

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

Doktori tézisek

Dr. Pál Gabriella

Semmelweis Egyetem

Szentágotthai 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

I. BEVEZETÉS

1. Ischémiás stroke

A stroke világszerte harmadik a vezető halálokok listáján, és számos felnőttkori súlyos és maradandó mozgáskorlátozottságnak leggyakoribb oka. Az akut stroke esetek körülbelül 80%-a ischémiás eredetű. Napjainkban ez a betegség komoly problémát jelent világszerte mind a halálozási mutatók, mind a kezelés korlátozott lehetőségei és a magas egészségügyi kiadások miatt. Fokális ischémia során egy-egy érellátási terület érintett. Az ischémia az érintett agyerületen beindítja a sejthalállal végződő folyamatokat. A szöveti sérülés mechanizmusa mind celluláris, mind molekuláris szinten zajlik.

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. A penumbra az az ischémiás magot körülvevő terület, amely még megmenthető, és így ez a további neuroprotektív kezelések fő célpontja. Remélhetőleg a jövő ischémiás stroke terápiája neuroprotektív, trombolitikus, antitrombotikus és neuroreparáción alapuló kezelések kombinációjából állhat.

2. A TGF- β fehérjék és receptoraik

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. A TGF- β -k normál eloszlási mintázatát mind immunhisztokémiai módszerekkel fehérje szintjén,

mind in situ hibridizációs hisztokémiával mRNS szintjén leírták. In situ hibridizációs hisztokémiával megjelölt TGF- β 1 mRNS 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. 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. Fokális ischémiát követően mindhárom TGF- β fehérje indukálódik, de expressziós mintázatuk és annak időbeli változásai különbözőek a három típus esetén.

A TGF- β receptor család a szerin-kináz receptorok csoportjába tartozik, jelátviteli pályájukban Smad fehérjék vesznek részt, melyek foszforilálódva hatnak a sejtmagon belül. 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. A TGF- β RI-t, vagy más néven Alk5-öt (Activin-like kinase receptor 5), kezdetben mindhárom dimer TGF- β fehérje receptoraként azonosították. A ligandok a TGF- β RII-hoz kötődnek, mely TGF- β RI-ral kapcsolódva, és azt foszforilálva létrehozza a funkcionális receptort. A funkcionális receptor heterotetramer, mely 2 TGF- β RI-t és 2 TGF- β RII-t tartalmaz. Továbbá a TGF- β RIII, vagy bétaglikán képes befolyásolni az I. és II. típusú receptorból álló komplexet. A TGF- β RIII rendelkezik egy rövid intracelluláris doménnel, mellyel prezentálhatja a TGF- β -kat a TGF- β RII-nak. A TGF- β RIII különösen fontos a TGF- β 2 felismerésében, mely gyengén kötődik a TGF- β receptorokhoz. 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. Szintén leírták, hogy az Alk1-en keresztül megvalósuló jelátvitel gyakran különböző, sőt néha ellentétes a TGF- β RI-en keresztül bekövetkező jelátvitellel. A legtöbb sejtben a TGF- β jelátvitel azonban az általános TGF- β RI/Alk5-ön indul. Endoteliális sejtekben és neuronokban a TGF- β RI/Ak1-en keresztül is mehet a jel. 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.

3. A TGF- β rendszer szerepe agyi ischémiában

Agyi ischémia különböző állatkísérletes modelljeiben a TGF- β -k szintje megemelkedik. Fokális ischémiát követően mindhárom TGF- β fehérje indukálódik, de expressziós mintázatuk és annak időbeli változásai különbözőek a három típus esetén. MCAO által patkányban létrehozott fokális ischémiát követően a TGF- β 1 indukálódik és az ischémiás területet körülvevő penumbrában jelenik meg. A TGF- β 1 emelkedett szintjét ischémiás stroke után humán agyszövetben is leírták. A másik két TGF- β altípus ischémiában való érintettsége kevésbé vizsgált. 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 infarktusz terület méretét, 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. A TGF- β -

k az immunsejtek osztódásának, differenciálódásának, aktivációjának és effektív hatásuknak gátlásával védenek az immunrendszer túlműködésének káros hatásaitól fokális ischémiát követően.

4. A központi idegrendszer sejtjeinek válasza fokális ischémiára

Akut ischémia az agyban masszív sejthalálhoz vezet az érintett terület centrális részén, majd egy második fázisban a széli zóna, a penumbra is károsodik. 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. A penumbrában az alapvető sejtfunkciók viszonylagos fennmaradása lehetőséget teremt az idegsejtek megmentésére és túlélésére, ez által a hosszú távú károsodás csökkenthető. Sérülésre és betegségre az asztrociták a központi idegrendszerben reaktív asztroglíózisként meghatározott folyamattal válaszolnak. A penumbra területére eső asztrogliaheg szerepe elsősorban az, hogy gyulladási folyamatok lézió epicentrumán kívüli terjedését megakadályozza, így védve az ép neuronális hálózatokat a károsodásoktól. A mikroglia a központi idegrendszer immunsejtjei, melyek egészséges agyszövetben aktív szenzorok és patológiás esetben sokoldalú effektoros funkcióval rendelkeznek. Agyi ischémia erőteljes gyulladáshoz vezet, mely jelentős génexpressziós változásokkal és az idegrendszer sejtjeinek fenotípus változásaival jár. Agyi sérülést követően a mikroglia sejtek effektor programja gyors változáson megy keresztül, így megváltozik a morfológiájuk, proliferációjuk, továbbá proinflammatorikus faktorokat szabadítanak fel és megnövekszik az immunmoduláló felszíni antigének expressziója.

II. 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 órás és 1 hónapos túléléssel MCAO után in situ hibridizációs hisztokémiával megjelenítve vizsgáltuk. Az mRNS szintjében bekövetkező változásokat denzitometriás, kvantitatív analízissel igazoltuk.
2. Milyen sejttípusok 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 sejttípusok expresszálják a különböző típusú TGF- β receptorokat MCAO után? In situ hibridizációs hisztokémiát immunhisztokémiával kombináltunk, neuronális (NeuN), asztroglialis (S100), mikroglialis (Iba1), endoteliális (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?
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.

III. MÓDSZEREK

A kísérletek során összesen 58 hím Wistar patkányt használtunk (300-450 g, Charles Rivers Laboratories, Magyarország). A kísérletekhez a Semmelweis Egyetem Állatkísérleti Etikai Bizottsága hozzájárult, melyeket az 2010/63/EU állatkísérletekre alkalmazott rendelkezésével összhangban hajtottunk végre.

Kísérleteink során az ischémiás stroke létrehozása céljából széleskörűen alkalmazott intraluminalis technikát módosításokkal használtuk. Az externa és a communis lekötése után szilikonnal bevont monofilamentumot vezetünk fel a carotis communison ejtett metszéssel bevezetve az internán keresztül az artéria cerebri media eredéséig. A monofilamentumot 1 óra múlva távolítottuk el tranziens ischémiánál, viszont permanens esetben a helyén hagytuk. A szükséges túlélési időt követően, az állatok agyát in situ hibridizációs hisztokémiához kivettük és $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on lefagyasztottuk, dupla festés során felhasznált állatokat transzkardiálisan perfundáltuk. A lézió meghatározásának céljából párhuzamos MCAO-s metszeteket TTC festéssel és Nissl festékkel megfestettünk, és a lézionált terület méretét kvantáltuk.

A TGF- β receptorok indukciójának időbeli lefutásának leírása céljából a TGF- β RI, RII, RIII és Alk1 mRNS-eket 24, 72 órás és 1 hónapos túléléssel MCAO után in situ hibridizációs hisztokémiával megjelenítve vizsgáltuk. Az mRNS szintjében bekövetkező változásokat denzitometriás, kvantitatív analízissel igazoltuk.

In situ hibridizációs hisztokémiát immunhisztokémiával kombináltunk, mely során neuronális (NeuN), asztrogliális (GFAP, S100), mikroglialis (Iba1), endotheliális (vWF) és simaizomsejt (α SMA) markereket alkalmaztunk a három TGF- β altípust és a

különböző TGF- β receptorokat expresszáló sejtek azonosítására ischémiás patkány agyszövetben. Az indukciós mechanizmus megismerése céljából 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.

IV. 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 sejtmarkerekkel 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.

1. A TGF- β receptorok indukciójának időbeli lefolyása fokális ischémia után

A TGF- β receptorok nem jelentek meg az infarktált területen belül 24 órával MCAO után, valójában az alacsony expressziós szint is eltűnt. Az expresszió nem változott az ép agyszövetben. A TGF- β RI magasabb expressziós szintje látható a kéreg IV. rétegében, 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.

A legjelentősebb változás az volt 72 órával MCAO után, hogy a TGF- β RI mRNS expressziója megjelent a lézió területén belül. Bizonyos sejtek erőteljesen expresszáltak TGF- β RI mRNS-t. A sejtek eloszlása egyenetlen volt, de általánosan tekintve az egész infarktált területen

belül megjelent. A TGF- β RI mRNS expresszió denzitása a penumbrában szignifikánsan magasabbnak adódott, mint a lézió területén belül. TGF- β RII mRNS szintén indukálódott 72 órával MCAO után. 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. TGF- β RIII mRNS szintje megemelkedett a lézió belül és a penumbrában 72 órával MCAO után. Az emelkedés kevésbé volt kifejezett, mint a többi TGF- β receptor esetében, de azért tisztán megfigyelhető. 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. Az Alk1 mRNS expresszió intenzívebbnek adódott az erek mentén, mint a TGF- β RIII esetében.

A megmaradó, regenerálódó agyszövet magasabb expressziós szintet mutatott TGF- β RI és RII esetében 1 hónapnál, mint 72 órával MCAO-t követően. Érdekes módon a TGF- β RIII mRNS tovább indukálódott a lézió belül és az eloszlása TGF- β RI és TGF- β RII eloszlásához vált hasonlatossá. Ezzel ellentétben az Alk1 jelintenzitás eloszlása 72 órás állapothoz hasonló maradt.

2. A TGF- β fehérjéket expresszáló sejtek típusa MCAO-t követően

TGF- β 1-et expresszáló sejtek azonosítása során 72 órával MCAO után 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. TGF- β 1 sejtek közel 95%-a Iba1 immunreaktív, továbbá kis számban a lézió mellett GFAP-val szintén jelölődött. TGF- β 1 mRNS nem jelent meg NeuN pozitív neuronokban.

TGF- β 2 és - β 3 mRNS-t expresszáló sejtek több mint 80%-a kolokalizált NeuN pozitív sejtekkel, felvetve ezen altípusok neuronális expresszióját. A TGF- β 2-t és - β 3 viszont szinte nincs jelen mikroglia és asztroglia sejtekben.

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 tranziens MCAO után. TGF- β 1-et expresszáló sejtek hasonló eloszlással rendelkeznek ebben az időpontban. 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. Érdekes, hogy a TGF- β 2-t expresszáló sejtek megközelítőleg 75 %-a Hsp70 immunpozitív is volt. A gliális heg 1 hónappal MCAO-t követően jelent meg a lézió körül. A heg szövetet intenzív GFAP immunjelölés rajzolta ki. TGF- β 1-t expresszáló sejtek bőségesen megjelentek a heg szövetben és a lézió területén belül, de szinte teljesen hiányoztak az ép oldalon

3. A TGF- β receptorokat expresszáló sejtek típusa MCAO után

72 órával MCAO után az Iba1 immunhisztokémia és a TGF- β RI és RII mRNS in situ hibridizációs hisztokémia kombinálásával kolokalizációt tapasztaltunk az ischémiás területen belül és a penumbrában. Viszont az ép kéregben a TGF- β RI-t expresszáló nagyszámú sejtek neuronoknak bizonyultak.

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 immunreaktivitással. 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. Mind az S-100 és NeuN immunreaktív sejtek hiányoztak az ischémiás mag területéről. Az Alk1 és a TGF- β RIII expresszió vWF-ral jelölt endotél sejtekhez köthető. Továbbá TGF- β RII szintén expresszáldott endotél sejtekben.

4. A TGF- β fehérjék indukciójának mechanizmusa fokális ischémiát követően

Fos-t expresszáló sejtek jelentek meg a lézióval azonos oldalon végig az agykéregben 24 órával MCAO után, a legintenzívebb expresszió a II. rétegben észlelhető. A lézióval ellentétes oldalon egyáltalán nem jelenik meg Fos immunreaktivitás. Fos-szal ellentétben az ATF-3-mal intenzíven jelölődő sejtek csak a lézió körül jelentek meg. Dupla festést követően sem Fos, sem ATF-3 immunreaktivitást nem észleltünk a TGF- β 1 mRNS-t expresszáló sejtekben. Ezzel ellentétben szinte minden vizsgált TGF- β 2-t expresszáló neuron tartalmazott Fos immunreaktivitást, míg a többi Fos pozitív sejt nem expresszált TGF- β 2 mRNS-t. 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.

V. 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 asztrogliális 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.

VI. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

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

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