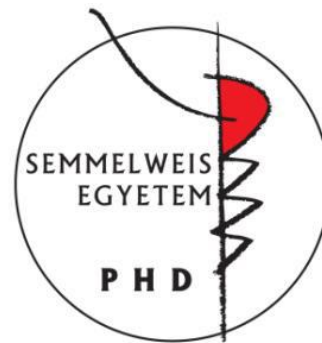


Transzformáló növekedési faktor-béta fehérjék és receptoraik fokális ischémiát követően patkányagyban

Doktori értekezés

Dr. Pál Gabriella

Semmelweis Egyetem
Szentágothai János Idegtudományi Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Dobolyi Árpád, Ph.D., az MTA doktora, tudományos tanácsadó

Hivatalos bírálók: Dr. Dénes Ádám, Ph.D., tudományos főmunkatárs
Dr. Reiniger Lilla, Ph.D., egyetemi adjunktus

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Bereczki Dániel, Ph.D., az MTA doktora, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Székely Andrea, Ph.D., egyetemi docens
Dr. Vastagh Ildikó, Ph.D., egyetemi adjunktus

Budapest

2016

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke	5
2. Bevezetés.....	7
2.1. Ischémiás stroke.....	7
2.1.1. <i>Ischémiás-reperfúziós károsodás</i>	<i>7</i>
2.1.2. <i>Ischémiás stroke kezelése, neuroprotekción</i>	<i>9</i>
2.2. A transzformáló növekedési faktor-béta fehérjék és receptoraik bemutatása	10
2.2.1. <i>A TGF-β fehérjék és jellemzésük.....</i>	<i>10</i>
2.2.2. <i>A TGF-β receptorok</i>	<i>11</i>
2.2.3. <i>A TGF-β jelátvitel</i>	<i>13</i>
2.3. A transzformáló növekedési faktor-béták megjelenése és szerepe agyi ischémiát követően	13
2.3.1. <i>A TGF-β-k neuroprotektív szerepe agyi ischémiát követően</i>	<i>13</i>
2.3.2. <i>A TGF-β1-3 indukciója fokális ischémiát követően</i>	<i>15</i>
2.4. A transzformáló növekedési faktor-béta fehérjék további neuroprotektív szerepei	18
2.4.1. <i>A TGF-β-k szerepe agydaganatokban.....</i>	<i>18</i>
2.4.2. <i>A TGF-β-k szerepe neurodegeneratív betegségekben.....</i>	<i>20</i>
2.5. A központi idegrendszer sejtjeinek válasza fokális ischémiára.....	21
2.5.1. <i>Neuronális válasz.....</i>	<i>21</i>
2.5.2. <i>Asztroglia reakció</i>	<i>23</i>
2.5.3. <i>Mikroglia aktiváció</i>	<i>24</i>
3. Célkitűzések	27
4. Módszerek	28
4.1. Kísérleti állatok.....	28
4.2. Artéria cerebri media okklúziója	28
4.3. Az operált állatok kísérleti csoportokba való besorolása.....	29
4.4. Krezil ibolya (Nissl) festés	31
4.5. A lézionált terület méretének kvantálása	31
4.6. In situ hibridizációs hisztokémia	31
4.6.1. <i>In situ hibridizációs DNS próba készítése.....</i>	<i>31</i>

4.6.2. <i>A metszetek előkészítése</i>	33
4.6.3. <i>Radioaktívan jelölt RNS próba előállítása</i>	33
4.6.4. <i>A hibridizáció és előhívás</i>	34
4.7. <i>In situ hibridizációs hisztokémia eredményeinek kvantálása</i>	34
4.8. <i>Szövetgyűjtés immunfestéshez</i>	35
4.9. <i>Immunhisztokémia</i>	35
4.10. <i>Immunhisztokémia és in situ hibridizációs hisztokémia kombinálása</i>	37
4.11. <i>A dupla jelölés eredményeinek kiértékelése</i>	37
4.12. <i>Szövetteni elemzés és fényképezés</i>	38
5. Eredmények	39
5.1. <i>A lézionált terület megjelenítése</i>	39
5.2. <i>A TGF-β receptorok mRNS expressziós mintázata MCAO-t követően patkányagyban</i>	41
5.2.1. <i>TGF-β receptorok mRNS expressziója az ép agyszövetben</i>	41
5.2.2. <i>24 órával tranziens MCAO után</i>	41
5.2.3. <i>72 órával tranziens MCAO-t követően</i>	43
5.2.4. <i>1 hónappal tranziens MCAO után</i>	46
5.3. <i>TGF-β-kat expresszáló sejtek típusának meghatározása tranziens MCAO-t követően</i>	47
5.3.1. <i>TGF-β1-t expresszáló sejtek típusa</i>	48
5.3.2. <i>TGF-β2-t és -β3-t expresszáló sejtek típusa</i>	49
5.3.3. <i>TGF-β mRNS-ek eloszlásának viszonya a penumbrához és a hegyszövethez</i>	50
5.4. <i>TGF-β receptorokat expresszáló sejtek típusai</i>	52
5.4.1. <i>TGF-β RI-t expresszáló sejtek típusa ép kéregben</i>	52
5.4.2. <i>TGF-β RI-et és TGF-β RII-t expresszáló sejtek típusa</i>	52
5.4.3. <i>TGF-β RIII-t és Alk1-et expresszáló sejtek típusa</i>	55
5.5. <i>TGF-β-kat expresszáló sejtek Fos és ATF-3 indukciója tranziens MCAO-t követően</i>	57
6. Megbeszélés	60
6.1. <i>A különböző TGF-β altípusok expressziója fokális ischémiát követően patkányagyban</i>	60

6.2. A különböző TGF- β receptor típusok expressziója fokális ischémiát követően patkányagyban.....	61
6.3. A TGF- β rendszer indukciójának lehetséges mechanizmusai	63
6.4. A TGF- β rendszer fokális ischémiát követő indukciójának lehetséges funkciói	65
7. Következtetések	69
8. Összefoglaló	70
9. Summary	71
10. Irodalomjegyzék	72
11. Saját publikációk jegyzéke	95
11.1. Az értekezés alapjául szolgáló saját közlemények	95
11.2. Az értekezéshez nem kapcsolódó közlemények	95
12. Köszönetnyilvánítás.....	96

1. Rövidítések jegyzéke

A β	beta-amyloid plakk	DPM	desintegration per minute
AB	arteria basilaris	DTT	dithiothreitol
ABC	avidin-biotin-horseradish peroxidase complex	GFAP	glial fibrillary acidic protein
ac	comissura anterior	HIF	hypoxia inducible factor
ACA	arteria cerebri anterior	Hsp-70	heat shock protein 70
ACC	arteria carotis communis	Iba1	ionized calcium binding adaptor molecule 1
ACE	arteria carotis externa	iNOS	inducible nitric oxide synthase
ACI	arteria carotis interna	IL-1	interleukin-1
ACIA	arteria cerebelli inferior anterior	IL-18	interleukin-18
ACM	arteria cerebri media	JNK	Jun N-terminal kinase
ACOA	arteria communicans anterior	LAP	latency associated peptide
ACOP	arteria communicans posterior	LTBP	latent TGF- β binding protein
ACP	arteria cerebri posterior	LV	lateral ventricle
ACS	arteria cerebelli superior	MAPK	mitogen activated protein kinase
Alk1	activin-like kinase 1	MCAO	medial cerebral artery occlusion
ANOVA	analysis of variance	MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6- tetrahidropiridin
α S-100	calcium-binding protein alpha	NeuN	neuronal nuclei
ATF-3	activating transcription factor- 3	NF- κ B	nuclear faktor- κ B
AV	arteria vertebralis	NMDA	N-methyl-D-aspartate receptor
BMP	bone morphogenic protein	NTB	nuclear track emulsion
BSA	bovine serum albumin	PB	phosphate buffer
cc	corpus callosum	PCI	percutaneous coronary intervention
CCl2	chemokine ligand 2	PHD	prolylhidroxilase
cp	caudate putamen, striatum	R-Smad	receptor regulated Smad
cx	cortex		
DAB	3',3'-diamino-benzidin		
DEPC	diethylpyrocarbonate		

TRAF6	tumor necrosis faktor- receptor-associated faktor 6	TNF- α	Tumor necrosis factor alpha
TAK1	TGF- β - associated kinase 1	TTC	2,3,5-triphenyltetrazolium chlorid
TE	Tris-edta puffer	SDS	Sodium dodecyl sulfat
TGF- β	Transforming growth faktor- beta	Sox-4	Sry-related HMG box -4
TGF- β R	Transforming growth faktor- beta receptor	VEGF	Vascular endothelial growth faktor
TLR	Toll-like receptor	vWF	von Willebrand Faktor

2. Bevezetés

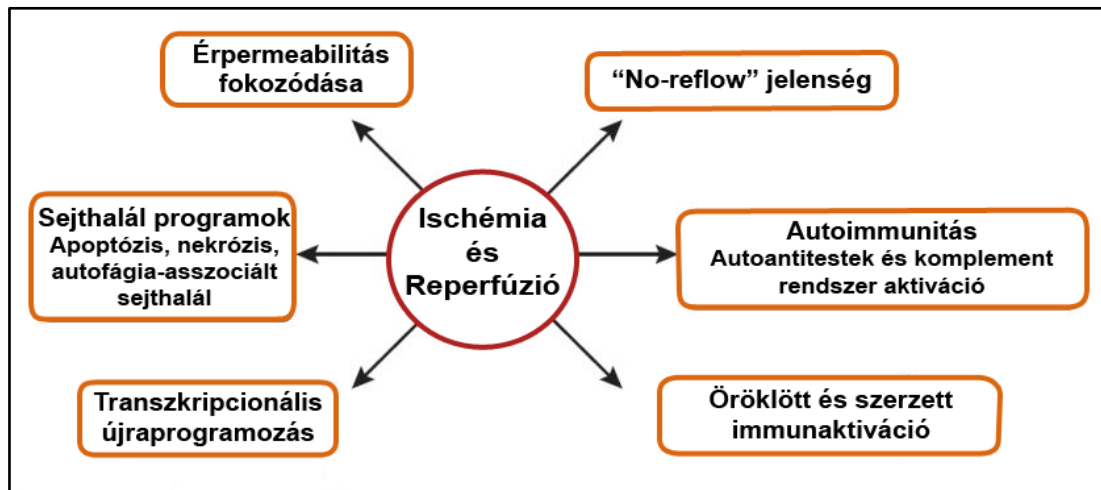
2.1. Ischémiás stroke

A stroke világszerte harmadik a vezető halálokok listáján, és számos felnőttkori súlyos és maradandó mozgáskorlátozottsának leggyakoribb oka (Roger és mtsai. 2012). Az akut stroke esetek körülbelül 80%-a ischémiás eredetű, a fennmaradó 20% vérzéses stroke. Napjainkban ez a betegség komoly problémát jelent világszerte mind a halálozási mutatók, mind a kezelés korlátozott lehetőségei és a magas egészségügyi kiadások miatt (Kim és Johnston 2013).

2.1.1. Ischémiás-reperfúziós károsodás

Globális agyi ischémia során számos érellátási terület érintett, mely létrejöhet szívleállás illetve agyi hipoperfúzió következményeként (Nour és mtsai. 2013). Fokális ischémia során egy-egy érellátási terület érintett, melyet a nyaki erek atherosclerózisa miatt kialakuló thrombus leszakadása, tovább sodródása és elakadása, illetve helyben keletkező thrombus kialakulása okozhat (Abou-Chebl 2013). Az ischémia az érintett agyerületen beindítja a sejthalállal végződő folyamatokat. Ide tartozik a nekrozis, melynek meghatározó folyamatai a progresszív sejt duzzadás, a plazmamebrán átszakadása és a proteázok illetve lizoszomális enzimek extracelluláris térbe történő felszabadulása. Ezen folyamatok közé tartozik az apoptózis, melyet a magfragmentáció, plazmamembrán lefűződés, a sejt zsugorodása és a mitokondrium membránpotenciáljának és integritásának elvesztése jellemez. Végül az autofágia-asszociált sejthalált is ide soroljuk, mely során sejtplazmában vakuólumok keletkeznek, melyek spirális membrándarabokat tartalmaznak. (Hotchkiss és mtsai. 2009). A szöveti sérülés mechanizmusa mind celluláris, mind molekuláris szinten zajlik. Az indukálható nitrogén-oxid-szintáz aktivitását az agyi ischémia befolyásolja. Ez segíti a nitrogén-oxid felszabadulását, amely peroxinitritté történő átalakulást követően, mint az egyik fő reaktív oxigén gyök nekrozishoz és apoptózishoz vezet (Bolanos és Almeida 1999). Az ischémiás periódus során a génexpresszió szabályozása jelentősen módosul. Például a prolilhidroxiláz (PHD) enzim gátlódik, mivel oxigén szükséges működéséhez kofaktorként. Ez számos hipoxia és gyulladás asszociált kaszkád poszttranszlációs

aktivációját indítja, melyek kontrollálják a hipoxia indukálta faktor (HIF) és a nukleárisfaktor- κ B (NF- κ B) stabilitását (Eltzschig és Carmeliet 2011). Az ischémiát követő reperfúzió akkor jön létre, mikor egy kezdeti érelzáródást követően később helyreáll a vérellátás és ezzel együtt az érintett szövet oxigenizációja. Ez a folyamat gyakran paradox módon további károsodáshoz vezet (Nour és mtsai. 2013). Ischémia és reperfúzió következtében a szövet sérülésével összefüggésben számos patológiai folyamat játszódik le (1. ábra). A metabolikus ellátás károsodása az ischémiás területen belül hipoxia mellett kapilláris diszfunkcióhoz vezet. Továbbá a korlátozott oxigén ellátás az ischémiás periódus alatt az endotel sejt barrier funkciójának károsodását okozza, és ez együtt jár az érpermeabilitás növekedésével, mely a reperfúzió során is fennáll (Khatri és mtsai. 2012).



1. ábra Ischémia és reperfúzió által érintett biológiai folyamatok (Eltzschig és Eckle 2011)

A celluláris metabolikus közeg általános diszfunkciójának eredményeképpen proinflammatorikus citokinek vezetnek az endotel sejtek gyulladásához és az érrendszer fokozott permeabilitásához. Ez a sérülés az ischémiás periódust követően is tart, arteria cerebri media okklúziós (MCAO) állatkísérletek során kimutatták, hogy az oxidatív stressz tartósan hat a kapillárisok pericitáira az artériás rekanalizáció ellenére is (Yemisci és mtsai. 2009). Az ischémia során elkezdődik, illetve reperfúzió következményeként tovább fokozódik az öröklött és adaptív immunválasz, illetve a programozott sejthalál (Eltzschig és Eckle 2011). Az öröklött és szerzett immunválasz aktiválódása a károsodás kiterjedéséhez vezet, mivel többek között aktiválódnak a mintázat felismerő, Toll-like receptorok (TLR-ek) és gyulladással sejtek árasztják el az

érintett szövetet (Chen és Nunez 2010). Az elzárt ér sikeres rekanalizációja ellenére, az ischémiás szervben nem feltétlenül áll helyre azonnal a perfúzió („no reflow”jelenség). Ezen felül a reperfúziós sérülés fokozott autoimmun válasszal jellemezhető, beleértve a sérülés miatt keletkező új antigéneket felismerő természetes antitesteket és a komplement rendszer aktivitását (Carroll és Holers 2005). Mindkét folyamat az immunrendszer további stimulálásához vezet, mely magába foglalja nukleotidok felszabadulását ami fagocitózist indukál az apoptotikus szöveti környezetben, és ez egészében véve még kiterjedtebb reperfúziós károsodást okoz (Elliott és mtsai. 2009). Szintén kimutatták, hogy reperfúzió során bekövetkező sérülések közé tartozik még a reaktív oxigén gyökök közvetítette károsodás az érintett szövetben (Peters és mtsai. 1998, Olmez és Ozyurt 2012).

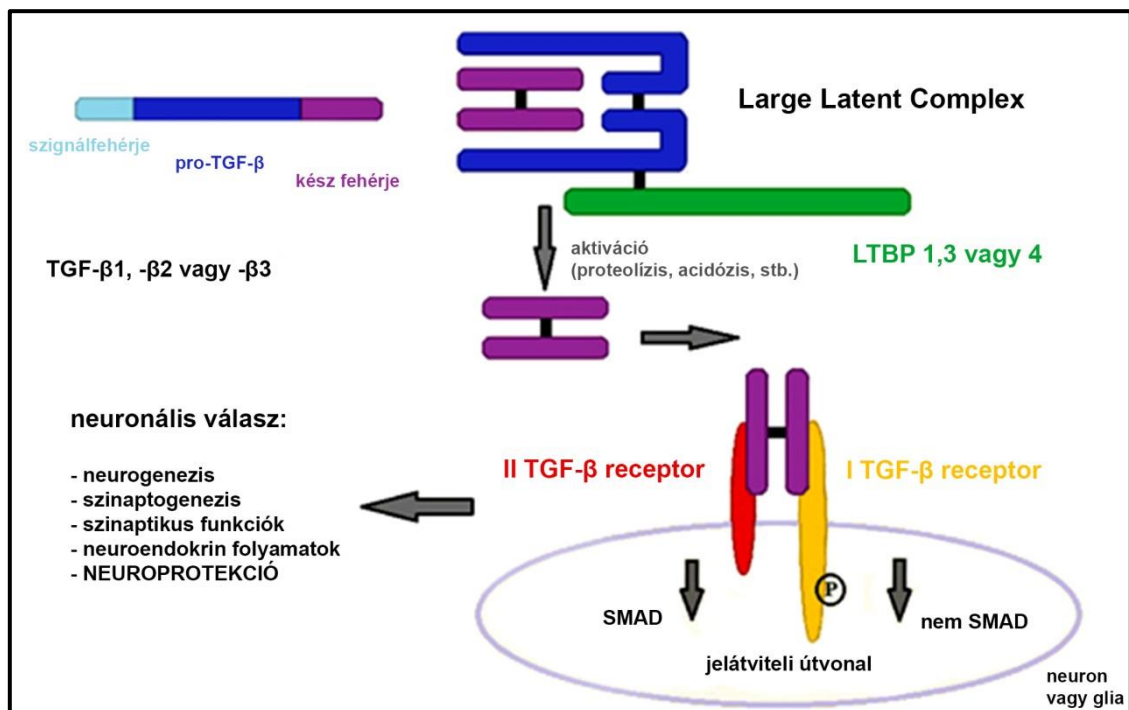
2.1.2. Ischémiás stroke kezelése, neuroprotekción

A jelenleg általánosan alkalmazott lízisterápia segítségével az agyi keringés helyreállítása és így a penumbra sejteinek megmentése a cél, viszont ez csak egy szűk időablakon belül alkalmazható (Wardlaw és mtsai. 2012). A penumbra az az ischémiás magot körülvevő terület, amely még megmenthető, és így ez a további neuroprotektív kezelések fő célpontja (Fisher 2006, Ramos-Cabrer és mtsai. 2011). A neuroprotekción a trombolízis alternatív, kiegészítő kezelési lehetősége. Az elmúlt évtizedben számos neuroprotektív ágenszt teszteltek különböző ischémiás állatkísérletes modellben, bár a klinikai kipróbálás során a hozzá fűzött remények többnyire nem váltak be. Továbbá az endovaszkulárisan kivitelezett mechanikai trombektómia egy újabb ígéretes terápiás lehetőség a nagy ereket érintő elzáródásnál (Ding 2015), mely az akut szívinfarktusból már elterjedten alkalmazott percutan coronaria intervencióhoz (PCI) igen hasonlóan kivitelezhető akut ischémiás stroke esetében is (Taqi és mtsai. 2012, Campbell és mtsai. 2015). Jelenleg világszerte a trombolízis maradt az elsődleges, habár koránt sem ideális kezelés, mivel számos komplikáció léphet fel és kevés beteg számára elérhető a szűk időablak miatt. Remélhetőleg a jövő ischémiás stroke terápiája neuroprotektív, trombolitikus, antitrombotikus és neuroreparáción alapuló kezelések kombinációjából állhat (Moretti és mtsai. 2014).

2.2. A transzformáló növekedési faktor- β fehérjék és receptoraik bemutatása

2.2.1. A TGF- β fehérjék és jellemzésük

TGF- β -kat eredetileg a vese fibroblasztjainak onkogén transzformációját indukáló képességéről nevezték el (Roberts és mtsai. 1981). TGF- β -k olyan fehérje szupercsalád tagjai, melybe többek között a csont-morfogenetikus proteinek (BMP-k), az anti-Müller hormon, az aktivin és az inhibin különböző altípusai tartoznak (Burt és Law 1994). Ezen fehérjék szerkezetükben hasonlóak, de eltérő receptorokon hatnak és különböző folyamatokban vesznek részt. A TGF- β -k különböző sejtek differenciálódását befolyásolják, gátolják a legtöbb sejt osztódását, de stimulálni tudják néhány kötőszöveti sejt növekedését és különböző szövetek extracelluláris mátrixának alakulására is hatnak (Roberts 1998). Az immunrendszerre való hatásuk alapján a TGF- β -k citokinekhez tartoznak (Kiefer és mtsai. 1995). A TGF- β 1-t, - β 2-t és - β 3-t különböző kromoszómákon három különböző gén kódolja (Lawrence 1996). A TGF- β -k előalakjai intracellulárisan homodimereket alkotva szintetizálódnak, majd a Golgi apparátusban egy furin típusú proteáz hasítja őket (2. ábra).



2. ábra TGF- β -k szerkezetének kialakulása és receptoraik aktiválása a központi idegrendszerben (Dobolyi és mtsai. 2012)

A TGF- β -t tartalmazó C-terminális vég és az N-terminális propeptid, a latency-asszociált fehérje (LAP), nem kovalens módon kapcsolódik, így létrehozva a kis látens komplexet (Clark és Coker 1998). Ezt követően az extracelluláris térben nagy látens komplexek formájában jelennek meg (2. ábra), melyekben a TGF- β -k az extracelluláris mátrixproteinek családjába tartozó fehérjék közül a látens TGF- β kötő fehérjékhez (LTBP-khez) kovalens módon kapcsolódnak (Rifkin 2005). A négy különböző LTBP szelektíven köti a TGF- β -kat, az LTBP-1 és -4 mindhárom TGF- β altípust, míg az LTBP-3 csak a TGF- β 1-t köti meg, míg az LTBP-2 pedig egyikhez sem kapcsolódik (Oklu és Hesketh 2000). A TGF- β -k aktivációjához a nagy látens komplex felbomlása szükséges. Ez többféle úton valósulhat meg, mint például acidózis vagy proteolízis során. Az extracelluláris TGF- β -nak több aktivátora ismert, mint például különböző proteázok, a trombospondin-1, integrinek, reaktív oxigéngyökök, és a pH csökkenése (Annes és mtsai. 2003).

A TGF- β -k normál eloszlási mintázatát mind immunhisztokémiai módszerekkel fehérje szintjén (Unsicker és mtsai. 1991), mind in situ hibridizációs hisztokémiával mRNA szintjén (Vincze és mtsai. 2010) leírták. In situ hibridizációs hisztokémiával megjelenített TGF- β 1 mRNA széles körben expresszáldott, így a kéreg és a hippocampus néhány sejtjében, medialis preopticus területen, nucleus paraventricularis hypothalamicusban, a nucleus amygdaloideus centralisban és az oliva superiorban jelent meg (Vincze és mtsai. 2010). A TGF- β 2 és - β 3 konstitutív módon jelen van számos agyi régióban, mind mRNA (Vincze és mtsai. 2010), mind fehérje (Unsicker és mtsai. 1991) szintjén, és az expressziós mintázatuk nagyrészt egyezik. Az agykéregben, a TGF- β 2 expresszió igen kifejezett volt az V. rétegben. A III. és IV. réteg szintén tartalmazott TGF- β 2-t és - β 3-at, viszont a TGF- β -k nem voltak jelen a putamenben (Unsicker és mtsai. 1991, Vincze és mtsai. 2010, Vincze 2015).

2.2.2. A TGF- β receptorok

TGF- β receptor család a szerin-kináz receptorok csoportjába tartozik (Arighi és mtsai. 2009, Weiss és Attisano 2013). Jelátviteli pályájukban Smad fehérjék vesznek részt, melyek foszforilálódva hatnak a sejttagon belül (Massague és Chen 2000). Funkciójukra és szekvencia homológiájukra alapozva feloszthatók I. típusra, mely Smad

fehérjéket foszforilál és II. típusra, mely az I. típus aktivitásához szükséges, továbbá kiegészítő receptorokra, melyek a ligandok kötődésének elősegítésében játszhatnak szerepet (Huang és Chen 2012). A TGF- β RI-t, vagy más néven Alk5-öt (Activin-like kinase receptor 5), kezdetben mindhárom dimer TGF- β fehérje receptoraként azonosították (Lawrence 1996, Roberts 1998). A ligandok a TGF- β RII-hoz kötődnek, mely TGF- β RI-ral kapcsolódva, és azt foszforilálva létrehozza a funkcionális receptort (Wrighton és mtsai. 2009). A funkcionális receptor heterotetramer, mely 2 TGF- β RI-t és 2 TGF- β RII-t tartalmaz (Wrana és mtsai. 1994). Továbbá a TGF- β RIII, vagy bétaglikán képes befolyásolni az I. és II. típusú receptorból álló komplexet (Bilandzic és Stenvers 2012). A TGF- β RIII rendelkezik egy rövid intracelluláris doménnel, mellyel prezentálhatja a TGF- β -kat a TGF- β RII-nak (Wang és mtsai. 1991, Blobe és mtsai. 2001) és megköthet néhány más ligandot, beleértve az inhibint (Lewis és mtsai. 2000). TGF- β RIII különösen fontos a TGF- β 2 felismerésében, mely gyengén kötődik a TGF- β receptorokhoz (Lopez-Casillas és mtsai. 1993). Nemrégiben egy másik I-es típusú receptort is leírtak, az Alk1-et (Activin-like kinase 1), mely a TGF- β 1-gyel és TGF- β 3-mal, illetve a BMP 9-cel együtt szignalizál (Lux és mtsai. 1999). Szintén leírták, hogy az Alk1-en keresztül megvalósuló jelátvitel gyakran különböző, sőt néha ellentétes a TGF- β RI-en keresztül bekövetkező jelátvitellel (Goumans és mtsai. 2003). A legtöbb sejtben a TGF- β jelátvitel azonban az általános TGF- β RI/Alk5-ön indul. Endoteliális sejtekben és neuronokban a TGF- β RI/Alk1-en keresztül is mehet a jel (Konig és mtsai. 2005). A TGF- β receptorok normál eloszlását egységesen még nem vizsgálták, bár az eddigi tanulmányok szerint széleskörű eloszlás feltételezhető. Egyedfejlődés során patkányban a különböző fejlődési stádiumokban RT-PCR-ral az agy különböző részein, többek között a kéregben, a középgagyban, a kisagyban, az agytörzsben, valamint a hippocampusban TGF- β receptorokat mutattak ki (Bottner és mtsai. 1996). Ezen felül RNáz protection assay segítségével is meghatározták a TGF- β RI, RII és RIII mRNS jelenlétét különböző agyi régiókban (Slotkin és mtsai. 1997). Immunohisztokémiával megállapították, hogy a TGF- β RI és RII mind neuronokban és mind gliális sejtekben jelen van az ép agyban (De Groot és mtsai. 1999, Bottner és mtsai. 2000). A TGF- β RIII-t szintén megtalálták az agyban nagy mennyiségben a reprodukív folyamatokért felelős régiókban (MacConell és mtsai. 2002).

2.2.3. A TGF- β jelátvitel

A szabad TGF- β -k dimerként kerülnek célsejtjeiken lévő receptoraik extracelluláris felszínéhez és heteromer komplexként szerin-treonin kináz domént tartalmazó I. és II. típusú receptoraikon keresztül hatnak (Attisano és Wrana 2002, Arighi és mtsai. 2009). Ezt követően a II. típusú receptor foszforilálja az I. típusú receptort, a jelet a Smad fehérjék továbbítják a sejten belül (Gumienny és Padgett 2002). Az aktivált I. típusú kináz receptor foszforilálja a receptor regulált Smad fehérjéket, ide tartozik a Smad1, Smad2, Smad3, Smad5 és Smad8 (Ten Dijke és Hill 2004). Ezek a receptor regulált Smad fehérjék a receptor komplexből felszabadulnak, hogy létrehozzanak egy heterotrimer komplexet, mely két R-Smad-ból és egy általános Smad4-ből áll, amely végül áthelyeződik a sejtmagba (Derynck és Zhang 2003). Ezek a komplexek a sejtmagban halmozódnak fel, ahol a sejtípus és a ligand mennyiségétől függő módon befolyásolják a génexpressziót, más transzkripciós faktorokkal, koaktivátorokkal és korepresszorokkal összhangban. A gátló I-Smad fehérjék közé tartozik a Smad6 és Smad7 (Ten Dijke és Hill 2004, Schmierer és Hill 2007). Nem Smad kapcsolt jelátviteli útvonalak is lehetségesek, mint például a p38, a kis GTP-áz Rho, Rac, a Jun N-terminális kináz (JNK) és a Ras/Erk/Mitogén aktivált protein kináz (MAPK) által mediált útvonal, melyekhez szükséges a Tumor nekrozis faktor-receptor-asszociált faktor 6 (TRAF6) és a TGF- β -asszociált kináz 1/TAK1 (Mu és mtsai. 2012, Dvashi és mtsai. 2015).

2.3. A transzformáló növekedési faktor-béták megjelenése és szerepe agyi ischémiát követően

2.3.1. A TGF- β -k neuroprotektív szerepe agyi ischémiát követően

Agyi ischémia különböző állatkísérletes modelljeiben a TGF- β -k szintje megemelkedik (Ata és mtsai. 1999). MCAO által patkányban létrehozott fokális ischémiát követően a TGF- β 1 indukálódik és az ischémiás területet körülvevő penumbrában jelenik meg (Zhu és mtsai. 2001, Vincze és mtsai. 2010). A TGF- β 1 emelkedett szintjét ischémiás stroke után humán agyszövetben is leírták (Krupinski és mtsai. 1996). Fokális ischémia után a TGF- β 1 mRNS szintjének cinguláris kéregben történő korai megemelkedését időben később a TGF- β 1 infarktált területen belüli

indukciója követte (Yamashita és mtsai. 1999, Doyle és mtsai. 2010). A másik két TGF- β altípus ischémiában való érintettsége kevésbé vizsgált, de indukciójuk feltételezhető, mivel különböző TGF- β -k indukálódnak nekrotizáló agyi lézióban (Ata és mtsai. 1997) és a TGF- β 2 expressziója korrelált a hegyszövet megjelenésével lézionált gerincvelőben (Lagord és mtsai. 2002).

Ischémiát követően indukálódó TGF- β 1 neuroprotektív szerepére szintjének a lézionált terület méretével való korrelációja utal. TGF- β 1 injektálás a stroke állatkísérletes modelljeiben csökkenti az infarktos terület méretét (Gross és mtsai. 1993, Prehn és mtsai. 1993, Zhu és mtsai. 2002), míg az endogén TGF- β 1 hatás szolubilis TGF- β II típusú receptor bejuttatásával antagonizálható, így gátolva a TGF- β 1 működését és aktivitását, és ez az infarktált terület méretének jelentős növekedéséhez vezet (Ruocco és mtsai. 1999). TGF- β nem invazív módon, intranazálisan történő bejuttatását követően csökkent az infarktus mérete és javult a funkcionális regeneráció egerekben artéria cerebri média okklúziója (MCAO) után (Ma és mtsai. 2008). A TGF- β 2 és - β 3 neuroprotekciónban való részvétele a közepagy dopaminerg neuronjainak (Poulsen és mtsai. 1994, Markus 2007, Roussa és mtsai. 2009) és motoneuronjainak (Gouin és mtsai. 1996) túlélésében való szerepükön és a hippocampus neuronjainak plaszticitásának modulálásán (Fukushima és mtsai. 2007) keresztül is bizonyítást nyert.

TGF- β -k az immunsejtek osztódásának, differenciálódásának, aktivációjának és effektív hatásuknak gátlásával védnek az immunrendszer túlműködésének káros hatásaitól fokális ischémiát követően. Paradox módon a TGF- β kemotaktikus faktorként szerepet játszik a neutrofil granulociták inváziójában (Mantel és Schmidt-Weber 2011). MCAO-t követően aktivált mikroglia és bevándorló makrofágok megjelenése az infarktált területen belül (Mabuchi és mtsai. 2000) feltételezhetően a TGF- β 1 fő forrása (Lehrmann és mtsai. 1998). A mikroglia krónikus aktivációja potenciálisan sejtkárosító, gyulladást keltő citokinek, proteázok és reaktív oxigén gyökök expressziójával neuronális károsodáshoz vezethet (Dheen és mtsai. 2007). A TGF- β -k gyulladás ellenes hatásként gátolják a mikroglia sejteket. Mivel a központi idegrendszerben TGF- β 1-t főleg mikroglia sejtek expresszálják (Kiefer és mtsai. 1995), feltételezhetően

visszacsatolt gátlással szabályozzák a mikroglia sejtek aktivitását (Lenzlinger és mtsai. 2001).

A sérült agyban hegeképződés indul, hogy a károsodott terület elhatárolódjon az ép szövetétől. TGF- β 1 részt vesz fibrotikus hegszövet formálódásában, 3 nappal a sérülést követően a lézió körül TGF- β receptort expresszáló sejtek jelentek meg (Komuta és mtsai. 2010). Továbbá TGF- β antagonisták lokális injektálását követően csökkent a gliális hegeképződés az agyi lézió körül (Moon és Fawcett 2001, Yoshioka és mtsai. 2011). A TGF- β 1 csökkenti a szinaptikus átvitelt (Heupel és mtsai. 2008), így feltételezhetően glutamát felszabadításával véd az excitotoxikus neuronális károsodás ellen a lézió széli zónájában. A TGF- β -k regeneratív folyamatokban is részt vehetnek. Ismert hogy gyrus dentatusban (Battista és mtsai. 2006), és zona subventricularisban (Mathieu és mtsai. 2010) neurogenézist indukálnak. TGF- β neuronális irányba kötelezi el a kérgi és hippocampusban elhelyezkedő progenitor sejteket (Vogel és mtsai. 2010).

Pár éve kis molekulájú TGF- β jelátvitel gátlók elérhetőek, alkalmazásuk klinikai fázisban van (Akhurst és Hata 2012). Néhány ezen új anyagok közül feltételezhetően neuroprotektív hatással bír (Manaenko és mtsai. 2014), habár még felfedésre vár, hogy melyik receptor vesz részt ezen folyamatokban. Leírták TGF- β RI és RII indukcióját fokális ischémiát (Vivien és mtsai. 1998, Ata és mtsai. 1999), és globális ischémiát (Li és mtsai. 2008) követően neuronokban és gliasejtekben. Ezzel ellentétben az Alk1 általában endothel sejtekhez köthető (Oh és mtsai. 2000), érsérülést követően megemelkedő expresszióval (Garrido-Martin és mtsai. 2013). Az Alk1 továbbá jelen lehet neuronokban is (Konig és mtsai. 2005). A TGF- β -k neuroprotektív funkciója feltételezi a TGF- β receptorok részvételét fokális ischémiát követően a hipoxiára adott szöveti válaszban. Ehhez köthetően a génexpressziós változások azonosítása a TGF- β neuroprotektív hatásának jobb megértését eredményezheti.

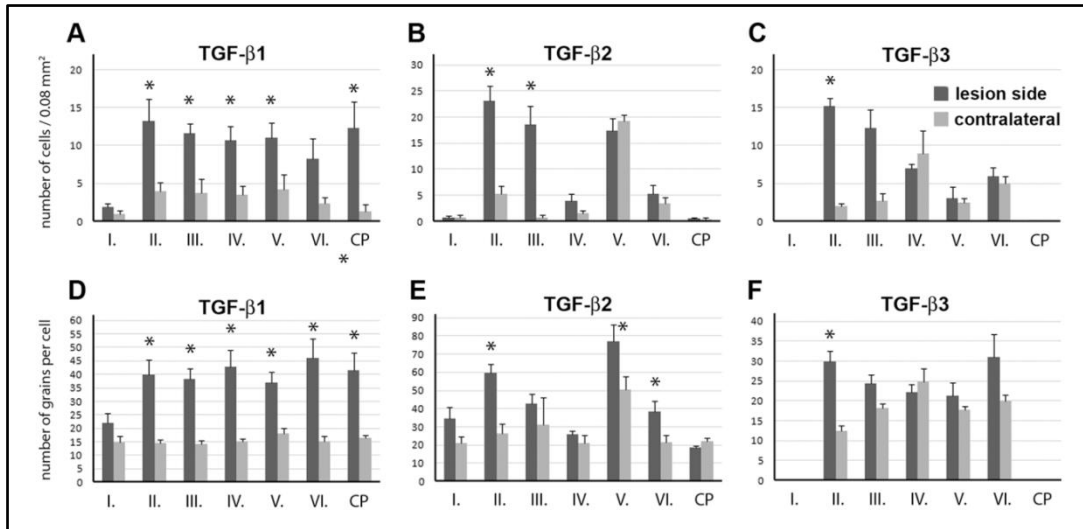
2.3.2. A TGF- β 1-3 indukciója fokális ischémiát követően

A TGF- β 1-3 mRNS időbeli eloszlása MCAO-t követően (Pal és mtsai. 2012) korábban Dr. Vincze Csilla Doktori értekezésében ismertetésre került (Vincze 2015), így ezen eredményeket a bevezetésben foglaljuk össze. Fokális ischémiát követően

mindhárom TGF- β fehérje indukálódik, de expressziós mintázatuk és annak időbeli változásai különbözőek a 3 típus esetén (Pal és mtsai. 2012).

Az artéria cerebri media 1 óras elzárása után 3 órával csak a TGF- β 1 indukciója figyelhető meg a lézió körül a penumbrában. A TGF- β 1-el ellentétben, a TGF- β 2 és - β 3 mRNS eloszlása nem változott szignifikánsan az áloperált állatokhoz képest ebben a korai időpontban (4. ábra).

24 órával MCAO-t a TGF- β 1 mRNS a lézió széli területén, a penumbrában jelent meg mind a kéregben, mind a striatumban. TGF- β 1 mRNS szintjének emelkedése szignifikáns volt az ellenoldali kéreg II-VI. rétegeinek és a striatumnak identikus részeivel összehasonlítva (3/A,D ábra). A TGF- β 2 is indukálódott a penumbrában, de csak a kéregben. A génexpresszió kvantitatív analízise során megállapítható volt, hogy a II. rétegben mind a TGF- β 2-t expresszáló sejtek száma, mind a TGF- β 2 mRNS szintje megemelkedett. A III. rétegben TGF- β 2-t expresszáló sejtek száma nőtt, de a TGF- β 2 mRNS szintje az egyes sejtekben nem változott. Ezzel ellentétben a kéreg V. és VI. rétegében, melyekben a TGF- β 2 alap aktivitása szignifikáns, csak az mRNS szintje emelkedett meg anélkül, hogy újabb sejtek expresszáltak volna TGF- β 2-t (3/B,E ábra). A TGF- β 3 csak a kéreg II. rétegének néhány sejtjében indukálódott a lézió szomszédságában. Az arteria cerebri media permanens elzárását követően a TGF- β -k indukciója kifejezettebbé vált, mint tranziens esetben. TGF- β 1 mRNS nagyobb területen jelent meg, mint 24 órával tranziens MCAO-t követően. TGF- β 2 indukció továbbra is a kéreg II., III. és V. rétegére korlátozódott. TGF- β 2 expresszió az ischémiás terület szomszédságában indukálódott ezekben a rétegekben és felerősödött egészen a középvonalig. Hasonló indukciós mintázat jelent meg a TGF- β 3-nál az azonos oldali kéreg II. rétegében. TGF- β -k expressziós szintje ellenoldalon az egyik esetben sem volt magasabb, mint az áloperált, kontroll állatokban (3. ábra).

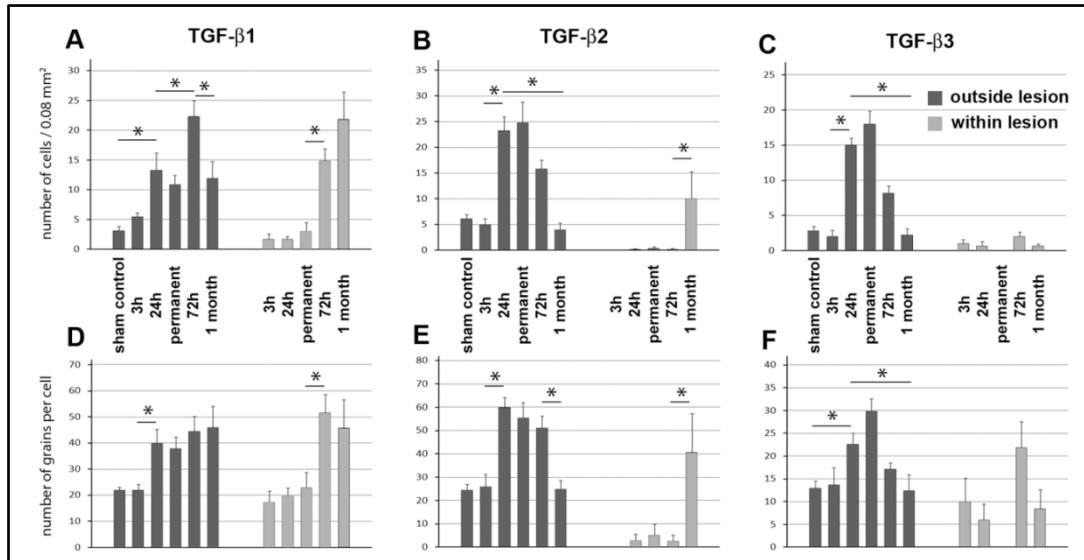


3. ábra TGF- β fehérjék expressziója a lézió körüli különböző agyterületeken 24 órás tranzienst MCAO-t követően (Pal és mtsai. 2012)

A sejteket koronális metszetek $200 \times 400 \mu\text{m}$ ($0,08 \text{ mm}^2$) méretű területén mutatja a kéreg I-VI. rétegében és a putamenben (CP) a penumbrában. A mérések eredményeit a lézióval azonos oldalon sötétszürke oszlopok jelölik, míg az ellenoldalon az előbbiekkal identikus területek eredményeit világosszürke oszlopok ábrázják. **A-C**: $0,08 \text{ mm}^2$ területen a TGF- β 1, - β 2 és - β 3-at expresszáló sejtek száma. **D-F**: TGF- β 1, - β 2 és - β 3 mRNS-ekkel arányos autoradiográfias szemcsék száma az egyes sejtek felett. Csillaggal (*) jelölt agyterületek esetében a TGF- β -t expresszáló sejtek száma vagy az egyes sejtek TGF- β mRNS szintje szignifikánsan ($p < 0,05$) emelkedett.

A TGF- β 1 expresszió 72 órával MCAO után emelkedett maradt a lézió körül a penumbra területén, mely a 24 órás eredményekkel összehasonlítva a TGF- β 1-t expresszáló sejtek számának további szignifikáns emelkedésével járt (4/A ábra). Ezen felül TGF- β 1-et intenzíven expresszáló sejtek jelentek meg az infarktusos lézió területén belül és a corpus callosumban. Ezzel párhuzamosan a TGF- β 2 és - β 3 mRNS szintjének csökkenése következett be az agykéregben a korábbi 24 órás időponthoz képest, az expressziós szint az alap aktivitáshoz tartott. TGF- β 1-el ellentétben a TGF- β 2 és - β 3 mRNS nem jelent meg a lézió területén belül 72 órával MCAO után (4/B,C ábra).

A TGF- β 1 expresszió igen magas maradt a lézió területén belül, de a TGF- β 1-t expresszáló sejtek száma csökkent a lézió területén kívül 1 hónappal MCAO után. Az agykéregben TGF- β 2 és - β 3 indukció már nem állt fenn, a lézió előtti szintre tért vissza. Néhány TGF- β 2-t expresszáló sejt megjelent a lézionált területen belül (4/B,E ábra) és a lézió környékén (Pal és mtsai. 2012).



4. ábra TGF- β fehérjék időbeli eloszlása MCAO-t követően (Pal és mtsai. 2012)

A sejteket koronális metszetek $200 \times 400 \mu\text{m}$ ($0,08 \text{ mm}^2$) méretű területén mutatja a kéreg II. rétegében közvetlenül a lézió mellett (sötétszürke) és 1 mm-el a lézió határán belül (világosszürke). **A-C**: $0,08 \text{ mm}^2$ területen a TGF- β 1, - β 2 és - β 3-at expresszáló sejtek száma. **D-F**: TGF- β 1, - β 2 és - β 3 mRNS-ekkel arányos autoradiográfiás szemcsék száma az egyes sejtek felett. Csillaggal (*) jelölt agyterületek esetében a TGF- β -t expresszáló sejtek száma vagy az egyes sejtek TGF- β mRNS szintje szignifikánsan ($p < 0,05$) változott.

2.4. A transzformáló növekedési faktor-béta fehérjék további neuroprotektív szerepei

2.4.1. A TGF- β -k szerepe agyagaganatokban

Tumorok esetében a TGF- β jelátviteli útvonal tumor szupresszor és promoter funkciókkal is rendelkezik. Bizonyos esetekben a TGF- β tumor szupresszornak tekinthető, mivel igen erősen gátolja az hámsejtek, asztrociták és immunsejtek proliferációját. Néhány tumor esetében elveszik a TGF- β által közvetített citosztatikus jelre való érzékenység, például a TGF- β jelátvitel egyes elemeinek mutációja következtében. Bizonyos rosszindulatú tumorok esetében, ide számítva a gliomákat, szelektíven veszítik el a TGF- β proliferációt gátló tulajdonságukat, míg a jelátviteli útvonal más funkciói érintetlenek maradnak (Seoane 2006). Ezen tumorokban a TGF- β hatás proliferációt, angiogenezist, infiltrációt, áttétképződést és immunszuppressziót okoz. Így a TGF- β -knak kettős szerepe lehet a tumorképződésben és a stádiumtól függően viselkedhetnek tumor szupresszorként vagy promoterként (Derynck és mtsai. 2001, Siegel és Massague 2003). Ez a tumor szupresszor és onkogén aktivitás közötti

váltásra való képesség 'TGF- β paradox'-ként is ismert (Massague és Gomis 2006, Rahimi és Leof 2007).

A TGF- β antiproliferatív kontrollal rendelkezik alap esetben a legtöbb sejtben, így az asztrocitákban is. Asztrocita sejt kultúrában TGF- β adását követően szignifikáns DNS szintézis csökkenést regisztráltak, a sejt ciklus G1 fázisban megrekedt és a p15 ciklin dependens kináz gátló szintje megemelkedett (Rich és mtsai. 1999). Smad3 hiányos egerekből származó asztrociták esetében a vad típusú egerekből származókhöz képest csökkent a TGF- β mediált proliferáció gátlás, mely a Smad jelátviteli útvonal érintettségével magyarázható (Rich és mtsai. 1999). Tumor sejtek rezisztenssé válnak a TGF- β osztódást gátló hatására, mivel olyan mechanizmusokkal rendelkeznek, melyek segítségével a TGF- β hatást antiproliferatív irányból onkogénné fordítják. Ezen folyamatok következtében a TGF- β részt vesz az agytumor progressziójában (Aigner és Bogdahn 2008). Azon uralkodó nézet mellett, mely szerint a TGF- β patogenitása az osztódást gátló hatás elleni rezisztencia megjelenésével járó malignus transzformáció eredménye, ezen hatással lényegében ellenkező TGF- β által befolyásolt szabályozó mechanizmusok létezése is feltételezhető (Jennings és Pietenpol 1998). A malignus átalakulás folyamata bizonyos hiperdiploid glioblastoma multiforme esetében magyarázható azzal, hogy a TGF- β mediált osztódást gátolja tumor szupresszor gén elvesztésével, vagy egy aktív onkogén útvonal felerősödésével. A Smad2 és Smad3 fehérjék expressziója a legtöbb glioma sejt vonalban csökkent, mivel a ezen fehérjék foszforilációja és sejtmagi transzlokációja is károsodott (Zhang és mtsai. 2006). A TGF- β indukálja a Sox2 gén expresszióját, ez az indukció Sox4 által mediált, mely egy direkt TGF- β célgén. A TGF- β jelátvitel gátlóinak alkalmazását követően drasztikusan csökken a glioblastoma sejtek tumorgenitása, ez alátámasztja a TGF- β /Sox4/Sox2 útvonalának fontosságát (Ikushima és mtsai. 2009). A TGF- β 1 és - β 2 stimulálja a VEGF, plazminogén aktivátor inhibitor és bizonyos metalloproteázok expresszióját, melyek az erek újraszerveződésében, újraképződésében és az extracelluláris mátrix átalakításában vesznek részt (Kaminska és mtsai. 2013). A TGF- β altípusok közül a legfontosabb malignus gliomák progressziójában részt vevő faktorként a TGF- β 2-t azonosították. A tumorban és plazmában a TGF- β 2 megemelkedett szintjét súlyosabb stádiumhoz és rosszabb prognózishoz kapcsolják (Hau és mtsai. 2011). A TGF- β antagonizálása ígéretes kezelési lehetőség glioblastomában, különböző in vitro

esetekben és rágcsáló állatkísérletes modellekben kutatják a felhasználás lehetőségét. Eddig számos korai fázisú klinikai vizsgálatot is végeztek (Juratli és mtsai. 2013).

2.4.2. A TGF- β -k szerepe neurodegeneratív betegségekben

Az Alzheimer kór az agy progresszív, degeneratív betegsége, mely az időskori demencia egyik leggyakoribb oka. Az Alzheimer kórt a beta-amiloid (A β) plakkok, neurofibrilláris kötegek és neuronvesztés jelenléte határozza meg. Jelenleg az Alzheimer esetében csak tüneti terápia érhető el. A patofiziológiájában meghatározó szerepet betöltő résztvevők azonosítása szükséges a betegséget módosító kezelés megtalálásához (Peskind 1996). Egyre több bizonyítékkal rendelkezünk azzal kapcsolatban, hogy a TGF- β 1 neuroprotektív szerepet játszik az A β toxicitással szemben, mind a betegség in vitro, mind in vivo modelljeiben (Caraci és mtsai. 2011). A betegség egér modelljében a TGF- β 1 expressziós szintje megemelkedett (Wirths és mtsai. 2010). Alzheimer kórban szenvedő betegek agyában emelkedett TGF- β 2 expressziót írtak le (Lippa és mtsai. 1995). Ezen felül a TGF- β 1 mRNS expressziós szint szignifikáns emelkedését találták demencia tüneti megjelenése előtt Alzheimeres betegekben, így feltételezhető, hogy ez a kór patológiájának kezdeti szakaszára is jellemző (Morimoto és mtsai. 2011). A TGF- β 1 expressziós szint összefüggésben van a cerebrovaszkuláris amiloid plakkok számával, és a TGF- β 1 immunreaktivitás ilyen esetekben az agyi erek mentén megemelkedett (Lifshitz és mtsai. 2012). Továbbá genetikai tanulmányok is alátámasztották a TGF- β 1 érintettségét Alzheimer kór patogenezisében, mivel a TGF- β 1 gén egy specifikus genotípusának jelenléte megnövelte a késői fellépésű Alzheimer kór rizikóját (Caraci és mtsai. 2012). Eddig leginkább a TGF- β 1 szerepét vizsgálták, a másik két TGF- β altípust kevésbé. Apolipoprotein E4, mely a legismertebb genetikai rizikófaktor Alzheimer kór esetében, specifikusan csökkenti a TGF- β 1, - β 2 és a - β 3 szintjét a septumban és a TGF- β 3 esetében a hippocampusban is, így valószínűsíthető, hogy a különböző TGF- β -k eltérő szerepet játszanak az apolipoprotein E4 mediálta patológiai folyamatokban Alzheimer kórban (Haas és mtsai. 2012).

A Parkinson kór patológiájának jellegzetessége a striatumba projiciáló nigrostriatalis dopaminerg sejtek pusztulása (Harris és mtsai. 2009). Elegendő

bizonyíték áll rendelkezésünkre, mely szerint a TGF- β -k elősegítik a dopaminerg neuronok túlélését a substantia nigrában. TGF- β 2 és - β 3 detektálható frissen izolált és tenyésztett mesencephalon sejtekben (Kriegstein és Unsicker 1994). Továbbá egér nigrostriatralis rendszerét MPTP-vel (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin) történő lézionálását követően a TGF- β 2 mRNS szintje megemelkedik a striatumban (Schober és mtsai. 2007). Ezen adatok szerint az endogén TGF- β -k elérhetőek és hatással vannak a substantia nigra dopaminerg sejtjeinek túlélésére. A Parkinson kór alternatív terápiájaként fejlesztésre került a neuronális transzplantáció. A fő limitáló faktor az, hogy a graft dopamin neuronjainak csak 3-20%-a tapad meg és éli túl a procedúrát. Különböző megközelítésből csökkenteni igyekeznek a beültetett sejtek veszteségét, és a graft neuronok túlélését. TGF- β -k azon növekedési faktorok között vannak, melyek remélhetőleg növelik a transzplantált sejtek túlélési esélyét Parkinson kórban szenvedő betegekben és csökkentik a humán embrionális donor sejtek szükséges mennyiségét, így növelve a sikeres kimenetel lehetőségét (Brundin és mtsai. 2000).

2.5. A központi idegrendszer sejtjeinek válasza fokális ischémiára

2.5.1. Neuronális válasz

Akut ischémia az agyban masszív sejthalálhoz vezet az érintett terület centrális részén, majd egy második fázisban a széli zóna, a penumbra is károsodik (Sarabi és mtsai. 2008). Agyi ischémia számos heterogén változáshoz vezet a szöveti oxigenizációban és a sejtek anyagcseréjében a lecsökkent véráramlás által (Shi és Liu 2007). Az agyi vérkeringés teljes elzáródása másodperceken belül neuronális elektromos aktivitását megszüntetését eredményezi, és néhány percen belül a metabolikus és az ionháztartás is sérül. A membrán ionpumpák károsodása következtében K^+ kiáramlás, Na^+ , Cl^- és víz beáramlás, illetve a membrán depolarizáció következik be viszonylag gyorsan. Ha az elzáródás tartósan fennáll, körülbelül 5 perc után a sejtkárosodás visszafordíthatatlan (Astrup és mtsai. 1981). Az akut fázis szakaszában a véráramlás küszöbérték alá csökkenésének közvetlen következménye az ioneqyensúly megbomlása, a sejtek ozmotikus duzzanata. A teljes elzáródást követően a súlyos ischémia végeredménye a sejtmembránok terminális depolarizációja (Heiss 2012). Az ischémiás esemény után az érintett területen az agyszövet hipoxiás és

hipoglikémiás. Az ischémiás mag az a károsodott terület, ahol a súlyos károsodás a glutamát által közvetített excitotoxicitás, illetve az oxigén és a glükóz hiánya vezet a sejtfunkciók gyors megszűnéséhez, nekrotikus, akut sejthalálhoz (Lipton 1999). Agyi ischémia esetében több a transzkripciós faktor aktiválódását leírták, például hipoxia indukálható faktor (HIF) és az NF- κ B (Bergeron és mtsai. 1999, Stephenson és mtsai. 2000).

Az ischémiás mag területén bekövetkezett akut neuronális sejthalált a szöveti károsodás második szakasza követi a szomszédos penumbrában (Kirino 2000). Az idő előrehaladtával, ha beavatkozás nem történik, a penumbra területén komplettálódik az infarktus folyamatos excitotoxicitás, terjedő depolarizáció, az apoptózis, és az ischémiát követő immunválasz által (Graham és Chen 2001, Carbonell és Rama 2007). Ezen a dinamikus változó területen belül az alapvető sejtfunkciók viszonylagos fennmaradása lehetőséget teremt az idegsejtek megmentésére és túlélésére, ez által a hosszú távú károsodás csökkenthető (Sarabi és mtsai. 2008). Az ischémiás penumbra esetében megvan a lehetőség a funkcionális javulásra, feltéve, hogy a helyi véráramlás helyreállítható, de elégtelen reperfüzió esetében a károsodás visszafordíthatatlan, a folyamat súlyossága nagyban függ az ischémia időtartamától (Heiss 2012). A Hsp-70 stressz fehérje indukciója egy endogén védekezési mechanizmus, amely penumbrában következik be, viszont az ischémiás mag neuronjaiban nem, így a penumbra megjelenítésére alkalmas. Fokális ischémia során Hsp-70-et túlexpresszálo transzgenikus egerekben a Hsp-70 elnyomja korai citokrómmal c felszabadulást, így neuroprotektívnek tekinthető (Weinstein és mtsai. 2004).

A neuronok és proximális dendritjeik a legfontosabb aktív szereplők a terjedő depolarizáció során. A terjedő depolarizáció olyan hullámot jelent a központi idegrendszer szürkeállományában, melyet a neuronok hirtelen kialakuló majdnem teljes, tartós depolarizációja, a lassú potenciál nagy változása határoz meg, és elcsendesíti az agy elektromos aktivitását (Dreier 2011). A közepes időtartamú depolarizációt korábban már vizsgálták az artéria cerebri media okklúzióját követően az ischémiás penumbrában, ahol a vérellátás jelentősen lecsökken, de az energia metabolizmus még egy ideig megtartott. Az infarktus széli depolarizáció miatt az ischémiás mag területe fokozatosan növekszik a penumbra rovására (Raff és mtsai. 1993). Az ischémia

kezdetén, a Na^+/K^+ -ATPáz fokozatos károsodása miatt lassan emelkedik az extracelluláris K^+ koncentráció, míg el nem ér egy kritikus küszöbértéket és elindul a terjedő depolarizáció (Eikermann-Haerter 2014). A terjedő depolarizáció felgyorsítja a metabolikus eltérést az ischémiás penumbrában az O_2 és glükózfogyasztás stimulálásával és az érösszehúzó neurovasculáris hatást kiváltva tovább rontja a sérült szövet perfúzióját (Shin és mtsai. 2006). Az infarktus széli depolarizációjának csökkentése céljából NMDA receptor antagonistá bejuttatása neuroprotektívnek bizonyult (Hartings és mtsai. 2003).

2.5.2. *Asztrogliá reakció*

Sérülésre és betegségre az asztrociták a központi idegrendszerben reaktív asztrogliózisként meghatározott folyamattal válaszolnak. Jelen eredmények alapján a reaktív asztrogliózis nem egy mindent vagy semmit jellegű válasz, hanem egy finoman szabályozott folyamatos változások összessége, mely magába foglalja a reverzibilis génextpressziós változásokat, a sejt hipertrófiát, melyek végül hegeképződéssel járó permanens szöveti átrendeződést eredményeznek. A folyamat több szinten heterogenitást mutat, ide értve a génextpressziót, sejt morfológiát, sérüléstől való távolságot, központi idegrendszer régióit, sejtek közötti jelátvitelt és a sejtek funkcióit (Anderson és mtsai. 2014).

Az asztrociták gyors migrációja gyulladáshoz epicentrum felé elindítja az asztrocitaheg kialakulását a lézióhoz tartozó penumbrában (Cregg és mtsai. 2014). Az asztrociták azonban sérülés következtében csak szerény mértékben proliferálnak, és ez a proliferáció egy vékony rétegre korlátozódik a lézió szélén gerincvelőben (Faulkner és mtsai. 2004). A reaktív gliális választ elsősorban az asztrogliális hipertrófia jellemzi, ahol az asztrociták mérete megnő és az intermediert filamentum fehérjék közül GFAP-t és vimentint intenzívebben expresszálnak (Yang és mtsai. 1994). Hipertrófiás asztrociták átstrukturáláson mennek keresztül, és egy hálószerű filamentosus rétegbe rendeződnek, fizikai gátat képeznek a hosszú leszálló vagy felszálló pályák regenerálódó axonjai számára a gerincvelőben (Wanner és mtsai. 2013). Továbbá, az asztrociták elkezdnek keratin szulfátot és a kondroitin szulfátot szintetizálni és felhalmozni az extracelluláris mátrix térben a sérülést követően egy napon belül, és

magas koncentrációban maradnak hónapokig a lézió teljes területén (McKeon és mtsai. 1999). Célzottan genetikailag módosított egerekben végzett vizsgálatok eredményei alapján a penumbra területére eső asztrogliaheg szerepe elsősorban az, hogy gyulladási folyamatok lézió epicentrumán kívüli terjedését megakadályozza, így védve az ép neuronális hálózatokat a károsodásoktól (Faulkner és mtsai. 2004, Wanner és mtsai. 2013). Összességében feltételezhetően a gliális heg védi az ép szövetet a gyulladási folyamatok tovaterjedésétől (Cregg és mtsai. 2014).

Számos véráram útján ide kerülő, illetve gyulladási folyamatok során felszabaduló faktort tekintenek a hegeképződés potenciális kiváltójaként, mint például interleukin-1-et (Giulian és mtsai. 1988), TGF- β -kat (Asher és mtsai. 2000, Moon és Fawcett 2001) és a fibrinogént (Schachtrup és mtsai. 2010). A TGF- β a keratin szulfát és a kondroitin szulfát bioszintézisét fokozza (Yin és mtsai. 2009). Fibrinogén deléciója következtében csökkent a lézió területén az aktív TGF- β mennyisége, ezzel korrelálva csökkent mind az asztrocita hipertrófia, mind kondroitin szulfát proteoglikánok termelődése. Az aktív TGF- β a TGF- β R/Smad2 függő jelátviteli úton hat asztrocitákban, feltételezhetően egy gliózisért felelős intrinsic transzkripciós program bekapcsolásával (Schachtrup és mtsai. 2010). Az agy sértése után lokálisan adott TGF- β antagonistá csökkent a gliális hegesedést (Lagord és mtsai. 2002).

2.5.3. Mikroglia aktiváció

A mikroglia a központi idegrendszer immunsejtjei, melyek egészséges agyszövetben aktív szenzorok és patológiás esetben sokoldalú effektoros funkcióval rendelkeznek. Agyi ischémia erőteljes gyulladási választ indukál, mely jelentős génextpressziós változásokkal és az idegrendszer sejtjeinek fenotípus változásaival jár együtt, ezen felül fehérvérsejtek lépnek ki a véráramból. Számos faktor válthatja ki a jelenlévő mikroglia átalakulását reaktív állapotba (Weinstein és mtsai. 2010). A mikroglia a központi idegrendszer szöveti makrofágjának tekinthető (Hanisch és Kettenmann 2007). Környezeti tényezőktől függően a mikroglia aktív állapotba tud váltani. Normál körülmények mellett a mikroglia kis sejttesttel és vékony, elágazó nyúlványokkal és alacsony felszíni antigén expresszióval rendelkezik (Kreutzberg 1996). Habár ez a nyugalmi státusza, ebben az állapotban is a mikroglia sejtnyúlványai

folyamatos mozgásban vannak és monitorozzák a környezetet szomszédos neuronok által küldött jelek után (Nimmerjahn és mtsai. 2005). Agyi sérülést követően a mikroglia sejtek effektor programja gyors változáson megy keresztül, így megváltozik a morfológiájuk, proliferációjuk, továbbá proinflammatorikus faktorokat szabadítanak fel és megnő az immunmoduláló felszíni antigének expressziója (Melchior és mtsai. 2006, Hanisch és Kettenmann 2007). A makrofágokhoz hasonlóan a mikroglia esetében is kétféle aktivált fenotípus ismert, a klasszikusan aktivált (M1), és az alternatívan aktivált (M2) fenotípus (Taylor és Sansing 2013). Az M1 mikroglia proinflammatorikusnak minősül és olyan faktorokat szekretál, mint TNF α -t, iNOS-t, CCL2-t, illetve IL-1-et és IL-18-at termel (Ransohoff és Brown 2012). Az M2 mikroglia részt vehet neuroprotektív folyamatokban, sérülés utáni regenerációban és neurotróp faktorok szabályozásában (Starossom és mtsai. 2012). Mikroglia ezen kettőssége miatt mind káros mind protektív folyamatokban is részt vehet sérülést követően a központi idegrendszerben (Taylor és Sansing 2013). Ischémiás sérülést követően rágszáló modellben a mikroglia aktiválódik és osztódik. Vékony nyúlványokkal rendelkező nyugvó mikroglia immunohisztokémiával megjeleníthető a felnőtt agyban olyan markerekkel, mint a lektin vagy az antitestek közül az ionizált kalciumkötő adapter molekula, az Iba-1. (Mabuchi és mtsai. 2000)

Ischémiás sérülést kísérő gyulladós folyamatok időbeli sorrendjét fokális ischémia állatkísérletes modelljében már vizsgálták. Korai változások közé sorolható az asztrociták aktivációja, mikroglia sérülés felé történő migrációja és proinflammatorikus citokinek termelődése, mint interleukin-1, interleukin-6 és TNF- α (Lai és Todd 2006). A mikroglialis és makrofág infiltráció jelentős, és csúcsát 48-72 órával MCAO után éri el egérben. Neutrofil granulociták inváziója hasonlóan erős, de csúcsát kissé később éri el (Stevens és mtsai. 2002, Gelderblom és mtsai. 2009). 12–24 órával permanens artéria cerebri média okklúziót (MCAO) követően patkányban mikroglia aktiválódik, amőboid alkot vesz fel megnagyobbodott sejttesttel és lekerekedett nyúlványokkal. Ezen sejtek megjelennek a széli zónában később a lézió területén belül és is (Mabuchi és mtsai. 2000). Permanens MCAO után egérben és patkányban is azt írták le, hogy az aktivált mikroglia konstansan megjelenik a penumbrális szövet területén az infarktus szélén, még mielőtt az krezil ibolya vagy MAP2 festéssel meghatározható vagy a neuronális apoptózis megjelenne (Rupalla és mtsai. 1998). Az aktiválódó mikroglia

sejtek száma folyamatosan növekszik az MCAO utáni első héten (Jander és mtsai. 1998). Limfociták, dendritikus sejtek és természetes ölósejtek (NK-sejtek) szintén infiltrálódnak, bár jelentősen kisebb arányban (Gelderblom és mtsai. 2009).

3. Célkitűzések

A disszertáció célja TGF- β receptorok MCAO-t követő indukciójának időbeli és térbeli eloszlása, a TGF- β fehérjéket és receptoraikat expresszáló sejtek típusának meghatározása és az indukciós mechanizmus feltérképezése. Ezért a következő kérdésekre keressük a választ:

1. Mi az időbeli lefutása a TGF- β receptorok közül a TGF- β RI, RII, RIII és Alk1 mRNS indukciójának MCAO-t követően? A TGF- β receptor mRNS-eket 24, 72 órá és 1 hónapos túléléssel MCAO után in situ hibridizációs hisztokémiával megjelenítve vizsgáltuk. Az mRNS szintjében bekövetkező változásokat denzitometriás, kvantitatív analízissel igazoltuk.
2. Milyen sejtípusok expresszálják a különböző TGF- β fehérjéket MCAO-t követően? In situ hibridizációs hisztokémiát immunhisztokémiával kombináltunk, mely során neuronális (NeuN), asztroglialis (GFAP), mikroglialis (Iba1) markereket alkalmaztunk a három különböző TGF- β altípust expresszáló sejtek azonosítására ischémiás patkányagyban.
3. Mely sejtípusok expresszálják a különböző típusú TGF- β receptorokat MCAO után? In situ hibridizációs hisztokémiát immunhisztokémiával kombináltunk neuronális (NeuN), asztroglialis (S100), mikroglialis (Iba1), endotheliális (vWF) és simaizomsejt (α SMA) markereket használtunk, hogy azonosítsuk a különböző TGF- β receptort expresszáló sejteket ischémiás patkány agyszövetben.
4. Milyen mechanizmusok aktiválják a TGF- β -kat ischémiát követően? A TGF- β -kat duplán festettük az azonnali korai gének közül a Fos-szal és az ATF-3-mal, a neuronális aktiváció és axonális degeneráció markereivel.

4. Módszerek

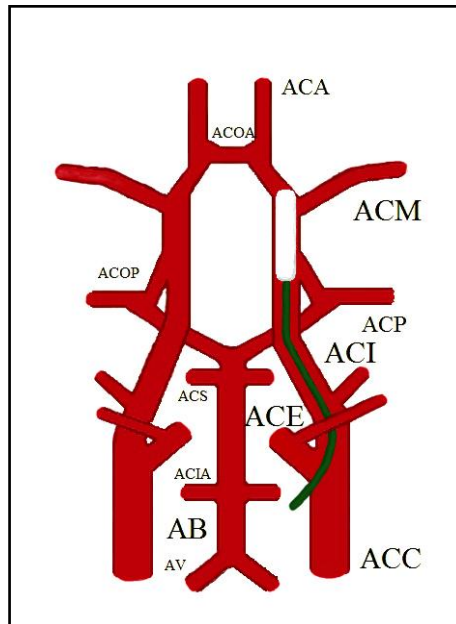
4.1. Kísérleti állatok

A kísérletek során összesen 58 hím Wistar patkányt használtunk (300-450 g, Charles Rivers Laboratories, Magyarország). Igyekeztünk a felhasznált állatok számát csökkenteni és az állatok szenvedését minimalizálni. Az állatokat standard laboratóriumi körülmények között tartottuk, 12 órás világos és 12 órás sötét periódus között. Folyamatosan száraz táppal és csapvízzel láttuk el őket. A patkányokat ketrecenként hármával helyeztük el 22 ± 1 °C környezetben. Az anesztézia során izomba adva 0,2 ml ketamint és 8 mg/ml xylazint alkalmaztunk az arteria cerebri media okklúziója, a transzkardiális perfúzió és a dekapitáció során. A kísérletekhez a Semmelweis Egyetem Állatkísérleti Etikai Bizottsága hozzájárult, melyeket az 2010/63/EU állatkísérletekre alkalmazott rendelkezésével összhangban hajtottunk végre.

4.2. Artéria cerebri media okklúziója

Kísérleteink során az ischémiás stroke létrehozása céljából széleskörűen alkalmazott intraluminalis technikát (Longa és mtsai. 1989) használtuk módosításokkal. A bal artéria carotis communist, a carotisvillát majd az internát és az externát egy középső nyaki metszésből felkerestük és a környező szövetektől elkülönítettük. Az erek alá fonalakat vezettünk. Az externa és a communis lekötése után 3-0 szilikonnal bevont monofilamentumot vezettünk fel a carotis communison ejtett metszésen bevezetve az internán keresztül az oszlástól 18-20 mm-re egészen az artéria cerebri media eredéséig (5. ábra). A pterygopalatinális ágat még felvezetés előtt lekötöttük, így elkerülve a filament rossz irányba történő behelyezését. Atraumatikus aneurizma klippel elzártuk az internát megelőzve a circulus arteriosus Willisii-n történő vérzést és a monofilament elmozdulását. A klippet és a monofilamentumot 1 óra múlva távolítottuk el tranziens ischémiánál, viszont permanens esetben a helyén hagytuk. A különböző időintervallumokat követően, az állatok agyát in situ hibridizációs hisztokémiához kivettük és a bregmától (koponyaboltozat legmagasabb pontjától) 1 mm-rel rostrális irányba elmetszettük. Az elülső részt 2,3,5-triphenyltetrazolium chloriddal (TTC)

megfestettük, a hátsó felét pedig -80°C -on lefagyasztottuk. A dupla festés során felhasznált állatokat transzkardiálisan perfundáltuk.



5. ábra *A circulus arteriosus Willisii és a fonal elhelyezkedése az artéria cerebri media eredésénél*

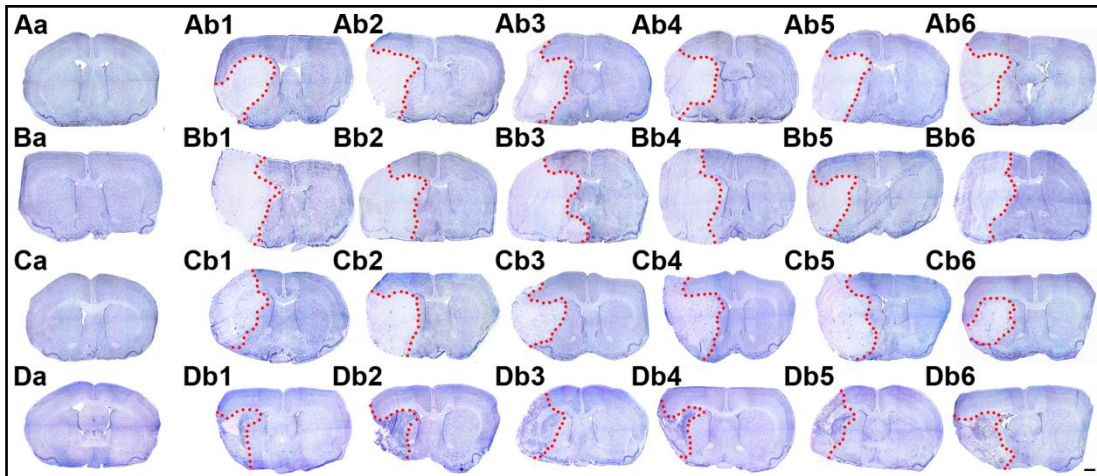
Az MCAO műtét során, a hátán fekvő patkány bal artéria carotis communisát és a carotis villát felkeresve az artéria carotis internán keresztül felvezetjük a fonalat egészen az artéria cerebri media eredéséig.

Rövidítések: ACA: arteria cerebri anterior, ACOA: arteria communicans anterior, ACM: arteria cerebri media, ACOP: arteria communicans posterior, ACP: arteria cerebri posterior, ACI: arteria carotis interna, ACE: arteria carotis externa, ACS: arteria cerebelli superior, ACIA: arteria cerebelli inferior anterior, AB: arteria basilaris, AV: arteria vertebralis, ACC: arteria carotis communis.

4.3. Az operált állatok kísérleti csoportokba való besorolása

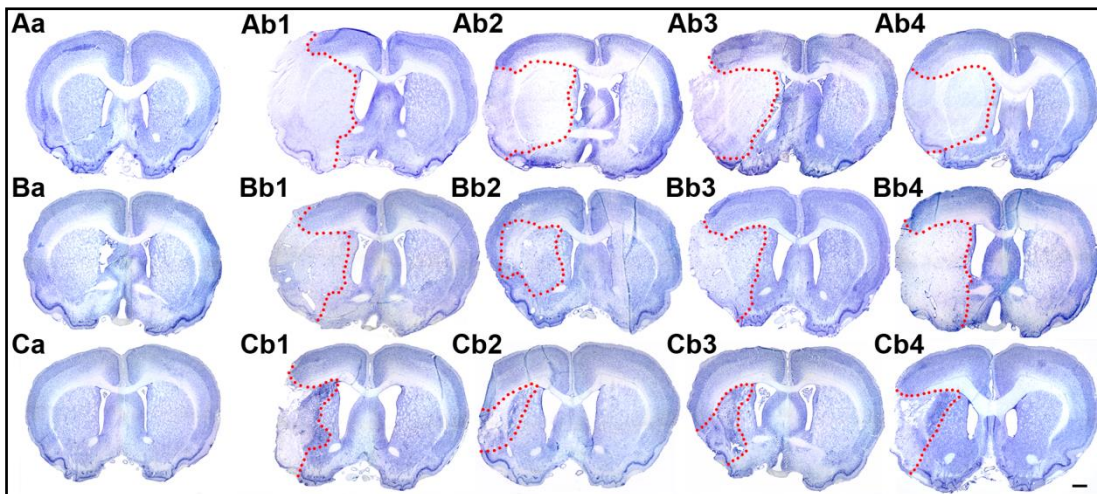
A TGF- β receptorok vizsgálata során a következő 4 csoportot hoztuk létre, melyekbe csoportonként 6 állat került (6. ábra): (a) 24 órás túlélésű 1 órás MCAO-t követően, (b) permanensen elzárt 24 órás állatok, (c) 72 órás és (d) 1 hónapos túlélésű patkányok 1 órás MCAO után. Bizonyos csoportokat (24 órás, 72 órás és 1 hónapos tranzien MCAO) további 4-4 állattal bővítettünk a perfúzió miatt (7. ábra). Ezen felül még 7 áloperált, kontroll állat került felhasználásra a különböző túlélési időpontokban. Továbbá a TGF- β fehérjék vizsgálatához perfúzióra került még 4 állat a következő

csoportokban: 24 órás, 72 órás és 1 hónapos tranzien MCAO, melyek kiegészítésre kerültek kontrollként csoportonként egy állattal.



6. ábra Áloperált és lézionált, frissen disszekált állatok Nissl festett metszetei különböző időpontokban MCAO után

Az első oszlopban mutatjuk az (a) áloperált patkányok 24 órával tranzien (Aa) és permanens (Ba) MCAO után, 72 órával (Ca) és 1 hónappal (Da) tranzien MCAO-t követően készült metszeteit. A Nissl festés alapján nem látható szövetkárosodás és a különböző időpontokban nincs különbség. A többi oszlop mutatja a lézionált terület nagyságát 24 órával tranzien (A1, A2, A3, A4, A5 és A6) és permanens (B1, B2, B3, B4, B5 és B6) MCAO után, 72 órával (C1, C2, C3, C4, C5 és C6) illetve 1 hónappal (D1, D2, D3, D4, D5 és D6) tranzien MCAO-t követően. A Nissl metszeteiken a lézió határát piros pöttyökkel jelöltük. Méretarány = 1 mm.



7. ábra Áloperált és lézionált, perfundálva fixált állatok Nissl festett metszetei különböző időpontokban MCAO után

Az első oszlopban mutatjuk az (a) áloperált patkányok 24 órával (Aa), 72 órával (Ba) és 1 hónappal (Ca) tranzien MCAO-t követően. A Nissl festés alapján nem látható szövetkárosodás és a három különböző időpont között nincs különbség áloperált állatoknál. A további sorok mutatják a lézionált terület nagyságát 24 órával (A1, A2, A3 és A4), 72 órával (B1, B2, B3 és

B4) illetve 1 hónappal (C1, C2, C3 és C4) tranzien MCAO-t követően. A Nissl metszeteken a lézió határát piros pöttyökkel jelöltük. Méretarány = 1 mm.

4.4. Krezil ibolya (Nissl) festés

A lézió meghatározásának céljából párhuzamos MCAO-s metszeteket Nissl festékekkel megfestettünk (6. és 7. ábra). A metszetek 0,1%-os krezil-ibolya festékben 10 percig festettük, majd 96%-os ecetsavat tartalmazó etanolban differenciáltuk. Ezt követően a metszeteket dehidratáltuk és Cytoseal 60-nal lefedtük.

4.5. A lézionált terület méretének kvantálása

Minden egyes agyból kiválasztottuk a lézió legnagyobb kiterjedését mutató metszetet. Az anterio-posterior bregma koordináták mindig +0.8 és 20.8 mm közé estek. Ezen metszeteket krezil ibolyával Nissl festettük. A Nissl festett metszeteken az infarktált területet, és az azonos oldali agyféltekét manuálisan körülhatároltuk és ezt követően lemértük ImageJ 1.47v (National Institutes of Health, USA) használatának segítségével. Végül kiszámoltuk a lézionált terület és az azonos oldal százalékos arányát.

4.6. In situ hibridizációs hisztokémia

4.6.1. In situ hibridizációs DNS próba készítése

A frissen disszektált patkányagyból kis darabokat metszettünk ki, és szárazjégen azonnal lefagyasztottuk és az mRNS izolálásig -80°C -on tároltuk. Az izolálást követően a teljes RNS mennyiséget a maradék DNS eltávolítása érdekében $2\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$ koncentrációra való hígítást követően Amplification Grade DNase I-gyet (Invitrogen) adtunk hozzá és cDNS-t szintetizáltunk Superscript II reverz transzkriptáz készlet (Invitrogen) segítségével. A cDNS tízszeres hígítása után $2,5\ \mu\text{l}$ -t templátként adtunk az iTaq DNS polimerázzal (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) végzett $12,5\ \mu\text{l}$ végtérfogatú PCR reakcióhoz a következő körülmények között: 95°C -on 3 perc, majd 35 cikluson keresztül 95°C -on 0.5 perc, ezután 60°C -on 0.5 perc végül 72°C -on 1 perc. Primerként $300\ \text{nM}$ végkoncentrációban TGF- β 1 esetében (A primer pár: GACTCTCCACCTGCAAGACC és CGTGTTGCTCCACAGTTGAC, B primer pár:

TGAGTGGCTGTCTTTTGACG és TGGTTGTAGAGGGCAAGGAC), TGF- β 2 esetében (A primer pár: GAGTGGCTGAACAACGGATT és CCATCGA TACCTGCGAATCT, B primer pár: CTCCACATATGCCAGTGGTG és AGGAT GGTCAGTGGTTCCAG), TGF- β 3 esetében (A primer pár: GTCCAACCTGGG TCTGGAAA és GCAGTTCTCCTCCAAGTTGC, B primer pár: AGAAGAGGGT GGAAGCCATT és GCTGCTTGG CTATGTGTTCA), TGF- β RI esetében (primer pár A: CAATTGCAAGGACCATTGTG és ATGTGAAGATGGGCAAGACC, B: ATCTTGGGAAGGGCAGAGTT és CACCAGTGAGGAGACCCAAT), TGF- β RII esetében (primer pár A: GTGGAAAACGGAGAAGGACA és AGCTCTTG AGGTCCCTGTGA, B: GTGTGACTTCGGGTTGTCCT és TTTCATGCTC TCCACACAGG), TGF- β RIII esetében (primer pár A: GGCTTGAGAAC AACGAGGAG és TCCCTGAGTAGCCATTGGTC, B: TTTGTCCAGGTG TCCAAACA és GGCACCTTTGTGFGAGTTGGTGT) és Alk1 (primer pár A: AGCGATTACCTGGACATTGG és GTACCAGCACTCTCGCATCA, B: TTTCAGC AGTGTGCAAGGAC és CATTGGAGAATGCCACCTT) használtunk. A PCR termékek számított hossza TGF- β 1 esetén 417 és 456 bázispár, (231-647 és 724-1179 bázispár a GenBank leltári szám NM_021578.2 szerint), a TGF- β 2 esetén 286 és 405 bázispár (870-1155 és 1159-1563 bázispár a GenBank leltári szám NM_031131.1 szerint), a TGF- β 3 esetén 298 és 441 bázispár (1046-1343 and 508-948 bázispár a GenBank leltári szám NM_013174.1 szerint), a TGF- β RI esetén 355 és 252 bázispár (663– 1017 és 2789–3040 bázispár a GenBank leltári szám NM_012775.2 szerint), a TGF- β RII esetén 290 és 280 bázispár (1109–1398 és 1436–1715 bázispár a GenBank leltári szám NM_031132.3 szerint), a TGF- β RIII esetén 366 és 331 bázispár (1404–1769 és 3178–3508 bázispára GenBank leltári szám NM_017256.1 szerint) és Alk1 esetén 345 és 306 bázispár (1219–1563 és 3096–3401 bázispár a GenBank leltári szám NM_022441.2 szerint). A primereket úgy választottuk, hogy az elkészült próbák ne fedjenek át, de felismerjék az adott gén mRNS-ének összes ismert variánsát. A keletkezett PCR termékeket gélen megfuttattuk, majd kitisztítottuk. Ezt követően a kitisztított PCR termékeket TOPO TA klónozó vektorokba ültettük, melyeket kémiai transzformálással alkalmassá tett *E. coli* baktériumokba juttattunk (TOPO TA Cloning kit, Invitrogen). A sikeresen transzformált baktériumkolóniák közül 5-7 baktériumkolóniából a próbákat tartalmazó plazmidokat kitisztítottuk PureLink Plasmid

Miniprep készlet (Invitrogen) segítségével és templátként használtuk a következő PCR reakcióban, melyben specifikus primerpárokkal választottuk ki a megfelelő, specifikus inzerteket tartalmazó plazmidokat. Majd a próbákra pozitív plazmidok templátként szerepeltek azokban a PCR reakciókban, amelyben a primerpárok specifikusak voltak a próbára és továbbá tartalmazták a T7 RNS felismerő helyet (GTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGTA) illetve reverz primerek esetében a T3 RNS felismerő helyet (AATTAACCCTCACTAAAGGGA ACAAAGCTGG) is. Végezetül a specificitás érdekében a cDNS próbák azonosságát szekvenálással igazoltuk. A kész próbákat felhasználásig -80°C -on tároltuk.

4.6.2. A metszetek előkészítése

A TGF- β receptorok esetében 28 patkányt (6 állatot mind a 4 kísérleti csoportból és 1-1 kontroll állatot) használtunk fel. Kriosztáttal $12\ \mu\text{m}$ -es koronális metszeteket készítettünk bregma szintjétől 1mm -től $-6\ \text{mm}$ -ig. A metszeteket pozitívan töltött tárgylemezre (SuperfrostPlus®, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) vittük fel, megszáritottuk, majd felhasználásig -80°C -on tároltuk. Az *in situ* hibridizációhoz a metszeteket 4%-os formaldehidben fixáltuk, majd PBS-ben mostuk. Ezt követően trietanolaminba tettük melyhez ecetsavat adtunk. A metszeteket kétszeres citrát pufferben mostuk, ezt követően desztillált vízbe mártottuk és alkoholsorban dehidráltuk. Végül szobahőmérsékleten szárítottuk ki az előkészített metszeteket.

4.6.3. Radioaktívan jelölt RNS próba előállítása

^{35}S UTP-vel jelölt RNS próbák a MAXIscript (Ambion, Austin, TX) transzkripció készlet segítségével készültek a DNS próbákról, melyek T7 és T3 RNS polimeráz felismerő szakaszokat tartalmaztak. Ehhez $2\ \mu\text{l}$ próbát, $6\ \mu\text{l}$ DEPC vizet, $1\ \mu\text{l}$ transzkripció puffert, $2\ \mu\text{l}$ DTT-t, $3\ \mu\text{l}$ dNTP mixet és $2\ \mu\text{l}$ ^{35}S UTP-t kevertünk össze. T7 RNS polimeráz használatával antiszensz RNS próbákat készítettünk, míg a szensz kontroll készítése során T3 RNS polimerázt alkalmaztunk. 37°C -os 1 órás inkubálást követően a templát DNS-t $1\ \mu\text{l}$ DNáz hozzáadásával bontottuk le. 15 perces 37°C -os inkubálást követően glikogént, TE puffert, ammónium-acetátot és 100%-os etanolt adtunk hozzá az RNS kicsapása céljából, majd szárazjégre tettük. Ezután 4°C -on 13000

rpm-en centrifugáltuk az Eppendorf csövekben lévő mintákat, majd a felülúszó leöntése után jéghideg 95%-os etanolt adtunk hozzá. Ismételt centrifugálás után a felülúszót ismét leöntöttük és a maradékot leszívtuk a próbákról. A csapadékot ezt követően TE pufferben feloldtuk. A próbák radioaktivitását β -számlálóval lemértük. Tárgylemezenként 1 millió DPM aktivitással rendelkező jelölt RNS próbát alkalmaztunk.

4.6.4. A hibridizáció és előhívás

A hibridizációs elegy elkészítése során a ^{35}S UTP-vel jelölt RNS próbákat, DEPC kezelt vizet és a nukleinsav mixet összekevertük és 5 percig 65°C -on melegítettük. Ezután DTT-t, SDS-t, NTS-t valamint a hibridizációs puffert adtunk hozzá. A hibridizáció alkalmával 80 μl hibridizációs elegyet vittünk fel tárgylemezekre és formamidot tartalmazó nedveskamrában tettük el 65°C -on 24 órára. Ezt követően a fedőlemezeket négyszeres citrát pufferben mostuk le és a metszeteket 1mM DTT-t tartalmazó oldatba helyeztük. A metszeteket 30 perces RNáz A-ban lévő inkubációt követően szobahőmérsékleten, és 65°C -on csökkenő koncentrációjú citrát pufferben mostuk. Dehidratálást és szárítást követően a tárgylemezeket NTB emulzióba (Eastman Kodak) mártottuk és 3 héten keresztül 4°C -on tároltuk. Ezt követően a tárgylemezeket előhívtuk és fixáltuk Kodak Dektol előhívóval és Kodak fixálóval, majd háttérfestettük Giemsa festékkel, végül Cytoseal 60-nal (Stephens Scientific, Riverdale, NJ) lefedtük.

4.7. In situ hibridizációs hisztokémia eredményeinek kvantálása

A következő kísérleti csoportonként 6 patkányagy metszeteit vizsgáltuk: 24 órás túlélés 1 órás MCAO után, permanens 24 órás, 72 órás túlélés 1 órás MCAO-t követően, 1 hónapos túlélésű patkányok 1 órás MCAO után. Sötét látóteres mikroszkóppal fotókat készítettünk a metszetekről 3 különböző pozícióban a lézió belül, a penumbrában és a hozzá tartozó ép szövetben 4x objektívvel. Az autoradiográfiás szemcsék denzitását a metszeteken $400 \times 400 \mu\text{m}$ (0.16 mm^2) területen a 3 különböző pozícióban mértük, és az adatokat egy egységként kezeltük. A fehér terület pixel számát (mely világosabb, mint az egységesen alkalmazott küszöbérték szürke az összes kép esetében) ImageJ 1.47v (National Institutes of Health, USA)

segítségével számoltuk. Az értékeket az mRNA szintjének kvantálására használtuk. Az mRNA szintjét a különböző időpontokban Egyutas (One-way) ANOVA, a különböző időpontok és eltérő pozíciók esetében Kétutas (Two-way) ANOVA használatával hasonlítottuk össze. Az egyéni értékeket Bonferroni-féle többszörös összehasonlító post-hoc tesztet alkalmazva vetettük össze.

4.8. Szövetgyűjtés immunfestéshez

Az állatokat (összesen 30, ebből 8 állat a 3 különböző időpontban: 24 órával, 72 órával és 1 hónappal MCAO-t követően, és ezen felül csoportonként egy kontroll állat) anesztézia után transzkardiálisan perfundáltuk 150 ml fiziológias sóoldattal majd ezt követően 300 ml 4%-os foszfát pufferben oldott (PB, pH=7,4) paraformaldehiddel. Az agyakat kivétel után 24 órán keresztül 4%-os paraformaldehidben posztfixáltuk. Metszés előtt 20%-os szaharóz oldatban szobahőmérsékleten 2 napig tartottuk. Kriosztáttal 20 µm-es koronális metszeteket készítettünk 4,0 és -6,0 bregma szint között. Állatonként 12 párhuzamos sorozatot metszettünk, melyeket különböző kombinációban összeállított in situ hibridizáció és immunhisztokémia dupla jelöléshez használtunk fel.

4.9. Immunhisztokémia

Tárgylemezre felvitt metszeteket először 3%-os hidrogén peroxiddal kezeltük 15 percig majd 1%-os, 0,5 %-os Triton X-100 PB-ben oldott BSA-ban 30 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. Ezt követően a párhuzamos metszetekre szobahőmérsékleten 24 órán keresztül a következő antitestek egyikét vittük fel: nyúl anti-Hsp70 (1:1000 hígításban) mint a penumbrális sejtek markere, egér anti-NeuN (1:500 hígításban) neuronális marker, egér anti-GFAP (1:300 hígításban) és egér anti-S-100 (1:5000 hígításban) asztrogliá marker, nyúl anti-Iba1 (1:100 hígításban) mikroglialis marker, nyúl anti-Fos (1:25000 hígításban) aktivált sejteket jelölő marker és nyúl anti-ATF-3 (1:300 hígításban), mely axonálisan degenerálódott neuronokat jelölő marker, egér anti-alpha smooth muscle actin (α SMA, 1:2000 hígításban) az erek simaizomsejtjeinek markere, nyúl anti-Von Willebrand factor (vWF, 1:1500 hígításban) endothel marker. A felvitt antitesteknek megfelelően vagy anti-nyúl, vagy anti-egér antitestben (1:1000 hígításban) inkubáltunk 1 órán keresztül. Ezután ABC (avidin-

biotin-horseradish peroxidáz) komplexben (1:500 hígításban) 1 órás inkubáció következett. Végül a metszeteket 0,06% DAB-bal és 0,003% hidrogén-peroxiddal Tris pufferben (0,05 M, pH=8,2) kezeltük 10 percig. Majd Cytoseal 60-nal lefedtük a metszeteket. Az antitestek specificitását már korábban megerősítették, és a mi eredményeink is specifikus jelölésnek felelnek meg. A gyártó szerint az anti-Hsp70 antitest intenzív sávot eredményezett 70 kDa-nál Western blot-ot alkalmazva. Mi nem észleltünk egyéb Hsp-70-nel jelölt sejtet az ép szövetben. A penumbra marker Hsp70 immunreaktivitás a vártnak megfelelően a lézió menti széli zónában jelent meg (Weinstein és mtsai. 2004, Popp és mtsai. 2009). Az anti-NeuN jelölt sejteket a morfológia alapján azonosítottuk. Ezt az antitestet számos korábbi publikációban alkalmazták, melyekben specificitásának megerősítésére volt szükség (Glasper és mtsai. 2011). A gyártó szerint az anti-GFAP antitest Western blot-ban 50 kDa molekulatömegnél eredményez egy sávot. A mi eredményeink szerint az anti-GFAP-val jelölt sejtek morfológiája megfelelt az asztrocitáknak. Ezen felül a GFAP immunreaktivitás jelentősen megemelkedett a lézió körül abban az időpontban, amikor az asztroglialis hegeképződésre számíthattunk. Az anti-Iba1 antiszérum által jelölt sejtek morfológiája nyugvó mikroglia esetében megfelelt sok vékony nyúlvánnyal rendelkező sejtnek, míg az aktivált mikroglia nagy amöboid alakú sejt morfológiát mutatott a lézió körül. Továbbá, ezt az antiszérumot korábban már mikroglia markerként használták (Bosco és mtsai. 2011). Az anti-Fos antiszérum, mely aktivált sejteket jelöl, nem festett áloperált kontroll állatokban, kivéve pár speciálisan jelölődő régiót. A jelölt sejtek a kéregben jelentek meg fokális ischémia után. Ezen felül ezt az antiszérumot korábbi tanulmányokban már használták (Gaszner és mtsai. 2007). Az anti-ATF-3 antiszérum nem jelölt áloperált kontroll állatokban, kivéve néhány régiót. Fokális ischémiát követően a jelölt neuronok a lézió körül jelentek meg, mivel az ATF-3 a neuronális nyúlványok sérülését jelző marker. Ezt az antiszérumot már korábban használták, mint sérült sejtek markere (Yamanaka és mtsai. 2011). Az S-100, α SMA és vWF antitestek specificitását Western blot-tal a gyártó cégek már korábban megerősítették, továbbá jelölt sejtek morfológiája és elhelyezkedése alapján a festést specifikusnak találtuk.

4.10. Immunhisztokémia és in situ hibridizációs hisztokémia kombinálása

Tárgylemezhez kötött perfundált metszetek először az in situ hibridizációs hisztokémiai procedúrán mentek végig. Amikor a szoros RNS-RNS párok már kialakultak, következett az immunhisztokémia, még mielőtt az autoradiográfiás emulzióba való bemártásra sor került volna. A perfúzió és az immunhisztokémia során használt oldatok DEPC-kezelt RNáz mentes vízzel készültek, ami biztosította, hogy az in situ hibridizációs hisztokémiai jel erőssége ne veszítsen jelerősségéből. Az immunreaktivitást DAB-bal jelenítettük meg, majd ezt követően mártottuk be a tárgylemezeket az emulzióba. Minden dupla jelölés során kontroll metszeteket is alkalmaztunk, melyek végigmentek a dupla jelölési procedúrán anélkül, hogy felvittük volna a radioaktív in situ hibridizációs próbákat. Ezek a kontrollok bizonyították hogy a DAB jel nem okozott autoradiográfiás jelet.

4.11. A dupla jelölés eredményeinek kiértékelése

TGF- β -kat vagy receptoraikat expresszáló sejtek felett legalább 3-szor több volt az mRNS-nek megfelelő autoradiográfiás szemcsék száma, mint a háttér egy sejtnek megfelelő, 25 μm átmérőjű területén. A háttér típusosan 3-4 szemcsét tartalmazott, de mindig kevesebbet mint sejtenként 7-et. Az mRNS-t expresszáló sejtek akkor immunpozitívak is, ha legalább annak területnek a fele felett, mely immunreaktivitást tartalmazott egy adott markerre, felhalmozódott autoradiográfiás szemcséket találunk. Az összehasonlítás során a TGF- β -t expresszáló sejteket és a duplán jelölt sejteket (TGF- β +NeuN, GFAP, Iba1, Hsp70, Fos vagy ATF-3) megszámláltuk 400x200 μm négyzetekben a lézió szélének külső határánál, a cortex II. és V. rétegében. A receptorok esetében a mRNS-t expresszáló sejteket és a duplán jelölt sejteket (TGF- β receptor + NeuN, S-100, Iba1, α SMA vagy vWF) megszámláltuk 400x400 μm négyzetekben a lézió területén belül, a penumbrában és az ép kéregben. A különböző agyterületek között a duplán jelölt sejtek százalékos arányát Egyutas (One-way) ANOVA alkalmazásával hasonlítottuk össze.

4.12. Szövetteni elemzés és fényképezés

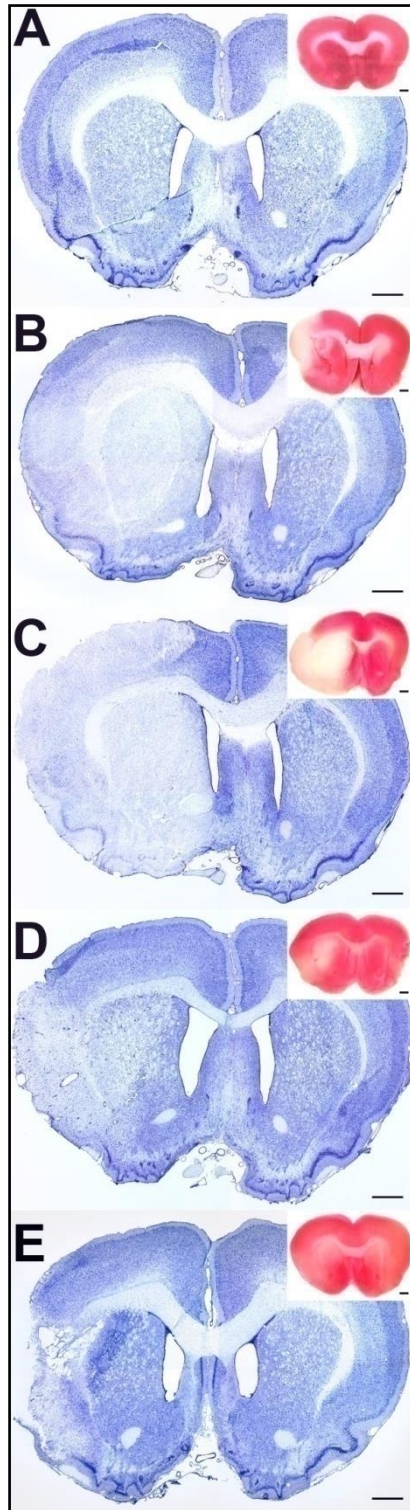
A metszeteket Olympus BX60 fénymikroszkóppal vizsgáltuk mind sötét és világos látótérben. A képeket SPOT Xplorer digitális CCD kamerával készítettük 2048 x 2048 felbontásban, sötét látótérben 4x-es objektívvel, világos látótérben 4-40x-es objektívvel. A képek kontrasztját és élességét Adobe Photoshop CS 8.0-ban állítottuk be.

5. Eredmények

A TGF- β receptorok közül a TGF- β RI, RII, RIII és Alk1 indukcióját vizsgáltuk. Az egyes receptorok mRNS-e specifikus térbeli és időbeli expressziós mintázatot mutatott fokális ischémia után. A különböző TGF- β receptorokat expresszáló sejtek típusát ismert sejtmakerekkel való kolokalizációjuk alapján azonosítottuk. Leírtuk továbbá, hogy a TGF- β -kat expresszáló sejtek típusa altípusonként eltérő. A TGF- β -1 és a receptorok közül a TGF- β RI és RII indukciója a lézió területén belül mikroglia sejtekhez köthető 72 órával MCAO után. Megmutattuk, hogy a TGF- β 2 neuronokban jelenik meg, melyek Fos aktivitást is jeleztek az azonos oldali kéregben.

5.1. A lézionált terület megjelenítése

Az 1 órás MCAO az azonos oldali striatum és a kéreg egy részét magába foglaló nagy léziót eredményezett. Az infarktust TTC festéssel tettük láthatóvá frissen kivett agy esetében. A lézionált terület jól láthatóan elkülönült a pirosan festődő ép szövetetől (8. ábra). A TTC festés igazolta minden, a tanulmányban részt vevő agyban a lézió meglétét. A metszetek Nissl festésével a szövetelhalást szintén megjelenítettük, és ez a festés további értékes információt nyújtott a metszeteken lévő lézionált terület méretéről (8. ábra). A kísérletben részt vevő agyak közül 24 frissen disszekált agyból készült Nissl-el megfestett metszeten kvantáltuk a lézió méretét. 24 órával tranziens MCAO után a lézió mérete az azonos oldali agyfélteke $46,3 \pm 2,9\%$ -ának adódott. A lézió mérete nagyobb volt permanens 24 órás okklúziót követően, mint a tranziens 24 órás MCAO esetében, itt az infarktált terület az azonos oldali félteke $59,9 \pm 5,1\%$ -a. 72 óránál, és 1 hónapnál még kifejezettebben a Nissl festett metszeteken a fehér terület csökkent a 24 órás MCAO-hoz képest ($47,7 \pm 4,7\%$ 72 óránál és $35,3 \pm 2,8\%$ 1 hónap esetében). Megfigyelhető, hogy ezen időpontokban a lézió területére bevándorló sejtek elfoglalták az ischémias területet, mégis csökkent a terület mérete (8. ábra).



8. ábra *Infarktált patkányagy Nissl és TTC festése különböző időpontokban MCAO után*
 Koronális metszetek demonstrálják a kísérleti beavatkozás által okozott infarktus méretét. A lézió fehérén jelenik meg mind a Nissl, mind a TTC festés esetében. **A:** Áloperált állat, mely esetében sérülés nem látható. **B:** 24 órával transziens MCAO-t követően. A lézionált terület fehérén kirajzolódik a striatumban és a kéregben. **C:** 24 órával permanens elzárást követően. A lézió kifejezettebb, mint transziens okklúzió esetében. **D:** 72 órával transziens MCAO után,

bevándorló sejtek tömege látható. **E:** 1 hónappal MCAO-t követően. Az elhalt szövet egyrészt eltűnik, míg másrészt teljesen elfoglalják a bevándorló, nem neuronális sejtek. Méretarány = 1 mm.

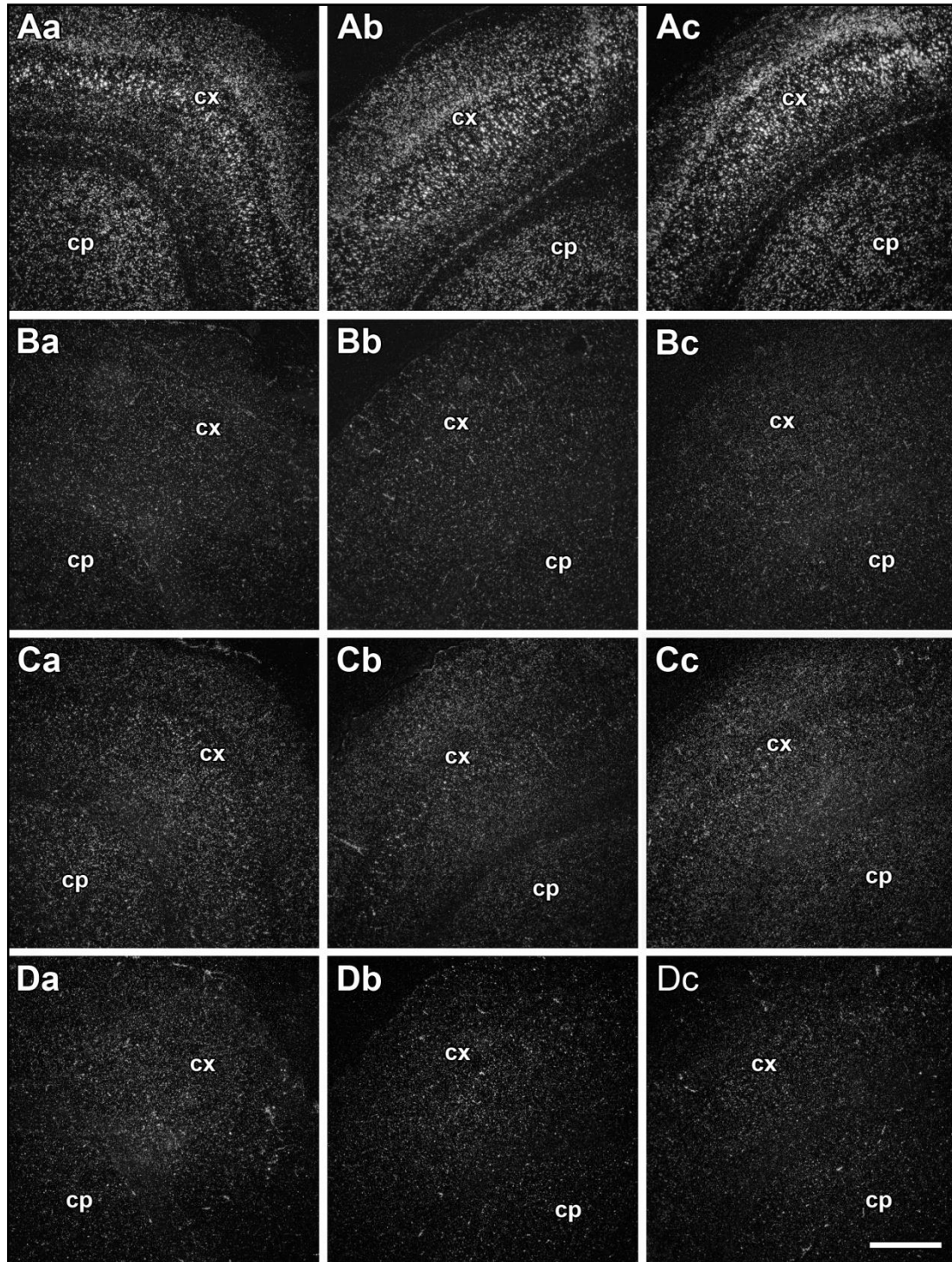
5.2. A TGF- β receptorok mRNS expressziós mintázata MCAO-t követően patkányagyban

5.2.1. TGF- β receptorok mRNS expressziója az ép agyszövetben

A TGF- β receptorok közül a TGF- β RI expressziós szintje magas volt az agykéregben, leginkább a IV. rétegben (9/A ábra). Ehhez képest a TGF- β RII, TGF- β RIII és az ALK1 mRNS expressziós szintje kifejezetten alacsony volt (9/B, C és D ábra). Nincs különbség a receptorok expressziójában a lézióval ellentétes oldali, 24 órával MCAO után (9. ábra a oszlop), azonos oldali, 24 órával áloperációt követően (9. ábra b oszlop), illetve az azonos oldali kontroll, nem műtött (9. ábra c oszlop) esetekben készült metszetek között. Ez bizonyítja, hogy a TGF- β RI, TGF- β RII, TGF- β RIII és az ALK1 receptorok esetében a különböző állatokból származó ép agyszövetben az mRNS expressziós mintázata azonos.

5.2.2. 24 órával tranziens MCAO után

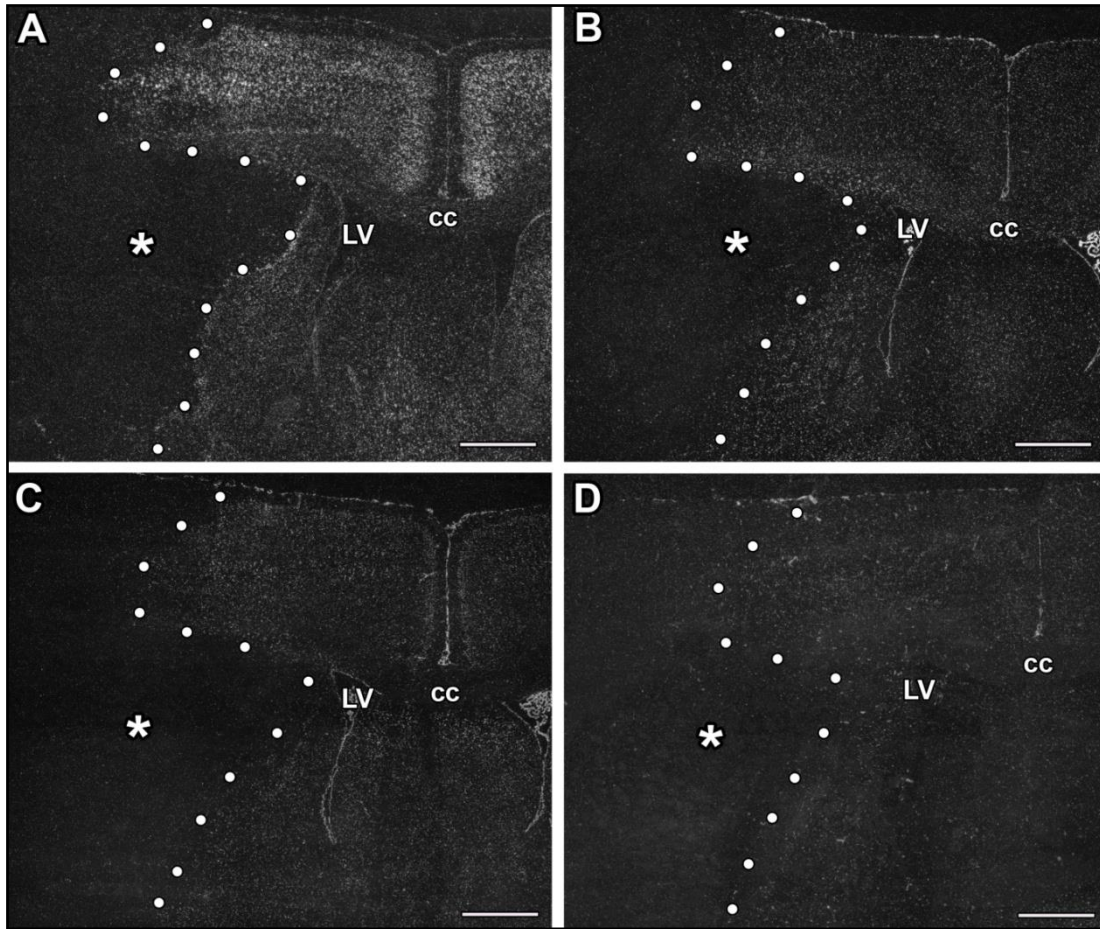
A TGF- β receptorok nem jelentek meg az infarktált területen belül, valójában az alacsony expressziós szint is eltűnt (10. ábra). Az expresszió nem változott az ép agyszövetben. A TGF- β RI magasabb expressziós szintje látható a kéreg IV. rétegében (10/A ábra), mely az alap expressziós szint, ez hasonló volt a lézióval ellentétes oldal expressziós mintázatához és az áloperált állatokban tapasztaltakhoz. A lézió széli zónája úgy képzett átmenetet a lézió és az ép szövet között, hogy semmilyen specifikus indukció nem történt a TGF- β RI, TGF- β RII, TGF- β RIII és az ALK1 mRNS-ének szintjében (10. ábra). Habár a permanens MCAO nagyobb lézióhoz vezetett, az expressziós mintázat hasonló volt a tranzienshez: nem volt látható indukció a TGF- β receptorok mRNS-ének szintjében egyetlen agyterület esetében sem.



9. ábra *TGF- β receptorok mRNA expressziója az intakt agyszövetben*

In situ hibridizációs metszetek sötétlátóteres megjelenítéssel mutatják a lézióval ellentétes oldalt (**a**, bal oszlop 24 órával MCAO után), áloperált állat azonos oldalát (**b**, középső oszlop 24 órával áloperációt követően) és kontroll, nem műtött agy azonos oldalát (**c**, jobb oszlop). Nincs különbség a TGF- β RI (**A**) expressziójában a lézióval ellentétes (Aa), azonos, áloperált (Ab), illetve a azonos, kontroll (Ac) oldal között. A TGF- β RI-hoz a TGF- β RII (**B**), TGF- β RIII (**C**) és az ALK1 (**D**) mRNA expressziója is hasonló ezen típusú ép szövetekben.

Rövidítések: cx – cerebral cortex, cp – caudate putamen. Méretarány = 1 mm.



10. ábra *TGF- β receptor expresszió 24 órával MCAO után*

In situ hibridizációs metszetek sötétlátóteres megjelenítéssel mutatják a TGF- β receptorok mRNS-ének expresszióját. A lézionált területeket csillaggal (*), és a lézió határát fehér pöttyökkel jelöltük. TGF- β receptorok mRNS-e eltűnik a lézió területén belül. TGF- β RI expresszió alacsony szinten megjelenik az ép striatumban és magasabb szinten a kéregben (A). Az alap expressziós szint TGF- β RII (B), TGF- β RIII (C) és ALK1 mRNS (D) esetében nagyon alacsony. TGF- β receptorok expressziója nem emelkedett meg ebben az időpontban az alapaktivitás fölé a lézió mentén.

Rövidítések: cc - corpus callosum, LV – ventriculus lateralis. Méretarány = 1 mm.

5.2.3. 72 órával tranziens MCAO-t követően

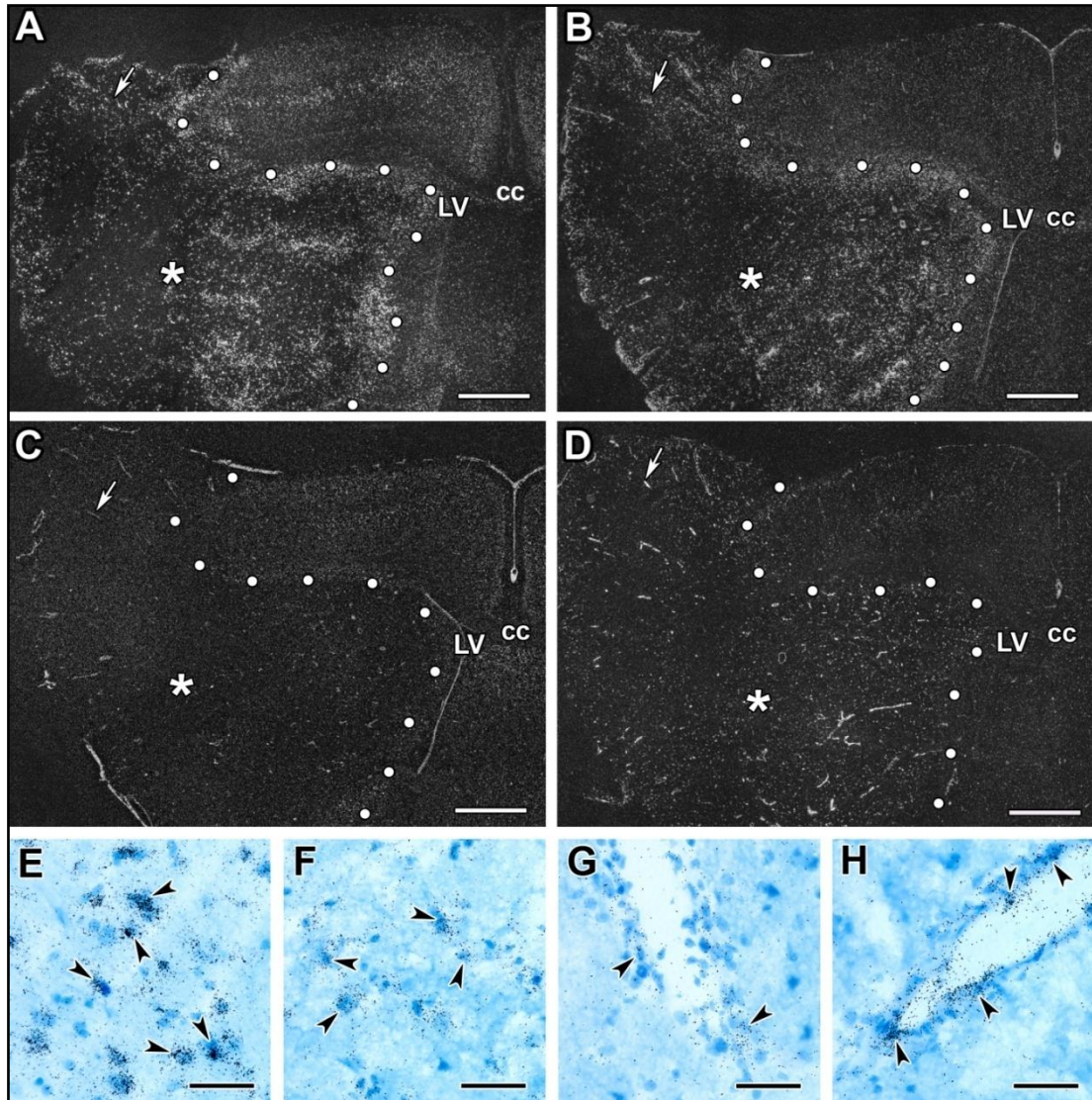
A legjelentősebb változás ebben az időpontban az volt, hogy a TGF- β RI mRNS megjelent a lézió belül. Bizonyos sejtek erőteljesen expresszáltak TGF- β RI mRNS-t. A sejtek eloszlása egyenetlen volt, de általánosan tekintve az egész infarktált területen belül megjelent (11/A ábra). A TGF- β RI-t expresszáló sejtek ezen felül nagy számban jelentek meg a lézió körüli széli részben a kéreg minden rétegében és striatum területén is. A TGF- β RI mRNS expresszió denzitása a penumbrában szignifikánsan magasabbnak adódott, mint a lézió területén belül (Kétutas ANOVA a kéreg esetében és

Bonferroni-féle post-hoc teszt 72 órával elzárás után: $F = 32.99$, $t = 6.501$, $p, 0.001$; a striatum esetében: $F = 441.6$, $t = 17.18$, $p, 0.001$; 12/A. ábra). A TGF- β RI mRNS indukcióját nem tapasztaltuk sem az azonos oldali, sem az ellenkező oldali ép agyszövetben.

TGF- β RII mRNS szintén indukálódott 72 órával MCAO után (11/B ábra). Valójában a TGF- β RII expressziója a TGF- β RI expressziójához volt hasonlatos, attól eltekintve, hogy az ép kéregben nem látható olyan alapaktivitás mint a TGF- β RI esetében. Indukció az ép szövetben nem következik be. Ebben az esetben is szignifikánsan magasabb a TGF- β RII mRNS denzitása a penumbrában, mint a lézió területén belül (12/B ábra). A sötét látóteres kis nagyítású képen a lézió területén belül látható (11/B ábra), hogy az indukció részben erek mentén következik be. Nagy nagyítású világos látóteres képek demonstrálják, hogy az in situ hibridizációs jelnek megfelelő autoradiográfias szemcsék sejtestek felett jelennek meg (11/F ábra). Világos látóterben látszik, hogy a TGF- β RII jel intenzitása alacsonyabb, mint a TGF- β RI esetében (11/E, F ábra).

TGF- β RIII mRNS szintje megemelkedett a lézió területén belül és a penumbrában (Egyutas ANOVA a kéreg esetében és Bonferroni-féle post-hoc teszt: $F = 19.29$, $t = 4.40$; $p \leq 0.01$; a striatum esetében: $F = 42.09$, $t = 7.12$; $p \leq 0.001$; 12/C ábra). Az emelkedés kevésbé volt kifejezett, mint a többi TGF- β receptor esetében, de azért tisztán megfigyelhető. A jelölt sejtek nagy területet fedtek le (11/C ábra). Világos látóteres Giemzával festett metszeten egyértelműen látható, hogy a TGF- β RIII mRNS erekhez kapcsolható (11/G ábra) az infarktált területen belül és a penumbrában. A TGF- β RIII mRNS nem indukálódott az ép agyszövetben (Egyutas ANOVA a kéreg esetében: $F = 2.70$; a striatum esetében: $F = 1.20$; 12/C ábra).

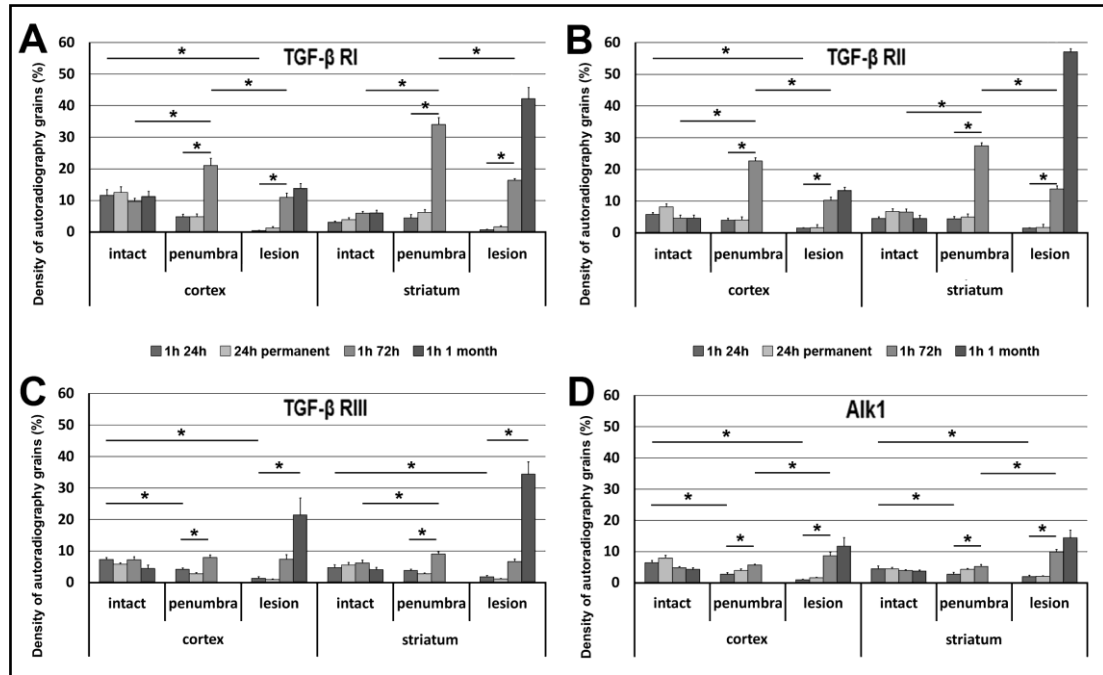
Alk1 mRNS láthatóan erek mentén indukálódik 72 órával MCAO-t követően. Az indukált Alk1 mRNS eloszlása TGF- β RIII-hoz volt hasonló ebben az időpontban (11/D ábra). Az Alk1 mRNS expresszió intenzívebbnek adódott az erek mentén, mint a TGF- β RIII esetében (11/H ábra). A lézió területén belüli expresszió denzitása szignifikánsan magasabb volt, mint a penumbrában, ellentétben a TGF- β RI és RII indukció eloszlásában tapasztaltakkal. A többi receptorhoz hasonlóan az Alk1 mRNS sem indukálódott az ép agyszövetben (12/D ábra).



11. ábra TGF- β receptorok indukciója 72 órával MCAO-t követően

Sötét és világos látóteres képek in situ hibridizációs technikával megjelenített TGF- β receptorok mRNS-ének indukcióját mutatják. A léziónt területeket csillaggal (*), és a lézió határát fehér pöttyökkel jelöltük. **A:** TGF- β RI expressziója indukálódott a lézió szélén a penumbrában, és a lézió belül is. **B:** TGF- β RII mRNS-e szintén indukálódott a penumbrában és a lézió belül. **C:** TGF- β RIII mRNS-t expresszáló sejtek megjelennek a lézió belül feltételezhetően az erek mentén. **D:** ALK1 szintén indukálódott az erek mentén a lézió területén belül. A fehér nyíllal jelölt területet az A-D képen az E-H képek nagy nagyítású világos látóterben mutatják TGF- β receptor mRNS-nek megfelelő fekete autoradiográfias szemcsék sejttestek felett halmozódnak fel. Azon sejteket, melyek TGF- β RI (**E**), TGF- β RII (**F**), TGF- β RIII (**G**) és Alk1 (**H**) expresszálják fekete nyílhegyekkel jelöltük. TGF- β RIII és Alk1 mRNS-e erek körül jelenik meg.

Rövidítések: cc - corpus callosum, LV – ventriculus lateralis. Méretarány: 1 mm A-D és 50 μ m E-H esetében.

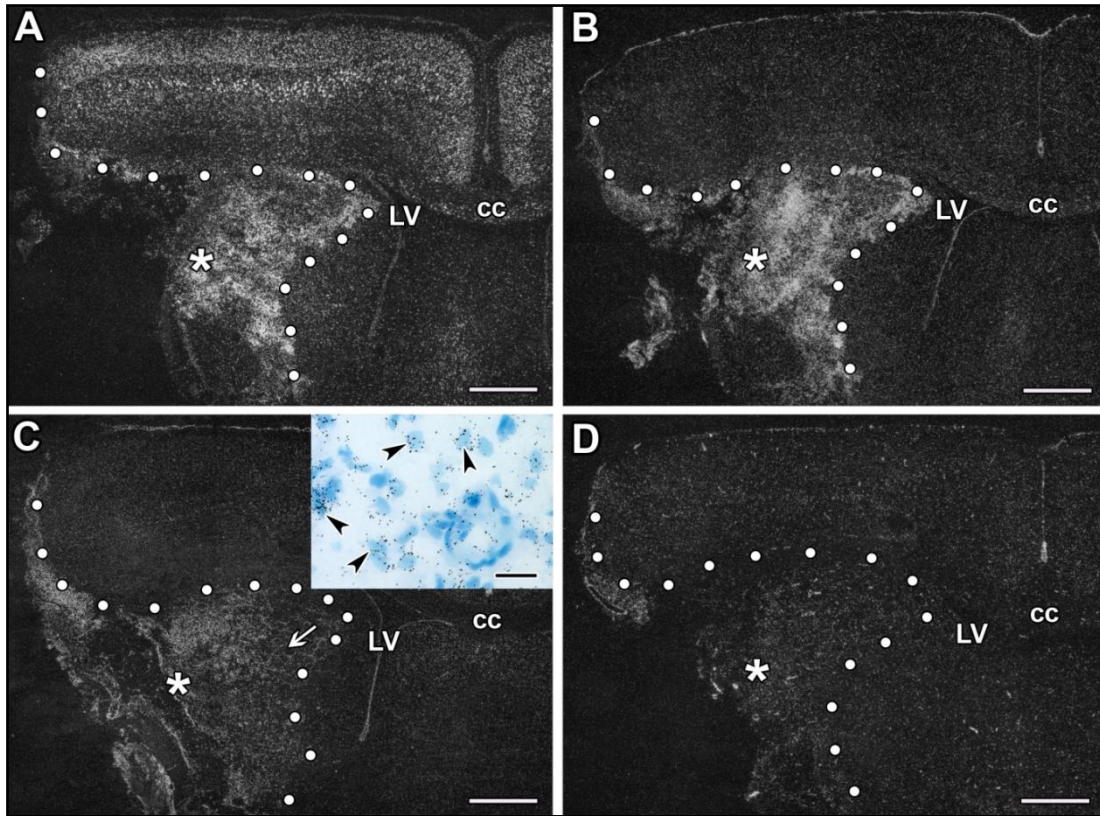


12. ábra TGF- β receptorok mRNA szintjében bekövetkező változások MCAO után

Az autoradiográfiás szemcsék denzitását (Y tengely) TGF- β RI (A), TGF- β RII (B), TGF- β RIII (C) és Alk1 (D) esetében számítottuk ki. Az elemzést a kéregben és a striatumban a következő 4 esetben végeztük: 24 órával tranziens (1 órás) és permanens MCAO, 72 órás, és 1 hónapos tranziens MCAO után. A penumbrát 1 hónapos MCAO esetében nem vizsgáltuk, mert ebben az időpontban már nem azonosítható. Azonos agyterületek esetében a különböző időpontokban kapott értékeket Egyutas ANOVA-t követő Bonferroni-féle többszörös összehasonlító post-hoc tesztet alkalmazva vetettük össze, míg a különböző agyterületeket Kétutas ANOVA segítségével hasonlítottuk össze. Csillaggal (*) jelöltük szignifikánsan ($p < 0,05$) különböző értékeket.

5.2.4. 1 hónappal tranziens MCAO után

TGF- β RI és RII expressziója igen magas maradt az infarktus területén belül (13/A, B ábra). A megmaradó, regenerálódó agyszövet magasabb expressziós szintet mutatott TGF- β RI és RII esetében 1 hónapnál, mint 72 órával MCAO-t követően (12/A, B ábra). Érdekes módon a TGF- β RIII mRNA tovább indukálódott a lézió belül és az eloszlása TGF- β RI és TGF- β RII eloszlásához vált hasonlatossá (13/C ábra). Ezzel ellentétben az Alk1 jelintenzitás eloszlása 72 órás állapothoz hasonló maradt (13/D ábra). A penumbra ezen időpontban nem azonosítható. A lézió kívül csak a TGF- β RI mutatott jelentős festődést az agykéregben az ép szövetben hasonló eloszlással (13/A ábra).



13. ábra *TGF- β receptorok indukciója 1 hónappal MCAO után*

Sötét látóteres képek mutatják a TGF- β receptorok mRNS-ének indukcióját. A lézionált területeket csillaggal (*), és a lézió határát fehér pöttyökkel jelöltük. **A:** TGF- β RI mRNS sűrűn megjelenik a lézionált területen belül. A lézió kívül a TGF- β RI a kéregben expresszálódik, de szintje nem emelkedik meg. **B:** TGF- β RII mRNS szintje markánsan emelkedik a lézió belül. **C:** TGF- β RIII szintén megjelenik az infarktált területen. A beillesztett világos látóteres nagy nagyítású kép mutatja, hogy az autoradiográfias szemcsék sejtestek felett helyezkednek el. **D:** ALK1 mRNS mennyisége kissé emelkedett a lézió belül.

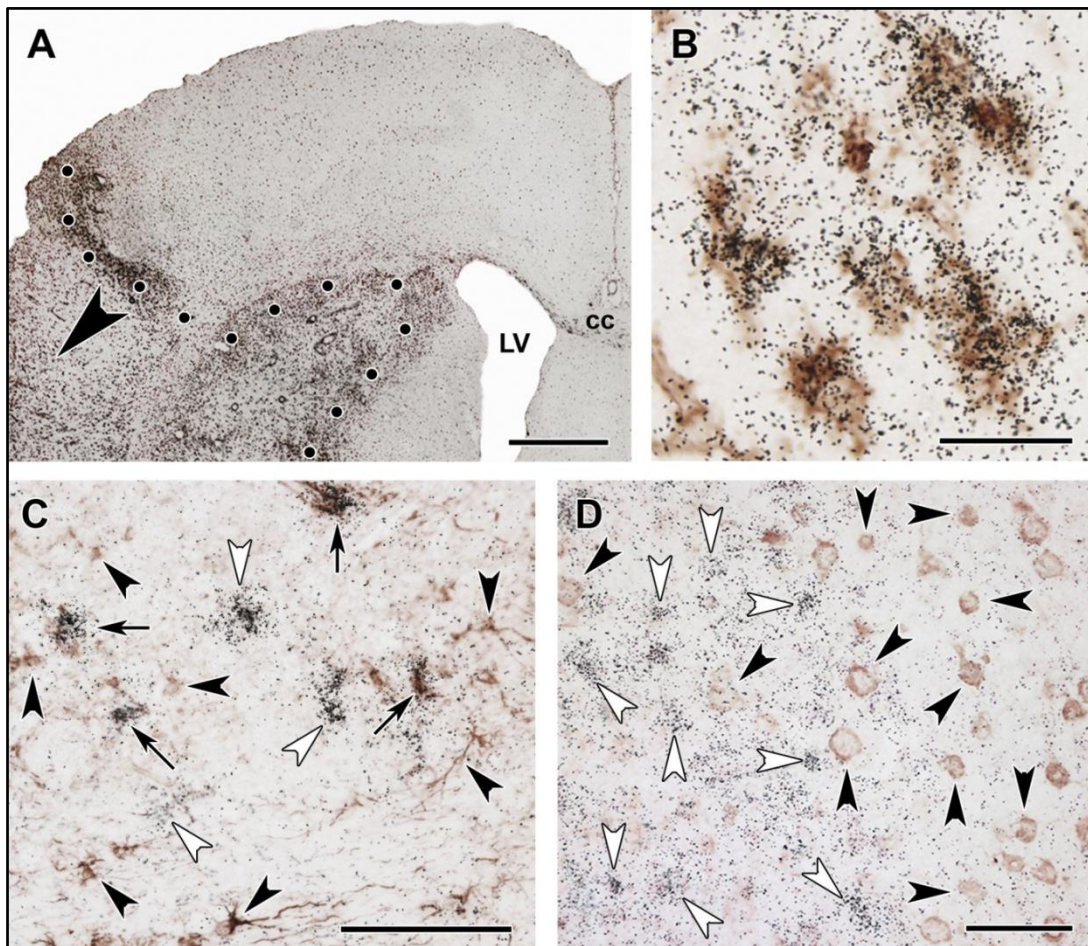
Rövidítések: cc - corpus callosum, LV – ventriculus lateralis. Méretarány: 1 mm és 20 μ m a C ábrára beillesztett képen.

5.3. TGF- β -kat expresszáló sejtek típusának meghatározása tranziens MCAO-t követően

A TGF- β 1 expresszió 3 órával MCAO után megemelkedett a penumbrában, majd tovább indukálódott 24 órával az MCAO-t követően. 72 órával és 1 hónappal az MCAO után a TGF- β 1 expresszió megjelenik a lézionált területen belül. A TGF- β 2 a lézióval azonos oldali kéreg II., III. és V. rétegében indukálódott 24 órával MCAO után. A TGF- β 3 expressziója csak a kéreg II. rétegének pár sejtjében emelkedett meg 24 órával MCAO-t követően (Pal és mtsai. 2012, Vincze 2015).

5.3.1. TGF- β 1-t expresszáló sejtek típusa

Intakt és áloperált állatokban Iba1 immunfestés által jelölt nyugvó mikrogliaak elágazó vékony nyúlványokkal jelennek meg. A lézió széli zónájában, intenzíven jelölődő Iba1 pozitív, nagy amőboid alakú sejtek észlelhetők 24 órával MCAO után, ezek feltételezhetően aktivált mikrogliaak. 72 órával MCAO-t követően az Iba1 immunreaktivitás tovább emelkedik a lézió körül, és Iba1 immunreaktív sejtek jelennek meg a lézió területén belül (14/A ábra). Az Iba1 pozitív sejtek eloszlása a TGF- β 1-t expresszáló sejtek eloszlásához hasonló minden időpontban. Ezen felül Iba1 immunhisztokémia és TGF- β 1 in situ hibridizációs hisztokémia kombinálásával a lézió szélén és azon belül az Iba1 és a TGF- β 1 kolokalizál (14/B ábra).



14. ábra A TGF- β 1 gliális sejtekben indukálódott 72 órával MCAO-t követően

A: A TGF- β 1 mRNS és a mikroglialis marker Iba1 dupla jelölése 72 órával MCAO-t követően. A lézió határát fekete pöttyökkel jelöltük. Az A ábrán fekete nyíllal jelölt terület nagy nagyítással a B ábrán látható. **B:** A fekete TGF- β 1 mRNS-nek megfelelő autoradiográfias szemcsék a barna Iba1 immunpozitív sejtek felett láthatók. **C:** Az egyszeresen jelölődő TGF- β 1

pozitív sejteket fehér nyílhegyekkel, a csak GFAP immunreaktív sejteket fekete nyílhegyekkel, míg a duplán jelölődő sejteket fekete nyilakkal jelöltük. **D:** A TGF- β 1 mRNS-t expresszáló sejteket fehér nyílhegyekkel, míg a NeuN pozitív neuronokat fekete nyílhegyekkel jelöltük. Duplán jelölődő sejtek nem láthatók.

Rövidítések: cc: corpus callosum, LV: ventriculus lateralis. Méretarány = 1 mm az A, 30 μ m a B és 100 μ m a C és a D panel esetében.

TGF- β 1 sejtek közel 95%-a Iba1 immunreaktív (1. táblázat). GFAP és NeuN immunreaktív sejtek hiányoznak az infarktált területen belül, de a lézió méretét jól mutatják az ép szövetben való megjelenésükkel. TGF- β 1 expresszáló sejtek közel 25% a lézió mellett szintén GFAP-val is jelölődött (14/C ábra). TGF- β 1 mRNS nem jelent meg NeuN pozitív neuronokban (14/D ábra).

1. táblázat TGF- β -t expresszáló sejtek immunfestése

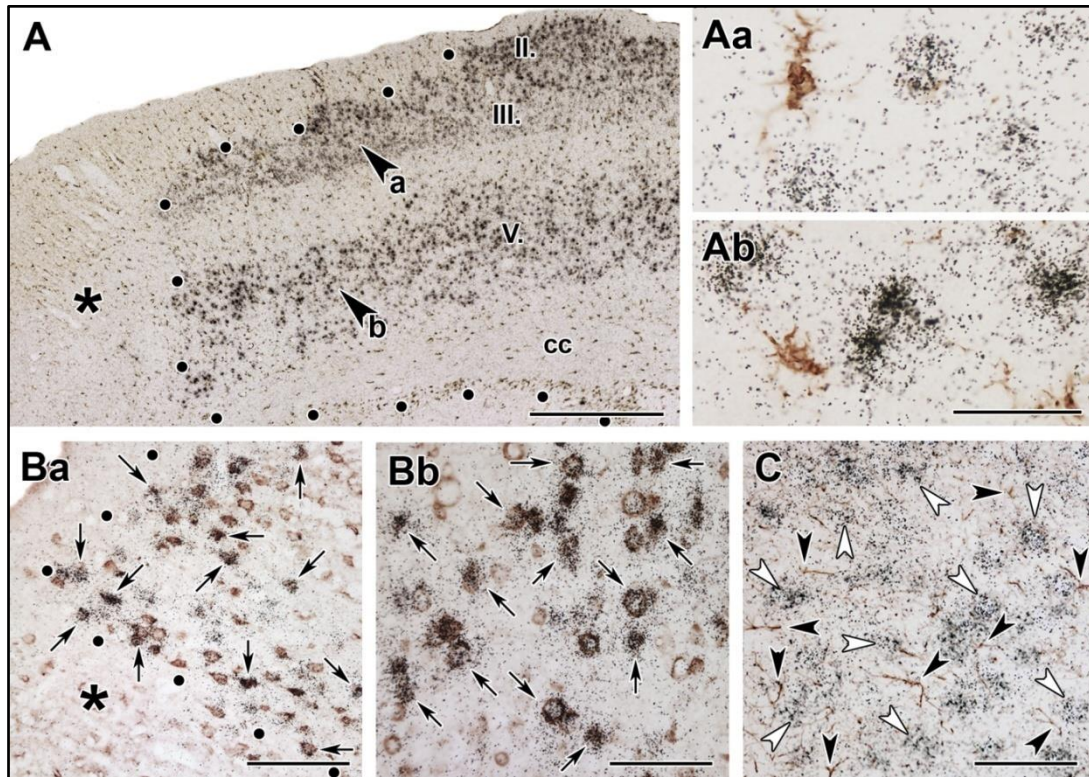
TGF- β 1 esetében az adatok 3 területéről származnak, a kéreg II. és V. rétegéből valamint a striatumból. Mivel a TGF- β 2 a striatumban nem expresszálódik, ezért a sejteket csak a kéregben számoltuk. Hasonlóképpen mivel a TGF- β 3 csak a II. rétegben indukálódik, ezért az adatok is csak innen származnak. A TGF- β -t expresszáló sejtek számát a lézió széle mellett számoltuk 200x400 μ m területen. Ugyanebben a látótérben a duplán jelölődő sejteket is megszámláltuk, és a számolt arányokat átlagoltuk. Egyutas (One-way) ANOVA analízis során szignifikáns különbséget a régiók között egyik marker esetében sem találtunk.

	TGF- β 1			TGF- β 2		TGF- β 3
	II. réteg	V. réteg	Striatum	II. réteg	V. réteg	II. réteg
TGF- β -t exp. sejtek száma/ 0,08 mm ²	18,3 \pm 4,9	16,3 \pm 3,5	20,5 \pm 4,2	18,3 \pm 4,2	17,0 \pm 3,9	14,0 \pm 4,5
Immunpozitív sejtek a TGF- β -t expresszáló sejtek %-ban						
NeuN	3,7 \pm 2,8	4,7 \pm 3,3	5,7 \pm 3,9	87,1 \pm 3,8	84,8 \pm 2,7	81,1 \pm 3,5
GFAP	26,3 \pm 2,8	21,6 \pm 6,2	22,2 \pm 4,4	4,2 \pm 2,3	4,0 \pm 2,1	9,3 \pm 5,8
Iba1	93,7 \pm 3,4	94,0 \pm 4,6	96,0 \pm 4,1	3,1 \pm 2,6	3,5 \pm 2,4	6,7 \pm 3,4
Hsp70	7,2 \pm 2,2	4,8 \pm 3,9	5,5 \pm 5,9	76,3 \pm 7,4	69,2 \pm 8,9	

5.3.2. TGF- β 2-t és - β 3-t expresszáló sejtek típusa

A TGF- β 2-t és - β 3-t expresszáló sejtek eloszlása a TGF- β 1-hez képest jelentősen eltér (15/A ábra). TGF- β 2 és - β 3 mRNS-t expresszáló sejtek több mint 80%-a kolokalizált NeuN pozitív sejtekkel, felvetve ezen altípusok neuronális expresszióját (15/B ábra). A TGF- β 2-t és - β 3 viszont szinte nincs jelen mikroglialis sejtekben (15/A ábra), mivel igen kis számban expresszálják Iba1 immunreaktív sejtek a kéreg III. rétegében (3,1 \pm 2,6%) és az V. rétegében (3,5 \pm 2,4%). A GFAP pozitív asztroglia és a

TGF- β 2-t expresszáló sejtek elkülönülnek egymástól (15/C ábra), kolokalizációjuk minimális (1. táblázat).



15. ábra A TGF- β 2 neuronális sejtekben indukálódott 24 órával MCAO után

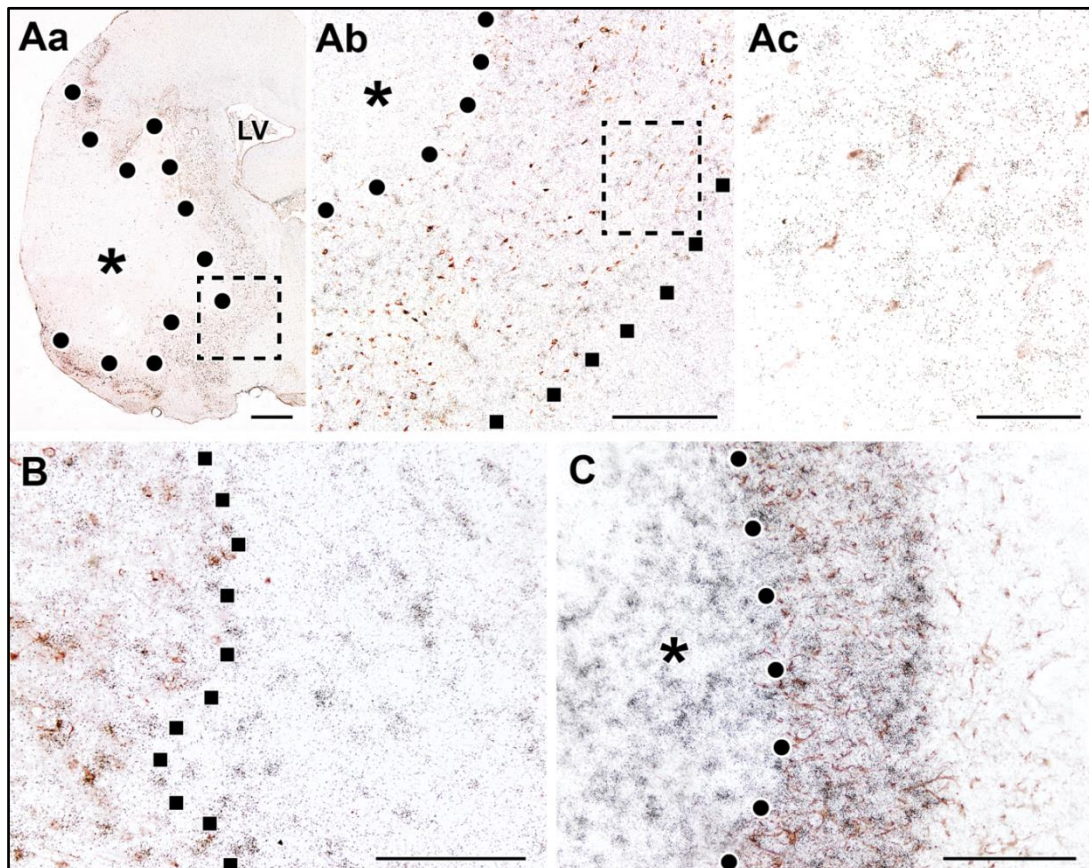
A: A TGF- β 2 mRNS (in situ hibridizációs hisztokémia) és a mikroglialis marker Iba1 (immunhisztokémia) dupla jelölése 24 órával MCAO-t követően. A lézionált területet csillaggal (*), és a lézió határát fekete pöttyökkel jelöltük. Az A ábrán fekete nyíllal jelöltük a kéreg III. és V. rétegében az Aa és Ab nagy nagyítású képet. Az Iba1 immunreaktív mikroglia sejtek a kéreg egyik rétegében sem tartalmaznak TGF- β 2 mRNS-t. **B:** A TGF- β 2 mRNS és a neuronális marker NeuN dupla jelölése 24 órával MCAO-t követően. Szinte minden TGF- β 2 mRNS-t expresszáló sejt NeuN immunreaktivitást is tartalmazott a kéreg mind a III. (Ba) és mind az V. (Bb) rétegében. A duplán jelölődő sejteket fekete nyíllal jelöltük. **C:** TGF- β 2 expresszió nem asztrogliaíkhhoz köthető. A GFAP pozitív sejteket fekete nyílhegyekkel, a TGF- β 2-t expresszáló sejteket fehér nyílhegyekkel jelöltük. Nincs duplán jelölődő sejt.

Rövidítések: cc: corpus callosum. Méretarány = 1 mm az A, 50 μ m az Aa és az Ab, 200 μ m a Ba, 100 μ m a Bb és a C képek esetében.

5.3.3. TGF- β mRNS-ek eloszlásának viszonya a penumbrához és a hegyszövethez

A Hsp70 (Heat shock protein 70), olyan a penumbrát jelző marker, mely a léziót körülvevő széli zónában lévő sejtekben jelent meg, de hiányzott a lézió belül és az ép szövetben 24 órával transziens MCAO után (16/A ábra). TGF- β 1-et expresszáló sejtek hasonló eloszlással rendelkeznek ebben az időpontban (16/A ábra). Viszont a TGF- β 1

mRNS és a Hsp70 immunreaktivitás nem azonos sejtekhez köthető (1. táblázat). A TGF- β 2 és a Hsp70 eloszlása 24 órával MCAO után átfedett a penumbrában, de további TGF- β 2-t expresszáló sejtek jelentek meg az ép szövetben a kéreg II., III. és V. rétegben (16/B ábra). Érdekes, hogy a TGF- β 2-t expresszáló sejtek megközelítőleg 75 %-a Hsp70 immunpozitív is volt (1. táblázat). A gliális heg 1 hónappal MCAO-t követően jelent meg a lézió körül. A hegszövetet intenzív GFAP immunjelölés rajzolta ki (16/C ábra). TGF- β 1-t expresszáló sejtek bőségesen megjelentek a hegszövetben és a lézió területén belül, de szinte teljesen hiányoztak az ép oldalon (16/C ábra). A gliális hegszövetben található TGF- β 1-t expresszáló sejtek többsége nem tartalmazott GFAP-t (16/C ábra). A TGF- β 2 és - β 3 nem jelent meg a hegszövetben 1 hónappal transziens MCAO-t követően.



16. ábra A TGF- β 1 és - β 2 mRNS elhelyezkedésének viszonya a penumbrához és a gliális hegszövethez

A: A TGF- β 1 mRNS (in situ hibridizációs fekete autoradiográfiai szemcsék) és a penumbra marker Hsp70 immunreaktív (barnán festődő sejtek) dupla jelölése 24 órával MCAO-t követően. A lézionált területet csillaggal (*), és a lézió határát fekete pöttyökkel jelöltük. A fekete négyzetekkel a penumbra ép szövet felé lévő szélét mutatjuk. Az Aa ábrán bekeretezett

rész az Ab ábrán mutatja a TGF- β 1 mRNS és a Hsp70 hasonló eloszlását a penumbrában. Az Ac ábra (Ab képen keretezéssel jelölt rész) nagy nagyítással mutatja, hogy a TGF- β 1 mRNS és a Hsp70 immunreaktivitás nem azonos sejtekhez köthető. **B:** TGF- β 2 mRNS (in situ hibridizációs fekete autoradiográfias szemcsék) és a Hsp70 immunreaktív (barnán festődő sejtek) dupla jelölése 24 órával MCAO után. Fekete négyzetek a penumbra külső határát jelölik. A penumbra belül a TGF- β 2 mRNS-t expresszáló sejtek többsége Hsp70 immunreaktivitással is rendelkezik. Az ép szövetben viszont csak TGF- β 2 mRNS-t expresszáló sejtek vannak jelen. **C:** A gliális hegszövetet a GFAP-vel intenzíven jelölődő asztrociták alkotják. TGF- β 1-t expresszáló sejtek a gliális hegszövetben és a lézió területén belül jelentek meg, viszont a hegen túli ép szövetben nem.

Rövidítések: LV: ventriculus lateralis. Méretarány = 1 mm az Aa, 400 μ m az Ab, 100 μ m az Ac és 200 μ m a B és a C panelek esetében.

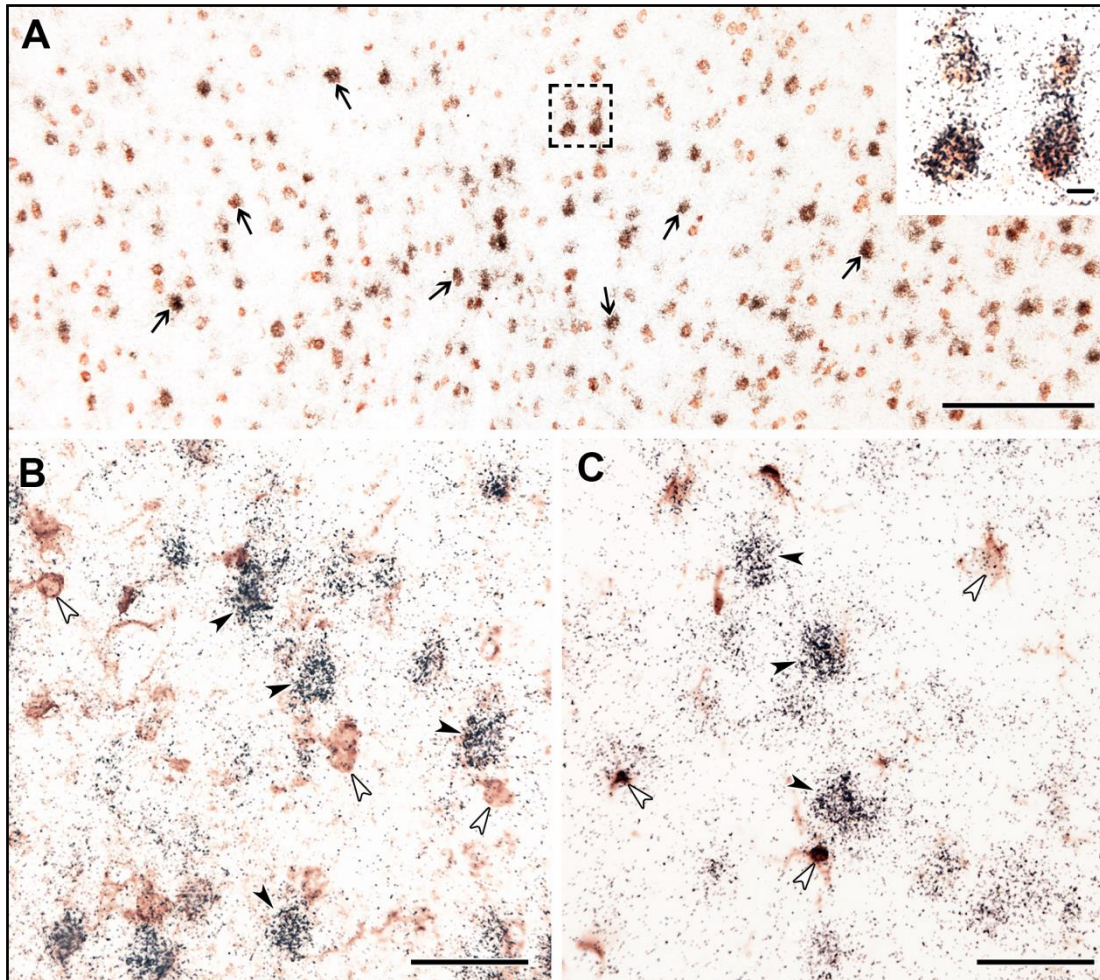
5.4. TGF- β receptorokat expresszáló sejtek típusai

5.4.1. TGF- β RI-t expresszáló sejtek típusa ép kéregben

Vártunk megfelelően, minden marker nagyszámú sejtet festett meg az ép agyszövetben. A markerek festési mintázata érzékelhetően nem változott az ép szövetben. TGF- β RI expresszáló nagyszámú sejtek neuronoknak bizonyultak csak néhány volt gliasejt (17. ábra). 54 TGF- β RI expresszáló sejtből 51 festődött NeuN-nel a kéreg IV. rétegben, néhány pedig gliális markerrel 0.16 mm² területen (2. táblázat). Más rétegek kevesebb TGF- β RI expresszáló sejteket tartalmaztak, de nagyrészüket szintén neuron volt. A többi TGF- β receptorokat sokkal kisebb számban expresszáló sejtek dupla festések alapján a TGF- β RII esetében az ép agyszövetben asztrociták (S-100 jelölve) és neuronok (NeuN jelölve), Alk1 és TGF- β RIII esetében neuronok és endothel sejtek (vWF jelölve) voltak.

5.4.2. TGF- β RI-et és TGF- β RII-t expresszáló sejtek típusa

Ép és áloperált patkányok agyának metszetén Iba1 immunhisztokémiával vékony nyúlványokkal rendelkező mikrogliaik jelölődtek. A lézió területén belül, intenzíven Iba1 immunreaktív, nagy amőboid alakú sejtek jelentek meg 72 órával MCAO után, melyek feltételezhetően aktivált mikrogliaik. (18. ábra).



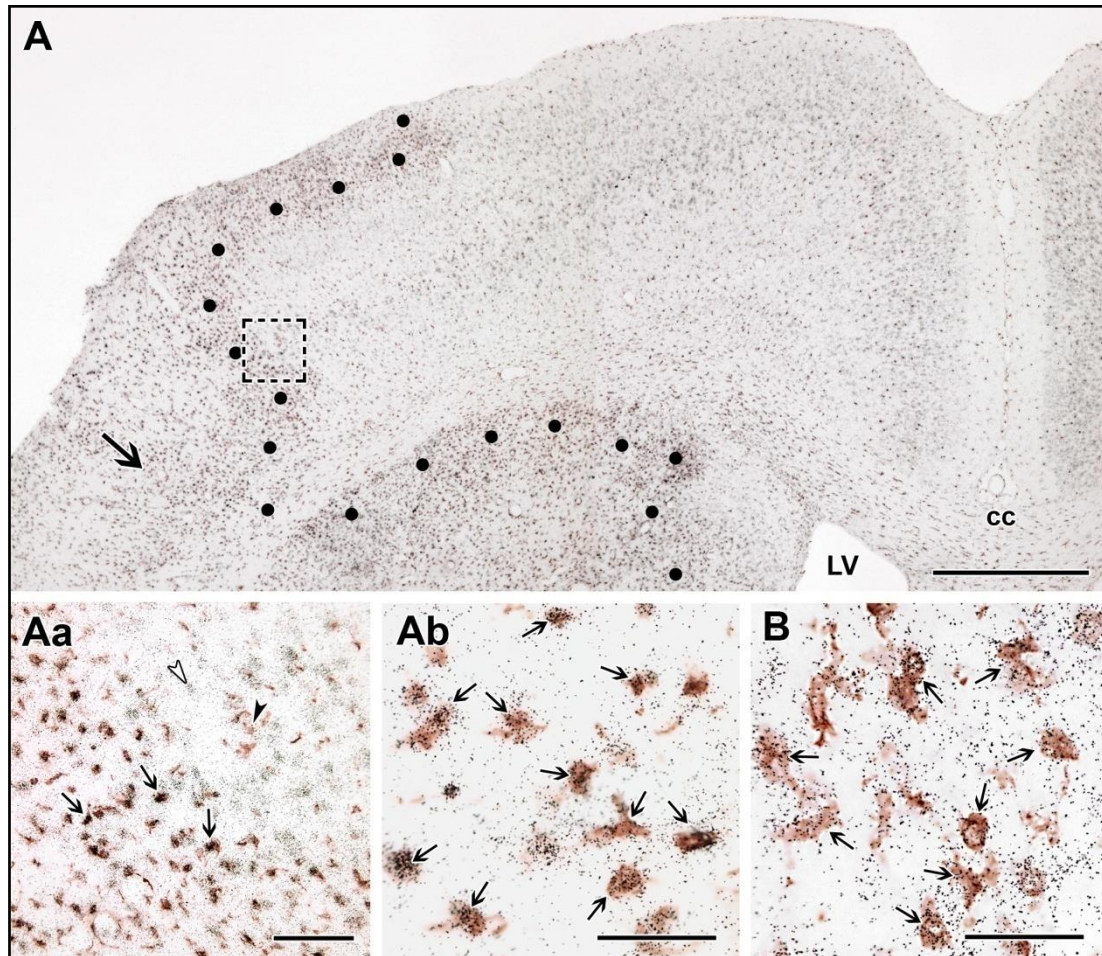
17. ábra TGF- β RI mRNA expresszió az ép agyszövetben neuronokhoz kapcsolható

A TGF- β RI túlnyomórészt neuronokban és nem gliasejtekben expresszálódik az ép agykéregben. **A:** TGF- β RI mRNA és NeuN immunreaktivitás dupla jelölése. Nagyszámú sejtben a fekete in situ hibridizációs jel kolokalizál a barna NeuN immunreaktivással. A fekete nyilak néhány duplán jelölődött sejtre mutat. A bekeretezett rész a jobb felső sarokban látható nagy nagyításban, mely megmutatja, hogy a felhalmozódó autoradiográfias szemcsék a barna NeuN immunpozitív sejttestek felett helyezkednek el. **B:** Az egyszeresen jelölt mRNA-t expresszáló sejteket fekete, az S-100 immunreaktív asztrocitákat fehér nyílhegyekkel jelöltük. **C:** TGF- β RI mRNA-t expresszáló neuronokat fekete, az Iba-1 immunpozitív mikrogliaikat fehér nyílhegyekkel jelöltük. Nincs dupla festés azon sejtekben, melyek az S-100 asztrocita és az Iba-1 mikroglia markerrel jelölődtek.

Méretarány = 200 μ m A, 50 μ m B és C, és 10 μ m az A ábrán beillesztett kép esetében.

Az Iba1 immunreaktív sejtek eloszlása a TGF- β RI-t és RII-t expresszáló sejtek eloszlásához hasonlatos. Továbbá, az Iba1 immunhisztokémia és a TGF- β RI és RII mRNA in situ hibridizációs hisztokémia kombinálásával kolokalizációt tapasztaltunk az ischémiás területen belül és a penumbrában (18. ábra). Szinte minden TGF- β RI (46-ból 41 0,16 mm² területen), és a TGF- β RII mRNA-t expresszáló sejtek többsége (34-ből

23) tartalmazott Iba1 és a legtöbb Iba1-t pozitív sejt a lézióban TGF- β RI és RII-t expresszált (2. táblázat).



18. ábra TGF- β RI és RII mikroglia sejtekben indukálódik

TGF- β RI és RII mRNS és a mikroglia marker Iba1 immunreaktivitás dupla festése 72 órával MCAO-t követően. **A:** Kis nagyítású képen látható a TGF- β RI és Iba1 duplán jelölt metszete. A lézionált terület határát fekete pöttyökkel jelöltük. A négyzet a nagy nagyítású Aa, és a nagy fekete nyíl az Ab kép pozícióját mutatja. **Aa:** Az egyszeresen jelölt TGF- β RI mRNS-t expresszáló neuront fehér, az Iba1 immunpozitív mikrogliaát fekete nyílhegyekkel jelöltük a lézió melletti ép kéregben. A penumbrában duplán jelölődő sejtek közül néhányat kis fekete nyíllal jelöltük. **Ab:** Nagy nagyítású képen mutatjuk, hogy a TGF- β RI mRNS-nek megfelelő fekete in situ hibridizációs jel a barna Iba1 immunreaktív sejttestek felett helyezkedik el a lézió belül. **B:** TGF- β RII szintén mikrogliaiban expresszálódik. TGF- β RII kolokalizál az Iba1 immunpozitív sejtekkel, mivel az mRNS-nek megfelelő fekete autoradiográfiai szemcsék a barnán jelölődő sejtek felett helyezkednek el. A duplán jelölődő sejteket fekete nyilakkal jelöltük.

Rövidítések: cc - corpus callosum, LV - ventriculus lateralis. Méretarány: 1 mm A, 100 μ m Aa és 50 μ m Ab és B képek esetében.

2. táblázat A TGF- β receptorok *in situ* hibridizációs hisztokémia és ezt követően a különböző sejttípusmarkerek immunhisztokémiával való dupla festése 72 órával MCAO után

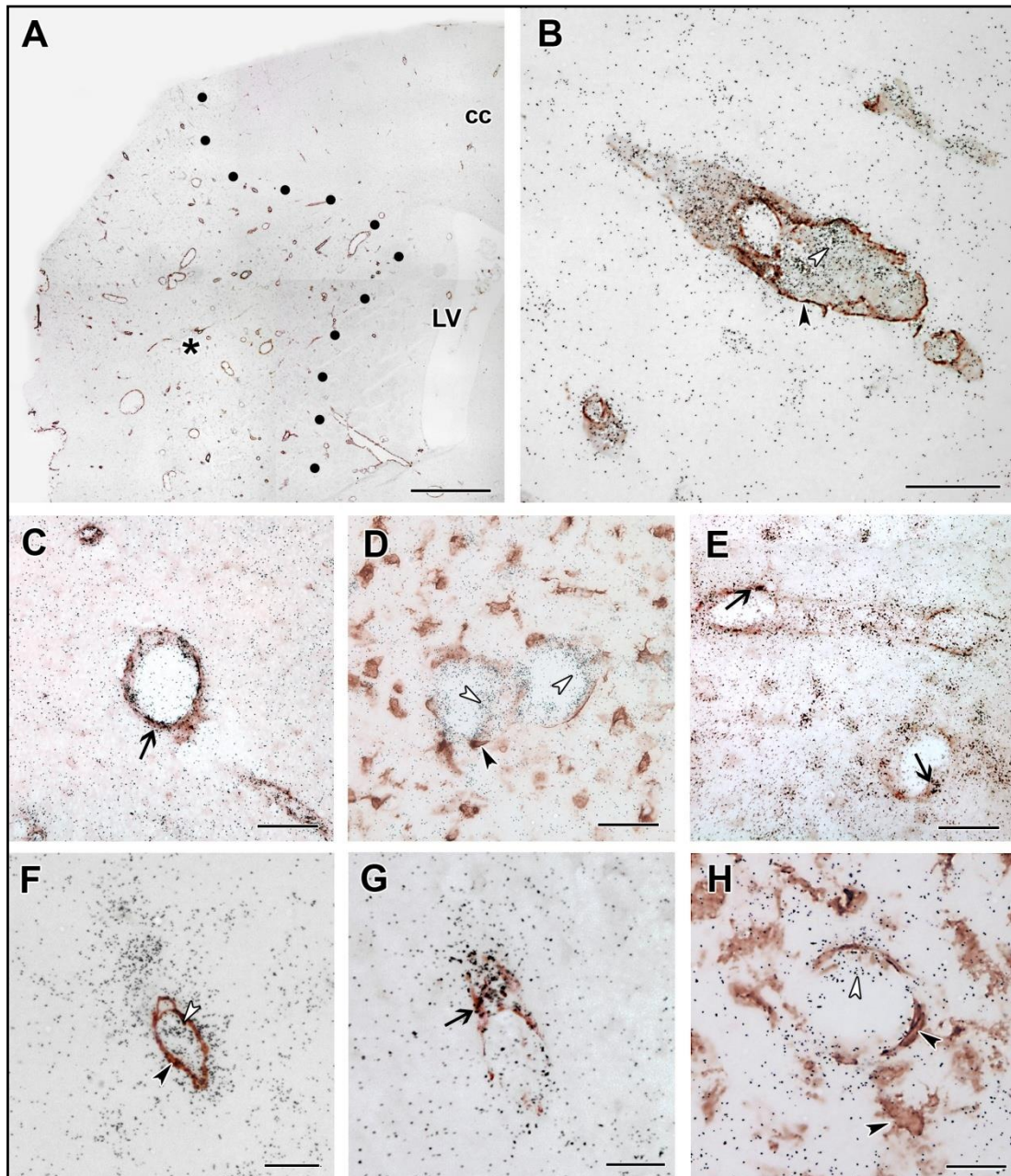
A sejttípusok azonosítására a következő markereket alkalmaztuk: NeuN a neuronokat, S-100 az asztrocitákat, Iba1 a mikroglialis sejteket és vWF az endothelt jelölte. A TGF- β receptor expresszáló sejtek és a duplán jelölődő sejtek számát 3 különböző területen néztük. Az adatokat 400 μm x 400 μm négyzet alakú területről gyűjtöttük 4 agy ép (léziótól távoli), penumbrális és lézionált agykérgéből.

	TGF- β RI			TGF- β RII		
	intakt	penumbra	lézió	intakt	penumbra	lézió
TGF- β -t exp. sejtek száma/0,16 mm ²	57,4 \pm 2,6	58,6 \pm 2,7	46,1 \pm 3,2	8,3 \pm 0,8	36,4 \pm 2,3	34,3 \pm 2,8
Duplán jelölődő sejtek száma/0,16 mm ²						
NeuN	50,5 \pm 1,9	17,5 \pm 2,5	2,0 \pm 0,8	2,8 \pm 0,5	2,5 \pm 1,0	0,5 \pm 0,3
S-100	4,3 \pm 0,5	2,5 \pm 0,3	0,8 \pm 0,5	4,8 \pm 0,5	3,5 \pm 0,6	0,8 \pm 0,3
Iba-11	2,5 \pm 0,3	40,3 \pm 1,7	41,3 \pm 4,5	1,0 \pm 0,4	26,5 \pm 1,2	23,0 \pm 0,9
vWF	0,5 \pm 0,3	1,5 \pm 0,5	1,5 \pm 0,5	1,3 \pm 0,6	5,3 \pm 0,9	12,5 \pm 1,3
	TGF- β RIII			Alk1		
	intakt	penumbra	lézió	intakt	penumbra	lézió
TGF- β -t exp. sejtek száma/0,16 mm ²	11,9 \pm 1,2	10,8 \pm 0,9	9,9 \pm 0,6	6,3 \pm 0,9	16,8 \pm 1,6	21,3 \pm 1,8
Duplán jelölődő sejtek száma/0,16 mm ²						
NeuN	5,5 \pm 1,2	1,0 \pm 0,4	0,3 \pm 0,3	3,0 \pm 0,4	1,5 \pm 0,3	0,0 \pm 0,0
S-100	1,5 \pm 0,6	0,5 \pm 0,3	0,3 \pm 0,3	0,5 \pm 0,3	0,5 \pm 0,3	0,0 \pm 0,0
Iba-11	0,3 \pm 0,3	0,8 \pm 0,5	0,8 \pm 0,5	0,5 \pm 0,3	1,5 \pm 0,3	1,5 \pm 0,3
vWF	6,8 \pm 1,5	9,5 \pm 0,5	8,3 \pm 0,6	3,3 \pm 1,0	16,0 \pm 1,5	20,8 \pm 1,5

5.4.3. TGF- β RIII-t és Alk1-et expresszáló sejtek típusa

A TGF- β RI és RII esetével ellentétben a TGF- β RIII-t és Alk1-et expresszáló sejtek eloszlása nem mutatott átfedést és nem is kolokalizált az Iba1 immunreaktivással (19/D ábra). Továbbá, az Iba1 pozitív mikroglia sejteken túl erek is festődtek az infarktált területen belül. Valójában vWF és α SMA immunfestés intenzitása erősebbnek mutatkozott a lézió területén belül mint az ép szövetben (19/A ábra). Mind az S-100 és NeuN immunreaktív sejtek hiányoztak az ischémiás mag területéről. Duplán festett metszetek nagy nagyítás melletti elemzése során megállapíthatjuk, hogy mind az Alk1 (19/C ábra), mind a TGF- β RIII (19/G ábra) expresszió vWF-ral jelölt endothel sejtekhez köthető, nem pedig simaizom sejtekhez vagy mikrogliahoz (19/B, D, F, H ábra). TGF- β RIII esetében, 10-ből 8 sejt, míg Alk1

esetében, 21-ből 21 sejt vWF immunpozitív volt 0,16 mm² területen az infarktált területen belül. Továbbá TGF- β RII szintén expresszálódott endotél sejtekben (19/E ábra), 34-ből 13 sejt esetében (2. táblázat). Ezzel ellentétben, a csak TGF- β RI-et expresszáló sejtek nagyon kis aránya volt jelen endotél sejtekben: 46-ból csupán 2 sejt volt duplán jelölt vWF-ral (2. táblázat).



19. ábra TGF- β RIII és ALK1 endothel sejtekben indukálódik a lézió belül

TGF- β RIII és ALK1 mRNS-ének mikroglialis (Iba1), endoteliális (vWF) és erek simaizomsejtjének (α SMA) markerével való dupla jelölése 72 órával MCAO után. **A:** ALK1 mRNS és α SMA immunreaktivitás dupla festése kis nagyítású ábrán. A léziót csillaggal (*)

jelöltük. A lézió határát fekete pöttyökkel mutatjuk. **B:** Nagy nagyítású képen az ALK1 mRNS és α SMA immunreaktivitás együttes festése látható kolokalizáció nélkül. Az ALK1 mRNS-t expresszáló sejteket fehér, az α SMA immunpozitív simaizomsejtet fekete nyílhegygel jelöltük. **C:** ALK1 mRNS és vWF-immunreaktív endothelsejt dupla jelölése. A nyíl példaként mutatja a duplán jelölődött sejtet. **D:** A fehér nyílhegyekkel indikált ALK1 mRNS expresszió nem kolokalizál a fekete nyílhegygel jelölt Iba1 immunreaktivással. **E:** TGF- β RII mRNS jelen van vWF immunreaktív endothel sejtekben és nem endothel sejtekben is megjelenik. Fekete nyíllal mutatjuk a duplán jelölt sejtet. Az utolsó 3 kép mutatja, hogy a TGF- β RIII endothel sejtekben expresszálódik 72 órával MCAO után. **F:** TGF- β RIII és α SMA együttes festése, mely kolokalizációt nem mutat. TGF- β RIII mRNS-t expresszáló sejtet fehér az α SMA-t expresszáló simaizomsejtet fekete nyílhegygel jelöltük. **G:** TGF- β RIII mRNS-t expresszáló sejtek vWF immunreaktivitást tartalmaznak. A duplán jelölt sejtet fekete nyíllal mutatjuk. **H:** TGF- β RIII nincs jelen mikrogliaiban. A fehér nyílhegygel a TGF- β RIII mRNS-t expresszáló sejtet, míg feketével Iba1 immunreaktív mikrogliaát jelöltük.

Rövidítések: cc - corpus callosum, LV - ventriculus lateralis. Méretarány: 1 mm A, 50 μ m B, C, D és E, 20 μ m F, G és H képek esetében.

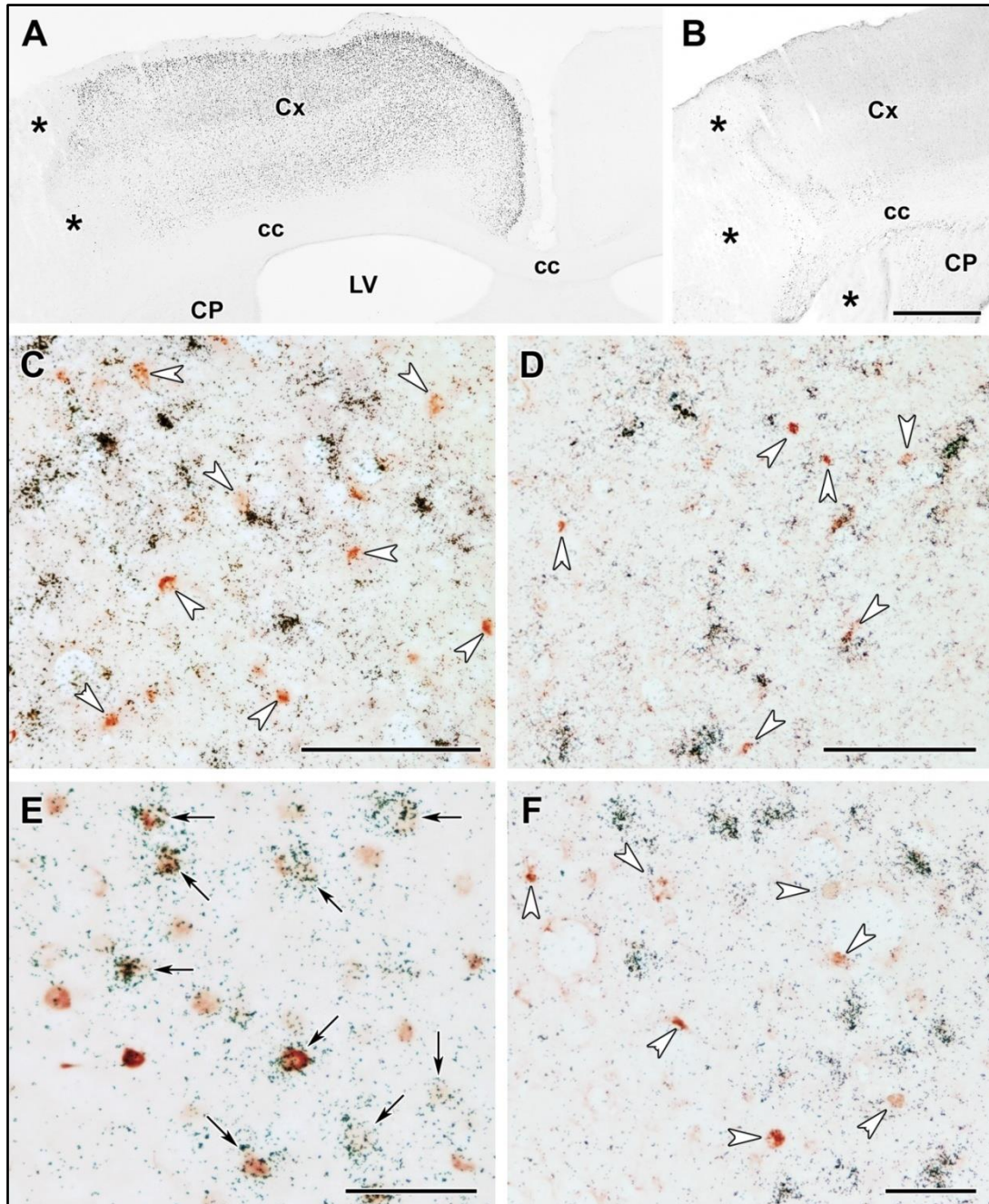
5.5. TGF- β -kat expresszáló sejtek Fos és ATF-3 indukciója tranziens MCAO-t követően

24 órával MCAO után Fos-t expresszáló sejtek jelentek meg a lézióval azonos oldalon végig az agykéregben, és a Fos immunreaktív sejtek viszonylagosan rendezett mintázatot mutattak. A legintenzívebb expresszió a II. rétegben észlelhető, míg a kéreg I., IV. és VI. rétegében kevesebb Fos immunreaktív sejt található (20/A ábra, 3. táblázat). A lézióval ellentétes oldalon egyáltalán nem jelenik meg Fos immunreaktivitás (20/A ábra).

3. táblázat TGF- β 1 és - β 2 dupla festése Fos és ATF-3 immunmarkerekkel

TGF- β 1 esetében az adatok 3 területről származnak, a kéreg II. és V. rétegéből és a striatumból. Mivel a TGF- β 2 a striatumban nem expresszálódik ezért a sejteket csak a kéregben számoltuk. A TGF- β -t expresszáló sejtek számát a lézió széle mellett számoltuk 200x400 μ m területen. Ugyanebben a látótérben a duplán jelölődő sejteket is megszámláltuk, és a számolt arányokat átlagoltuk. Egyutas (One-way) ANOVA analízis során szignifikáns különbséget a régiók között egyik marker esetében sem találtunk.

	TGF- β 1			TGF- β 2	
	II. réteg	V. réteg	Striatum	II. réteg	V. réteg
TGF- β -t exp. sejtek száma/ 0,08 mm ²	18,3 \pm 4,9	16,3 \pm 3,5	20,5 \pm 4,2	18,3 \pm 4,2	17,0 \pm 3,9
Immunpozitív sejtek a TGF- β -t expresszáló sejtek %-ban					
Fos	4,1 \pm 2,2	4,7 \pm 3,3	5,2 \pm 2,7	90,2 \pm 3,8	91,9 \pm 4,6
ATF-3	8,4 \pm 1,9	7,1 \pm 2,6	8,5 \pm 4,1	2,8 \pm 1,9	4,3 \pm 2,9



20. ábra A TGF- β -t expresszáló sejtek Fos és ATF-3 tartalma 24 órával MCAO után

A: Fos immunreaktív sejtek jelentek meg a lézióval azonos oldali kéregben, ellentétes oldalon viszont nem. A Fos immunreaktivitás denzitása a II., III. és V. rétegben a legmagasabb. A léziónt területet csillaggal (*) jelöltük. **B:** ATF-3 immunreaktivitás a léziót körülvevő sejtekben jelent meg. **C:** TGF- β 1 mRNS-ek (fekete autoradiográfiás szemcsék) nem kolokalizálnak a Fos immunpozitív (barnán jelölődő) fehér nyílhegygel jelölt kéregben lévő sejtekkel. **D:** TGF- β 1 mRNS-t (fekete szemcsék) expresszáló sejtek nem kolokalizálnak az ATF-3 immunpozitív (barnán jelölődő) fehér nyílhegygel jelölt sejtekkel. **E:** TGF- β 2 kolokalizál a Fos immunpozitív sejtekkel, mivel az mRNS-nek megfelelő fekete autoradiográfiás szemcsék a barnán jelölődő sejtek felett helyezkednek el. A duplán jelölődő sejteket fekete nyilakkal jelöltük. Megfigyelhető még néhány Fos immunreaktív TGF- β 2-t nem

expresszáló sejt is. **F**: TGF- β 2 nem kolokalizál az ATF-3 immunpozitív (barnán jelölődő) fehér nyílhegygel jelölt sejtekkel.

Rövidítések: cc: corpus callosum, CP: caudate putamen/striatum, Cx: cortex/agykéreg, LV: ventriculus lateralis. Méretarány = 1 mm a B, 100 μ m a C és a D, 50 μ m az E és az F esetében.

Fos-szal ellentétben az ATF-3-mal intenzíven jelölődő sejtek csak a lézió körül jelentek meg egy viszonylag szűk sávban (20/B ábra). Dupla festést követően sem Fos sem ATF-3 immunreaktivitást nem észleltünk a TGF- β 1 mRNS-t expresszáló sejtekben (20/C,D ábra). Ezzel ellentétben szinte minden vizsgált TGF- β 2-t expresszáló neuron tartalmazott Fos immunreaktivitást (3. táblázat), míg a többi Fos pozitív sejt nem expresszált TGF- β 2 mRNS-t (20/E ábra). Az ATF-3 immunreaktivitást mutató sejteket tartalmazó terület kis mértékben átfedett a TGF- β 2 mRNS-t expresszáló sejtek területével. Ezekben a régiókban, az ATF-3 immunreaktivitás nem kolokalizált a TGF- β 2 mRNS-sel (20/F ábra).

6. Megbeszélés

Eredményeink igazolják, hogy a TGF- β receptorok mRNS expressziója indukálódik patkányagyban fokális ischémiát követően és eltérő időbeli, illetve eloszlási mintázattal rendelkeznek. A TGF- β fehérjéket és receptoraikat különböző sejtek expresszálják. Kapott eredményeinket összehasonlítottuk a korábban publikált MCAO utáni expressziós adatokkal, és bővítettük az indukciós mechanizmusukban részt vevő folyamatokról szóló ismeretanyagot. Végül, adataink elemzésével a TGF- β rendszer potenciális funkcióit vizsgáltuk agyi ischémiában.

6.1. A különböző TGF- β altípusok expressziója fokális ischémiát követően patkányagyban

A TGF- β 1 a lézió széli részén jelent meg 24 órával MCAO után, melyet későbbi időpontokban a lézió területén belüli expresszió követett (Pal és mtsai. 2012, Vincze 2015). Demonstráltuk, hogy a lézió széli részére lokalizálódó TGF- β 1 indukció a Hsp70-nel megjelenített penumbrához kötődik. MCAO-t követően a TGF- β 1 mikrogliaiban történő expresszióját már korábban publikálták, TGF- β 1 in situ hibridizációjának és OX42 immunhisztokémiai festésének kombinációjával (Lehrmann és mtsai. 1998). Mi az Iba1 antitestet használtunk, mely nyugvó és aktivált mikrogliaának egyaránt markere (Imai és Kohsaka 2002), hogy demonstráljuk a TGF- β 1 expresszióját mikrogliaiban. Korábban a TGF- β 1 asztrocitákban való teljes hiányát írták le (Lehrmann és mtsai. 1998), mi azonban megfigyeltünk TGF- β 1 expressziót néhány GFAP pozitív sejtben is, megerősítve a tranziens ischémiát követő TGF- β 1 asztrocitákban történő indukcióját leíró tanulmányokat (Knuckey és mtsai. 1996). Neuronális NeuN markert alkalmazva demonstráltuk, hogy a TGF- β 1 nem neuronokban expresszálódik. Ezzel megállapítottuk, hogy a TGF- β 1 indukció gliális sejtekre korlátozódik. A sejtek azon kis aránya, mely kolokalizációt sugall, annak eredménye lehet, hogy az egyszeresen jelölt sejtek a szövetben különböző síkokban egymás felett helyezkednek el. A TGF- β 2 és - β 3 indukciója a lézióval azonos oldali kéregben a penumbrához és ezen kívüli intakt kéreghez köthető 24 órával MCAO-t követően, későbbi időpontokban sem jelennek meg a lézió területén belül (Pal és mtsai. 2012, Vincze 2015). Egyik fő különbség a TGF- β 1 és - β 2 indukciója között, hogy az utóbbi

kizárólag csak neuronokban expresszáldott az azonos oldali kéreg II., III. és V. rétegében. Eredményeink jelentősen bővítették a TGF- β -kat expresszálo sejtekről való ismereteinket MCAO-t követően.

6.2. A különböző TGF- β receptor típusok expressziója fokális ischémiát követően patkányagyban

24 órával MCAO után bár jelentős méretű lézió alakult ki, a TGF- β receptorok szintjében nem következett be szignifikáns változás. A lézió belüli jel hiányának oka feltételezhetően az, hogy a pusztuló neuronok nem expresszálnak TGF- β receptorokat és a TGF- β jelátvitel a penumbrában sem változik. Az ép szövetben a TGF- β RI szintje volt a legmagasabb, és ez volt az egyetlen receptor, mely rétegek szintjén organizált. Az agykéreg IV. rétegében fejeződött ki erőteljesen, és itt az expresszió neuronális. Ezt a TGF- β RI eloszlási mintázatot korábban még nem írták le. A többi fennmaradó TGF- β RI-t expresszálo sejt S-100-al festődő asztrocita. A TGF- β RII asztrocitában való jelenléte megfelel a korábban leírtaknak (Galter és mtsai. 1999), így feltételezhetően ez a két receptor kolokalizál. Ezzel ellentétben mind a TGF- β RIII és az Alk1 kisebb részt neuronokhoz, de főleg endothelhez köthető. A TGF- β RIII esetében a neuronális expressziót korábban már jelezték (MacConell és mtsai. 2002), míg az Alk1 megjelenését mind neuronokhoz mind endothelhez kötötték (Oh és mtsai. 2000, Seki és mtsai. 2003, König és mtsai. 2005).

72 órával és 1 hónappal MCAO-t követően mind a négy TGF- β receptor szignifikánsan indukálódott. A térbeli és időbeli megoszlás meglehetősen hasonló volt a TGF- β RI és RII esetében, ami koexpressziójukat feltételezi, és szükséges, mivel funkcionálisan heteromer receptorok (Huang és Chen 2012). Mindkét receptor jelentősen indukálódott a lézió körül és a lézió belül, de az ép szövetben nem, és az ellenoldalon sem. A lézió körüli terület megfelel az átmeneti zónának, a penumbrának, mely a neuroprotektív kezelések fő célterülete (Ramos-Cabrera és mtsai. 2011). Ezen eredmények összhangban vannak a korábban leírtakkal, melyek szerint RT-PCR-ral azonosított TGF- β RII mRNS szintje jelentősen megemelkedik az infarktált területen belül 3 nappal permanens MCAO után egérben (Vivien és mtsai. 1998). Ugyanakkor eredményeink ellentétesek a TGF- β RI esetében leírtakkal, mely szerint nem volt

detektálható változás TGF- β RI mRNS szintjében (Vivien és mtsai. 1998). Véleményünk szerint azonban az ép szövetben található magas alap TGF- β RI mRNS maszkírozta a RT-PCR adatokat. Eredményeink megegyeznek az előző immunhisztokémiai vizsgálatok eredményeivel, mely szerint a TGF- β RI és RII neuronokban, gliasejtekben és endothelben indukálódik mind a lézióval azonos oldali, mind az ellenoldali agyféltekében MCAO után (Ata és mtsai. 1999). Habár különböző expressziós mintázatot mutat a mRNS és a fehérje indukció, úgy gondoljuk hogy a knock-out állatok nélkül tesztelt antitestek specificitása kevésbé megbízható, mint két nem átfedő próba által kapott in situ hibridizációs hisztokémia eredménye.

Az emelkedett TGF- β RI és RII szintet mutató sejtek túlnyomó része dupla jelölések alapján mikroglíanak bizonyult, mivel a stabil, megbízható markerként használt antitest mind a nyugvó, mind az aktivált mikroglíát festi (Imai és Kohsaka 2002). Ezen eredmények a korábbi vizsgálatokkal összhangban vannak, melyek szerint egyetlen hipoxiás esemény által kiváltott globális ischémia együtt jár a TGF- β RI és RII mRNS és fehérje szintjének emelkedésével, melyet RT-PCR-rel és Western blot-tal mértek ki (Li és mtsai. 2008). Továbbá, immunhisztokémiával kimutatták, hogy a TGF- β RI és RII expresszió mikroglában történik (*Lycopersicon esculentum* lectinjével azonosították, mely mind a mikroglíát, mind az erek endothel sejtjeit jelöli) és mikroglia sejt kultúrában, ahol szintén megemelkedett a TGF- β RI és RII expressziós szintjük (Li és mtsai. 2008). A jelen tanulmányban in situ hibridizációs hisztokémiával leírtuk, hogy a fokális ischémia szintén a TGF- β RI és RII mikroglialis indukciójához vezet, az expressziós szint magasabb a penumbrában, mint a lézió területén belül 72 órával MCAO után és a TGF- β RI és RII mikroglialis expressziója tovább emelkedik az infarktált területen belül 1 hónappal MCAO-t követően.

TGF- β RIII mRNS szintje sokkal kisebb változást mutatott a penumbrában és a lézió területén belül 72 órával MCAO után, mint a TGF- β RI és RII szintje. Továbbá, az emelkedett expressziós szintet mutató sejtek ebben az időpontban főként endotél sejtek, ezt korábban még nem írták le. Mivel az endotélben minimális mennyiségű TGF- β RI-et találtunk, lehetséges, hogy a TGF- β RIII a TGF- β szupercsalád más ligandjainak jelátvitelében vehet részt, mint például csont morfogénikus fehérjék (BMP-k) (Lux és mtsai. 1999, Lee és mtsai. 2009, Townsend és mtsai. 2012). A TGF- β RIII hiánya

mikroglában 72 órával MCAO után feltételezi, hogy a TGF- β RI és RII a TGF- β jelet a TGF- β RIII közreműködése nélkül továbbítja ebben az időpontban. Korábbi adatok alapján TGF- β RI és RII TGF- β RIII hiányában is funkcionális receptort alkothat (Deng és mtsai. 1999) kivéve, hogy a TGF- β 2 felismerés hiányzik (Bilandzic és Stenvers 2012). A TGF- β RIII megjelenik nem endotél sejtekben is egy hónappal az MCAO után, így valószínű, hogy ebben az időpontban a TGF- β RI és RII az összes TGF- β altípust felismeri.

Alk1 expresszió szignifikáns emelkedést mutatott 72 órával MCAO után a penumbrában és a lézió területén belül, azonban a TGF- β RIII-ral ellentétben nem emelkedik tovább 1 hónappal MCAO-t követően. Ezen új eredmények megfelelnek a korábban leírt adatoknak, melyek alapján az Alk1 indukálódik sebgyógyulást követően meglévő tápláló artériák és újonnan képződő erek mentén (Seki és mtsai. 2003) és erőteljesen kifejeződik endotél sejtekben sértést követően (Garrido-Martin és mtsai. 2013). Eredményeink bizonyították, hogy az emelkedett Alk1 expresszió endotél sejtekhez köthető és megmutattuk, hogy a TGF- β RII szintén indukálódik endothelben. Bár mi nem találtunk emelkedett Alk1 mRNS szintet neuronokban, mely különbözik az eddigi immunhisztokémiai eredményektől (Konig és mtsai. 2005); ezért lehetséges, hogy a fehérje szintjének emelkedése nem tükröződik az mRNS szinten. I-es típusú receptorként, az Alk1 jelátviteléhez szükséges II-es típusú receptor. Láthatóan a TGF- β RII is megemelkedik az erek mentén, így lehetővé téve a TGF- β felismerését (Lux és mtsai. 1999, Huang és Chen 2012). Továbbá, Alk1 megköthet más típusú II-es receptorokat, hogy a TGF- β -kon kívül más ligandokat is felismerhessen, például a BMP-9 és -10-et (Hawinkels és mtsai. 2013). Egy további érdekesség, hogy az Alk1 és a TGF- β RIII mRNS eloszlása nagyon hasonló, kapcsolatot feltételezve a két receptor között. Összességében a jelen tanulmány jelentősen növeli a TGF- β receptorok MCAO utáni indukciójáról való ismeretanyagot, mivel elsőként írja le a négy TGF- β receptor expresszióját fokális ischémiát követően különböző időpontokban.

6.3. A TGF- β rendszer indukciójának lehetséges mechanizmusai

A TGF- β receptorok indukciójának térbeli és időbeli mintázata hasonló volt a kéregben és a striatumban, ellentétben a TGF- β fehérjékkel (Pal és mtsai. 2012), ezért

feltételezhetően TGF- β receptorok indukciója nem függ az azt körülvevő agyszövet struktúrájától. Mivel a TGF- β receptorok expressziós szintje nem különbözött permanens MCAO és 1 óras elzárást követő reperfúzió után, így valószínűsíthető, hogy maga az ischémiás inzultus és nem a reperfúziós károsodás felelős a TGF- β receptorok indukciójáért. Továbbá a TGF- β 1 expresszió és a Hsp-70-nel megjelenített penumbra határának precíz átfedése azt feltételezi, hogy az ischémia vezet a TGF- β 1 indukciójához.

A mikroglialis aktiváció néhány perccel az ischémia után kezdődik, így megelőzi a morfológiailag detektálható neuronális károsodást, továbbá magába foglal egy átmeneti generalizált választ 24 órán belül ischémiát követően (Gehrmann és mtsai. 1995). Az aktivált mikroglia olyan proinflammatorikus citokinek termelődéséért felelős, mint interleukin-1, interleukin-6 és TNF- α (Lai és Todd 2006), melyek közül például a TNF- α indukálja a TGF- β 1 expressziót (Chao és mtsai. 1995). A TGF- β 1 expresszió indukálódik mikrogliaiban és asztrocitákban MCAO-t követően egerekben (Doyle és mtsai. 2010). Az Iba1 emelkedett expressziót mutat tranziens fokális ischémia után mikrogliaiban és az infarktált területre infiltrálódó makrofágokban egyaránt (Ito és mtsai. 2001), korai időpontokban a mikroglia aktiváció jelentősebb a makrofágok kilépésénél (Weinstein és mtsai. 2010). Továbbá a receptorok esetében az expressziós szint szignifikánsan magasabb a penumbrában, mint a lézió belül 72 óránál, eredményeink szerint az emelkedett TGF- β RI és RII expresszió az infarktus területére bevándorló aktivált mikrogliaikhoz köthető. Habár, a vérből az infarktált területre bevándorló makrofágok hozzájárulása az emelkedett TGF- β RI és RII expressziós szinthez nem elhanyagolható, mégis valószínű, hogy az emelkedett TGF- β RI és RII expresszió túlnyomórészt a mikroglialis aktiváció következménye. Citokinek, ideértve magukat a TGF- β -kat is, közreműködnek a TGF- β receptorok szintjének indukciójában, TGF- β -k szabadulnak fel hipoxiára adott válasz következményeként (Morgan és mtsai. 2000, Li és mtsai. 2008), mely indukálja a TGF- β RI és RII-t (Bloom és mtsai. 1996, Morgan és mtsai. 2000). Érdekes, hogy a TGF- β RIII expresszió TGF- β 1 által néhány rákos sejtben (Hempel és mtsai. 2008) és hereszövet sejtjeiben (Farnworth és mtsai. 2007) negatívan szabályozott. Ez egy olyan lehetséges mechanizmus, mely magyarázhatja, hogy miért nem expresszálódik TGF- β RIII 72 óránál mikroglia sejtekben. TGF- β RI-ral és RII-ral ellentétben, TGF- β kezelés nem

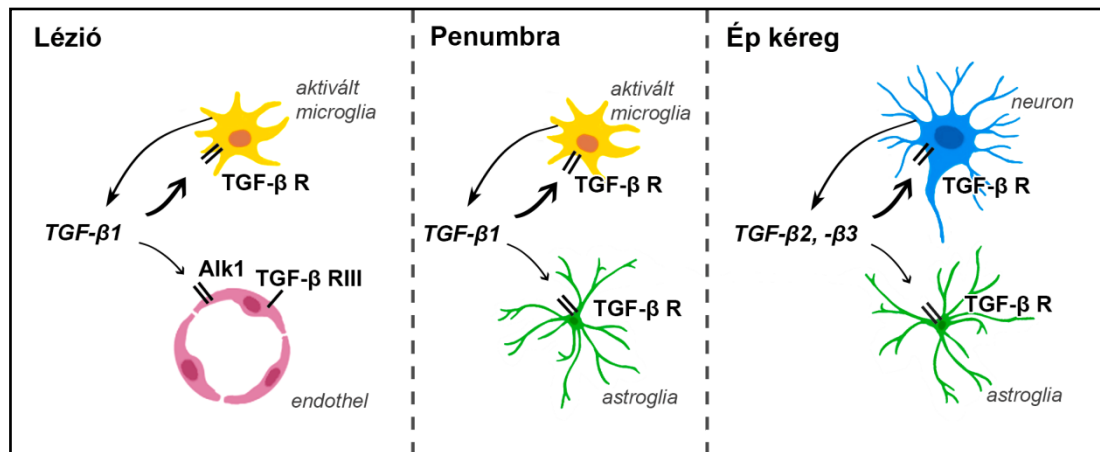
emeli meg az Alk1 expressziós szintjét (Konig és mtsai. 2005). Mindazonáltal, az Alk1 szintje megemelkedik olyan szolubilis citokinek hatására, mint például a sérülés után felszabaduló interleukin 6 (Garrido-Martin és mtsai. 2013).

Az indukciós mechanizmus megismerése céljából duplán festettük a TGF- β 1 és - β 2 mRNS-t az azonnali korai gének közül az ATF-3-mal és a Fos-szal. ATF-3 aktivációt sejtmagokban axonális károsodás indukálja (Tsujino és mtsai. 2000). Az MCAO nagyon gyors ATF-3 indukciót eredményezett a lézionált területen belül, és ezt követte az ATF-3 periinfarktusos területen való megjelenése (Ohba és mtsai. 2003), ahol neuronokkal és nem gliális sejtekkel kolokalizált (Song és mtsai. 2011). A TGF- β -k és ATF-3 kolokalizációjának hiánya feltételezi, hogy a TGF- β -k indukciójában az axonális károsodás nem játszik fő szerepet. Ezzel ellentétben, a TGF- β 2-t expresszáló sejtek eloszlása MCAO-t követően hasonló, mint a c-fos aktivációs mintázat (Uemura és mtsai. 1991, Kinouchi és mtsai. 1994), ezen neuronok korábbi aktivációját feltételezve (Morgan és Curran 1991, Hoffman és mtsai. 1993). Továbbá, a TGF- β 2-t expresszáló sejtek mindegyike tartalmazott Fos immunreaktivitást. A Fos expressziót a kérgi terjedő depolarizáció okozhatja MCAO-t követően (Kiessling és Gass 1994), ezért valószínű, hogy a TGF- β 2 és - β 3 indukciója kérgi terjedő depolarizációs mechanizmussal történik, feltételezhetően c-fos aktiváció útján. A kéreg II. és V. rétegében az ép szövetben lévő néhány neuron TGF- β 2 expresszál. Valószínűsíthető, hogy a kérgi terjedő depolarizációs mechanizmus megemeli a TGF- β 2 expressziós szintjét ezekben a neuronokban. További neuronok bevonása szintén feltételezhető, mivel TGF- β 2-t és - β 3-t expresszáló neuronok megjelennek a kéreg II. és III. rétegében (Pal és mtsai. 2012).

6.4. A TGF- β rendszer fokális ischémiát követő indukciójának lehetséges funkciói

MCAO-t követően 24 órával mindhárom TGF- β altípus indukálódik a penumbrában. Míg a TGF- β 1 a lézió széli részén indukálódik, addig a TGF- β 2 és - β 3 bizonyos kérgi rétegekben expresszálódik (II., IV., V. réteg), nem csak a penumbrában, hanem permanens esetben az azonos oldali kéreg léziótól távolabbi ép területén is (Pal és mtsai. 2012, Vincze 2015). Így a TGF- β -k aktivációja megelőzi a TGF- β receptorok aktivációját. 72 óránál és egy hónapnál MCAO után, a TGF- β 1 eloszlás nagyon hasonló

a receptorok eloszlásához (Pal és mtsai. 2014). TGF- β 1 a penumbrában és a lézió belül expresszálódik mikrogliaiban és kisebb mértékben asztrogliális sejtekben. Egy hónappal MCAO után TGF- β 2 szintén megjelenik az infarktált területen. TGF- β 1 gliális sejtekből származó ligandum, mely aktiválja a TGF- β receptorokat az infarktált területen belül (21. ábra).



21. ábra TGF- β jelátvitel sematikus ábrája 72 órával MCAO után

Az infarktált területen belül a TGF- β 1 mikroglia sejtekből szabadul fel, mikroglialis és endothel sejteken hat a TGF- β RI, RII, RIII és Alk1 receptorokon keresztül. A penumbrában a TGF- β 1 asztrocitákból és mikrogliaiból szabadul fel és ezen gliális sejteken hat TGF- β R-on keresztül. Mindeközben az ép agyszövetben a léziótól távolabb TGF- β 2 és - β 3 szabadul fel neuronokból és az itt lévő neuronokon és asztrocitákon hat a TGF- β R-on keresztül.

Ezzel ellentétben egy hónappal MCAO után TGF- β 2 is hozzájárulhat az aktivációhoz. TGF- β 1 72 órával MCAO után olyan mikroglia sejteken hathat, melyek csak TGF- β RI-et és RII-t tartalmaznak, míg egy hónappal a TGF- β RIII is részt vehet a jelátvitelben. Figyelemre méltó, hogy a TGF- β RIII szükséges a TGF- β 2 aktivációjához (Townsend és mtsai. 2012), míg a TGF- β 1 esetében nem (Deng és mtsai. 1999, Weiss és Attisano 2013), mely megfelel a TGF- β 2 és a TGF- β RIII együttes megjelenésének. A felszabadult TGF- β -k közvetlenül befolyásolni tudják az endothel sejteket az Alk1 receptoron keresztül (21. ábra). Eközben a TGF- β 2 és - β 3 a lézióval azonos oldali ép kéreg neuronjaiban indukálódik, feltételezhetően terjedő depolarizáció által, és az általunk itt talált TGF- β receptorokon hathat (21. ábra). Még ha ezen receptorok nem is indukálódnak MCAO után, képesek az indukált TGF- β -k általi jel továbbítására.

TGF- β -k neuroprotektív funkcióval rendelkeznek hipoxiás események során, melyet különböző kísérletes modellben demonstráltak (Klempt és mtsai. 1992, Gross és

mtsai. 1994, Ruocco és mtsai. 1999, Guan és mtsai. 2004). A TGF- β -k eltérő térbeli és időbeli eloszlása alátámasztja, hogy különböző funkciókban vesznek részt fokális ischémia után. Ezen folyamatok közül néhány a mikrogliaán található TGF- β receptorokon keresztül valósul meg. A TGF- β kifejezetten erősíti a mikroglia IL-4 indukálta alternatív aktivációját, mely TGF- β RI gátlását követően károsodott (Zhou és mtsai. 2012). Ez az alternatív aktiváció hozzájárul a szöveti helyreállításhoz és az extracelluláris mátrix újjáépítéséhez (Gordon 2003). Ezzel egy időben TGF- β blokkolja a mikroglia Th1 citokin indukálta klasszikus aktivációját (Tsunawaki és mtsai. 1988, Gehrman és mtsai. 1995). A klasszikusan aktivált mikroglia blokkolása negatív auto-feedback gátlást okoz a mikroglia azon funkciójában, mely az elhalt szövettörmelék eltávolításáért felelős, de ezenfelül hozzájárul a neuronok károsodásához a reaktív oxigénradikálok és gyulladáscsökkentő citokinek felszabadításával (Marin-Teva és mtsai. 2011). TGF- β -k nemcsak a mikroglia deaktiválására képesek (Tsunawaki és mtsai. 1988), de szelektív apoptózist is elősegítik, így csökkentik a gyulladás okozta neurotoxicitást (Xiao és mtsai. 1997, Jones és mtsai. 1998).

TGF- β -k endotél sejteken való hatása más folyamatokban is részt vehet ischémiát követően, mint például neoangiogenezisben (Gault és mtsai. 2004, Wick és mtsai. 2006). Az Alk1 receptor érintettségét már leírták *in vitro* és *in vivo* az angiogenezis neutralizáló antitestek által gátolva (Hawinkels és mtsai. 2013). A hatás független a vasculáris endoteliális növekedési faktor (VEGF) jelátviteltől (van Meeteren és mtsai. 2012). Továbbá az Alk1 emelkedett expressziója endotél sejtenyészeten fokozza a TGF- β /Alk1 jelátviteli útvonalat és olyan endoteliális sejtfunkciókat, mint a tubulogenezis és a migráció (Albinana és mtsai. 2011). Az Alk1 receptor ezen funkcióira alapozva lehetséges, hogy mediálja a TGF- β -k angiogenezist serkentő hatását MCAO-t követően.

Gliális sejteken lévő TGF- β receptorok részt vesznek a gliális hegszövet kialakulásának szabályozásában (Dobolyi és mtsai. 2012). TGF- β antagonistának az agy sérült területére történő lokális injektálását követően a gliális hegszövet csökken (Lagord és mtsai. 2002). Megszűnik továbbá a fibrinogén indukálta hatás a gliális hegszövet esetében (Schachtrup és mtsai. 2010). Hasonlóan hat az asztrociták

proliferációjára, migrációjára és aktivációjára (Bottner és mtsai. 2000) és az extracelluláris mátrixra (Yin és mtsai. 2009).

A TGF- β -k neuroprotektív funkciói közé tartoznak a direkt neuronális hatásai is (Dhandapani és Brann 2003). Ezen folyamatok között különböző neurotrop faktorok közvetítenek, melyeket a TGF- β -k modulálnak (Krieglstein és mtsai. 2002). A legtöbb folyamat vizsgálata során nem tettek különbséget a különböző TGF- β altípusok között. Eredményeink elkülönült funkciót feltételeznek a TGF- β altípusoknál. TGF- β 2 és a Fos együttes expressziója az agykéregben részt vehet a neuronális apoptózis szabályozásában, mivel ismert, hogy a kérgi neuronok MCAO-t követően programozott sejthalált mutatnak (Chopp és Li 1996, Namura és mtsai. 1998, Guegan és Sola 2000, Sharp és mtsai. 2000), és a Fos expresszió a programozott sejthalálban döntő szerepet játszik. E folyamatban a Fos gátlása neuroprotektívnek mutatkozott MCAO-t követően (Rau és mtsai. 2003). Mivel TGF- β 2 és - β 3 gátolja a hipoxia indukálta neuronális apoptózist (Prehn és mtsai. 1993, Flanders és mtsai. 1998), lehetséges, hogy az azonos oldali kéregben indukálódott TGF- β 2 és - β 3 az apoptózis gátlásával neuroprotektív funkciót gyakorol. Neuronális túléléshez hozzásegít, hogy a TGF- β -k érintettek lehetnek a neuronális újjáépítő folyamatokban, melyek a stroke utáni beavatkozások céljából intenzíven kutatott terület (Barone 2010). Az ischémiás léziót követően, az idegi funkciók visszaállításához szükséges új idegi növekedési és szinaptikus formációk létrejötte, mely folyamatokat a TGF- β -k szintén befolyásolják (Unsicker és mtsai. 1996, Pratt és McPherson 1997, Unsicker és Krieglstein 2002). Az ischémia indukálta idegi őssejtek osztódása és differenciálódása magába foglalja a TGF- β útvonalat is (Sun és mtsai. 2010). A TGF- β -k növelték a neuronális markerek expresszióját kérgi primer sejt kultúrákban (Vogel és mtsai. 2010), felnőtt neurogenesis során tapasztaltakhoz hasonlóan (Mathieu és mtsai. 2010). Ezen direkt neuronális hatások TGF- β receptorok segítségével fejeződhetnek ki a penumbra és az ép agyszövet neuronjaiban. Míg a legtöbb hatás TGF- β RI mediált, a neuronális Alk1 feltételezhetően szintén részt vesz a neuroprotekciónban (Konig és mtsai. 2005).

7. Következtetések

A TGF- β fehérjék és receptoraik indukciójának eltérő térbeli és időbeli eloszlása különböző élettani folyamatokban való részvételt valószínűsít. Kutatásaink jelentősen bővítették a TGF- β -k és receptoraik fokális ischémiát követő megjelenéséről való ismeretanyagot, új eredményeink a következők:

1. Az ép agyban csak a TGF- β RI jelent meg szignifikánsan a kéreg IV. rétegének neuronjaiban. Emelkedett expressziós szintet, indukciót viszont egyik TGF- β receptor sem mutatott 24 órával az okklúziót követően. Ezzel ellentétben 72 órával az MCAO-t követően mind a négy TGF- β receptor indukálódott az infarktált területen belül, és a TGF- β RI és RII a penumbrában is megjelent. Szintén mind a négy receptor indukálódott a lézió területén belül 1 hónappal MCAO után. Különösen a TGF- β RIII indukálódott jelentősen a 72 órához képest.
2. Dupla festés eredményeként a legtöbb TGF- β 1-et expresszáló sejt a mikroglialis marker Iba1-el, míg kisebb részük az asztroglialis GFAP markerrel kolokalizált 72 órával MCAO után. Ezzel ellentétben, TGF- β 2 csak a neuronális markerrel jelölt NeuN pozitív sejtekhez volt köthető.
3. A penumbrában és az infarktált területen belül a TGF- β RI és RII jelentősen indukálódott mikroglia sejtekben 72 órával az okklúziót követően. Továbbá, Alk1 a lézionált területen belül endothel sejtekben indukálódott, mely feltételezi az MCAO-t követő angiogenezisben való részvételét. TGF- β RIII mRNS főként endotél sejtekben expresszálódott a 72 órás időpontban, de 1 hónappal MCAO után megjelent más sejtekben is.
4. TGF- β 2 kolokalizált Fos-szal, míg ATF-3-mal nem, tehát TGF- β 2 indukciójának mechanizmusában feltételezhetően nem axonális károsodás, hanem a kéreg terjedő depolarizációja vesz részt.

A TGF- β -k és receptoraik expressziójában bekövetkező változások MCAO után feltételezik, hogy hasonló változások mehetnek végbe stroke betegekben a lézió körül. Ezen eredmények azt mutatják, hogy a különböző TGF- β altípusok és receptoraik a neuroprotekción különböző aspektusában vesznek részt.

8. Összefoglaló

A transzformáló növekedési faktor-béta fehérjék (TGF- β 1-3) különböző sejtek osztódásának, differenciálódásának és túlélésének szabályozásáért felelősek. A TGF- β -k az I típusú (TGF- β RI) és a II típusú (TGF- β RII) transzmembrán kináz receptorhoz kötődnek, továbbá kiegészítő III típusú (TGF- β RIII) receptor is kapcsolódhat a rendszerhez. TGF- β jelátvitel egy másik fajta I típusú receptoron, az Activin-like kinase 1 (Alk1) receptoron keresztül is megvalósulhat. A TGF- β fehérjék neuroprotektív szerepére utal, hogy TGF- β 1 injektálása csökkenti, míg annak antagonizálása növeli fokális ischémia után a lézió mértékét. Fokális ischémiát az artéria cerebri média okklúziójával (MCAO) hoztunk létre patkánygyanban. Korábban leírtuk a TGF- β 1-3 mRNS expressziós mintázatát az idő függvényében. Jelen tanulmányban vizsgáltuk a TGF- β receptorok közül a TGF- β RI, RII, RIII és az Alk1 mRNS indukcióját 24, 72 órával és 1 hónappal tranziens vagy permanens MCAO-t követően, illetve azonosítottuk a TGF- β fehérjéket és receptoraikat expresszáló sejtek típusát fokális ischémi után. Az mRNS megjelenítésére radioaktív in situ hibridizációs hisztokémiát alkalmaztunk, amit immunhisztokémiával is kombináltunk. Az ép agyban, csak a TGF- β RI mRNS jelent meg szignifikánsan a kéreg IV. rétegének neuronjaiban. 72 órával az MCAO-t követően mind a négy TGF- β receptor indukálódott az infarktált területen belül, és a TGF- β RI és RII a penumbrában is megjelent főként mikrogliaiban. TGF- β RII mRNS kolokalizált mind mikroglialis mind endothel markerrel, míg TGF- β RIII és Alk1 dominánsan endothelben jelent meg. Mind a négy TGF- β receptor indukálódott a lézió területén belül 1 hónappal MCAO után. A TGF- β 1 mRNS expresszió a lézió területén belül 72 órával az MCAO-t követően mikrogliaiban indukálódott. A TGF- β 2 expresszió 24 órával fokális ischémiát követően az azonos oldali ép kéregben neuronokhoz köthető. Továbbá a TGF- β 2 kolokalizált Fos-szal míg ATF-3-mal nem, tehát TGF- β 2 indukciójának mechanizmusában feltételezhetően nem axonális károsodás, hanem a kéreg terjedő depolarizációja vesz részt. Ezen adatok alapján feltételezhető, hogy a TGF- β fehérjék és receptoraik időben és térben szabályozott rendszer alapján indukálódnak MCAO-t követően és így különböző neuroprotektív folyamatokban vehetnek részt.

9. Summary

Transforming growth factor-beta proteins (TGF- β 1-3) regulate the proliferation, differentiation, and survival of various cell types. TGF- β s bind to type I (TGF- β RI) and II receptors (TGF- β RII), which are transmembrane kinase receptors, and an accessory type III receptor (TGF- β RIII). TGF- β may utilize another type I receptor, Activin-like kinase receptor (Alk1). TGF- β proteins are neuroprotective as injection of TGF- β 1 decreased, while its antagonist increased the infarct size following focal ischemia. Focal ischemia was induced by middle cerebral artery occlusion (MCAO) in the rat brain. Previously, we reported the induction pattern of TGF- β 1-3 mRNA. The present study describes the induction of the mRNA of TGF- β RI, RII, RIII, and Alk1 at 24 h, 72 h, and 1 month after transient or permanent MCAO, and the expressing cell types of the TGF- β proteins and their receptors. We performed in situ hybridization histochemistry to label the mRNAs and we also combined it with immunohistochemistry. In intact brain, only TGF- β RI mRNA had significant expression in neurons of cortical layer IV. At 72 h following MCAO, all four types of TGF- β receptors were induced in the infarct area, while TGF- β RI and RII also appeared in the penumbra, mostly in microglia. TGF- β RII mRNA co-localized with both microglial and endothelial markers, while TGF- β RIII and Alk1 were present predominantly in endothels. All four TGF- β receptors were induced within the lesion 1 month after the occlusion. The induction of TGF- β 1 mRNA was present in microglial cells within the infarct area at 72 h following MCAO. The expression of the mRNA of TGF- β 2 was increased in neurons at 24 h following focal ischemia in the intact ipsilateral cortex. Furthermore, the co-localization of TGF- β 2 with Fos but not with ATF-3 suggests that cortical spreading depolarization, but not damage to neural processes, might be the mechanism of induction. These data suggest that TGF- β proteins and their receptors are induced after MCAO in a timely and spatially regulated fashion and are involved in distinct neuroprotective processes.

10. Irodalomjegyzék

Abou-Chebl A (2013) Management of acute ischemic stroke. *Curr Cardiol Rep*, 15: 348.

Aigner L, Bogdahn U (2008) TGF-beta in neural stem cells and in tumors of the central nervous system. *Cell Tissue Res*, 331: 225-241.

Akhurst RJ, Hata A (2012) Targeting the TGFbeta signalling pathway in disease. *Nat Rev Drug Discov*, 11: 790-811.

Albinana V, Sanz-Rodriguez F, Recio-Poveda L, Bernabeu C, Botella LM (2011) Immunosuppressor FK506 increases endoglin and activin receptor-like kinase 1 expression and modulates transforming growth factor-beta1 signaling in endothelial cells. *Mol Pharmacol*, 79: 833-843.

Anderson MA, Ao Y, Sofroniew MV (2014) Heterogeneity of reactive astrocytes. *Neurosci Lett*, 565: 23-29.

Annes JP, Munger JS, Rifkin DB (2003) Making sense of latent TGFbeta activation. *J Cell Sci*, 116: 217-224.

Arighi CN, Liu H, Natale DA, Barker WC, Drabkin H, Blake JA, Smith B, Wu CH (2009) TGF-beta signaling proteins and the Protein Ontology. *BMC Bioinformatics*, 10 Suppl 5: S3.

Asher RA, Morgenstern DA, Fidler PS, Adcock KH, Oohira A, Braistead JE, Levine JM, Margolis RU, Rogers JH, Fawcett JW (2000) Neurocan is upregulated in injured brain and in cytokine-treated astrocytes. *J Neurosci*, 20: 2427-2438.

Astrup J, Siejo BK, Symon L (1981) Thresholds in cerebral ischemia - The ischemic penumbra. *Stroke*, 12: 723-725.

Ata AK, Funa K, Olsson Y (1997) Expression of various TGF-beta isoforms and type I receptor in necrotizing human brain lesions. *Acta Neuropathol*, 93: 326-333.

Ata KA, Lennmyr F, Funa K, Olsson Y, Terent 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: 447-455.

Attisano L, Wrana JL (2002) Signal transduction by the TGF-beta superfamily. *Science*, 296: 1646-1647.

Barone FC (2010) Post-stroke pharmacological intervention: Promoting brain recovery from injury in the future. *Neuropharmacology*, 59: 650-653.

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: 83-93.

Bergeron M, Yu AY, Solway KE, Semenza GL, Sharp FR (1999) Induction of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) and its target genes following focal ischaemia in rat brain. *Eur J Neurosci*, 11: 4159-4170.

Bilandzic M, Stenvers KL (2012) Reprint of: Betaglycan: a multifunctional accessory. *Mol Cell Endocrinol*, 359: 13-22.

Blobe GC, Schiemann WP, Pepin MC, Beauchemin M, Moustakas A, Lodish HF, O'Connor-McCourt MD (2001) Functional roles for the cytoplasmic domain of the type III transforming growth factor beta receptor in regulating transforming growth factor beta signaling. *J Biol Chem*, 276: 24627-24637.

Bloom BB, Humphries DE, Kuang PP, Fine A, Goldstein RH (1996) Structure and expression of the promoter for the R4/ALK5 human type I transforming growth factor-beta receptor: regulation by TGF-beta. *Biochim Biophys Acta*, 1312: 243-248.

Bolanos JP, Almeida A (1999) Roles of nitric oxide in brain hypoxia-ischemia. *Biochim Biophys Acta*, 1411: 415-436.

Bosco A, Steele MR, Vetter ML (2011) Early microglia activation in a mouse model of chronic glaucoma. *J Comp Neurol*, 519: 599-620.

Bottner M, Krieglstein K, Unsicker K (2000) The transforming growth factor-betas: structure, signaling, and roles in nervous system development and functions. *J Neurochem*, 75: 2227-2240.

Bottner M, Unsicker K, Suter-Crazzolara C (1996) Expression of TGF-beta type II receptor mRNA in the CNS. *Neuroreport*, 7: 2903-2907.

Brundin P, Karlsson J, Emgard M, Schierle GS, Hansson O, Petersen A, Castilho RF (2000) Improving the survival of grafted dopaminergic neurons: a review over current approaches. *Cell Transplant*, 9: 179-195.

Burt DW, Law AS (1994) Evolution of the transforming growth factor-beta superfamily. *Prog Growth Factor Res*, 5: 99-118.

Campbell BC, Donnan GA, Lees KR, Hacke W, Khatri P, Hill MD, Goyal M, Mitchell PJ, Saver JL, Diener HC, Davis SM (2015) Endovascular stent thrombectomy: the new standard of care for large vessel ischaemic stroke. *Lancet Neurol*, 14: 846-854.

Caraci F, Battaglia G, Bruno V, Bosco P, Carbonaro V, Giuffrida ML, Drago F, Sortino MA, Nicoletti F, Copani A (2011) TGF-beta1 Pathway as a new target for neuroprotection in alzheimer's disease. *CNS Neurosci Ther*, 17: 237-249.

Caraci F, Bosco P, Signorelli M, Spada RS, Cosentino FI, Toscano G, Bonforte C, Muratore S, Prestianni G, Panerai S, Giambirtone MC, Gulotta E, Romano C, Salluzzo MG, Nicoletti F, Copani A, Drago F, Aguglia E, Ferri R (2012) The CC genotype of transforming growth factor- β 1 increases the risk of late-onset Alzheimer's disease and is associated with AD-related depression. *Eur Neuropsychopharm*, 22: 281-289.

Carbonell T, Rama R (2007) Iron, oxidative stress and early neurological deterioration in ischemic stroke. *Curr Med Chem*, 14: 857-874.

Carroll MC, Holers VM (2005) Innate autoimmunity. *Adv Immunol*, 86: 137-157.

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: 358-365.

Chen GY, Nunez G (2010) Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol*, 10: 826-837.

Chopp M, Li Y (1996) Apoptosis in focal cerebral ischemia. *Acta Neurochir Suppl*, 66: 21-26.

Cregg JM, DePaul MA, Filous AR, Lang BT, Tran A, Silver J (2014) Functional regeneration beyond the glial scar. *Exp Neurol*, 253: 197-207.

De Groot CJ, Montagne L, Barten AD, Sminia P, Van Der Valk P (1999) Expression of transforming growth factor (TGF)-beta1, -beta2, and -beta3 isoforms and TGF-beta type I and type II receptors in multiple sclerosis lesions and human adult astrocyte cultures. *J Neuropathol Exp Neurol*, 58: 174-187.

Deng X, Bellis S, Yan Z, Friedman E (1999) Differential responsiveness to autocrine and exogenous transforming growth factor (TGF) beta1 in cells with nonfunctional TGF-beta receptor type III. *Cell Growth Differ*, 10: 11-18.

Derynck R, Akhurst RJ, Balmain A (2001) TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nat Genet*, 29: 117-129.

Derynck R, Zhang YE (2003) Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature*, 425: 577-584.

Dhandapani KM, Brann DW (2003) Transforming growth factor-beta: a neuroprotective factor in cerebral ischemia. *Cell Biochem Biophys*, 39: 13-22.

Dheen ST, Kaur C, Ling EA (2007) Microglial activation and its implications in the brain diseases. *Curr Med Chem*, 14: 1189-1197.

Ding D (2015) Endovascular Mechanical Thrombectomy for Acute Ischemic Stroke: A New Standard of Care. *J Stroke*, 17: 123-126.

Dobolyi A, Vincze C, Pal G, Lovas G (2012) The neuroprotective functions of transforming growth factor Beta proteins. *Int J Mol Sci*, 13: 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.

Dreier JP (2011) The role of spreading depression, spreading depolarization and spreading ischemia in neurological disease. *Nat Med*, 17: 439-447.

Dvashi Z, Goldberg M, Adir O, Shapira M, Pollack A (2015) TGF-beta1 induced transdifferentiation of rpe cells is mediated by TAK1. *PLoS One*, 10: e0122229.

Eikermann-Haerter K (2014) Spreading depolarization may link migraine and stroke. *Headache*, 54: 1146-1157.

Elliott MR, Cheken FB, Tramont PC, Lazarowski ER, Kadl A, Walk SF, Park D, Woodson RI, Ostankovich M, Sharma P, Lysiak JJ, Harden TK, Leitinger N, Ravichandran KS (2009) Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. *Nature*, 461: 282-286.

Eltzschig HK, Carmeliet P (2011) Hypoxia and inflammation. *N Engl J Med*, 364: 656-665.

Eltzschig HK, Eckle T (2011) Ischemia and reperfusion - from mechanism to translation. *Nat Med*, 17: 1391-1401.

Farnworth PG, Wang Y, Escalona R, Leembruggen P, Ooi GT, Findlay JK (2007) Transforming growth factor-beta blocks inhibin binding to different target cell types in a context-dependent manner through dual mechanisms involving betaglycan. *Endocrinology*, 148: 5355-5368.

Faulkner JR, Herrmann JE, Woo MJ, Tansey KE, Doan NB, Sofroniew MV (2004) Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury. *J Neurosci*, 24: 2143-2155.

Fisher M (2006) The ischemic penumbra: A new opportunity for neuroprotection. *Cerebrovascular Diseases*, 21: 64-70.

Flanders KC, Ren RF, Lippa CF (1998) Transforming growth factor-betas in neurodegenerative disease. *Prog Neurobiol*, 54: 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: 5-9.

Galter D, Bottner M, Unsicker K (1999) Developmental regulation of the serotonergic transmitter phenotype in rostral and caudal raphe neurons by transforming growth factor-betas. *J Neurosci Res*, 56: 531-538.

Garrido-Martin EM, Blanco FJ, Roque M, Novensa L, Tarocchi M, Lang UE, Suzuki T, Friedman SL, Botella LM, Bernabeu C (2013) Vascular injury triggers Kruppel-like factor 6 mobilization and cooperation with specificity protein 1 to promote endothelial activation through upregulation of the activin receptor-like kinase 1 gene. *Circ Res*, 112: 113-127.

Gaszner B, Korosi A, Palkovits M, Roubos EW, Kozicz T (2007) Neuropeptide Y activates urocortin 1 neurons in the nonpreganglionic Edinger-Westphal nucleus. *J Comp Neurol*, 500: 708-719.

Gault J, Sarin H, Awadallah NA, Shenkar R, Awad IA (2004) Pathobiology of human cerebrovascular malformations: Basic mechanisms and clinical relevance. *Neurosurgery*, 55: 1-16.

Gehrmann J, Banati RB, Wiessner C, Hossmann KA, Kreutzberg GW (1995) Reactive microglia in cerebral ischaemia: an early mediator of tissue damage? *Neuropathol Appl Neurobiol*, 21: 277-289.

Gelderblom M, Leyboldt F, Steinbach K, Behrens D, Choe CU, Siler DA, Arumugam TV, Orthey E, Gerloff C, Tolosa E, Magnus T (2009) Temporal and spatial dynamics of cerebral immune cell accumulation in stroke. *Stroke*, 40: 1849-1857.

Giulian D, Woodward J, Young DG, Krebs JF, Lachman LB (1988) Interleukin-1 injected into mammalian brain stimulates astrogliosis and neovascularization. *J Neurosci*, 8: 2485-2490.

Glasper ER, Kozorovitskiy Y, Pavlic A, Gould E (2011) Paternal experience suppresses adult neurogenesis without altering hippocampal function in *Peromyscus californicus*. *J Comp Neurol*, 519: 2271-2281.

Gordon S (2003) Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol*, 3: 23-35.

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: 454-464.

Goumans MJ, Valdimarsdottir G, Itoh S, Lebrin F, Larsson J, Mummery C, Karlsson S, ten Dijke P (2003) Activin receptor-like kinase (ALK)1 is an antagonistic mediator of lateral TGFbeta/ALK5 signaling. *Mol Cell*, 12: 817-828.

Graham SH, Chen J (2001) Programmed cell death in cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, 21: 99-109.

Gross CE, Bednar MM, Howard DB, Sporn MB, MacMillan V (1993) Transforming growth factor- β 1 reduces infarct size after experimental cerebral ischemia in a rabbit model. *Stroke*, 24: 558-562.

Gross CE, Howard DB, Dooley RH, Raymond SJ, Fuller S, Bednar MM (1994) TGF-beta 1 post-treatment in a rabbit model of cerebral ischaemia. *Neurol Res*, 16: 465-470.

Guan J, Miller OT, Waugh KM, McCarthy DC, Gluckman PD, Gunn AJ (2004) TGF beta-1 and neurological function after hypoxia-ischemia in adult rats. *Neuroreport*, 15: 961-964.

Guegan C, Sola B (2000) Early and sequential recruitment of apoptotic effectors after focal permanent ischemia in mice. *Brain Res*, 856: 93-100.

Gumienny T, Padgett RW (2002) The other side of TGF-beta superfamily signal regulation: thinking outside the cell. *Trends Endocrinol Metab*, 13: 295-299.

Haas A, Liraz O, Michaelson DM (2012) The effects of apolipoproteins E3 and E4 on the transforming growth factor-beta system in targeted replacement mice. *Neurodegener Dis*, 10: 41-45.

Hanisch UK, Kettenmann H (2007) Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci*, 10: 1387-1394.

Harris MK, Shneyder N, Borazanci A, Korniychuk E, Kelley RE, Minagar A (2009) Movement disorders. *Med Clin North Am*, 93: 371-388, viii.

Hartings JA, Rolli ML, Lu XC, Tortella FC (2003) Delayed secondary phase of peri-infarct depolarizations after focal cerebral ischemia: relation to infarct growth and neuroprotection. *J Neurosci*, 23: 11602-11610.

Hau P, Jachimczak P, Schlaier J, Bogdahn U (2011) TGF-beta2 signaling in high-grade gliomas. *Curr Pharm Biotechnol*, 12: 2150-2157.

Hawinkels LJ, Garcia de Vinuesa A, Ten Dijke P (2013) Activin receptor-like kinase 1 as a target for anti-angiogenesis therapy. *Expert Opin Investig Drugs*, 22: 1371-1383.

Heiss WD (2012) The ischemic penumbra: how does tissue injury evolve? *Ann N Y Acad Sci*, 1268: 26-34.

Hempel N, How T, Cooper SJ, Green TR, Dong M, Copland JA, Wood CG, Blobel GC (2008) Expression of the type III TGF-beta receptor is negatively regulated by TGF-beta. *Carcinogenesis*, 29: 905-912.

Heupel K, Sargsyan V, Plomp JJ, Rickmann M, Varoqueaux F, Zhang W, Kriegstein K (2008) Loss of transforming growth factor-beta 2 leads to impairment of central synapse function. *Neural Dev*, 3: 25.

Hoffman GE, Smith MS, Verbalis JG (1993) c-Fos and related immediate early gene products as markers of activity in neuroendocrine systems. *Front Neuroendocrinol*, 14: 173–213.

Hotchkiss RS, Strasser A, McDunn JE, Swanson PE (2009) Cell death. *N Engl J Med*, 361: 1570-1583.

Huang F, Chen YG (2012) Regulation of TGF-beta receptor activity. *Cell Biosci*, 2: 9.

Ikushima H, Todo T, Ino Y, Takahashi M, Miyazawa K, Miyazono K (2009) Autocrine TGF- β Signaling Maintains Tumorigenicity of Glioma-Initiating Cells through Sry-Related HMG-Box Factors. *Cell Stem Cell*, 5: 504-514.

Imai Y, Kohsaka S (2002) Intracellular signaling in M-CSF-induced microglia activation: Role of Iba1. *Glia*, 40: 164-174.

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: 1208-1215.

Jander S, Schroeter M, D'Urso D, Gillen C, Witte OW, Stoll G (1998) Focal ischaemia of the rat brain elicits an unusual inflammatory response: early appearance of CD8+ macrophages/microglia. *Eur J Neurosci*, 10: 680-688.

Jennings MT, Pietenpol JA (1998) The role of transforming growth factor β in glioma progression. *Journal of Neuro-Oncology*, 36: 123-140.

Jones LL, Kreutzberg GW, Raivich G (1998) Transforming growth factor beta's 1, 2 and 3 inhibit proliferation of ramified microglia on an astrocyte monolayer. *Brain Res*, 795: 301-306.

Juratli TA, Schackert G, Krex D (2013) Current status of local therapy in malignant gliomas--a clinical review of three selected approaches. *Pharmacol Ther*, 139: 341-358.

Kaminska B, Kocyk M, Kijewska M (2013) TGF beta signaling and its role in glioma pathogenesis. *Adv Exp Med Biol*, 986: 171-187.

Khatri R, McKinney AM, Swenson B, Janardhan V (2012) Blood-brain barrier, reperfusion injury, and hemorrhagic transformation in acute ischemic stroke. *Neurology*, 79: S52-57.

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: 331-339.

Kiessling M, Gass P (1994) Stimulus-transcription coupling in focal cerebral ischemia. *Brain Pathol*, 4: 77-83.

Kim AS, Johnston SC (2013) Temporal and geographic trends in the global stroke epidemic. *Stroke*, 44: S123-125.

Kinouchi H, Sharp FR, Chan PH, Koistinaho J, Sagar SM, Yoshimoto T (1994) Induction of c-fos, junB, c-jun, and hsp70 mRNA in cortex, thalamus, basal ganglia, and hippocampus following middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab*, 14: 808-817.

Kirino T (2000) Delayed neuronal death. *Neuropathology*, 20 Suppl: S95-97.

Klempt ND, Sirimanne E, Gunn AJ, Klempt M, Singh K, Williams C, Gluckman PD (1992) Hypoxia-ischemia induces transforming growth factor β 1 mRNA in the infant rat brain. *Brain Res Mol Brain Res*, 13: 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: 1-14.

Komuta Y, Teng X, Yanagisawa H, Sango K, Kawamura K, Kawano H (2010) Expression of transforming growth factor-beta receptors in meningeal fibroblasts of the injured mouse brain. *Cell Mol Neurobiol*, 30: 101-111.

Konig HG, Kogel 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: 1077-1086.

Kreutzberg GW (1996) Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci*, 19: 312-318.

Krieglstein K, Strelau J, Schober A, Sullivan A, Unsicker K (2002) TGF- β and the regulation of neuron survival and death. *J Physiol Paris*, 96: 25-30.

Krieglstein K, Unsicker K (1994) Transforming growth factor- β promotes survival of midbrain dopaminergic neurons and protects them against N-methyl-4-phenylpyridinium ion toxicity. *Neuroscience*, 63: 1189-1196.

Krupinski J, Kumar P, Kumar S, Kaluza J (1996) Increased expression of TGF- β 1 in brain tissue after ischemic stroke in humans. *Stroke*, 27: 852-857.

Lagord C, Berry M, Logan A (2002) Expression of TGF β 2 but not TGF β 1 correlates with the deposition of scar tissue in the lesioned spinal cord. *Mol Cell Neurosci*, 20: 69-92.

Lai AY, Todd KG (2006) Microglia in cerebral ischemia: Molecular actions and interactions. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 84: 49-59.

Lawrence DA (1996) Transforming growth factor- β : a general review. *Eur Cytokine Netw*, 7: 363-374.

Lee NY, Kirkbride KC, Sheu RD, Blobel GC (2009) The transforming growth factor- β type III receptor mediates distinct subcellular trafficking and downstream signaling of activin-like kinase (ALK)3 and ALK6 receptors. *Mol Biol Cell*, 20: 4362-4370.

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- β 1 after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Glia*, 24: 437-448.

Lenzlinger PM, Morganti-Kossmann MC, Laurer HL, McIntosh TK (2001) The duality of the inflammatory response to traumatic brain injury. *Mol Neurobiol*, 24: 169-181.

Lewis KA, Gray PC, Blount AL, MacConell LA, Wiater E, Bilezikjian LM, Vale W (2000) Betaglycan binds inhibin and can mediate functional antagonism of activin signalling. *Nature*, 404: 411-414.

Li JJ, Lu J, Kaur C, Sivakumar V, Wu CY, Ling EA (2008) Effects of hypoxia on expression of transforming growth factor-beta1 and its receptors I and II in the amoeboid microglial cells and murine BV-2 cells. *Neuroscience*, 156: 662-672.

Lifshitz V, Weiss R, Benromano T, Kfir E, Blumenfeld-Katzir T, Tempel-Brami C, Assaf Y, Xia W, Wyss-Coray T, Weiner HL, Frenkel D (2012) Immunotherapy of cerebrovascular amyloidosis in a transgenic mouse model. *Neurobiol Aging*, 33: 432 e431-432 e413.

Lippa CF, Smith TW, Flanders KC (1995) Transforming growth factor-beta: neuronal and glial expression in CNS degenerative diseases. *Neurodegeneration*, 4: 425-432.

Lipton P (1999) Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev*, 79: 1431-1568.

Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R (1989) Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*, 20: 84-91.

Lopez-Casillas F, Wrana JL, Massague J (1993) Betaglycan presents ligand to the TGF beta signaling receptor. *Cell*, 73: 1435-1444.

Lux A, Attisano L, Marchuk DA (1999) Assignment of transforming growth factor beta1 and beta3 and a third new ligand to the type I receptor ALK-1. *J Biol Chem*, 274: 9984-9992.

Ma M, Ma Y, Yi X, Guo R, Zhu W, Fan X, Xu G, Frey WH, 2nd, 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.

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: 1735-1743.

MacConell LA, Leal AM, Vale WW (2002) The distribution of betaglycan protein and mRNA in rat brain, pituitary, and gonads: implications for a role for betaglycan in inhibin-mediated reproductive functions. *Endocrinology*, 143: 1066-1075.

Manaenko A, Lekic T, Barnhart M, Hartman R, Zhang JH (2014) Inhibition of Transforming Growth Factor-beta Attenuates Brain Injury and Neurological Deficits in a Rat Model of Germinal Matrix Hemorrhage. *Stroke*.

Mantel PY, Schmidt-Weber CB (2011) Transforming growth factor-beta: recent advances on its role in immune tolerance. *Methods Mol Biol*, 677: 303-338.

Marin-Teva JL, Cuadros MA, Martin-Oliva D, Navascues J (2011) Microglia and neuronal cell death. *Neuron Glia Biol*, 7: 25-40.

Markus A (2007) How dopamine neurons survive. *Nat Neurosci*, 10:12.

Massague J, Chen YG (2000) Controlling TGF-beta signaling. *Genes Dev*, 14: 627-644.

Massague J, Gomis RR (2006) The logic of TGFbeta signaling. *FEBS Lett*, 580: 2811-2820.

Mathieu P, Piantanida AP, Pitossi F (2010) Chronic expression of transforming growth factor-beta enhances adult neurogenesis. *Neuroimmunomodulation*, 17: 200-201.

McKeon RJ, Jurynek MJ, Buck CR (1999) The chondroitin sulfate proteoglycans neurocan and phosphacan are expressed by reactive astrocytes in the chronic CNS glial scar. *J Neurosci*, 19: 10778-10788.

Melchior B, Puntambekar SS, Carson MJ (2006) Microglia and the control of autoreactive T cell responses. *Neurochem Int*, 49: 145-153.

Moon LDF, Fawcett JW (2001) Reduction in CNS scar formation without concomitant increase in axon regeneration following treatment of adult rat brain with a combination of antibodies to TGF β 1 and β 2. *Eur J Neurosci*, 14: 1667-1677.

Moretti A, Ferrari F, Villa RF (2014) Neuroprotection for ischaemic stroke: Current status and challenges. *Pharmacol Ther*.

Morgan JI, Curran T (1991) Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun. *Annu Rev Neurosci*, 14: 421-451.

Morgan TE, Rozovsky I, Sarkar DK, Young-Chan CS, Nichols NR, Laping NJ, Finch CE (2000) Transforming growth factor-beta1 induces transforming growth factor-beta1 and transforming growth factor-beta receptor messenger RNAs and reduces complement C1qB messenger RNA in rat brain microglia. *Neuroscience*, 101: 313-321.

Morimoto K, Horio J, Satoh H, Sue L, Beach T, Arita S, Tooyama I, Konishi Y (2011) Expression Profiles of Cytokines in the Brains of Alzheimer's Disease (AD) Patients Compared to the Brains of Non-Demented Patients with and without Increasing AD Pathology. *J Alzheimers Dis*, 25: 59-76.

Mu Y, Gudey SK, Landstrom M (2012) Non-Smad signaling pathways. *Cell Tissue Res*, 347: 11-20.

Namura S, Zhu J, Fink K, Endres M, Srinivasan A, Tomaselli KJ, Yuan J, Moskowitz MA (1998) Activation and cleavage of caspase-3 in apoptosis induced by experimental cerebral ischemia. *J Neurosci*, 18: 3659-3668.

Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F (2005) Neuroscience: Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science*, 308: 1314-1318.

Nour M, Scalzo F, Liebeskind DS (2013) Ischemia-reperfusion injury in stroke. *Interv Neurol*, 1: 185-199.

Oh SP, Seki T, Goss KA, Imamura T, Yi Y, Donahoe PK, Li L, Miyazono K, ten Dijke P, Kim S, Li E (2000) Activin receptor-like kinase 1 modulates transforming growth factor-beta 1 signaling in the regulation of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97: 2626-2631.

Ohba N, Maeda M, Nakagomi S, Muraoka M, Kiyama H (2003) Biphasic expression of activating transcription factor-3 in neurons after cerebral infarction. *Brain Res Mol Brain Res*, 115: 147-156.

Oklu R, Hesketh R (2000) The latent transforming growth factor beta binding protein (LTBP) family. *Biochem J*, 352 Pt 3: 601-610.

Olmez I, Ozyurt H (2012) Reactive oxygen species and ischemic cerebrovascular disease. *Neurochem Int*, 60: 208-212.

Pal G, Lovas G, Dobolyi A (2014) Induction of Transforming Growth Factor Beta Receptors following Focal Ischemia in the Rat Brain. *PLoS One*, 9: e106544.

Pal G, Vincze C, Renner E, Wappler EA, 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: e46731.

Peskind ER (1996) Neurobiology of Alzheimer's disease. *J Clin Psychiatry*, 57 Suppl 14: 5-8.

Peters O, Back T, Lindauer U, Busch C, Megow D, Dreier J, Dirnagl U (1998) Increased formation of reactive oxygen species after permanent and reversible middle cerebral artery occlusion in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab*, 18: 196-205.

Popp A, Jaenisch N, Witte OW, Frahm C (2009) Identification of ischemic regions in a rat model of stroke. *PLoS One*, 4: e4764.

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: 1245-1252.

Pratt BM, McPherson JM (1997) TGF-beta in the central nervous system: potential roles in ischemic injury and neurodegenerative diseases. *Cytokine Growth Factor Rev*, 8: 267-292.

Prehn JHM, Backhaus C, Kriegstein J (1993) Transforming growth factor- β 1 prevents glutamate neurotoxicity in rat neocortical cultures and protects mouse neocortex from ischemic injury in vivo. *J Cereb Blood Flow Metab*, 13: 521-525.

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: 695-700.

Rahimi RA, Leof EB (2007) TGF-beta signaling: a tale of two responses. *J Cell Biochem*, 102: 593-608.

Ramos-Cabrer P, Campos F, Sobrino T, Castillo J (2011) Targeting the ischemic penumbra. *Stroke*, 42: S7-S11.

Ransohoff RM, Brown MA (2012) Innate immunity in the central nervous system. *J Clin Invest*, 122: 1164-1171.

Rau SW, Dubal DB, Bottner M, Wise PM (2003) Estradiol differentially regulates c-Fos after focal cerebral ischemia. *J Neurosci*, 23: 10487-10494.

Rich JN, Zhang M, Datto MB, Bigner DD, Wang XF (1999) Transforming growth factor- β -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: 35053-35058.

Roberts AB (1998) Molecular and cell biology of TGF-beta. *Miner Electrolyte Metab*, 24: 111-119.

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 U S A*, 78: 5339-5343.

Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM, Benjamin EJ, Berry JD, Borden WB, Bravata DM, Dai S, Ford ES, Fox CS, Fullerton HJ, Gillespie C, Hailpern SM, Heit JA, Howard VJ, Kissela BM, Kittner SJ, Lackland DT, Lichtman JH, Lisabeth LD, Makuc DM, Marcus GM, Marelli A, Matchar DB, Moy CS, Mozaffarian D, Mussolino ME, Nichol G, Paynter NP, Soliman EZ, Sorlie PD, Sotoodehnia N, Turan TN, Virani SS, Wong ND, Woo D, Turner MB (2012) Heart disease and stroke statistics--2012 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*, 125: e2-e220.

Roussa E, von Bohlen und Halbach O, Kriegstein 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: 1345-1353.

Rupalla K, Allegrini PR, Sauer D, Wiessner C (1998) Time course of microglia activation and apoptosis in various brain regions after permanent focal cerebral ischemia in mice. *Acta Neuropathol*, 96: 172-178.

Sarabi AS, Shen H, Wang Y, Hoffer BJ, Backman CM (2008) Gene expression patterns in mouse cortical penumbra after focal ischemic brain injury and reperfusion. *J Neurosci Res*, 86: 2912-2924.

Schachtrup C, Ryu JK, Helmrick MJ, Vagena E, Galanakis DK, Degen JL, Margolis RU, Akassoglou K (2010) Fibrinogen triggers astrocyte scar formation by promoting the availability of active TGF-beta after vascular damage. *J Neurosci*, 30: 5843-5854.

Schmierer B, Hill CS (2007) TGFbeta-SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8: 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: 378-391.

Seki T, Yun J, Oh SP (2003) Arterial endothelium-specific activin receptor-like kinase 1 expression suggests its role in arterialization and vascular remodeling. *Circ Res*, 93: 682-689.

Seoane J (2006) Escaping from the TGFbeta anti-proliferative control. *Carcinogenesis*, 27: 2148-2156.

Sharp FR, Lu A, Tang Y, Millhorn DE (2000) Multiple molecular penumbras after focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, 20: 1011-1032.

Shi H, Liu KJ (2007) Cerebral tissue oxygenation and oxidative brain injury during ischemia and reperfusion. *Front Biosci*, 12: 1318-1328.

Shin HK, Dunn AK, Jones PB, Boas DA, Moskowitz MA, Ayata C (2006) Vasoconstrictive neurovascular coupling during focal ischemic depolarizations. *J Cereb Blood Flow Metab*, 26: 1018-1030.

Siegel PM, Massague J (2003) Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer. *Nat Rev Cancer*, 3: 807-821.

Slotkin TA, Wang XF, Symonds HS, Seidler FJ (1997) Expression of mRNAs coding for the transforming growth factor-beta receptors in brain regions of euthyroid and hypothyroid neonatal rats and in adult brain. *Brain Res Dev Brain Res*, 99: 61-65.

Song DY, Oh KM, Yu HN, Park CR, Woo RS, Jung SS, Baik TK (2011) Role of activating transcription factor 3 in ischemic penumbra region following transient middle cerebral artery occlusion and reperfusion injury. *Neurosci Res*, 70: 428-434.

Starossom SC, Mascanfroni ID, Imitola J, Cao L, Raddassi K, Hernandez SF, Bassil R, Croci DO, Cerliani JP, Delacour D, Wang Y, Elyaman W, Khoury SJ, Rabinovich GA (2012) Galectin-1 deactivates classically activated microglia and protects from inflammation-induced neurodegeneration. *Immunity*, 37: 249-263.

Stephenson D, Yin T, Smalstig EB, Hsu MA, Panetta J, Little S, Clemens J (2000) Transcription factor nuclear factor-kappa B is activated in neurons after focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, 20: 592-603.

Stevens SL, Bao J, Hollis J, Lessov NS, Clark WM, Stenzel-Poore MP (2002) The use of flow cytometry to evaluate temporal changes in inflammatory cells following focal cerebral ischemia in mice. *Brain Research*, 932: 110-119.

Sun J, Zhou W, Sha B, Yang Y (2010) Ischemia induced neural stem cell proliferation and differentiation in neonatal rat involved vascular endothelial growth factor and transforming growth factor-beta pathways. *Brain Dev*, 32: 191-200.

Taqi MA, Vora N, Callison RC, Lin R, Wolfe TJ (2012) Past, present, and future of endovascular stroke therapies. *Neurology*, 79: S213-220.

Taylor RA, Sansing LH (2013) Microglial responses after ischemic stroke and intracerebral hemorrhage. *Clin Dev Immunol*, 2013: 746068.

Ten Dijke P, Hill CS (2004) New insights into TGF- β -Smad signalling. *Trends Biochem Sci*, 29: 265-273.

Townsend TA, Robinson JY, How T, DeLaughter DM, Blobe GC, Barnett JV (2012) Endocardial cell epithelial-mesenchymal transformation requires Type III TGFbeta receptor interaction with GIPC. *Cell Signal*, 24: 247-256.

Tsujino H, Kondo E, Fukuoka T, Dai Y, Tokunaga A, Miki K, Yonenobu K, Ochi T, Noguchi K (2000) Activating transcription factor 3 (ATF3) induction by axotomy in sensory and motoneurons: A novel neuronal marker of nerve injury. *Mol Cell Neurosci*, 15: 170-182.

Tsunawaki S, Sporn M, Ding A, Nathan C (1988) Deactivation of macrophages by transforming growth factor-beta. *Nature*, 334: 260-262.

Uemura Y, Kowall NW, Moskowitz MA (1991) Focal ischemia in rats causes time-dependent expression of c-fos protein immunoreactivity in widespread regions of ipsilateral cortex. *Brain Res*, 552: 99-105.

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: 613-625.

Unsicker K, Krieglstein K (2002) TGF-betas and their roles in the regulation of neuron survival. *Adv Exp Med Biol*, 513: 353-374.

Unsicker K, Meier C, Krieglstein K, Sartor BM, Flanders KC (1996) Expression, localization, and function of transforming growth factor- β s in embryonic chick spinal cord, hindbrain, and dorsal root ganglia. *J Neurobiol*, 29: 262-276.

van Meeteren LA, Thorikay M, Bergqvist S, Pardali E, Stampino CG, Hu-Lowe D, Goumans MJ, ten Dijke P (2012) Anti-human activin receptor-like kinase 1 (ALK1) antibody attenuates bone morphogenetic protein 9 (BMP9)-induced ALK1 signaling and interferes with endothelial cell sprouting. *J Biol Chem*, 287: 18551-18561.

Vincze C (2015). A transzformáló növekedési faktor béta fehérjék a központi idegrendszerben, Doktori disszertáció, Szentágotthai János Idegtudományi Doktori Iskola, Semmelweis Egyetem.

Vincze C, Pal G, Wappler EA, Szabo ER, Nagy ZG, Lovas G, Dobolyi A (2010) Distribution of mRNAs encoding transforming growth factors-beta1, -2, and -3 in the intact rat brain and after experimentally induced focal ischemia. *J Comp Neurol*, 518: 3752-3770.

Vivien D, Bernaudin M, Buisson A, Divoux D, MacKenzie ET, Nouvelot A (1998) Evidence of type I and type II transforming growth factor-beta receptors in central nervous tissues: changes induced by focal cerebral ischemia. *J Neurochem*, 70: 2296-2304.

Vogel T, Ahrens S, Büttner N, Krieglstein K (2010) Transforming growth factor β 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: 661-671.

Wang XF, Lin HY, Ng-Eaton E, Downward J, Lodish HF, Weinberg RA (1991) Expression cloning and characterization of the TGF-beta type III receptor. *Cell*, 67: 797-805.

Wanner IB, Anderson MA, Song B, Levine J, Fernandez A, Gray-Thompson Z, Ao Y, Sofroniew MV (2013) Glial scar borders are formed by newly proliferated, elongated astrocytes that interact to corral inflammatory and fibrotic cells via STAT3-dependent mechanisms after spinal cord injury. *J Neurosci*, 33: 12870-12886.

Wardlaw JM, Murray V, Berge E, del Zoppo G, Sandercock P, Lindley RL, Cohen G (2012) Recombinant tissue plasminogen activator for acute ischaemic stroke: an updated systematic review and meta-analysis. *Lancet*, 379: 2364-2372.

Weinstein JR, Koerner IP, Miller T (2010) Microglia in ischemic brain injury. *Future Neurology*, 5: 227-246.

Weinstein PR, Hong S, Sharp FR (2004) Molecular identification of the ischemic penumbra. *Stroke*, 35: 2666-2670.

Weiss A, Attisano L (2013) The TGFbeta superfamily signaling pathway. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*, 2: 47-63.

Wick W, Naumann U, Weller M (2006) Transforming growth factor-beta: a molecular target for the future therapy of glioblastoma. *Curr Pharm Des*, 12: 341-349.

Wirh's O, Breyhan H, Marcello A, Cotel MC, Bruck W, Bayer TA (2010) Inflammatory changes are tightly associated with neurodegeneration in the brain and spinal cord of the APP/PS1KI mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 31: 747-757.

Wrana JL, Attisano L, Wieser R, Ventura F, Massague J (1994) Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. *Nature*, 370: 341-347.

Wrighton KH, Lin X, Feng XH (2009) Phospho-control of TGF-beta superfamily signaling. *Cell Res*, 19: 8-20.

Xiao BG, Bai XF, Zhang GX, Link H (1997) Transforming growth factor- β 1 induces apoptosis of rat microglia without relation to bcl-2 oncoprotein expression. *Neurosci Lett*, 226: 71-74.

Yamanaka H, Kobayashi K, Okubo M, Fukuoka T, Noguchi K (2011) Increase of close homolog of cell adhesion molecule L1 in primary afferent by nerve injury and the contribution to neuropathic pain. *J Comp Neurol*, 519: 1597-1615.

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 Res*, 836: 139-145.

Yang HY, Lieska N, Shao D, Kriho V, Pappas GD (1994) Proteins of the intermediate filament cytoskeleton as markers for astrocytes and human astrocytomas. *Mol Chem Neuropathol*, 21: 155-176.

Yemisci M, Gursoy-Ozdemir Y, Vural A, Can A, Topalkara K, Dalkara T (2009) Pericyte contraction induced by oxidative-nitrative stress impairs capillary reflow despite successful opening of an occluded cerebral artery. *Nat Med*, 15: 1031-1037.

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.

Yoshioka N, Kimura-Kuroda J, Saito T, Kawamura K, Hisanaga S, Kawano H (2011) Small molecule inhibitor of type I transforming growth factor-beta receptor kinase ameliorates the inhibitory milieu in injured brain and promotes regeneration of nigrostriatal dopaminergic axons. *J Neurosci Res*, 89: 381-393.

Zhang L, Sato E, Amagasaki K, Nakao A, Naganuma H (2006) Participation of an abnormality in the transforming growth factor- β signaling pathway in resistance of malignant glioma cells to growth inhibition induced by that factor. *J Neurosurg*, 105: 119-128.

Zhou X, Spittau B, Krieglstein K (2012) TGFbeta signalling plays an important role in IL4-induced alternative activation of microglia. *J Neuroinflammation*, 9: 210.

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: 593-602.

Zhu Y, Yang GY, Ahlemeyer B, Pang L, Che XM, Culmsee C, Klumpp S, Krieglstein J (2002) Transforming Growth Factor- β 1 Increases Bad Phosphorylation and Protects Neurons Against Damage. *J Neurosci*, 22: 3898-3909.

11. Saját publikációk jegyzéke

11.1. Az értekezés alapjául szolgáló saját közlemények

Pál G., Lovas G., Dobolyi A. (2014) Induction of transforming growth factor beta receptors following focal ischemia in the rat brain. *PLoS One*.9(9):e106544. IF: 3,234

Pál G., Vincze C., Renner E., Wappler E.A., 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. IF: 3,730

11.2. Az értekezéshez nem kapcsolódó közlemények

Nardai S., Dobolyi A., **Pál G.**, Skopál J., Pintér N., Lakatos K., Merkely B., Nagy Z. (2014) Selegiline promotes NOTCH-JAGGED signaling in astrocytes of the peri-infarct region and improves the functional integrity of the neurovascular unit in a rat model of focal ischemia. *Restor Neurol Neurosci* 33(1):1-14. IF: 2,490

Dobolyi A., Vincze C., **Pál G.**, Lovas G. (2012) The neuroprotective functions of transforming growth factor Beta proteins. *Int J Mol Sci* 13: 8219-8258. IF: 2,464

Vincze C., **Pál G.**, Wappler E.A., Szabó E.R., Nagy Z.G., Lovas G., Dobolyi A. (2010) Distribution of mRNAs encoding transforming growth factors-beta1, -2, and -3 in the intact rat brain and after experimentally induced focal ischemia. *J Comp Neurol* 518: 3752-3770. IF: 3,774

12. Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Dobolyi Árpádnak a sok segítséget és figyelmet, mellyel tudományos diákkörös munkámat és PhD tanulmányaimat kísérte.

Köszönettel tartozom Dr. Vincze Csillának az eredmények feldolgozásában nyújtott segítségért. Köszönöm az évek alatt nyújtott segítséget Borsicsné Szabó Éva Rebekának, Dr. Dobolyiné Renner Évának, Toronyay-Kasztner Magdolnának és Dr. Vitéz-Cservenák Melindának. Továbbá köszönöm a Neuromorfológiai Laboratórium korábbi vezetőjének Dr. Palkovits Miklós professzor úrnak és a labor minden munkatársának a kiváló hangulatú munkahely megteremtését, és hogy mindig szívesen segítettek a kezdetektől fogva. Köszönöm Hanák Nikolettnek és Deák Szilviának a kísérletek során nyújtott technikai segítséget.

Végül köszönöm szüleimnek és testvéreimnek, Szilvinek és Balázsnak, hogy minden döntésemben támogattak és megfelelő háttérrel biztosítottak számomra mind az egyetem, mind a doktori képzés során.