a metszeteket 5 percre 4x, 1mM DDT-t tartalmazó oldatba helyeztük. Ezután a maradék egyszálú RNS-t RN-áz A puffer (1 ml RNáz (Sigma), 62,5 ml 4 M NaCl, 5 ml 1M TRIS HCl, 1 ml 0,5 M EDTA) hozzáadásával bontottuk le. Ezután a metszeteket a következő oldatokban mostuk (az oldatokhoz használat előtt 1 mM-os DTT-t adtunk): 2x5 percet 2xSSC-ben, 1x5 percet 1xSSC-ben, 1x5 percet 0,5xSSC-ben, majd 65 °C-on 30 percig 0,1xSSC-ben. Ezután 0.1xSSC-ben hűtöttük ki szobahőmérsékletre és a mosást felszálló alkoholsorral fejeztük be (1 perc 70%-os, 80%-os, 90%-os, 95%-os, 100%-os alkoholban). Ezután a metszeteket autoradiográfiás emulzióba merítettük (Eastman Kodak) majd 3 hétig 4 °C fokon tároltuk. A metszeteket Kodak Dektol developer-rel hívtuk elő, majd Kodak fixálóval fixáltuk, egyenként Giemsa-val festettük majd lefedtük Cytoseal 60-al (Stephens Scientific, Riverdale, NJ).

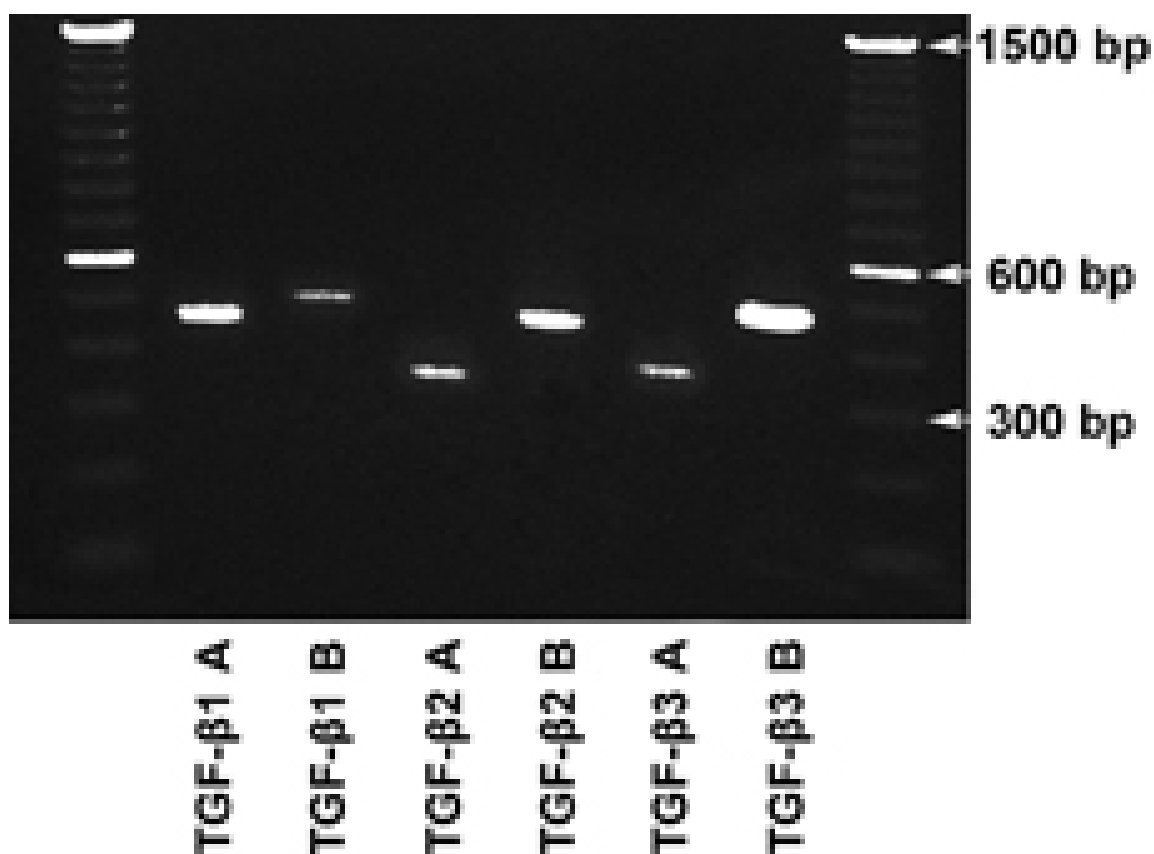
4.6. Mikroszkópia és fényképezés

A metszeteket Olympus BX60 fénymikroszkóppal vizsgáltuk meg, mely világos és sötét látóterű kondenzorral is el volt látva. A képeket 2048 x 2048 pixel felbontással SPOT Xplorer digitalis CCD kamerával (Diagnostic Instruments, Sterling Heights, MI) készítettük. A sötét látóteres képeknél 4x, a világos látóterűeknél 4-40x-es objektívet használtunk. A felvételek kontrasztját és élességét az Adobe Photoshop CS 8.0 program Kontraszt ill. Élesség parancsaival állítottuk be.

5. EREDMÉNYEK

5.1. Az *in situ* hibridizációs próbák előállítása

A próbagyártás első lépésében minden egyes TGF- β altípusra 2-2 primer párral elvégzett RT-PCR mindhárom TGF- β altípus expresszióját kimutatta a patkány agyban. A keletkező PCR termékeket kettő, egymással átfedésben nem lévő, az egyes TGF- β altípus T7 felismerő szekvenciáját tartalmazó, *in situ* hibridizációs próba előállításához használtuk. A PCR termékeket agaróz gélen megfuttatuk. A termékek méretüknek megfelelően helyezkednek el az agaróz gélben (5. ábra).



5. ábra

Az agaróz gélről készült fénykép: a TGF- β 1, TGF- β 2 és β 3-hoz készített 2-2 pár *in situ* hibridizációs próba méretét mutatja.

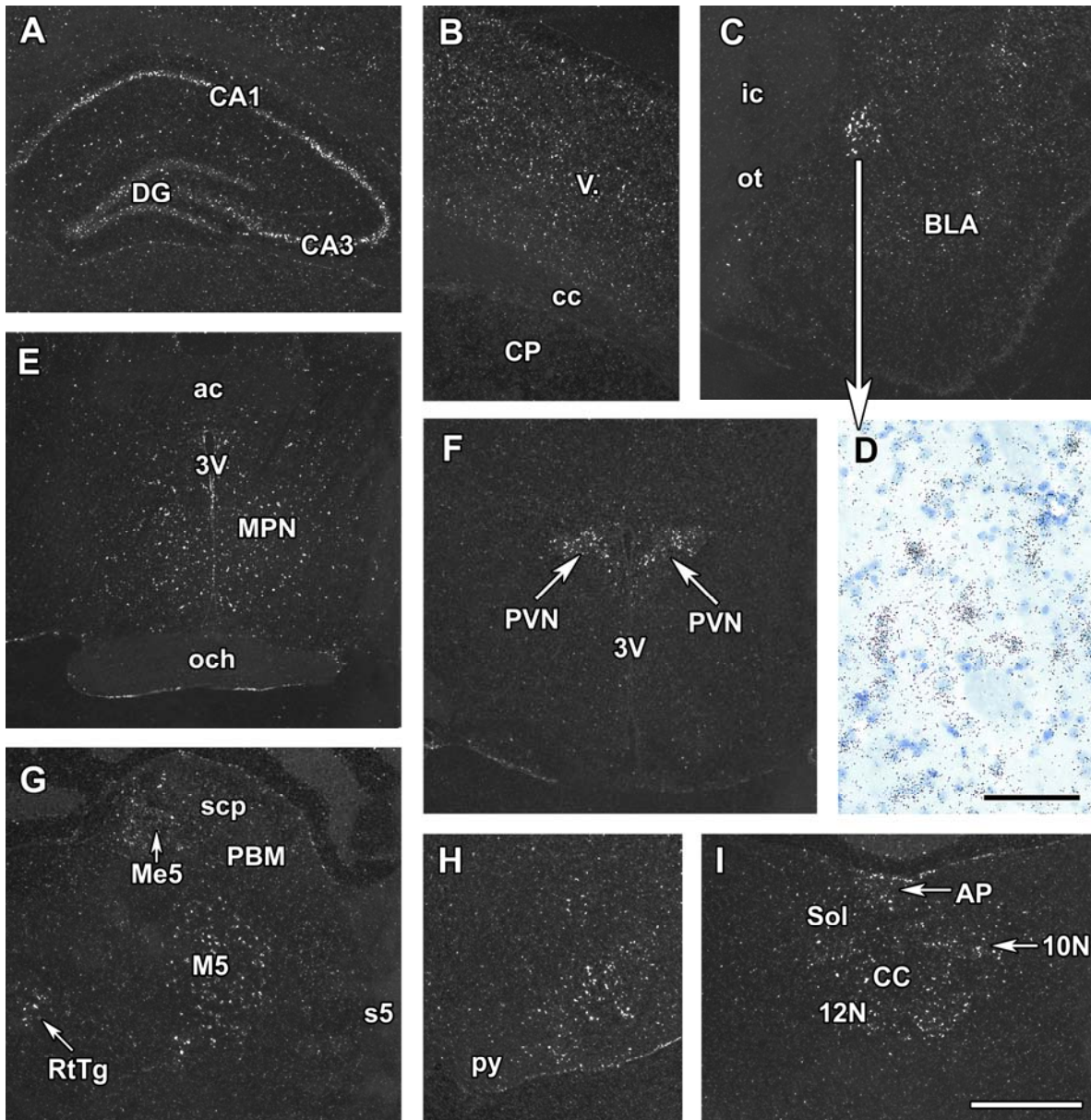
A T7 szekvenciával együtt (32 bázispár) a próbák számított mérete: TGF- β 1A-nél 449 bázispár, 488 bázispár a TGF- β 1B-nél, 318 bázispár a TGF- β 2A-nál, 437 bázispár a TGF- β 2B-nél, 330 bázispár a TGF- β 3A-nál, 473 bázispár a TGF- β 3B-nél. A gél jobb oldalán található DNS létra mutatja, hogy a készített próbák hossza megfelel a számított értékeknek. A PCR termékek specifikusságát ezután szekvenálással is bizonyítottuk.

5.2. A TGF- β expressziójának topográfiai eloszlása intakt patkány agyban

Az in situ hibridizáció mindhárom TGF- β mRNS expresszióját kimutatta patkány agyban (6-8. ábra). Minden egyes TGF- β altípusra két antiszenz hibridizációs próbát készítettünk, ezek azonos hibridizációs mintázatot mutattak, emiatt egyenként nem kerülnek leírásra. A cortexben mindhárom TGF- β mRNS-e megtalálható volt, az egyes cortikális rétegekre specifikus eloszlásban. Az I-es réteg nem tartalmazott TGF- β mRNS-t. A TGF- β 1 legkifejezettebben az V-ös rétegben volt jelen, ezenkívül a II-es és VI-os réteg is tartalmazta (6B ábra). A TGF- β 2 igen kifejezetten expresszálódik az V-ös réteg belső részében, a VI-os rétegben, kevésbé erősen a többi cortikális rétegben (7A ábra). Ezzel szemben a TGF- β 3 expressziója az V-ös réteg külső részén volt jelentős, valamint az expresszió megfigyelhető a VI-os rétegben, közvetlenül a commissura felett (8A és 8B ábra). A hippocampusban is mindhárom TGF- β mRNS-e megtalálható volt, de expressziójuk intenzitása és eloszlása jelentős különbségeket mutatott: a TGF- β 1 az összes rétegben megtalálható volt (6A ábra). A TGF- β 2 a gyrus dentatusban mutatott jelentős expressziót ill. egyes hippocampalis sejtekben, szétszórtan (7A ábra). A TGF- β 3 a CA2 régióban expresszálódott a legintenzívebben, de megtalálható volt a piramissejtek rétegében is (8A ábra). A TGF- β -k az előagy többi részén is megtalálhatóak, de az egyes altípusok kifejezetten eltérő eloszlást mutattak. A TGF- β 1 a corpus amygdaloideumban főleg a centrális és medialis részben jelent meg (6C ábra). A TGF- β 2 expressziója az amygdala elülső részén volt jelentős. A corpus amygdaloideum basalis és laterális részében főleg a TGF- β 3 jelent meg (8C ábra). A nucleus interstitialis striae terminalis mérsékelt intenzitással mutatott TGF- β 1 és TGF- β 3 mRNS expressziót, a TGF- β 2 mRNS-ének expressziója ennél is kevesebb volt. A nucleus septalis medialisban és laterálisban mindhárom TGF- β megjelent. A legmagasabb intenzitást a nucleus septalis laterálisban a

TGF- β 3 expressziója mutatta. TGF- β mRNS alig volt jelen a nucleus basalisban, viszont a substantia innominataban mérsékelt jelen volt a TGF- β 2 és TGF- β 3, a TGF- β 1 kevésbé. A nucleus accumbens és a globus pallidus ventralis részében néhány TGF- β -t expresszáló sejtet találtunk, míg a nucleus caudatus, a putamen, a globus pallidus nagy része és a claustrum egyik TGF- β mRNS-ét sem tartalmazta. A thalamus gazdagon tartalmazta mindhárom TGF- β -t, de az egyes altípusok eloszlása igen jelentős eltérést mutatott. A TGF- β 1 mindenütt expresszálódott, kivéve a corpus geniculatum lateralét, ahol TGF- β 1 expresszió nem volt kimutatható. A nucleus parafascicularis (7D ábra) és a mediális thalamikus magok gazdagon tartalmaztak TGF- β 2 mRNS-t, viszont a ventralis magban és a többi thalamusmagban a TGF- β 2 nem volt jelen. A thalamus összes magja tartalmazott TGF- β 3-at, azonban az expresszió főleg a mediális thalamikus magokban és a nucleus reticularisban, valamint a nuclei anterioresban és ventralesben volt a leggazdagabb (8E ábra). Általánosságban kijelenthető, hogy a thalamusban a TGF- β 3 expresszálódott a legerősebben. A TGF- β -k eloszlása a hypothalamusban is erősen lokalizált volt. A TGF- β 1 jelent volt az area preopticanban, főleg a nucleus preopticus medialisban (6E ábra). Jelentős TGF- β 1 expressziót mutatott a nucleus paraventricularis, főleg a kissejtes része (6F ábra), míg a többi hypothalamicus magban kevésbé vagy egyáltalán nem expresszálódott. A TGF- β 2 mRNS-ének expressziója az area hypothalamica posteriorban és a nucleus mamillaris medialis medialis subdivíziójában volt a legerősebb. Ezekon a területeken kívül az area preoptica medialis és a nucleus supraopticus tartalmazott számottevő mennyiségű TGF- β 2-t, míg a nucleus arcuatus, az area hypothalamica lateralis, a nuclei ventromedialis und dorsomedialis egyáltalán nem tartalmazott TGF- β 2-mRNS-t. A TGF- β 3 expressziós mintázata jelentősen eltért a másik két altípustól. Igen jelentős TGF- β 3 expressziót mutatott a nucleus supramamillarius, a nucleus arcuatus, (8D ábra) az area hypothalamica, a preoptikus area valamint a nucleus paraventricularis. A TGF- β 3 viszont nem jelent meg a nucleus supraopticusban, a nucleus dorsomedialisban és ventromedialisban. A középagyban is megjelent mind a három TGF- β mRNS-e. A TGF- β 1 a legdominánsabban a substantia nigraiban, a nucleus ruberben, az area tegmentalis ventralisban, a nucleus interpeduncularisban jelent meg, míg ezekben a magvakban a TGF- β 2 és- β 3 expressziója elhanyagolható volt. A zona incerta, az area pretectalis, a substantia grisea centralis, a raphe

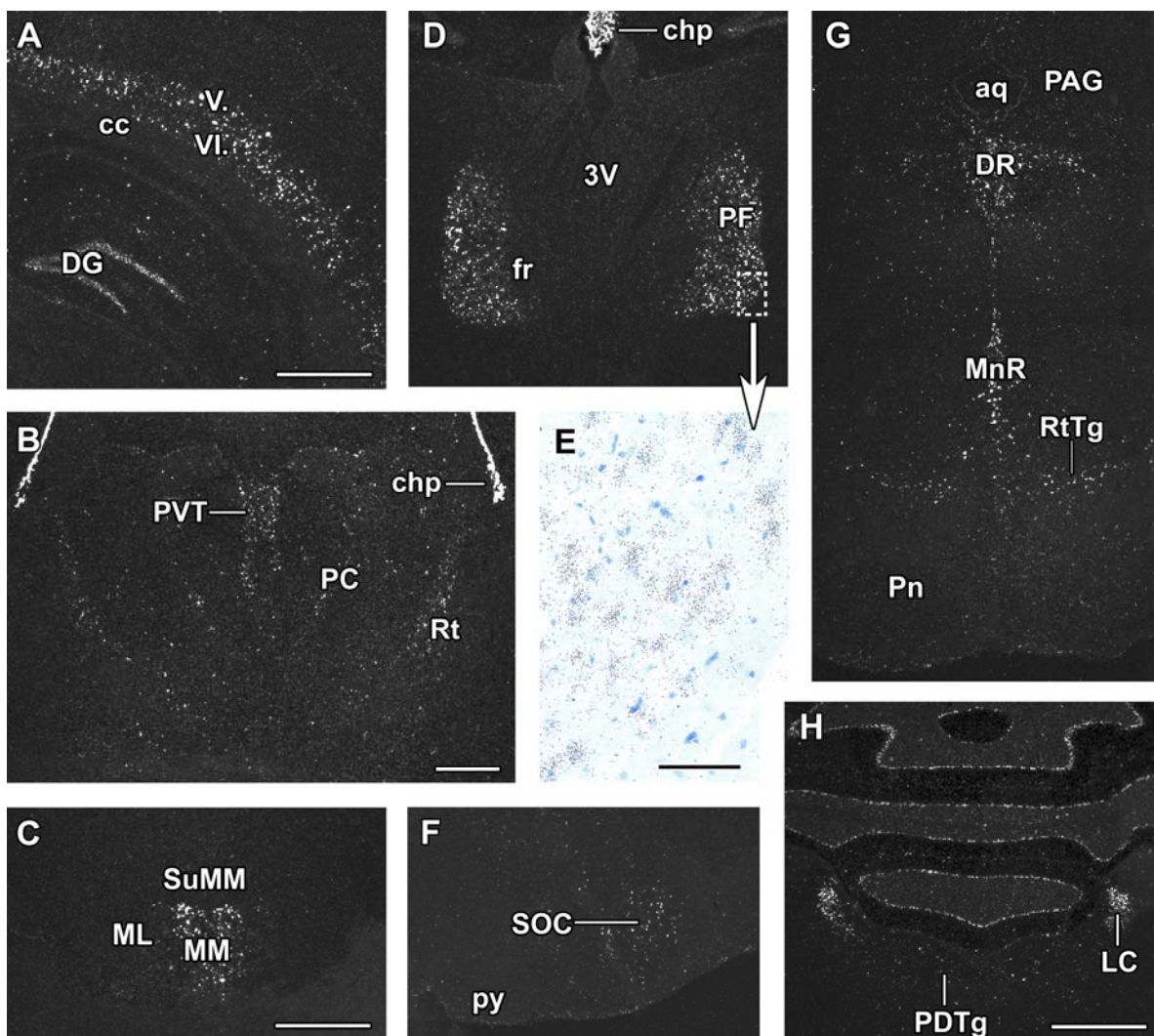
magvak, a colliculus inferior és a nucleus cuneiforme mutatott gyengébben TGF- β 1 mRNS expressziót. Ezzel szemben a TGF- β 2 expressziója igen jelentős volt a nucleus dorsalisban, a raphe magvakban, kissé kevésbé jelentkezett a substantia grisea centralisban, a nucleus nervi oculomotoriiban, a colliculus inferiorban és a nucleus cuneiformeiban. A zona incertaban, az area pretectalisban és a colliculus superiorban viszont elenyésző mennyiségben volt jelen. Az utóbbi középagy területén azonban jelentős TGF- β 3 mRNS-t tartalmazott a felszíni rétegeiben (8F ábra). A TGF- β 3 szintén jelen volt több más középagy régióban is, bár csak kisebb mennyiségben. A hídban és a nyúltvelőben a TGF- β -k eloszlása hasonló volt. Az oliva superior a hídi és a nyúltvelői formatio reticularis, az agyidegek szomatomotoros magjai valamint az area postrema bőségesen tartalmazta mindhárom TGF- β -t (6H, 7F ábra, 8H ábra). Közepes intenzitással jelen volt mindhárom TGF- β a nucleus lemniscusban, a nucleus tegmentalisban, a parabrachialisban, a szenzoros trigeminusmagvakban, a raphe magvakban, a nucleus cochlearesokban, a paragingantocelluláris magban valamint a lateralis retikuláris magvakban. Különbség a locus coeruleus, a nucleus tractus solitariiban és a nucleus reticularis nagysejtes részében volt: ezek a magvak jelentős TGF- β 2 expressziót mutattak, míg a TGF- β 1 és TGF- β 3 mRNS alig volt jelen. Ezzel szemben a nuclei pontis alig tartalmazott TGF- β 2-t, de megjelent benne a TGF- β 1 és TGF- β 3. Feltűnő volt, hogy az oliva inferior igen gazdagon tartalmazott TGF- β 3 mRNS-t (8I ábra), viszont alig volt TGF- β 1 jelölődés valamint a TGF- β 2-től teljesen mentes volt. A cerebellumban a legerősebb expressziót a TGF- β 2 mutatta, főleg a Purkinje sejtek és kevésbé jelentősen a granuláris sejtréteg (7H ábra). Minden réteg egynéhány sejtje tartalmazott TGF- β 1-et, míg TGF- β 3 egyáltalán nem jelent meg a cerebellumban. A plexus choroideusban igen erős jelet adott a TGF- β 2 (7B és 7D ábra), kevésbé intenzíven jelölt a TGF- β 1 és β 3. A plexus choroideus minden agykamrában azonosan jelölődött. A TGF- β expresszáló sejtek eloszlását sematikusán a 9. ábra mutatja be.



6. ábra

Az in situ hibridizációs metszeteken a sötét látóteres mikroszkópos felvételeken mutatjuk be a TGF- β 1 mRNS-ének expresszóját az A: a hippocampusban, B: a cortexben, C: a nucleus amygdaloideumban, E: az area preopticában, F: a hypothalamus nucleus paraventriculárisában és annak környező területeiben, G: a híd dorsalis részében, H: az oliva superiorban, I: a nucleus dorsalis nervi vagiban, az area postremában és a nucleus tractus solitarii-ban. A C képen kijelölt területet világos látóterű, nagy nagyítású felvételen a D képen mutatjuk meg: látható, hogy a TGF- β mRNS-nek megfelelő egyedi

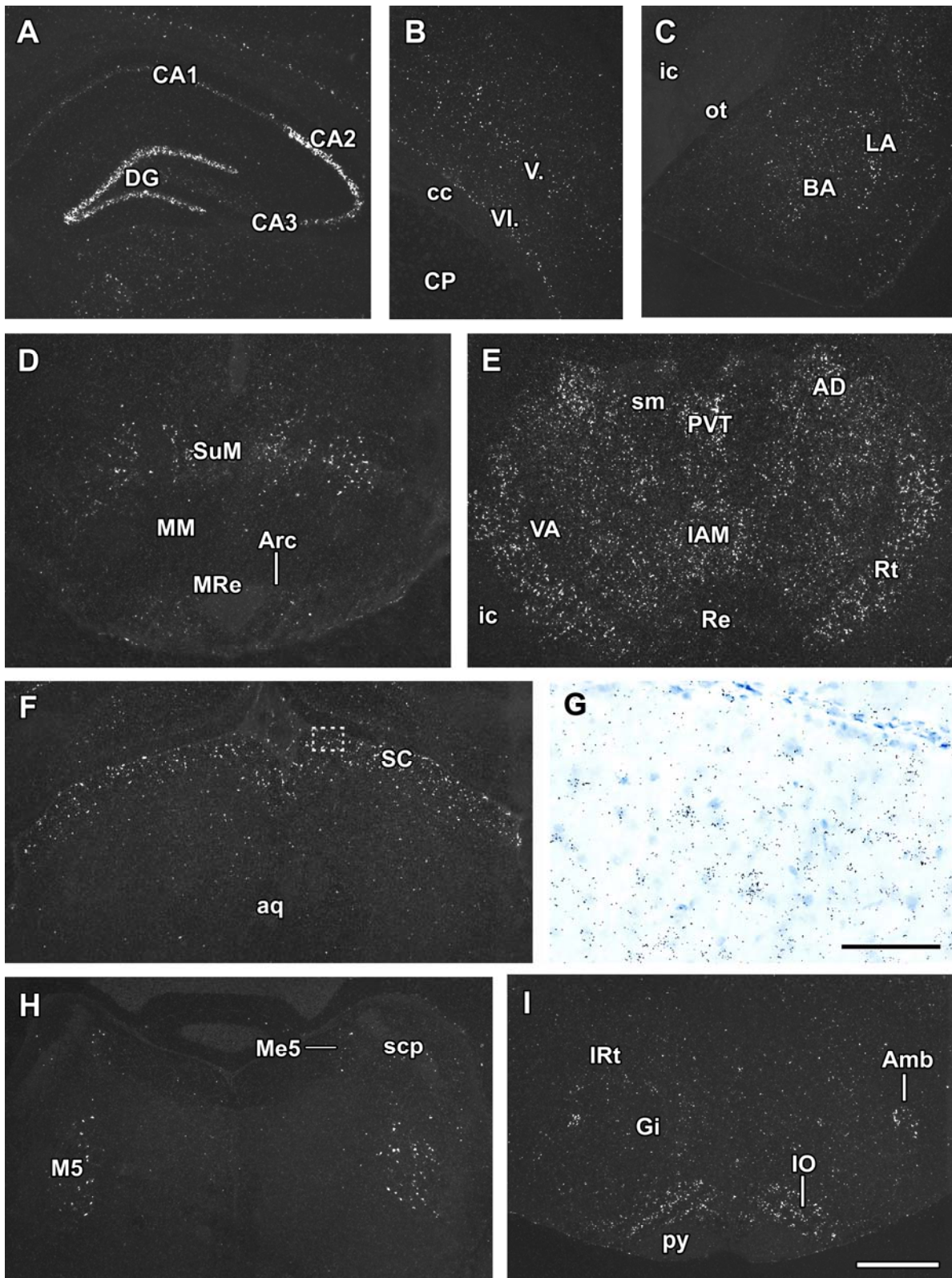
autoradiográfiás szemcsék fekete jelként a sejtestek felett jelölődtek. A sötét látóteres képeken ezek az egyéni autoradiográfiás pontok a sejtek felett összeolvadva fehér jelként egy-egy pozitív sejtet jelölnek. Lépték 1 mm a sötét látóteres, 100 μ m a világos látóteres D felvétel esetén.



7. ábra

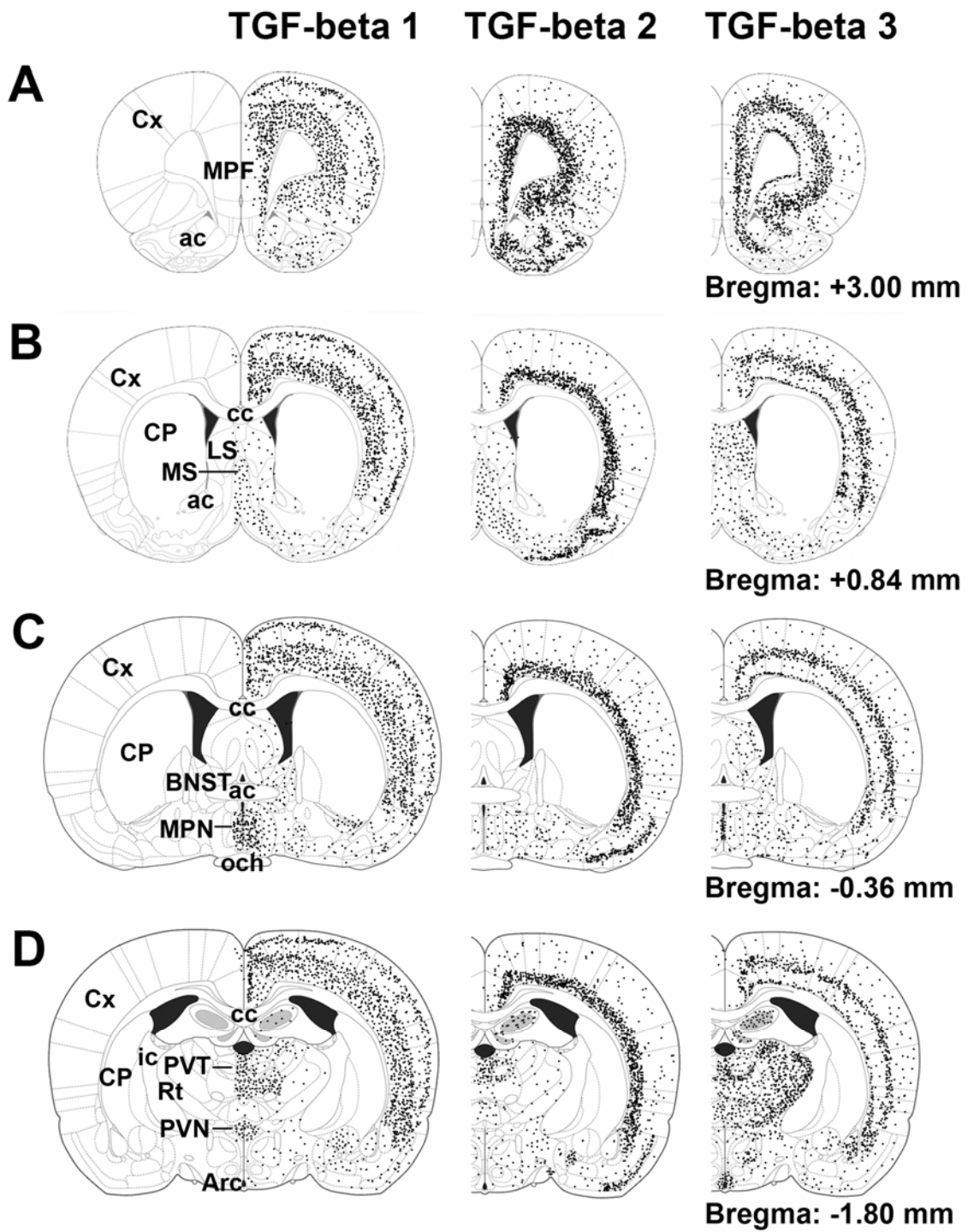
Az in situ hibridizációs metszeteken a sötét látóteres mikroszkópos felvételeken mutatjuk be a TGF- β 2 mRNS-ének expresszóját az A: a cortexben és hippocampusban, B: a thalamusban és a plexus choroideusban, C: a medialis nucleus mamiliariusban, D: a thalamus nucleus parafascicularisában és a plexus choroideusban, F: az oliva superiorban,

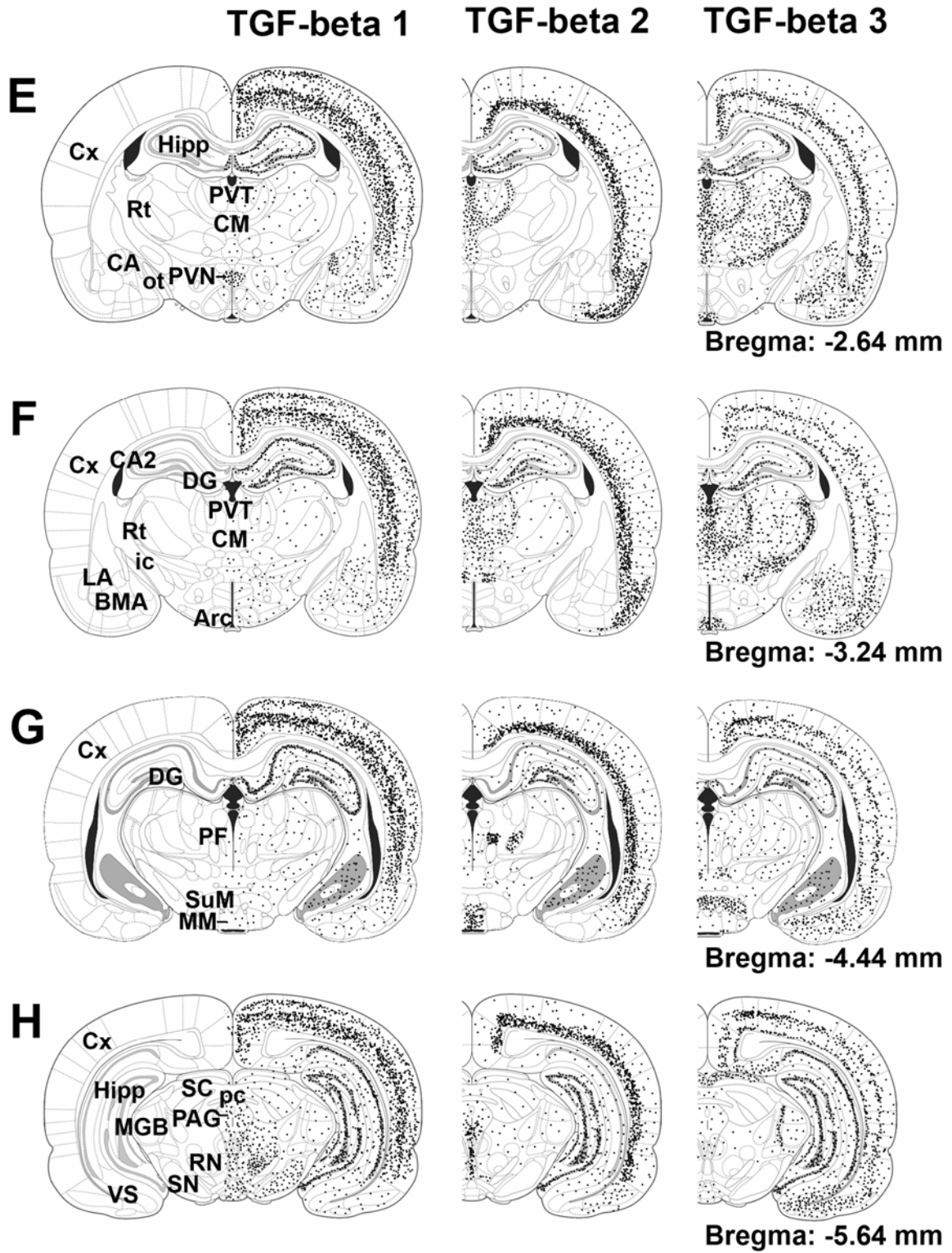
G: a középagy raphe magvaiban, H: a locus coeruleusban, a híd nucleus tegmentalisában valamint a cerebellumban. A D képen kijelölt területet világos látótérben, kinagyítva az E képen mutatjuk meg, hogy az egyes autoradiográfiás szemcsék fekete jelként a sejtestek felett láthatóak. Lépték 1 mm a sötét látóterés, 100 μ m a világos látóterés E felvétel esetén.

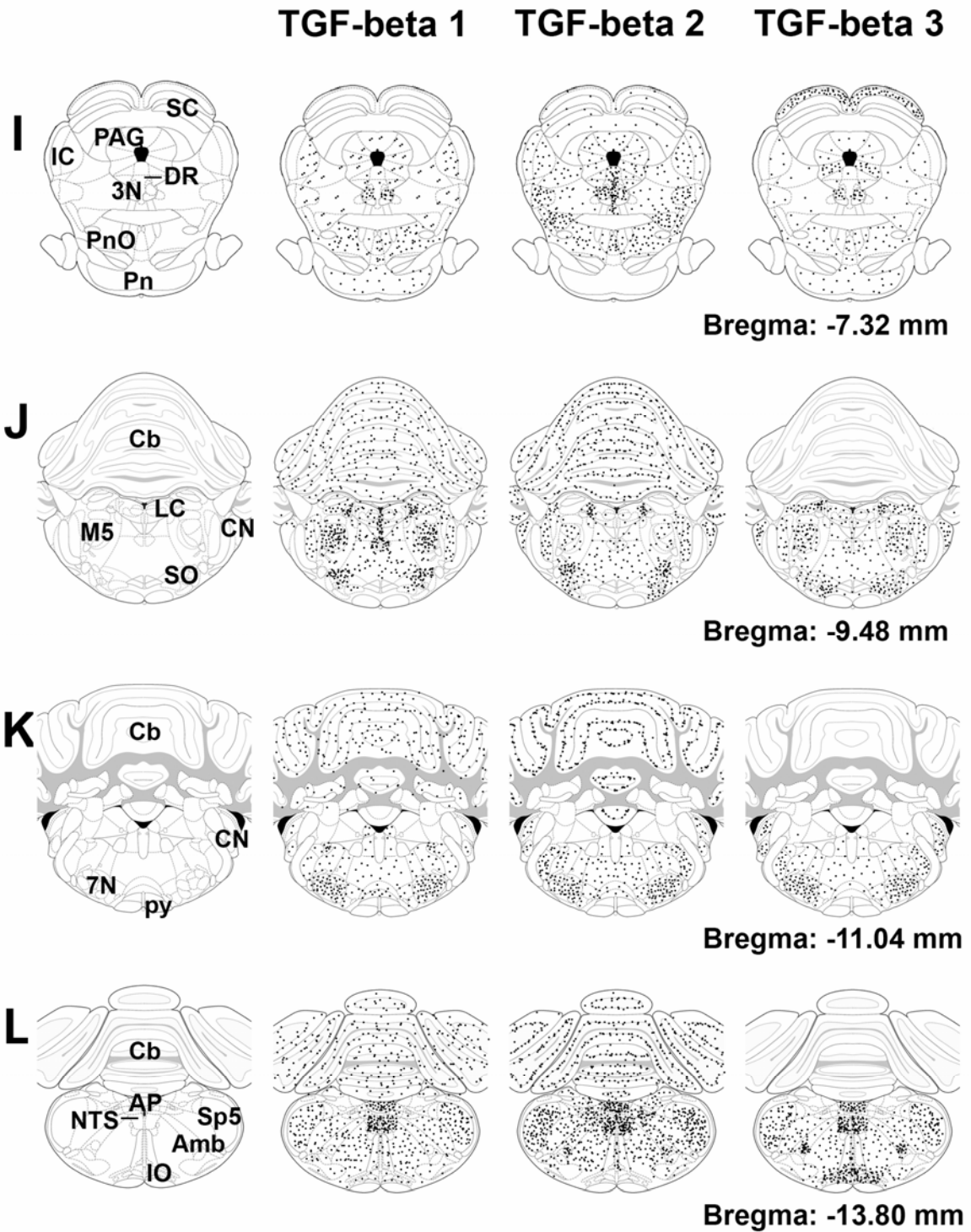


8. ábra

Az in situ hibridizációs metszeteken a sötét látóteres mikroszkópos felvételeken mutatjuk be a TGF- β 3 mRNS-ének expresszióját az A: a hippocampusban, B: a cortexben, C: az amygdalában, D: a nucleus arcuatusban és a supramamilláris magokban, E: a középvonali thalamicus magokban, F: a colliculus superiorban, H: a nucleus motorius nervi trigeminiben, a nucleus reticularisban és a parabrachialis magokban, I: az oliva inferiorban, nucleus reticuláris gigantocelluláris sejtjeiben valamint a nucleus ambiguusban. A D képen kijelölt területet világos látótérben, kinagyítva a G képen mutatjuk meg: a TGF- β 3 mRNS-nek megfelelő egyedi autoradiográfiás szemcsék fekete jelként láthatóak a sejtestek felett. Lépték 1 mm a sötét látóteres, 100 μ m a világos látóteres G felvétel esetén.



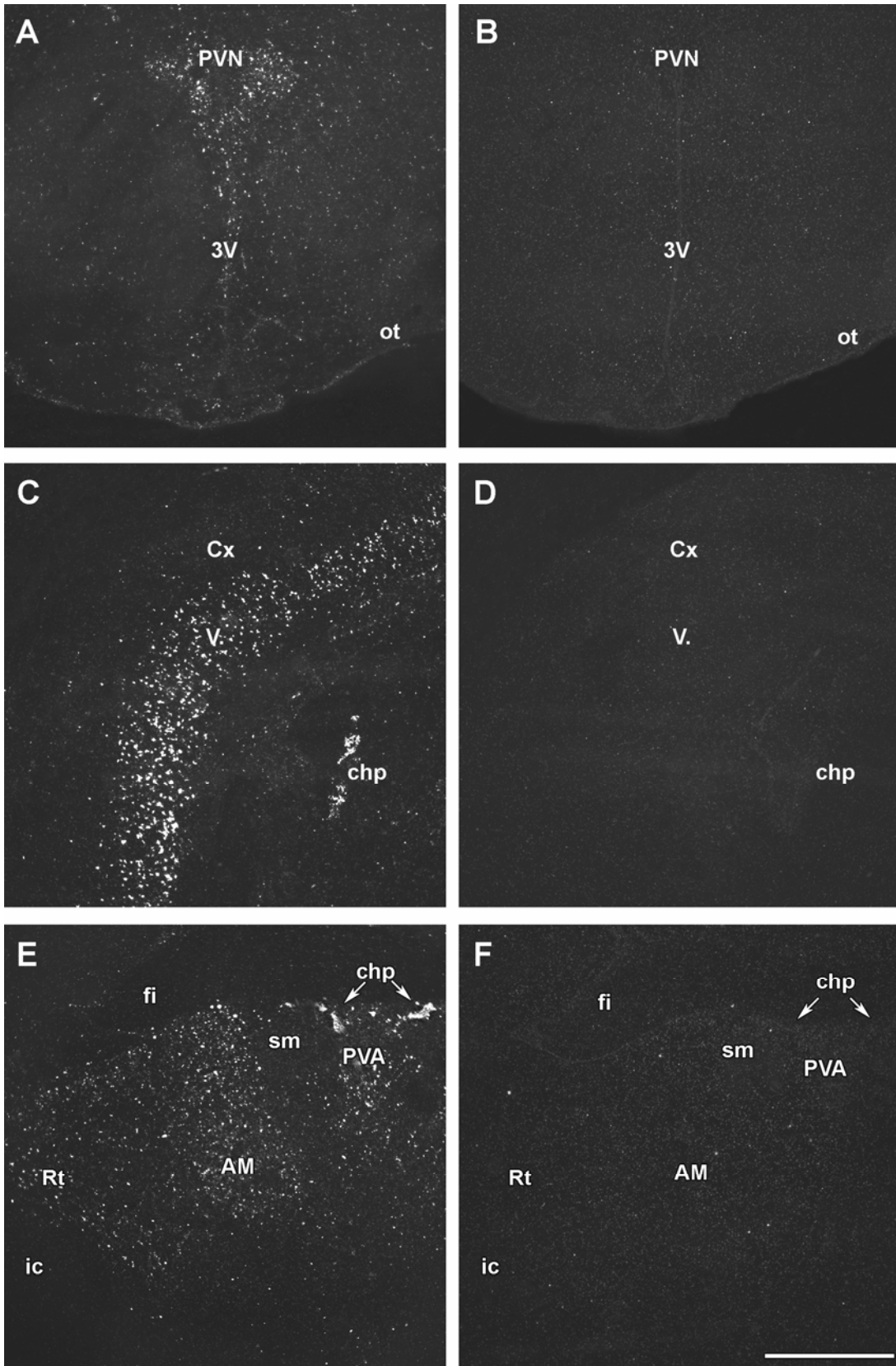




9. ábra

A TGF- β expresszázó sejtek eloszlásának sematikus bemutatása patkány agyban. A sematikus ábrákat Paxinos és Watson (2005) atlaszából vettük át. A TGF- β -t expresszázó sejteket a megfelelő denzitásban fekete pontokkal jelöltük. A bal oldali oszlopban az egyes agyi területeket mutatjuk be, a következő oszlopban a TGF- β 1 ezen területen jelentkező expresszióját jelöltük. A középső oszlopban a TGF- β 2, a jobb oldalon a TGF- β 3 expresszióját mutatjuk be. A betűk (A-L) különböző rostrocaudális szinteket jelölnek, melyekhez tartozó bregma értékek a panelek jobb alsó sarkában vannak feltüntetve.

A hibridizáció specifikusságát szensz próbákkal elvégzett in situ hibridizációval kontrolláltuk. A szensz kontroll próbákkal történt in situ hibridizáció során a TGF- β -k egyetlen agyi területen sem jelölődtek (10. ábra).

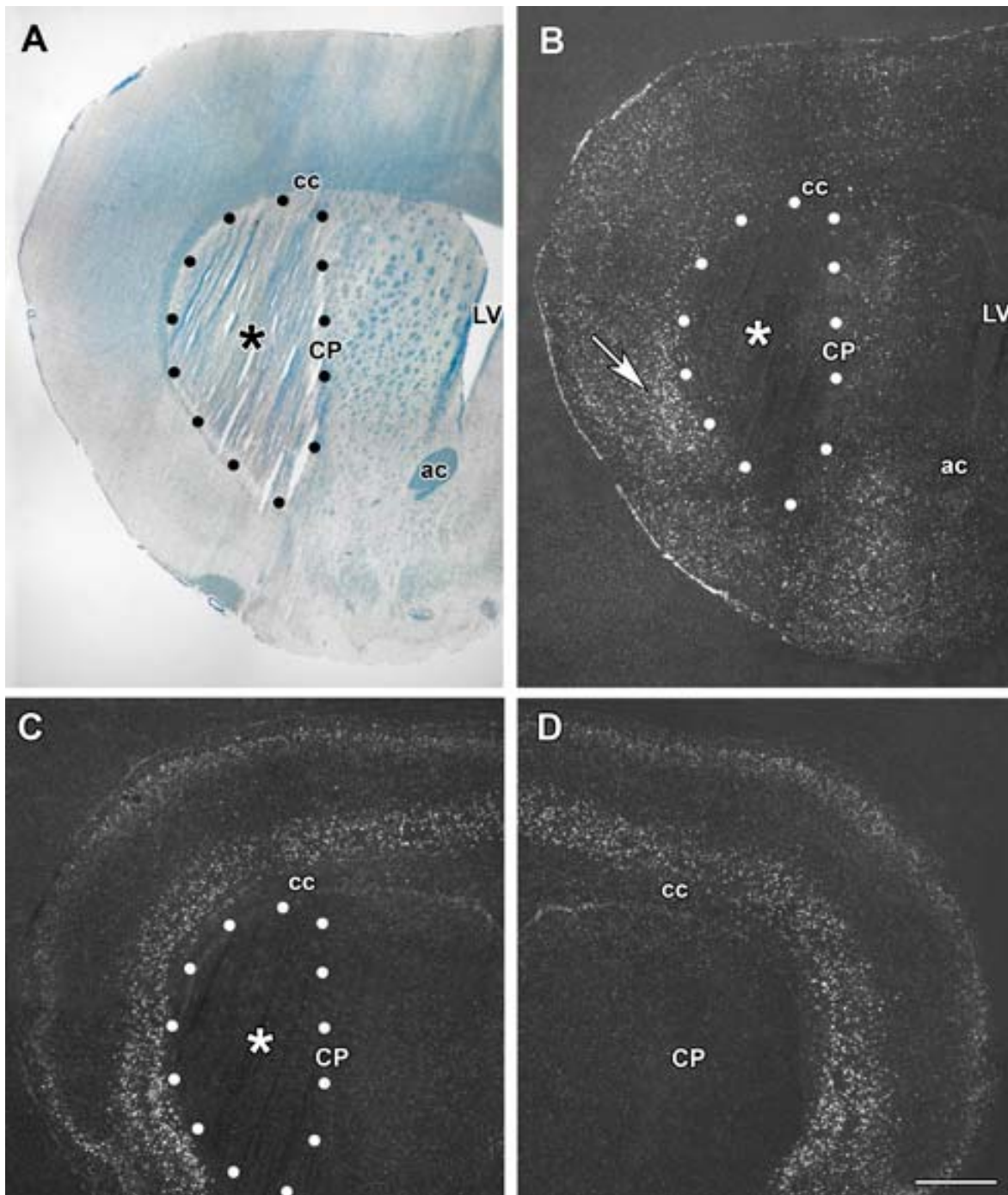


10. ábra

Az in situ hibridizációs metszetekről készült sötét látóterű mikroszkópos képek a TGF- β -k szensz kontrollal történő in situ hibridizációja során a jelölés hiányát mutatják be. A: A hypothalamus nucleus paraventriculárisában jelentkező TGF- β 1 mRNS antiszensz próba esetén. B: ugyanennek a területnek megfelelő metszet TGF- β 1 szensz kontrollal végzett in situ hibridizációja esetén nincs jelölés. C: a TGF- β 2 mRNS eloszlása a cortexet tartalmazó metszeten antiszensz próba esetén. A jelölés az V. cortikális rétegben, és a laterális agykamra plexus choroideusában intenzív. D: azonos területnek megfelelő metszeten TGF- β 2 szensz kontroll próba esetén nem következik be jelölés. E: A TGF- β 3 eloszlása az elülső thalamusban antiszensz próbával. A TGF- β 3 mRNS a thalamus nucleus paraventriculárisában, a thalamus retikuláris magjában és a thalamus anteromediális magját is magába foglaló elülső részében van jelen. F: ugyanennek a területnek megfelelő metszeten kivitelezett in situ hibridizáció TGF- β 3 szensz kontroll próbák használata esetén nem mutat jelölést. Lépték = 1 mm

5.3. A TGF- β fehérjék mRNS eloszlásának változása MCAO esetén**5.3.1. Tranziens MCAO után 3 órával**

Az artéria cerebri média 1 óráig tartó okklúziója 3 órával az iszkémiát követően szövettanilag látható léziót okozott. Giemsa festéssel megfigyelhető, hogy a striatum laterális részén a szövet struktúráját elveszti (11A ábra). Az infarktuson belül egyik TGF- β nem volt jelen, de a TGF- β 1 indukciója a lézió szélén már megfigyelhető. A TGF- β 1 indukciója a striatum nem lézionált részén jelentkezett (11B ábra). Az áloperált állatokban ezen a területen nem volt expresszió megfigyelhető. A TGF- β 1 az agykéregben is megjelent. A legintenzívebb jelölés a léziótól laterálisan, az inzuláris és a frontális szomatoszenzoros kéregben volt jelen. Ezzel szemben a TGF- β 2 (11C és 11D ábra) és TGF- β 3 mRNS eloszlása nem változott sem az intakt sem az áloperált állatokhoz viszonyítva, így indukciójuk sem volt látható.



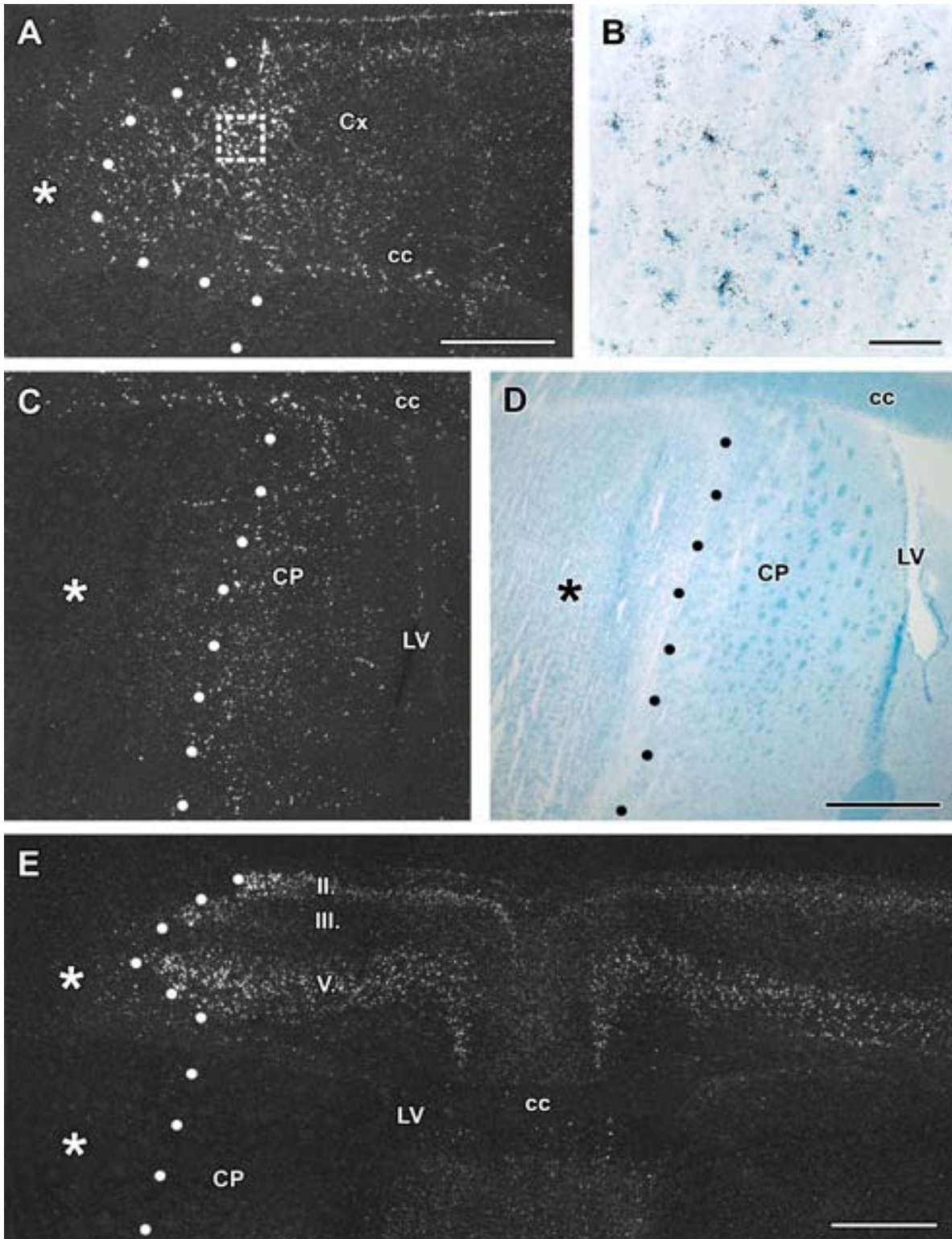
11. ábra

Az in situ hibridizációs metszeteken a sötét látóteres mikroszkópos felvételeken mutatjuk be a TGF- β -k mRNA expressziójának indukcióját 3 órával az MCAO-t követően. A léziót *-gal, a lézió határát pontozással jelöltük. A: Giemsa festés mutatja a léziót a striatumban.

B: ugyanaz a metszet sötét látótérrel mutatja a TGF- β 1 mRNS indukcióját a lézió körül. Nagy fehér nyíl mutatja a legkifejezettebben indukálódó, a léziótól laterálisan elhelyezkedő cortikális területet. C: TGF- β 2 mRNS eloszlása a léziótól ipszilaterálisan. D: TGF- β 2 mRNS eloszlása ugyanazon a metszet intakt oldalán, az eloszlás és a jelölés intenzitása az agy mindkét oldalán azonos. Lépték 1 mm.

5.3.2. *Tranziens MCAO után 24 órával*

MCAO után 24 órával a striatumot és az ipszilaterális cortex nagy részét érintő lézió keletkezett. A TGF- β 1 mRNS a lézió széli területén a cortex mindegyik rétegében és a striatumban jelent meg (12A-C ábra). A TGF- β 2 a lézióval szomszédos agykéreg specifikus rétegeiben indukálódott, a striatumban viszont nem (12E ábra). Az indukció intenzitása a II-es és V-ös cortikális rétegben volt a legkifejezettebb, amelyek az intakt patkányagyban is tartalmaznak TGF- β 2-t, valamint a III-as rétegben is megjelent egy-egy jelölt sejt. A TGF- β 3 indukciója a lézió körül csak a II. rétegben volt látható.

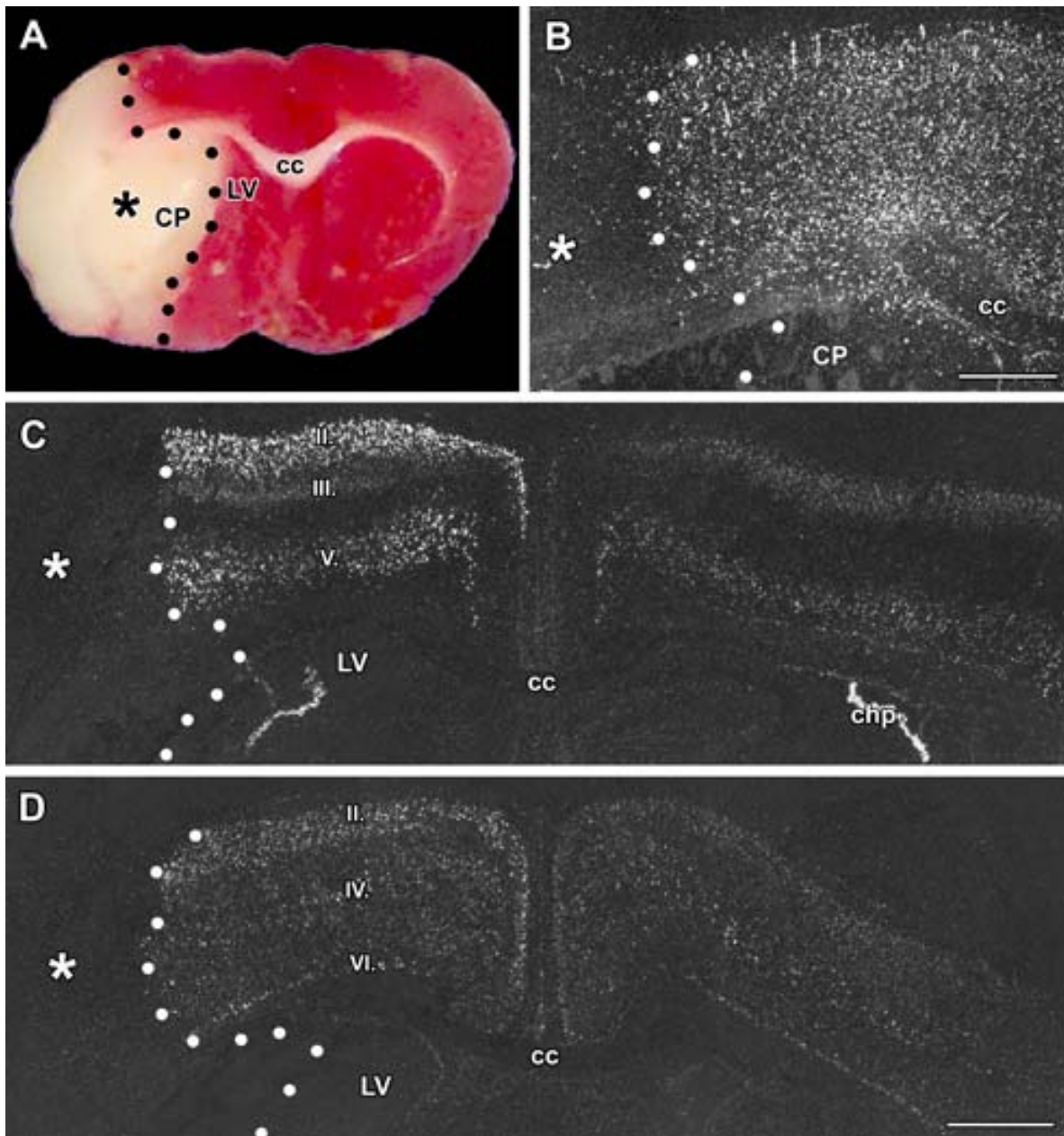


12. ábra

A TGF- β 1 és - β 2 mRNS expressziójának indukciója 24 órával a transziens MCAO-t követően. A léziót *-gal, a lézió határát pontozással jelöltük. A: TGF- β 1 expressziója a lézió körüli cortex mindegyik rétegében indukálódik. B: az A képen bekeretezett terület világos látótérben, nagy nagyítással: az autoradiográfiás szemcsék a Giemzával megfestett sejtestek felett helyezkednek el. A TGF- β 1 az iszkémia körül indukálódik. C: a TGF- β 1 indukálódik a striatum iszkémiás, széli részén. D: Ugyanaz a metszet világos látótérrel mutatja az anatómiai struktúrákat. E: a TGF- β 2 a II, III és V-ös, a lézióval ipszilaterális cortexben, főleg a lézió mellett indukálódik. Lépték 1 mm az A, C, D és E képeknél, 100 μ m B képnél.

5.3.3. Permanens 24 órás MCAO után

Az artéria cerebri media permanens elzárása következtében kialakuló nagy lézió az azonos oldali striatum és az agykéreg jelentős részét érintette (13A ábra). A TGF- β -k mRNS indukciója sokkal kifejezettebbé vált, mint a transziens MCAO során. A TGF- β 1 mRNS-e nagyobb területet foglalt el, mint a transziens okklúzió után ugyanebben az időpontban (13B ábra). A TGF- β 2 indukciója továbbra is a II-es, III-as és V-ös cortikális rétegre korlátozódott, továbbá, az indukció nemcsak a lézió szomszédos széli részében jelent meg, hanem az ipszilaterális agykéregben egészen a középvonalig felerősödött (13C ábra). Azonban a kontralaterális cortexben TGF- β 2 indukció nem volt megfigyelhető. A TGF- β 3 indukciója a TGF- β 2-höz hasonló mintázatot mutatott az azonos oldali agykéreg II-es rétegében. Ezzel ellentétben, az intakt patkányagykéregben TGF- β 3-at expresszáló IV-es és VI-os réteg sejteiben az indukció nem következett be (13D ábra).



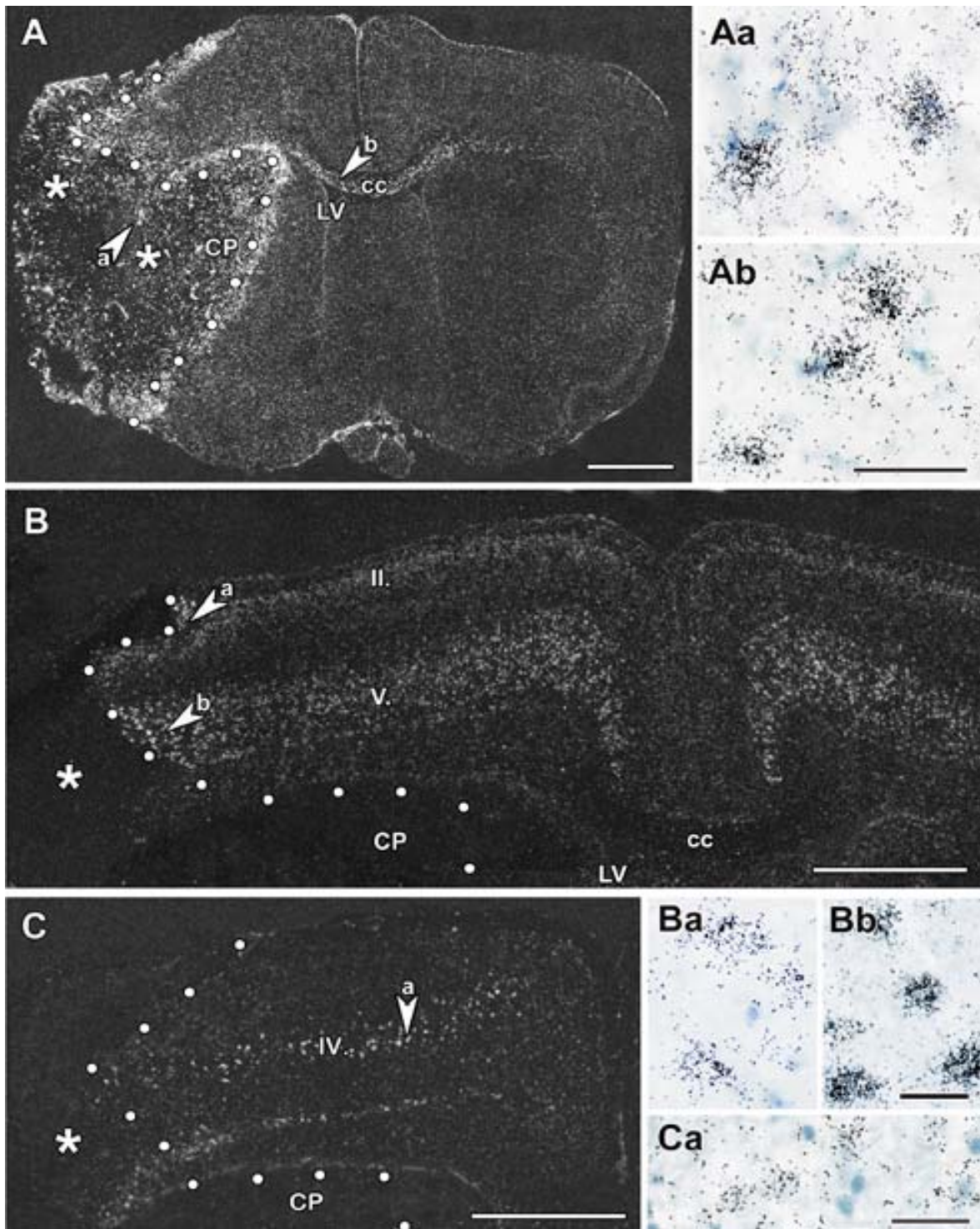
13. ábra

A TGF- β 1,- β 2 és- β 3 mRNS expressziójának indukciója 24 órás permanens MCAO-t követően. A léziót *- gal, a lézió határát pontozással jelöltük. A: TTC festés igazolja az iszkémia létrejöttét az agyszöveten. B: A TGF- β 1 expressziója az iszkémia körüli területen indukálódik. C: a TGF- β 2 a lézióval ipsilaterális II-es, III-as és V-ös cortikális rétegben indukálódik. Az indukció a II-es és III-as ipsilaterális rétegben a legszembetűnőbb, a

jelölés a kontralaterális oldalhoz képest sokkal intenzívebb. D: a TGF- β 3 a lézióval ipszilaterális II. cortikális rétegben indukálódik. Lépték 1 mm.

5.3.4. *Tranziens MCAO után 72 órával*

Tranziens MCAO után 72 órával a lézió körül a TGF- β 1 expressziója emelkedett maradt. Továbbá, az infarktus területén belül valamint a corpus callosumban számos TGF- β 1-et termelő sejt jelent meg (14A ábra). A TGF- β 2 és- β 3 mRNS expressziója az intakt állapothoz hasonlóra csökkent (14B-C ábra). A TGF- β 2 és- β 3 mRNS nem jelent meg a lézió belül.

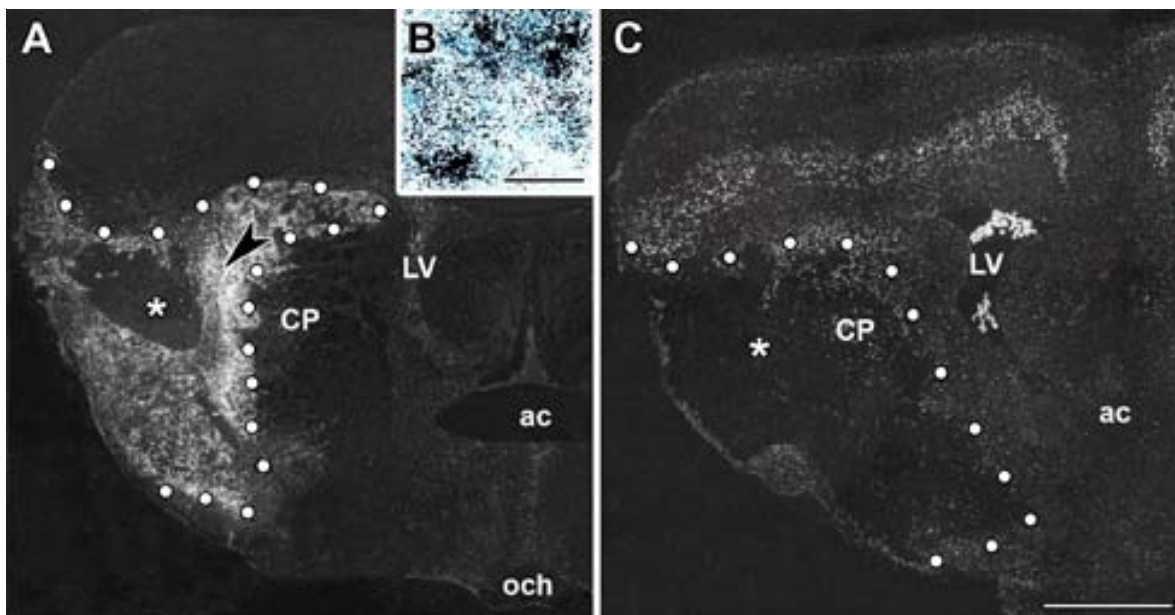


14. ábra

A TGF- β 1,- β 2 és- β 3 mRNS expressziójának indukciója 72 órával tranziens MCAO-t követően. A léziót *-gal, a lézió határát pontozással jelöltük. A: A TGF- β 1 expressziója a lézió körül és a lézió területén belül indukálódik. Továbbá, a corpus callosumban is TGF- β 1 mRNS jelenik meg. Nagy nagyítású világos látóteres képen igazoljuk, hogy a TGF- β 1 mRNS a sejttestek felett akumulálódik, mind az iszkémás területen (Aa), mind a corpus callosumban (Ab). B: A TGF- β 2 a II, III és V-ös kortikális rétegben van jelen. A lézió szélén csak egy pár sejt mutat emelkedett expressziót. A II-es (Ba), és V-ös (Bb) rétegben nagy nagyítású világos látóteres képen mutatunk meg a TGF- β 2 mRNS-ének akumulációját a sejttestek felett. C: a TGF- β 3 a IV cortikális réteg egyes sejtjeiben megfigyelhető, de az expresszió szintje nem magasabb, mint intakt állatban. Nagy nagyítású világos látóteres képen mutatjuk a TGF- β 3 mRNS akumulációját a IV. cortikális réteg sejttestjei felett. Lépték: 2 mm az A, 1 mm a B és C, 50 μ m az Aa, Ab, Bb és Ca kép esetén.

5.3.5. Tranziens MCAO után 1 hónappal

Tranziens MCAO után 1 hónappal az infarktuson belül a TGF- β 1 indukciója igen emelkedett maradt, míg az infarktuson kívüli területen csökkent (15A ábra). Az agykéregben a TGF- β 2 és - β 3 expressziója továbbra is a léziót megelőző szinten maradt (15C ábra). A lézióon belül valamint a lézió határán néhány TGF- β 2-t expresszáló sejt jelent meg.



15. ábra

A TGF- β 1 és- β 2 mRNS expressziójának indukciója 1 hónappal transziens MCAO-t követően. A léziót *-gal, a lézió határát pontozással jelöltük. A: TGF- β 1 mRNS az iszkémián belül bőségesen jelen van. B: az A képen fekete nyílfejjel jelölt területet kinagyítva világos látótérrel mutatjuk meg, hogy megmutassuk, a legsűrűbb TGF- β 1 jel is az egyes sejtestek felett akkumulálódott autoradiográfias szemcséket jelöli. C: TGF- β 2 mRNS az iszkémián belül néhány sejtben van jelen. A lézió kívül a TGF- β 2 mRNS-ének eloszlása a cortexben az intakt patkány agyhoz hasonló mintázatot mutat, de a TGF- β 2 mRNS expresszió nem indukálódott. Lépték: 50 μ m a B, 2 mm C kép esetén.

6. MEGBESZÉLÉS

Eredményeink szerint a TGF- β 1, - β 2 és - β 3 mRNS expressziója normál patkány agyban térben eltérő eloszlási mintázatot mutat. Ezeket a mintázatokat hasonlítjuk össze egyrészt azon korábbi irodalmi adatokkal, melyek az immunreaktivitás alapján írták le az egyes TGF- β fehérjék lokalizációját, valamint az LTBP-k eloszlásával.

6.1. A TGF- β 1, - β 2 és - β 3 mRNS expressziójának összehasonlítása a TGF- β immunreaktivitással intakt patkány agyban

Az RT-PCR mindhárom TGF- β expresszióját kimutatta patkány agyban. Ezekben az RT-PCR kísérletekben a kontamináció lehetőségét többszörösen korlátoztuk. A kereszt kontaminációt kizártuk templat nélküli PCR reakciók indításával. A genomikus kontaminációt az RNS DNáz kezeléssel zártuk ki. Ennek eredményességét azzal ellenőriztük, hogy a tervezett primerek 2 különböző exonon helyezkedtek el, így genomikus szennyezés esetén az intron beékelődése miatt az abból keletkezett PCR termék hosszabb lett volna, mint az, amelynek a templatja a cDNS volt. Az in situ hibridizációs kísérleteink megerősítették és nagymértékben kiterjesztették az RT-PCR-ral nyert eredményeinket. Ezzel a technikával a gének részletes topográfiai elhelyezkedése vizsgálható. Elsőként írtuk le mindhárom TGF- β gén elrendeződését (1. táblázat). Az in situ hibridizációs próbákat úgy terveztük, hogy azok minden egyes TGF- β típus összes ismert mRNS változatát felismerje. Tehát az in situ hibridizációval nyert jel az összes, a szövetben jelen lévő TGF- β altípus különböző alternatív splicing formáját mutatja (Madisen és mtsai 1988; Koishi és mtsai 2000; Kriegstein és mtsai 2000; Konrad és mtsai 2007).

A TGF- β 1, - β 2 és - β 3 mRNS expressziója a különböző agyi területeken széleskörű eloszlást mutatott. Az expresszió térbeli szabályozására utal az, hogy az egyes altípusok mRNS eloszlása specifikus régiókra korlátozódott. Bizonyos területeken, mint pl. az area postremában és az agytörzsi motoneuronokban mindhárom TGF- β hasonló és igen erős expressziós mintázatot mutatott. Ez arra utalhat, hogy egy sejten belül a különböző altípusok ko-expresszálódnak. A legtöbb agyi területen azonban az eloszlás jelentősen különbözött. A cortexben a TGF- β -k eltérő rétegekben expresszálódtak. A TGF- β 1 a hippocampus minden rétegében, a TGF- β 2 főleg a gyrus dentatusban míg a - β 3 a gyrus

dentatusban és a CA2 régióban volt jelen. A cerebellumban a TGF- β 1 minden rétegben, a - β 2 a Purkinje sejtek rétegében jelent meg, a - β 3 mRNS-e viszont nem volt jelen. Továbbá, számos agyi területen csak egyetlen TGF- β altípus volt jelen. Pl. a mediális preoptikus area, a nucleus paraventricularis és centrális amygdalamagok kizárólagosan jelentős mennyiségű TGF- β 1 mRNS-t tartalmaztak. A nucleus mamillarius mediális magjában, a nucleus parafascicularisban és a plexus choroideusban főleg TGF- β 2 expresszálódott, míg a thalamus nucleus reticularisában, a colliculus superiorban, és az oliva inferiorban majdnem kizárólagosan csak - β 3 mRNS. Az, hogy a TGF- β -k és az LTBP-k neuronális vagy gliális eredetűek, fontos kérdés, amelyet dupla jelöléses vizsgálatok még nem vizsgáltak. Mindazonáltal a különböző eloszlási mintázatok és az mRNS expresszió nagy regionális eltérései neuronális eredet mellett szólnak, de további gliális expresszió is elképzelhető.

A TGF- β -k mRNS-ének eloszlási mintázata számos területen hasonlított a TGF- β immunreaktivitáshoz. A TGF- β 2 és - β 3 immunreaktivitás a II, III és V cortikális rétegben volt jelen, valamint jelenlétüket a cortikális réteg határozta meg, nem pedig az, hogy az agy melyik területét vizsgálták (Unsicker és mtsai 1991). Ez a TGF- β -k mRNS eloszlására is jellemző volt. Továbbá, a hippocampus különböző területein, a hypothalamicus- és amygdalamagokban TGF- β 2 és - β 3 immunreaktivitás volt jelen, amely korrelál a TGF- β -k mRNS eloszlásával ezen a területeken. Erős TGF- β 2 immunjel volt jelen a kisagy Purkinje sejtjeiben, az agytörzsi monoaminerg és motoneuronokban (Unsicker és mtsai 1991). Ezzel megegyezően ezek a területek különösen magas TGF- β 2 mRNS szintet tartalmaztak. Azonban a striatum, a legtöbb thalamicus mag és a colliculus superior szinte mentes volt a TGF- β 2 mRNS-től, mely megegyezik azzal, hogy ezeken a területeken nem volt TGF- β 2 immunpozitivitás sem (Unsicker és mtsai 1991). Ezekről a hasonlóságoktól eltekintve, jelentős eltéréseket is találtunk a TGF- β -k mRNS expressziója és immunreaktivitása között. A legfontosabb különbség, hogy az irodalmi adatok szerint a TGF- β 1 immunpozitivitás főleg és kizárólagosan a meningeális sejtekben és a plexus choroideusban jelentkezett (Unsicker és mtsai 1991; Komuta és mtsai 2009), míg kísérleteinkben a TGF- β 1 mRNS expressziójának ennél jóval széleskörűbb jelenlétét igazoltuk. Továbbá, a TGF- β 2 és - β 3 immunpozitivitás eloszlása az immunhisztokémiai vizsgálatokban teljesen megegyezett, és az eloszlására jellemző volt, hogy főleg a nagy multipoláris neuronokban jelentkezett

(Unsicker és mtsai 1991), valamint a TGF- β 2 szint számottevően magasabb volt (Bottner és mtsai. 2000). Ezzel szemben, a mi eredményeink jelentős különbséget mutattak a TGF- β 2 és- β 3 mRNS expressziós mintázatában. A TGF- β immunpozitivitás főleg a sejttetekben és kisebb mértékben a rostokban jelentkezett, így nem valószínű, hogy az eloszlásban megfigyelt különbségek a TGF- β -k sejttestből való transzportjából eredne. Valószínűbb, hogy az in situ hibridizáció és az immunhisztokémia eltérő szenzitivitása és szelektivitása az oka a tapasztalt különbségeknek.

Area	TGF - β 1	TGF - β 2	TGF - β 3
Forebrain			
Cerebral cortex			
Layer I	0	0	0
Layer II	+++	+	+
Layer III	+	+	+
Layer IV	+++	+	++++
Layer V	+++	++++	++
Layer VI	+	++	+++
Hippocampus			
CA1 region	+++	+	+
CA2/CA3 region	+++	+	++
Dentate gyrus	+++	+++	+++
Subiculum	++	++	++
Amygdala			
Central nucleus	+++	0	+
Basal nuclei	++	0	+++
Lateral nucleus	+	0	++
Medial nucleus	++	0	+
Cortical nucleus	+	0	+
Bed nucleus of the stria terminalis	++	+	++
Septum			
Medial septal nucleus	++	++	+
Lateral septal nucleus	+	++	+++
Basal nuclei			
Caudate-putamen	0	0	0
Globus pallidus	0	0	0
Claustrum	0	0	0
Accumbens nucleus	+	+	+
Ventral pallidum	0	+	+
Substantia innominata	+	++	++
Choroid plexus	++	++++	+
Diencephalon			
Thalamus			
Anteromedial nucleus	++	+	+++
Anterodorsal nucleus	++	+	+++
Anteroventral nucleus	++	+	+++
Midline nuclei	++	+++	++++
Parafascicular nucleus	+	++++	+
Ventral nuclei	+	0	+++
Reticular nucleus	+	+	++++

Habenular nuclei	++	+	++
Posterior nuclei	+	+	+
Medial geniculate body	+	+	++
Lateral geniculate body	0	+	+
Subthalamic nucleus	+	0	++
Hypothalamus			
Medial preoptic area	+++	++	++
Lateral preoptic area	+	+	+
Supraoptic nucleus	0	++	0
Anterior hypothalamic area	+	+	++
Paraventricular nucleus	+++	+	++
Arcuate nucleus	+	0	+++
Lateral hypothalamic area	+	0	+
Ventromedial nucleus	+	0	0
Dorsomedial nucleus	+	0	0
Posterior hypothalamic area	+	+++	++
Supramamillary nucleus	+	+	++++
Mamillary body	+	+++	+
Hindbrain			
Midbrain			
Zona incerta	++	+	++
Substantia nigra	+++	+	+
Red nucleus	++++	0	0
Ventral tegmental area	+++	0	+
Interpeduncular nucleus	+++	0	+
Pretectal area	+	+	+
Periaqueductal gray	+	++	++
Oculomotor nuclei	++	++	++
Raphe nuclei	+	++++	+
Superior colliculus	0	+	+++
Inferior colliculus			
Central nucleus	++	++	++
External cortex	++	++	+
Cuneiform nucleus	+	++	+
Pons			
Lemniscal nuclei	+	++	++
Locus coeruleus	++	+++	+
Tegmental nuclei	+	++	+
Parabrachial nuclei	++	+	++
Pontine nuclei	++	0	++
Superior olive	+++	+++	+++
Nucleus of the trapezoid body	+	+	++
Pontine reticular formation	+++	++	+++
Sensory (principal) trigeminal nu.	++	++	++
Motor trigeminal nucleus	++++	++	+++
Pontine raphe nuclei	++	+	+
Vestibular nuclei	+	+	+
Medulla Oblongata			
Cochlear Nuclei	+	++	++
Gigantocellular reticular nucleus	++	+++	++
Paragigantocellular nucleus	+	+	+
Spinal trigeminal nucleus	++	+++	++
Medullary reticular formation	++	++	++
Inferior olive	+	0	++++
Nucleus of the solitary tract	++	+++	++
Dorsal motor vagal nucleus	+++	++++	+++
Area postrema	+++	++++	+++
Motor hypoglossal nucleus	++	+++	++
Nucleus ambiguus	++	++	+++

Lateral reticular nucleus	+	+	+
Medullary raphe nuclei	+	++	++
Gracile nucleus	0	+	0
Cuneate nucleus	0	+	0
Cerebellum			
Cortex			
Molecular layer	+	+	0
Purkinje cell layer	+	+++	0
Granule cell layer	+	+	0
Deep cerebellar nuclei	+	+	0

1. táblázat

A TGF- β 1, - β 2 és - β 3 mRNS expressziójának összehasonlítása patkány agyban. A plusz (+) jelek száma az adott területen az in situ hibridizációs jel intenzitásával arányosak. Legerősebb jel: +++++, jelölés hiánya: 0.

6.2. A TGF- β 1, - β 2 és - β 3 mRNS expressziójának eloszlása a LTBP-hez viszonyítva

Az már korábban megállapításra került, hogy a TGF- β -k a nagy látens TGF- β komplex részeként szekretálódnak, az extracelluláris térben aktiválódnak és hatásaikat az I-es és II-es típusú, plazmamembránban elhelyezkedő TGF- β receptorokon fejtik ki (Saharinen és mtsai 1999; Koli és mtsai 2001; Annes és mtsai 2003). Ezt a folyamatot a központi idegrendszerben részletesen még nem írták le, de több tanulmány szerint a mellékvesevelő kromaffin sejtek (neuron-modell) is aktivitás-függő módon szekretálják a TGF- β -t (Kriegelstein és Unsicker 1995; Bottner és mtsai 2000), mint ahogy a hippokampális neuronok is (Lacmann és mtsai 2007). A TGF- β -k aktiválódása a központi idegrendszerben összetett szabályozást feltételez. Az ún. látens TGF- β kötő fehérjék (LTBP-k) a TGF- β -t tartalmazó kis látens komplexhez kötődnek, melynek eredményeként létrejön a nagy látens TGF- β komplex, mely a TGF- β -k aktivációjában játszhat szerepet (Hyttiainen és mtsai 2004; Rifkin 2005). A különböző LTBP-k egyes TGF- β -hoz történő esetleges szelektív kötődése még nem jellemzett folyamat (Sinha és mtsai 1998; Todorovic, és mtsai 2005) és a központi idegrendszerben még nem ismert. Korábban patkány agyban leírásra került mind a 4 fajta LTBP mRNS-ének lokalizációja (Dobolyi és Palkovits 2008). A patkány agyban dominánsan az LTBP3 volt jelen, de az LTBP4 az elülső agyterületeken mutatott magas expressziót. Az LTBP1 csak egyes agyterületeken volt jelentős

mennyiségben jelen, míg a LTBP2 csak a cortexben, a hippocampusban és a laterális hypothalamusban volt jelen (Dobolyi és Palkovits 2008). Mindazonáltal az LTBP altípusok eltérő eloszlási mintázatot mutattak, amely lehetővé teszi a TGF- β és az LTBP mRNS eloszlásának összehasonlítását. Azok az agyterületek, melyek túlnyomórészt egy bizonyos TGF- β fehérjét expresszálnak, alkalmasak a legjobban arra, hogy altípus-specifikus koexpressziót feltételezhessünk. Eszerint, az amygdala centrális magja, amely főleg TGF- β 1-et expresszált, LTBP3-at és LTBP4-et tartalmazott (Dobolyi és Palkovits 2008). A kizárólagosan TGF- β 1-et expresszáló supraoptikus magban csak LTBP4 volt kimutatható, de a nucleus ruberben, a nucleus interpeduncularisban az LTBP3 volt a domináns altípus (Dobolyi és Palkovits 2008) (2. táblázat).

Area	TGF- β 1	TGF- β 2	TGF- β 3	LTBP1	LTBP2	LTBP3	LTBP4
Amygdala							
Central nucleus	+++	0	+	0	0	++	++
Midbrain							
Red nucleus	++++	0	0	0	0	+++	0
Interpeduncular nucleus	+++	0	+	0	0	++	+

2. táblázat

A TGF- β 1 és az LTBP-k kolokalizációjának vizsgálata az mRNS eloszlás alapján. A TGF- β 1 az LTBP3-hoz és LTBP4-hez is kötődhet.

A plexus choroideusban, mely dominánsan TGF- β 2-t expresszál, LTBP1 és 3 volt jelen. A mediális mamilláris mag, a dorsalis és medialis raphe mag, a kisagy piramidális sejtrétege főleg TGF- β 2-t expresszál, és kizárólag LTBP3-at tartalmaz (Dobolyi és Palkovits 2008) (3. táblázat). Azonban a thalamus ventrális és retikuláris magjában és a colliculus superiorban, ahol igen magas a TGF- β 3 expresszió, csaknem kizárólagosan LTBP3 van jelen (Dobolyi és Palkovits 2008). Ezzel szemben az oliva inferiorban, mely TGF- β 3-at expresszál, a LTBP4 nagyobb mennyiségben van jelen, mint a LTBP3, míg a TGF- β 3-at expresszáló

nucleus arcuatusban inkább nagyobb mennyiségű LTBP1 van jelen, mint LTBP3 vagy 4 (4. táblázat).

Area	TGF- β 1	TGF- β 2	TGF- β 3	LTBP1	LTBP2	LTBP3	LTBP4
Choroid plexus	++	++++	+	++++	0	++++	+
Hypothalamus							
Mamillary body	+	+++	+	+	0	++++	+
Midbrain							
Raphe nuclei	+	++++	+	+	0	+++	0
Cerebellum							
Purkinje cell layer	+	+++	0	0	0	++++	0

3. táblázat

A TGF- β 2 és az LTBP-k kolokalizációjának vizsgálata az mRNS eloszlás alapján. A TGF- β 2 az LTBP1-hez és LTBP3-hoz is kötődhet.

Area	TGF- β 1	TGF- β 2	TGF- β 3	LTBP1	LTBP2	LTBP3	LTBP4
Thalamus							
Ventral nuclei	+	0	+++	0	0	+++	+
Reticular nucleus	+	+	++++	+	0	++++	+
Midbrain							
Superior colliculus	0	+	+++	0	0	+	0
Medulla Oblongata							
Inferior olive	+	0	++++	+	0	++	+++
Hypothalamus							
Arcuate nucleus	+	0	+++	++++	0	++	+++

4. táblázat

A TGF- β 3 és az LTBP-k kolokalizációjának vizsgálata az mRNS eloszlás alapján. A TGF- β 3 az LTBP2 kivételével mindegyik LTBP-hez kötődhet.

Következtetésképp, a TGF- β -k és az LTBP-k mRNS eloszlásának összehasonlítása alapján mindegyik TGF- β kötődhet az LTBP3-hoz. Továbbá, bizonyos agyterületeken a TGF- β -k a többi LTBP-hez is kötődhetnek. Az LTBP2 az összehasonlítás alapján valószínűleg nem köt TGF- β -t.

6.3. Az egyes TGF- β fehérjék mRNS expressziójának idő- és térbeli változása fokális agyi iszkémiát követően

MCAO után mindhárom TGF- β mRNS-e indukálódott a patkány agyban. Az iszkémia időtartamától függően a TGF- β fehérjék mRNS expressziójának indukciója eltérő, egyedi topográfiai mintázatot mutatott. Eredményeink alátámasztják és kibővítik az eddigi irodalmi ismereteket a TGF- β -k agyi iszkémiát követő indukciójáról. Permanens MCAO után a TGF- β 1 mRNS expresszió bifázikus, az iszkémia körüli agykéregben bekövetkező korai, valamint későbbi, az iszkémiás lézió belüli indukcióját patkányokban már leírták (Yamashita és mtsai 1999). Ebben a tanulmányban a korai indukciót csak 12 órás túlélési idő után mutatták ki, melynek oka az lehet, hogy az in situ hibridizációt film autoradiogramokkal értékelték ki, amely jelentősen kisebb térbeli felbontást tett lehetővé mint a mi kísérleteink. Mindazonáltal a TGF- β 1 bifázikus indukcióját megerősítettük de a mi eredményeink szerint a TGF- β 1 korai fázisú indukciója tranziens iszkémiát követően már 3 órával megjelenik. Adataink arra mutatnak, hogy az iszkémia korai időpontjában a TGF- β 1 indukciója az iszkémiás penumbrában következhet be. TGF- β 1 in situ hibridizációjának és a mikroglia marker OX42-vel végzett immunhisztokémia kombinációja már korábbi kutatások során felvetette, hogy a TGF- β 1 MCAO utáni indukciója mikroglia sejtekhez köthető (Lehrmann és mtsai 1998). A TGF- β 2 és - β 3 expressziós mintázatát fokális iszkémiát követően elsőként mi írtuk le és hasonlítottuk össze a TGF- β 1 mRNS expressziós mintázatával. Jelentős különbséget találtunk: TGF- β 2 és - β 3 MCAO-t követően kizárólagosan az agykéreg specifikus rétegeiben indukálódott. Ezekben a rétegekben az indukció nemcsak a lézióval szomszédos területeket érintette, hanem a távolabbi ipsilaterális kéregterületeket is. A TGF- β 2-t intakt patkányagyban is expresszáló V. réteg sejtjeiben az expresszió mértéke megnőtt, valamint a II-es és III-as rétegben új sejtek is bekapcsolódtak az expresszióba. A TGF- β 2 és - β 3 indukciós mintázata

a TGF- β 1-gyel ellentétben nem bifázisos, hanem 24 órás MCAO után a legkifejezettebb, utána az indukció az alapállapothoz hasonló szintre csökken. A TGF- β 1 és - β 2 mRNS eltérő idő- és térbeli expressziós mintázata az expresszáló sejtek különböző típusából adódhat.

6.4. A TGF- β -k mRNS indukciójának lehetséges mechanizmusai

Permanens okklúzió során mindhárom TGF- β mRNS expresszió indukciója kifejezettebbé vált a tranziens okklúzióhoz képest, emiatt az valószínű, hogy maga az iszkémia és nem a reperfüzió válja ki a TGF- β -k indukcióját. Ismert, hogy a fokális agyi iszkémia az infarktus területén valamint a penumbrában mikroglia aktivációt okoz (Mabuchi és mtsai 2000). A mikroglia aktivációt az iszkémiás neuronokból és a vérből származó sejtes elemekből felszabaduló gyulladáscitokinek okozzák (Liu és mtsai 1994; Kawano és mtsai 2012). Tranziens fokális iszkémia esetén a mikroglia motilitásában és fagocitózisában részt vevő Iba1 (ionized calcium binding adaptor molecule) expressziója megnő az infarcterült területet infiltráló mikrogliaiban és makrofágokban (Ohsawa és mtsai 2000, Ito és mtsai 2001). MCAO-t követően a mikroglialis aktiváció dominál a makrofág infiltrációval szemben (Schilling és mtsai 2003). Valószínű, hogy a TGF- β 1 expressziójának növekedése főleg mikroglia aktiváció eredménye, melyet a TGF- β 1 korai, az infarkus széli részén való megjelenése is alátámaszt. Tény, hogy olyan gyulladási citokinek mint a TNF- α (tumor necrosis factor alpha) és az IL-1 indukálják TGF- β 1 expressziót mikrogliaiban és asztrocitáiban (da Cunha és mtsai 1993; Chao és mtsai 1995). A TGF- β 2 és - β 3 mRNS indukciójának TGF- β 1-től jelentősen eltérő expressziós mintázata neuronális eredetre utal és arra enged következtetni, hogy ezen TGF- β típusok indukciójában más mechanizmusok játszanak szerepet

6.5. A TGF- β -k eloszlása alapján feltételezhető funkcióik

A TGF- β -k neuroprotektív szerepét hypoxia esetén több kísérlet is bizonyította (Gross és mtsai 1993; Prehn és mtsai 1993; Ruocco és mtsai 1999; Zhu és mtsai 2002). Az MCAO után bekövetkező eltérő tér- és időbeli indukció az iszkémiás válaszban betöltött eltérő szerepekre utal. A TGF- β 1 expresszió az iszkémiás penumbrában jelenik meg, mely a

neuroprotektív kezelések fő célpontja (Ramos-Cabrer és mtsai 2011). A TGF- β -k negatív auto-feedback gátló hatással lehetnek a mikroglia funkcióira, melyek nemcsak a törmelék eltakarításához szükségesek, hanem reaktív oxigéngyökök és gyulladásozó citokinek felszabadításával neuronális károsodáshoz is hozzájárulhatnak (Marin-Teva és mtsai 2011). A TGF- β 1 képes a mikroglia deaktiválni valamint apoptózisukat szelektíven elősegíteni (Xiao és mtsai 1997). A TGF- β -k ezen kívül a neoangiogenezisben valamint a glióma kialakításában is szerepet játszanak (Gault és mtsai 2004; Wick és mtsai 2006; Dobolyi és mtsai 2012). Agyi sérülésnél TGF- β antagonisták lokális beadása csökkentette a glióma képződést valamint a fibrinogén-indukálta hatásokat is megszüntette (Lagord és mtsai 2002; Schachtrup és mtsai 2011). A glióma képződés csökkentése valószínűleg az asztrociták proliferációjára, migrációjára és aktivációjára valamint az extracelluláris mátrixra gyakorolt hatással függ össze (Flanders és mtsai 1991; Bottner és mtsai 2000; Yin és mtsai 2009). A TGF- β -k direkt neuroprotektív szerepét *in vitro* a neuronok túlélésére gyakorolt hatásai is bizonyítják (Prehn és mtsai 1993; Flanders és mtsai 1998; Dhandapani és Brann 2003). Ezek a hatások különböző neurotrófikus faktorokon keresztül valósulhatnak meg, mely hatásokat a TGF- β módosítani képes (Krieglstein és mtsai 2002; Roussa és mtsai 2008; Rahhal és mtsai 2009). Iszkémia után a neuronális funkciók helyreállításánál szükséges új szinapszisok képződése és új neurit nyúlványok növekedése, mely folyamatokban a TGF- β is szerepet játszhat (Abe és mtsai; Unsicker és mtsai 1996; Feng és Ko 2008). A legtöbb vizsgálat azonban nem differenciált a különböző TGF- β altípusok között.

7. KÖVETKEZTETÉSEK

- Kimutattuk, hogy mindhárom TGF- β expresszálódik intakt patkány agyban.
- A különböző TGF- β 1, - β 2 és - β 3 mRNS expressziója az ép patkány agyban egyéni térbeli eloszlást mutat, mely az expresszió térbeli szabályozottságára utal.
- A TGF- β fehérjék mRNS-ének eloszlási mintázata egyes területeken megegyezett, bizonyos területeken eltért az immunhisztokémiai festések során leírt immunreaktivitással. Ez a különbség, mivel az immunreaktivitást a sejtestekben írták le és nem a sejtek nyúlványaiban, nem a TGF- β -k sejtestből való transzportjából ered, hanem az immunhisztokémia és az in situ hibridizáció eltérő szenzitivitásából és szelektivitásából adódik.
- A TGF- β -k és a kötőfehérjéik, az LTBP-k expressziós mintázatának összehasonlítása alapján valószínű, hogy mindhárom TGF- β kötődhet LTBP3-hoz, valamint bizonyos agyterületeken a többi LTPB-hez is.
- Az agyi iszkémia során az időben és térben eltérő TGF- β 1, - β 2 és - β 3 mRNS expressziós mintázat az iszkémia során bekövetkező TGF- β indukció eltérő mechanizmusára, valamint a neuroprotekcióban betöltött eltérő szerepre utal.
- A permanens okklúzió során mindhárom TGF- β altípus mRNS expressziója kifejezettebbé vált. Ez arra utal, hogy iszkémia során a TGF- β -k indukcióját nem a reperfüzió, hanem maga az iszkémia váltja ki.

8. ÖSSZEFOGLALÁS

A TGF- β 1, - β 2 és - β 3 fehérjék a különböző sejtek proliferációját, differenciálódását és túlélését szabályozzák. Neuroprotektív szerepüket több vizsgálat is bizonyította. Kísérleteink célja a normál patkány agy TGF- β 1, - β 2 és - β 3 mRNS eloszlásának leírása, az mRNS eloszlás összehasonlítása az irodalomban már közölt immunhisztokémiai vizsgálatok eredményeivel, valamint a TGF- β -k szabályozott szekréciójának megértése céljából az LTBP-k eloszlásával. Az mRNS expressziót radioaktív in situ hibridizációval vizsgáltuk. A TGF- β 1 mRNS eloszlás igen jelentősen különbözött az irodalmi adatok szerinti immunpozitivitástól (immunpozitivitást csak a meningeális sejtekben és a plexus choroideus epithel sejteiben írtak le): a cortex, a hippocampus, a centrális amygdala mag, a mediális preoptikus area, a substantia nigra, az agytörzsi formatio reticularis és motoneuronok valamint az area postrema is tartalmazott TGF- β 1 mRNS-t. A TGF- β 2 és - β 3 mRNS eloszlása bizonyos agyterületeken, mint pl. a II, III és V-ös cortikális rétegben, a hippocampusban, hypothalamusban és az amygdalában megegyezett az immunreaktivitás eloszlásával, azonban jelentős eltéréseket is találtunk az agy több más területén. A két altípus mRNS eloszlása sem egyezett meg, mint arra a korábbi adatok utaltak. A TGF- β fehérjék mRNS eloszlását összehasonlítva az LTBP-k mRNS eloszlási mintázatával valószínű, hogy mindegyik TGF- β kötődhet az LTBP3-hoz, továbbá, bizonyos agyterületeken az egyes TGF- β típusok más LTBP-hez is kötődhetnek. Mindezen adatok a TGF- β fehérje típusoknak a különböző neuronok szabályozásában betöltött eltérő szerepére utalnak. További kísérleteinkben a neuroprotektió vizsgálata céljából 3, 24, 72 órás és 1 hónapos tranziens (1 órás) és permanens (24 órás) MCAO-t követően vizsgáltuk a TGF- β fehérjék indukcióját patkány agyban. Megállapítottuk, hogy MCAO-t követően a TGF- β fehérjék mRNS expressziója térben és időben eltérően indukálódik. A TGF- β 1 a lézió körülvevő penumbrában, míg a TGF- β 2 és - β 3 az ipsilaterális cortex rétegeiben, a lézió határától távolabb indukálódik. Permanens MCAO esetén az mRNS expresszió kifejezettebbé vált, amely arra utal, hogy az indukciót nem a reperfüzió, hanem maga az iszkémia váltja ki. Az eredmények arra utalnak, hogy fokális agyi iszkémia esetén az endogén TGF- β fehérjék indukciója eltérő mechanizmusokkal történik, tehát valószínű, hogy altípustól függően különböző neuroprotektív folyamatokban vesznek részt.

9. SUMMARY

Transforming growth factors- β 1, - β 2, and - β 3 are involved in the regulation of proliferation, differentiation, and survival of various cell types. TGF- β s were also reported to be neuroprotective. We investigated their distribution at the mRNA level with radioactive in situ hybridization histochemistry in the rat brain and compare it with the distribution of TGF- β immunoreactivity, furthermore, to understand the complex regulation of their secretion, with the distribution of the latent transforming growth factor beta binding proteins (LTBPs). Most importantly, TGF- β 1 immunoreactivity was reported to be present constitutively only in meninges and the choroid plexus, but we found a more widespread expression of the mRNA of this subtype: in the cerebral cortex, hippocampus, central amygdaloid nucleus, medial preoptic area, hypothalamic paraventricular nucleus, substantia nigra, brainstem reticular formation and motoneurons and area postrema. The distribution of TGF- β 2 and - β 3 mRNA overlapped in some brain regions, e.g. in cerebral cortical layers II, III, and V, in the hypothalamus and amygdala, which correlate well with the presence of TGF- β immunoreactivities in these regions, but we found significantly different expression patterns in another brain regions. Furthermore, the distribution patterns of these subtypes are not similar, as reported previously. Our further comparisons suggest that all three subtypes of TGF- β s can bind to LTBP3 in the brain. In addition, TGF- β s can also bind to other types of LTBPs in certain brain regions. The expression of the subtypes of TGF- β s in different brain regions suggests that they are involved in the regulation of different neurons. In addition, we investigated the role of the TGF- β s in the neuroprotection after focal ischemia at 3 h, 24 h, 72 h and 1 month after transient (1 h) or permanent (24 h) middle cerebral artery occlusion (MCAO) in the rat brain. Our findings indicate that TGF- β s are induced in the brain following focal ischemic attack and they have individual topographical and temporal distribution patterns. TGF- β 1 appears in the penumbra around the lesion, TGF- β 2 and - β 3 in the ipsilateral cortical layers away from the border of the lesion also. Permanent MCAO further elevated the levels of all 3 subtypes of TGF- β s suggesting that reperfusion is not a major factor in their induction. The results imply that endogenous TGF- β s are induced by different mechanisms following an ischemic attack in the brain suggesting that they are involved in distinct inflammatory and neuroprotective processes.

10. IRODALOMJEGYZÉK

- Abe K, Chu PJ, Ishihara A, Saito H. (1996) "Transforming growth factor-beta 1 promotes re-elongation of injured axons of cultured rat hippocampal neurons." *Brain Res* 723(1- 2): 206-209.
- Aigner L. és Bogdahn U. (2008) "TGF-beta in neural stem cells and in tumors of the central nervous system." *Cell Tissue Res* 331(1): 225-241.
- Ali C, Docagne F, Nicole O, Lesné S, Toutain J, Young A, Chazalviel L, Divoux D, Caly M, Cabal P, Derlon JM, MacKenzie ET, Buisson A, Vivien D. (2001) "Increased expression of transforming growth factor-beta after cerebral ischemia in the baboon: an endogenous marker of neuronal stress?" *J Cereb Blood Flow Metab* 21(7): 820-827.
- Annes JP, Munger JS, Rifkin DB. (2003) "Making sense of latent TGFbeta activation." *J Cell Sci* 116(Pt 2): 217-224.
- Antonelli-Orlidge A, Saunders KB, Smith SR, D'Amore PA. (1989) "An activated form of transforming growth factor beta is produced by cocultures of endothelial cells and pericytes." *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(12): 4544-4548.
- Ata KA, Lennmyr F, Funa K, Olsson Y, Terént A. (1999) "Expression of transforming growth factor-beta1, 2, 3 isoforms and type I and II receptors in acute focal cerebral ischemia: an immunohistochemical study in rat after transient and permanent occlusion of middle cerebral artery." *Acta Neuropathol* 97(5): 447-455.
- Battaglia G, Cannella M, Riozzi B, Orobello S, Maat-Schieman ML, Aronica E, Busceti CL, Ciarmiello A, Alberti S, Amico E, Sassone J, Sipione S, Bruno V, Frati L, Nicoletti F, Squitieri F. (2011) "Early defect of transforming growth factor beta1 formation in Huntington's disease." *J Cell Mol Med* 15(3): 555-571.
- Battista D, Ferrari CC, Gage FH, Pitossi FJ. (2006) "Neurogenic niche modulation by activated microglia: transforming growth factor beta increases neurogenesis in the adult dentate gyrus." *Eur J Neurosci* 23(1): 83-93.

- Bederson JB, Pitts LH, Germano SM, Nishimura MC, Davis RL, Bartkowski HM. (1986) "Evaluation of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a stain for detection and quantification of experimental cerebral infarction in rats." *Stroke* 17(6): 1304-1308.
- Beynon AL, Thome J, Coogan AN. (2009) "Age and time of day influences on the expression of transforming growth factor-beta and phosphorylated SMAD3 in the mouse suprachiasmatic and paraventricular nuclei." *Neuroimmunomodulation* 16(6): 392-399.
- Böttner M, Krieglstein K, Unsicker K. (2000) "The transforming growth factor-betas: structure, signaling, and roles in nervous system development and functions." *J Neurochem* 75(6): 2227-2240.
- Böttner M, Unsicker K, Suter-Crazzolaro C. (1996) "Expression of TGF-beta type II receptor mRNA in the CNS." *Neuroreport* 7(18): 2903-2907.
- Bouret S, De Seranno S, Beauvillain JC, Prevot V. (2004) "Transforming growth factor beta1 may directly influence gonadotropin-releasing hormone gene expression in the rat hypothalamus." *Endocrinology* 145(4): 1794-1801.
- Buisson A, Lesne S, Docagne F, Ali C, Nicole O, MacKenzie ET, Vivien D. (2003) "Transforming growth factor-beta and ischemic brain injury." *Cell Mol Neurobiol* 23(4-5): 539-550.
- Burt DW, Law AS. (1994) "Evolution of the transforming growth factor-beta superfamily." *Prog Growth Factor Res.* 5(1): 99-118.
- Buss A, Pech K, Kakulas BA, Martin D, Schoenen J, Noth J, Brook GA. (2008) "TGF-beta1 and TGF-beta2 expression after traumatic human spinal cord injury." *Spinal Cord* 46(5): 364-371.
- Caraci F, Battaglia G, Bruno V, Bosco P, Carbonaro V, Giuffrida ML, Drago F, Sortino MA, Nicoletti F, Copani A. (2009) "TGF-beta1 pathway as a new target for neuroprotection in Alzheimer's Disease." *CNS Neurosci Ther.* 17 (4): 237-49
- Chao CC, Hu S, Sheng WS, Tsang M, Peterson PK. (1995) "Tumor necrosis factor-alpha mediates the release of bioactive transforming growth factor-beta in murine microglial cell cultures." *Clin Immunol Immunopathol* 77(3): 358-365.

- Chu W, Li X, Li C, Wan L, Shi H, Song X, Liu X, Chen X, Zhang C, Shan H, Lu Y, Yang B. (2011) "TGFB3, a potential negative regulator of TGF-beta signaling, protects cardiac fibroblasts from hypoxia-induced apoptosis." *J Cell Physiol* 226(10): 2586-2594.
- Clark DA, Coker R. (1998) "Transforming growth factor-beta (TGF-beta)." *Int J Biochem Cell Biol* 30(3): 293-298.
- da Cunha A, Jefferson JA, Jackson RW, Vitković L. (1993) "Glial cell-specific mechanisms of TGF-beta 1 induction by IL-1 in cerebral cortex." *J Neuroimmunol* 42(1): 71-85.
- da Cunha A, Jefferson JJ, Tyor WR, Glass JD, Jannotta FS, Vitković L. (1993) "Control of astrocytosis by interleukin-1 and transforming growth factor-beta 1 in human brain." *Brain Res* 631(1): 39-45.
- Dennler S, Goumans MJ, ten Dijke P. (2002) "Transforming growth factor beta signal transduction." *J Leukoc Biol* 71(5): 731-740.
- Dhandapani KM, Brann DW. (2003) "Transforming growth factor-beta: a neuroprotective factor in cerebral ischemia." *Cell Biochem Biophys* 39(1): 13-22.
- Dobolyi A, Palkovits M. (2008) "Expression of latent transforming growth factor beta binding proteins in the rat brain." *J Comp Neurol* 507(3): 1393-1408.
- Dobolyi A, Vincze C, Pál G, Lovas G. (2012) "The neuroprotective functions of transforming growth factor Beta proteins." *Int J Mol Sci* 13(7): 8219-8258.
- Doyle KP, Cekanaviciute E, Mamer LE, Buckwalter MS. (2010) "TGFbeta signaling in the brain increases with aging and signals to astrocytes and innate immune cells in the weeks after stroke." *J Neuroinflammation* 7(62): 62.
- Farkas LM, Dünker N, Roussa E, Unsicker K, Kriegstein K. (2003) "Transforming growth factor-beta(s) are essential for the development of midbrain dopaminergic neurons in vitro and in vivo." *J Neurosci*. 23(12): 5178-5186.
- Feng Z, Ko CP. (2008) "Schwann cells promote synaptogenesis at the neuromuscular junction via transforming growth factor-beta1." *J Neurosci* 28(39): 9599-9609.
- Fèvre-Montange M, Dumontel C, Chevallier P, Isnard AK, Guigard MP, Trouillas J. (2004) "Localization of transforming growth factors, TGFbeta1 and TGFbeta3, in

- hypothalamic magnocellular neurones and the neurohypophysis." *J Neuroendocrinol* 16(7): 571-576.
- Finch CE, Laping NJ, Morgan TE, Nichols NR, Pasinetti GM. (1993) "TGF-beta 1 is an organizer of responses to neurodegeneration." *J Cell Biochem* 53(4): 314-322.
- Fitch MT, Silver J. (2008) "CNS injury, glial scars, and inflammation: Inhibitory extracellular matrices and regeneration failure." *Exp Neurol* 209(2): 294-301.
- Flanders KC, Lüdecke G, Engels S, Cissel DS, Roberts AB, Kondaiah P, Lafyatis R, Sporn MB, Unsicker K. (1991) "Localization and actions of transforming growth factor-betas in the embryonic nervous system." *Development* 113(1): 183-191.
- Flanders KC, Ren RF, Lippa CF. (1998) "Transforming growth factor-betas in neurodegenerative disease." *Prog Neurobiol* 54(1): 71-85.
- Fukushima T, Liu RY, Byrne JH. (2007) "Transforming growth factor-beta2 modulates synaptic efficacy and plasticity and induces phosphorylation of CREB in hippocampal neurons." *Hippocampus* 17(1): 5-9.
- Garcia-Campmany L, Marti E. (2007) "The TGFbeta intracellular effector Smad3 regulates neuronal differentiation and cell fate specification in the developing spinal cord." *Development* 134(1): 65-75.
- Gault J, Sarin H, Awadallah NA, Shenkar R, Awad IA. (2004) "Pathobiology of human cerebrovascular malformations: basic mechanisms and clinical relevance." *Neurosurgery* 55(1): 1-16; discussion 16-17.
- Gentry LE, Nash BW. (1990) "The pro domain of pre-pro-transforming growth factor beta 1 when independently expressed is a functional binding protein for the mature growth factor." *Biochemistry* 29(29): 6851-6857.
- Giacomini D, Páez-Pereda M, Stalla J, Stalla GK, Arzt E. (2009) "Molecular interaction of BMP-4, TGF-beta, and estrogens in lactotrophs: impact on the PRL promoter." *Mol Endocrinol* 23(7): 1102-1114.
- Giaume C, Kirchhoff F, Matute C, Reichenbach A, Verkhratsky A. (2007) "Glial cells: the fulcrum of brain diseases." *Cell Death Differ* 14(7): 1324-1335.

- Gleizes PE, Munger JS, Nunes I, Harpel JG, Mazzieri R, Noguera I, Rifkin DB. (1997) "TGF-beta latency: biological significance and mechanisms of activation." *Stem Cells* 15(3): 190-197.
- Gouin A, Bloch-Gallego E, Tanaka H, Rosenthal A, Henderson CE. (1996) "Transforming growth factor-beta 3, glial cell line-derived neurotrophic factor, and fibroblast growth factor-2, act in different manners to promote motoneuron survival in vitro." *J Neurosci Res* 43(4): 454-464.
- Gross CE, Bednar MM, Howard DB, Sporn MB. (1993) "Transforming growth factor-beta 1 reduces infarct size after experimental cerebral ischemia in a rabbit model." *Stroke* 24(4): 558-562.
- Gumienny TL, Padgett RW. (2002) "The other side of TGF-beta superfamily signal regulation: thinking outside the cell." *Trends Endocrinol Metab* 13(7): 295-299.
- Hatten ME, Mason CA, Liem RK, Edmondson JC, Bovolenta P, Shelanski ML. (1984) "Neuron-astroglial interactions in vitro and their implications for repair of CNS injury." *Cent Nerv Syst Trauma* 1(1): 15-27.
- Hau P, Jachimczak P, Schlaier J, Bogdahn U. (2011) "TGF-b2 signaling in high-grade gliomas." *Curr Pharm Biotechnol.* 12(12):2150-7.
- Henrich-Noack P, Prehn JH, Krieglstein J. (1994) "Neuroprotective effects of TGF-beta 1." *J Neural Transm Suppl* 43: 33-45.
- Heupel K, Sargsyan V, Plomp JJ, Rickmann M, Varoquaux F, Zhang W, Krieglstein K. (2008) "Loss of transforming growth factor-beta 2 leads to impairment of central synapse function." *Neural Dev* 3: 25.
- Hyytiäinen M, Penttinen C, Keski-Oja J. (2004) "Latent TGF-beta binding proteins: extracellular matrix association and roles in TGF-beta activation." *Crit Rev Clin Lab Sci* 41(3): 233-264.
- Ikushima H, Todo T, Ino Y, Takahashi M, Miyazawa K, Miyazono K. (2009) "Autocrine TGF-beta signaling maintains tumorigenicity of glioma-initiating cells through Sry-related HMG-box factors." *Cell Stem Cell* 5(5): 504-514.
- Ishibashi T, Miller SL, Burstein SA. (1987) "Type beta transforming growth factor is a potent inhibitor of murine megakaryocytopoiesis in vitro" *Blood* 69(6): 1737-1741.

- Ito D, Tanaka K, Suzuki S, Dembo T, Fukuuchi Y. (2001) "Enhanced expression of Iba1, ionized calcium-binding adapter molecule 1, after transient focal cerebral ischemia in rat brain." *Stroke* 32(5): 1208-1215.
- Jiang Y, McLennan IS, Koishi K, Hendry IA. (2000) "Transforming growth factor-beta 2 is anterogradely and retrogradely transported in motoneurons and up-regulated after nerve injury." *Neuroscience* 97(4): 735-742.
- Jiang Y, Zhang M, Koishi K, McLennan IS. (2000) "TGF-beta2 attenuates the injury-induced death of mature motoneurons." *J Neurosci Res* 62(6): 809-813.
- Kawano H, Kimura-Kuroda J, Komuta Y, Yoshioka N, Li HP, Kawamura K, Li Y, Raisman G. (2012) "Role of the lesion scar in the response to damage and repair of the central nervous system." *Cell Tissue Res* 349(1): 169-180.
- Khalil N. (1999) TGF-beta: from latent to active. *Microbes Infect* 1(15): 1255-1263.
- Kiefer R, Streit WJ, Toyka KV, Kreutzberg GW, Hartung HP. (1995) "Transforming growth factor-beta 1: a lesion-associated cytokine of the nervous system." *Int J Dev Neurosci* 13(3-4): 331-339.
- Kingsley DM. (1994) "The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms." *Genes Dev* 8(2): 133-146.
- Klempt ND, Sirimanne E, Gunn AJ, Klempt M, Singh K, Williams C, Gluckman PD. (1992) "Hypoxia-ischemia induces transforming growth factor beta 1 mRNA in the infant rat brain." *Brain Res Mol Brain Res* 13(1-2): 93-101.
- Knuckey NW, Finch P, Palm DE, Primiano MJ, Johanson CE, Flanders KC, Thompson NL. (1996) "Differential neuronal and astrocytic expression of transforming growth factor beta isoforms in rat hippocampus following transient forebrain ischemia." *Brain Res Mol Brain Res* 40(1): 1-14.
- Koishi K, Dalzell KG, McLennan IS. (2000). "The expression and structure of TGF-beta2 transcripts in rat muscles." *Biochim Biophys Acta* 1492(2-3): 311-319.
- Koli K, Saharinen J, Hyytiäinen M, Penttinen C, Keski-Oja J. (2001) "Latency, activation, and binding proteins of TGF- beta." *Microsc Res Tech* 52(4): 354-362.

- Komuta Y, Teng X, Yanagisawa H, Sango K, Kawamura K, Kawano H. (2009) "Expression of transforming growth factor-beta receptors in meningeal fibroblasts of the injured mouse brain." *Cell Mol Neurobiol* 30(1): 101-111.
- König HG, Kögel D, Rami A, Prehn JH. (2005) "TGF- β 1 activates two distinct type I receptors in neurons: implications for neuronal NF- κ B signaling." *J Cell Biol* 168(7): 1077-1086.
- Konrad L, Scheiber JA, Völck-Badouin E, Keilani MM, Laible L, Brandt H, Schmidt A, Aumüller G, Hofmann R. (2007) "Alternative splicing of TGF-betas and their high-affinity receptors T beta RI, T beta RII and T beta RIII (betaglycan) reveal new variants in human prostatic cells." *BMC Genomics* 8(318): 318.
- Krieglstein K, Henheik P, Farkas L, Jaszai J, Galter D, Krohn K, Unsicker K. (1998) "Glial cell line-derived neurotrophic factor requires transforming growth factor-beta for exerting its full neurotrophic potential on peripheral and CNS neurons." *J Neurosci* 18(23): 9822-9834.
- Krieglstein K, Richter S, Farkas L, Schuster N, Dünker N, Oppenheim RW, Unsicker K. (2000) "Reduction of endogenous transforming growth factors beta prevents ontogenetic neuron death." *Nat Neurosci.* 3(11): 1085-1090.
- Krieglstein K, Rufer M, Suter-Crazzolara C, Unsicker K. (1995) "Neural functions of the transforming growth factors beta." *Int J Dev Neurosci.* 13(3-4): 301-315.
- Krieglstein K, Strelau J, Schober A, Sullivan A, Unsicker K. (2002) "TGF-beta and the regulation of neuron survival and death." *J Physiol Paris* 96(1-2): 25-30.
- Krieglstein K, Unsicker K. (1995) "Bovine chromaffin cells release a transforming growth factor-beta-like molecule contained within chromaffin granules." *J Neurochem* 65(3): 1423-1426.
- Krohn K. (1999) "TGF-beta1-dependent differential expression of a rat homolog for latent TGF-beta binding protein in astrocytes and C6 glioma cells." *Glia* 25(4): 332-342.
- Krupinski J, Kumar P, Kumar S, Kaluza J. (1996) "Increased expression of TGF-beta 1 in brain tissue after ischemic stroke in humans." *Stroke* 27(5): 852-857.

- Lacmann A, Hess D, Gohla G, Roussa E, Krieglstein K. (2007) "Activity-dependent release of transforming growth factor-beta in a neuronal network in vitro." *Neuroscience* 150(3): 647-657.
- Lagord C, Berry M, Logan A. (2002) "Expression of TGFbeta2 but not TGFbeta1 correlates with the deposition of scar tissue in the lesioned spinal cord." *Mol Cell Neurosci* 20(1): 69-92.
- Lawrence DA. (1996) "Transforming growth factor-beta: a general review." *Eur Cytokine Netw* 7(3): 363-374.
- Lehrmann E, Kiefer R, Christensen T, Toyka KV, Zimmer J, Diemer NH, Hartung HP, Finsen B. (1998) "Microglia and macrophages are major sources of locally produced transforming growth factor-beta1 after transient middle cerebral artery occlusion in rats." *Glia* 24(4): 437-448.
- Lehrmann E, Kiefer R, Finsen B, Diemer NH, Zimmer J, Hartung HP. (1995) "Cytokines in cerebral ischemia: expression of transforming growth factor beta-1 mRNA in the postischemic adult rat hippocampus." *Exp Neurol* 131(1): 114-123.
- Lenzlinger PM, Morganti-Kossmann MC. (2001) "The duality of the inflammatory response to traumatic brain injury." *Mol Neurobiol* 24(1-3): 169-181.
- Lippa CF, Smith TW, Flanders KC. (1995) "Transforming growth factor-beta: neuronal and glial expression in CNS degenerative diseases." *Neurodegeneration* 4(4): 425-432.
- Liu T, Clark RK, McDonnell PC, Young PR, White RF, Barone FC, Feuerstein GZ. (1994) "Tumor necrosis factor-alpha expression in ischemic neurons." *Stroke* 25(7): 1481-1488.
- Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. (1989) "Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats." *Stroke* 20(1): 84-91.
- Ma M, Ma Y, Yi X, Guo R, Zhu W, Fan X, Xu G, Frey WH, Liu X. (2008) "Intranasal delivery of transforming growth factor-beta1 in mice after stroke reduces infarct volume and increases neurogenesis in the subventricular zone." *BMC Neurosci* 9(117): 117.
- Mabuchi T, Kitagawa K, Ohtsuki T, Kuwabara K, Yagita Y, Yanagihara T, Hori M, Matsumoto M. (2000) "Contribution of microglia/macrophages to expansion of

- infarction and response of oligodendrocytes after focal cerebral ischemia in rats." *Stroke* 31(7): 1735-1743.
- Madisen L, Webb NR, Rose TM, Marquardt H, Ikeda T, Twardzik D, Seyedin S, Purchio AF. (1988) "Transforming growth factor-beta 2: cDNA cloning and sequence analysis." *DNA* 7(1): 1-8.
- Mangasser-Stephan K, Gressner AM. (1999) "Molecular and functional aspects of latent transforming growth factor-beta binding protein: just a masking protein?" *Cell Tissue Res* 297(3): 363-370.
- Marín-Teva JL, Cuadros MA, Martín-Oliva D, Navascués J. (2011) "Microglia and neuronal cell death." *Neuron Glia Biol* 7(1): 25-40.
- Markus A. (2007) "How dopamine neurons survive." *Nat Neurosci* 10(1): 12.
- Massague J. (1990) "The transforming growth factor-beta family." *Annu Rev Cell Biol* 6: 597-641.
- Massague J. (1992) "Receptors for the TGF-beta family." *Cell* 69(7): 1067-1070.
- Massague J. (1998) "TGF-beta signal transduction." *Annu Rev Biochem* 67: 753-791.
- Mathieu P, Piantanida AP, Pitossi F. (2011) "Chronic expression of transforming growth factor-beta enhances adult neurogenesis." *Neuroimmunomodulation* 17(3): 200-201.
- McNeill H, Williams C, Guan J, Dragunow M, Lawlor P, Sirimanne E, Nikolics K, Gluckman P. (1994) "Neuronal rescue with transforming growth factor-beta 1 after hypoxic-ischaemic brain injury." *Neuroreport* 5(8): 901-904.
- Miyazono K, ten Dijke P, Heldin CH. (2000) "TGF-beta signaling by Smad proteins." *Adv Immunol* 75: 115-157.
- Morgan TE, Nichols NR, Pasinetti GM, Finch CE. (1993) "TGF-beta 1 mRNA increases in macrophage/microglial cells of the hippocampus in response to deafferentation and kainic acid-induced neurodegeneration." *Exp Neurol* 120(2): 291-301.
- Moses HL, Branum EL, Proper JA, Robinson RA. (1981) "Transforming growth factor production by chemically transformed cells." *Cancer Res* 41(7): 2842-2848.
- Moses HL, Yang EY, Pietenpol JA. (1990) "TGF-beta stimulation and inhibition of cell proliferation: new mechanistic insights." *Cell* 63(2): 245-247.

- Mu Y, Gudey SK, Landström M. (2011) "Non-Smad signaling pathways." *Cell Tissue Res* 347(1):11-20
- Naumann U, Maass P, Gleske AK, Aulwurm S, Weller M, Eisele G. (2008). "Glioma gene therapy with soluble transforming growth factor-beta receptors II and III." *Int J Oncol* 33(4): 759-765.
- Nieto-Sampedro M. (1999) "Neurite outgrowth inhibitors in gliotic tissue." *Adv Exp Med Biol* 468: 207-224.
- Ohsawa K, Imai Y, Kanazawa H, Sasaki Y, Kohsaka S. (2000) "Involvement of Iba1 in membrane ruffling and phagocytosis of macrophages/microglia." *J Cell Sci* 113 (Pt 17): 3073-3084.
- Oklu R, Hesketh R. (2000) "The latent transforming growth factor beta binding protein (LTBP) family." *Biochem J* 352: 601-610.
- Ongali B, Nicolakakis N, Lecrux C, Aboukassim T, Rosa-Neto P, Papadopoulos P, Tong XK, Hamel E. (2011) "Transgenic mice overexpressing APP and transforming growth factor-beta1 feature cognitive and vascular hallmarks of Alzheimer's disease." *Am J Pathol* 177(6): 3071-3080.
- Padgett RW, Cho SH, Evangelista C. (1998) "Smads are the central component in transforming growth factor-beta signaling." *Pharmacol Ther* 78(1): 47-52.
- Palladino MA, Morris RE, Starnes HF, Levinson AD. (1990) "The transforming growth factor-betas. A new family of immunoregulatory molecules." *Ann NY Acad Sci* 593: 181-187.
- Pang L, Ye W, Che XM, Roessler BJ, Betz AL, Yang GY. (2001) "Reduction of inflammatory response in the mouse brain with adenoviral-mediated transforming growth factor-ss1 expression." *Stroke* 32(2): 544-552.
- Pera J, Zawadzka M, Kaminska B, Szczudlik A. (2004) "Influence of chemical and ischemic preconditioning on cytokine expression after focal brain ischemia." *J Neurosci Res* 78(1): 132-140.
- Platten M, Wick W, Weller M. (2001) "Malignant glioma biology: role for TGF-beta in growth, motility, angiogenesis, and immune escape." *Microsc Res Tech* 52(4): 401-410.

- Postlethwaite AE, Keski-Oja J, Moses HL, Kang AH. (1987) "Stimulation of the chemotactic migration of human fibroblasts by transforming growth factor beta." *J Exp Med* 165(1): 251-256.
- Poulsen KT, Armanini MP, Klein RD, Hynes MA, Phillips HS, Rosenthal A. (1994) "TGF beta 2 and TGF beta 3 are potent survival factors for midbrain dopaminergic neurons." *Neuron* 13(5): 1245-1252.
- Prehn JH, Backhauss C, Krieglstein J. (1993) "Transforming growth factor-beta 1 prevents glutamate neurotoxicity in rat neocortical cultures and protects mouse neocortex from ischemic injury in vivo." *J Cereb Blood Flow Metab* 13(3): 521-525.
- Prevot V, Bouret S, Croix D, Takumi T, Jennes L, Mitchell V, Beauvillain JC. (2000) "Evidence that members of the TGFbeta superfamily play a role in regulation of the GnRH neuroendocrine axis: expression of a type I serine-threonine kinase receptor for TGRbeta and activin in GnRH neurones and hypothalamic areas of the female rat." *J Neuroendocrinol* 12(7): 665-670.
- Purchio AF, Cooper JA, Brunner AM, Lioubin MN, Gentry LE, Kovacina KS, Roth RA, Marquardt H. (1988) "Identification of mannose 6-phosphate in two asparagine-linked sugar chains of recombinant transforming growth factor-beta 1 precursor." *J Biol Chem* 263(28): 14211-14215.
- Raff MC, Barres BA, Burne JF, Coles HS, Ishizaki Y, Jacobson MD. (1993) "Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from the nervous system." *Science* 262(5134): 695-700.
- Rahhal B, Heermann S, Ferdinand A, Rosenbusch J, Rickmann M, Krieglstein K. (2009) "In vivo requirement of TGF-beta/GDNF cooperativity in mouse development: focus on the neurotrophic hypothesis." *Int J Dev Neurosci* 27(1): 97-102.
- Ramos-Cabrer P, Campos F, Sobrino T, Castillo J. (2011) "Targeting the ischemic penumbra." *Stroke* 42(1 Suppl): S7-11.
- Rich JN, Zhang M, Datto MB, Bigner DD, Wang XF. (1999) "Transforming growth factor-beta-mediated p15(INK4B) induction and growth inhibition in astrocytes is SMAD3-dependent and a pathway prominently altered in human glioma cell lines." *J Biol Chem* 274(49): 35053-35058.

- Rifkin DB. (2005) "Latent transforming growth factor-beta (TGF-beta) binding proteins: orchestrators of TGF-beta availability." *J Biol Chem* 280(9): 7409-7412.
- Roberts AB, Anzano MA, Lamb LC, Smith JM, Sporn MB. (1981) "New class of transforming growth factors potentiated by epidermal growth factor: isolation from non-neoplastic tissues." *Proc Natl Acad Sci USA* 78(9): 5339-5343.
- Roberts AB, Lamb LC, Newton DL, Sporn MB, De Larco JE, Todaro GJ. (1980) "Transforming growth factors: isolation of polypeptides from virally and chemically transformed cells by acid/ethanol extraction." *Proc Natl Acad Sci USA* 77(6): 3494-3498.
- Roberts AB, Sporn MB, Assoian RK, Smith JM, Roche NS, Wakefield LM, Heine UI, Liotta LA, Falanga V, Kehrl JH. (1986) "Transforming growth factor type beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro." *Proc Natl Acad Sci USA* 83(12): 4167-4171.
- Roussa E, Oehlke O, Rahhal B, Heermann S, Heidrich S, Wiehle M, Krieglstein K. (2008) "Transforming growth factor beta cooperates with persephin for dopaminergic phenotype induction." *Stem Cells* 26(7): 1683-1694.
- Roussa E, von Bohlen und Halbach O, Krieglstein K. (2009) "TGF-beta in dopamine neuron development, maintenance and neuroprotection." *Adv Exp Med Biol.* 651: 81-90.
- Ruocco A, Nicole O, Docagne F, Ali C, Chazalviel L, Komesli S, Yablonsky F, Roussel S, MacKenzie ET, Vivien D, Buisson A. (1999) "A transforming growth factor-beta antagonist unmasks the neuroprotective role of this endogenous cytokine in excitotoxic and ischemic brain injury." *J Cereb Blood Flow Metab* 19(12): 1345-1353.
- Saharinen J, Hyytiäinen M, Taipale J, Keski-Oja J. (1999) "Latent transforming growth factor-beta binding proteins (LTBPs) - structural extracellular matrix proteins for targeting TGF-beta action." *Cytokine Growth Factor Rev* 10(2): 99-117.
- Saharinen J, Keski-Oja J. (2000) "Specific sequence motif of 8-Cys repeats of TGF-beta binding proteins, LTBPs, creates a hydrophobic interaction surface for binding of small latent TGF-beta." *Mol Biol Cell* 11(8): 2691-2704.

- Santibañez JF, Quintanilla M, Bernabeu C. (2011) "TGF- β /TGF- β receptor system and its role in physiological and pathological conditions." *Clin Sci (Lond)*. 121(6): 233-251.
- Sasaki A, Naganuma H, Satoh E, Kawataki T, Amagasaki K, Nukui H. (2001) "Participation of thrombospondin-1 in the activation of latent transforming growth factor-beta in malignant glioma cells." *Neurol Med Chir (Tokyo)* 41(5): 253-258; discussion 258-259.
- Sato Y, Rifkin DB. (1989) "Inhibition of endothelial cell movement by pericytes and smooth muscle cells: activation of a latent transforming growth factor-beta 1-like molecule by plasmin during co-culture." *J Cell Biol* 109(1): 309-315.
- Schachtrup C, Ryu JK, Helmrick MJ, Vagena E, Galanakis DK, Degen JL, Margolis RU, Akassoglou K. (2011) "Fibrinogen triggers astrocyte scar formation by promoting the availability of active TGF-beta after vascular damage." *J Neurosci* 30(17): 5843-5854.
- Schilling MI, Besselmann M, Leonhard C, Mueller M, Ringelstein EB, Kiefer R. (2003) "Microglial activation precedes and predominates over macrophage infiltration in transient focal cerebral ischemia: a study in green fluorescent protein transgenic bone marrow chimeric mice." *Exp Neurol* 183(1): 25-33.
- Schlunegger MP, Grutter MG. (1992) "An unusual feature revealed by the crystal structure at 2.2 Å resolution of human transforming growth factor-beta 2." *Nature* 358(6385): 430-434.
- Schmierer B, Hill CS. (2007) "TGFbeta-SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility." *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(12): 970-982.
- Schober A, Peterziel H, von Bartheld CS, Simon H, Kriegstein K, Unsicker K. (2007) "GDNF applied to the MPTP-lesioned nigrostriatal system requires TGF-beta for its neuroprotective action." *Neurobiol Dis* 25(2): 378-391.
- Sinha S, Nevett C, Shuttleworth CA, Kielty CM. (1998) "Cellular and extracellular biology of the latent transforming growth factor-beta binding proteins." *Matrix Biol* 17(8-9): 529-545.

- ten Dijke P, Hill CS. (2004) "New insights into TGF-beta-Smad signalling." *Trends Biochem Sci* 29(5): 265-273.
- ten Dijke P, Iwata KK, Thorikay M, Schwedes J, Stewart A, Pieler C. (1990) "Molecular characterization of transforming growth factor type beta 3." *Ann NY Acad Sci* 593: 26-42.
- Todorovic V, Jurukovski V, Chen Y, Fontana L, Dabovic B, Rifkin DB. (2005) "Latent TGF-beta binding proteins." *Int J Biochem Cell Biol* 37(1): 38-41.
- Ueda R, Fujita M, Zhu X, Sasaki K, Kasthuber ER, Kohanbash G, McDonald HA, Harper J, Lonning S, Okada H. (2009) "Systemic inhibition of transforming growth factor-beta in glioma-bearing mice improves the therapeutic efficacy of glioma-associated antigen peptide vaccines." *Clin Cancer Res* 15(21): 6551-6559.
- Unsicker K, Flanders KC, Cissel DS, Lafyatis R, Sporn MB. (1991) "Transforming growth factor beta isoforms in the adult rat central and peripheral nervous system." *Neuroscience* 44(3): 613-625.
- Unsicker K, Meier C, Krieglstein K, Sartor BM, Flanders KC. (1996) "Expression, localization, and function of transforming growth factor-beta s in embryonic chick spinal cord, hindbrain, and dorsal root ganglia." *J Neurobiol* 29(2): 262-276.
- Vincze C, Pál G, Wappler EA, Szabó ER, Nagy ZG, Lovas G, Dobolyi A. (2010) "Distribution of mRNAs encoding transforming growth factors- β 1, -2, and -3 in the intact rat brain and after experimentally induced focal ischemia." *J Comp Neurol* 518(18): 3752-3770.
- Vogel T, Ahrens S, Büttner N, Krieglstein K. (2010) "Transforming growth factor beta promotes neuronal cell fate of mouse cortical and hippocampal progenitors in vitro and in vivo: identification of Nedd9 as an essential signaling component." *Cereb Cortex* 20(3): 661-671.
- Wang X, Chen W, Liu W, Wu J, Shao Y, Zhang X. (2009) "The role of thrombospondin-1 and transforming growth factor-beta after spinal cord injury in the rat." *J Clin Neurosci* 16(6): 818-821.
- Wick W, Naumann U, Weller M. (2006) "Transforming growth factor-beta: a molecular target for the future therapy of glioblastoma." *Curr Pharm Des* 12(3): 341-349.

- Wilson JX. (1997) "Antioxidant defense of the brain: a role for astrocytes." *Can J Physiol Pharmacol* 75(10-11): 1149-1163.
- Wu Z, Hayashi Y, Zhang J, Nakanishi H. (2007) "Involvement of prostaglandin E2 released from leptomeningeal cells in increased expression of transforming growth factor-beta in glial cells and cortical neurons during systemic inflammation." *J Neurosci Res* 85(1): 184-192.
- Wu Z, Tokuda Y, Zhang XW, Nakanishi H. (2008) "Age-dependent responses of glial cells and leptomeninges during systemic inflammation." *Neurobiol Dis* 32(3): 543-551.
- Wyss-Coray T, Lin C, von Eeuw D, Masliah E, Mucke L, Lacombe P. (2000) "Alzheimer's disease-like cerebrovascular pathology in transforming growth factor-beta1 transgenic mice and functional metabolic correlates." *Ann NY Acad Sci* 903: 317-323.
- Xiao BG, Bai XF, Zhang GX, Link H. (1997) "Transforming growth factor-beta1 induces apoptosis of rat microglia without relation to bcl-2 oncoprotein expression." *Neurosci Lett* 226(2): 71-74.
- Yamashita K, Gerken U, Vogel P, Hossmann K, Wiessner C. (1999) "Biphasic expression of TGF-beta1 mRNA in the rat brain following permanent occlusion of the middle cerebral artery." *Brain Research* 836(1-2): 139-145.
- Yin J, Sakamoto K, Zhang H, Ito Z, Imagama S, Kishida S, Natori T, Sawada M, Matsuyama Y, Kadomatsu K. (2009) "Transforming growth factor-beta1 upregulates keratan sulfate and chondroitin sulfate biosynthesis in microglia after brain injury." *Brain Res* 1263: 10-22.
- Zhang JM, Hoffmann R, Sieber-Blum M. (1997) "Mitogenic and anti-proliferative signals for neural crest cells and the neurogenic action of TGF-beta1." *Dev Dyn* 208(3): 375-386.
- Zhang L, Sato E, Amagasaki K, Nakao A, Naganuma H. (2006) "Participation of an abnormality in the transforming growth factor-beta signaling pathway in resistance of malignant glioma cells to growth inhibition induced by that factor." *J Neurosurg* 105(1): 119-128.

- Zhu HJ, Burgess AW. (2001) "Regulation of transforming growth factor-beta signaling." *Mol Cell Biol Res Commun* 4(6): 321-330.
- Zhu Y, Culmsee C, Roth-Eichhorn S, Krieglstein J. (2001) "Beta(2)-adrenoceptor stimulation enhances latent transforming growth factor-beta-binding protein-1 and transforming growth factor-beta1 expression in rat hippocampus after transient forebrain ischemia." *Neuroscience* 107(4): 593-602.
- Zhu Y, Yang GY, Ahlemeyer B, Pang L, Che XM, Culmsee C, Klumpp S, Krieglstein J. (2002) "Transforming growth factor-beta 1 increases bad phosphorylation and protects neurons against damage." *J Neurosci* 22(10): 3898-3909.

11. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

11.1. *Az értekezés alapjául szolgáló saját közlemények*

1. **Vincze C.**, Pál G., Wappler E., Szabó E. R., Nagy Z., Lovas G., Dobolyi A. (2010). "Distribution of mRNAs encoding transforming growth factors- β 1,-2, and-3 in the intact rat brain and after experimentally induced focal ischemia." *J. Comp. Neurol.* 518(18): 3752-3770. Impakt faktor: **3,774**
2. Dobolyi A., **Vincze C.**, Pál G, Lovas G. (2012). "The neuroprotective functions of transforming growth factor Beta proteins." *Int. J. Mol. Sci.* 13(7): 8219-8258.
Impakt faktor: **2,464**
3. Pál G., **Vincze C.**, Renner É., Wappler E., Nagy Z., Lovas G., Dobolyi A. (2012). "Time course, distribution and cell types of induction of transforming growth factor betas following middle cerebral artery occlusion in the rat brain." *PLoS One* 7(10): e46731. Impakt faktor: **3,730**

11.2. *A disszertációhoz nem kapcsolódó tudományos cikkek*

1. Frank CL, Czirok SJ, **Vincze C**, Rácz G, Szél A, Vigh B. Autonomic nerves terminating on microvessels in the pineal organs of various submammalian vertebrates. *Acta Biol Hung.* 2005;56(1-2):35-41.
2. Vigh B, Manzano e Silva MJ, Frank CL, **Vincze C**, Czirok SJ, Szabó A, Lukáts A, Szél A. The system of cerebrospinal fluid-contacting neurons. Its supposed role in the nonsynaptic signal transmission of the brain. *Histol Histopathol.* 2004 Apr; 19(2):607-28.
3. Frank CL, David C, Czirok S, **Vincze C**, Manzano MJ, Vigh B. Autonomic nerves terminating on smooth muscle cells of vessels in the pineal organ of various mammals. *Acta Biol Hung.* 2003; 54:(3-4) pp. 233-240.

12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Hálás köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Dobolyi Árpádnak állandó és fáradhatatlan útmutatásáért, a tudomány iránti lankadatlan lelkesedéséért, mely mindig magával ragadott. Továbbá szívből köszönöm Dr. Lovas Gábornak, hogy a neurológia és az idegtudomány útvesztőjében mindig a helyes útra terelt. Szeretném megköszönni Bereczki Dániel Professzor Úrnak és Böhm József Főorvos Úrnak mindenkori szívélyes támogatását, mely lehetővé tette PhD munkám elkészítését. Szeretném megköszönni Vígh Béla Professzor Úrnak, hogy orvostanhallgató koromban fantasztikus személyiségével és szemléletmódjával megszerettette velem a neuroanatómiát és az alapkutatást, melynek hatására a neurológia és az idegtudományok felé fordultam. Ezen kívül hálával tartozom Dr. Pál Gabriellának mindenkori, a kísérletekben és az eredmények feldolgozásában nyújtott segítségért. Továbbá köszönettel tartozom Hanák Nikolettnek és Dellaszéga-Lábas Viktóriának a technikai segítségért, továbbá Dr. Dobolyiné Renner Évának, Dr. Vitéz-Cservenák Melindának, Szabó Éva Rebekának, hogy mindig minden kérdésemre türelemmel válaszoltak és mindenkor a segítségemre voltak.

Köszönöm szüleimnek, hogy mind egyetemi éveim alatt mind diplomám és szakvizsgám megszerzése után mindenben messzemenőig támogattak.