

A P2X7 receptor részvétele a központi idegrendszer megbetegedéseinek állatmodelljében

Doktori tézisek

Otrokocsi Lilla

Semmelweis Egyetem

Szentágothai János Idegtudományi Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Kittel Ágnes D.Sc. tudományos tanácsadó

Hivatalos bírálók: Dr. Román Viktor Ph.D. csoportvezető

Dr. Timár Júlia Ph.D. egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Hársing László D.Sc. tudományos tanácsadó

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Miklya Ildikó Ph.D. egyetemi docens

Dr. Tarnawa István Ph.D., csoportvezető

Budapest

2018

1. Bevezetés

Az ATP által közvetített purinerg jelátvitel alapvető fontosságú a sejtek közötti kommunikációban. Patológias folyamatokban vagy sérülés hatására megemelkedik az ATP koncentrációja az extracelluláris térben, ami aktiválja a purin receptorok működését. Az ionotróp P2X7 receptor immunsejteken, neuronokon, asztrocitákon és mikroglia sejteken egyaránt megtalálható. Jellemző tulajdonsága, hogy kizárólag magas ATP koncentráció hozza működésbe, és intenzív aktivációt követően nagyobb méretű molekulákat is áteresztő pórusá alakul át. Elsődleges funkciója, hogy gyulladási mediátorokat szabadít fel, ezzel közreműködik a sejt immunválasz beindításában, emellett aktivációjakor növekszik a reaktív oxigénformák, és pro-apoptikus gének mennyisége, így a receptor hozzájárul a sejtpusztuláshoz, neurodegenerációhoz is. Fontos szerepet játszik más jelátviteli útvonalak modulálásában, mivel aktiválásakor Ca^{2+} áramlik a sejtbe, amit glutamát, majd GABA ürülés követhet. Mindezen folyamatok kapcsán a P2X7 működését számos központi idegrendszert érintő megbetegedés patogenezisével kapcsolatba hozták, mint pl. az Alzheimer- és Parkinson-kór, a depresszió, bipoláris zavar, epilepszia, migrén és skizofrénia. Ezek közül disszertációmban a depresszió tanult tehetetlenség modelljével foglalkoztam. Az autizmus spektrumzavart illetően még nem vizsgálták a P2X7 receptor funkcióját, ezért kísérleteink során arra is választ kerestünk, hogyan reagálnak a P2rx7^{-/-} egerek az autizmus anyai immunaktivációs modelljében. A Parkinson-kór *in vitro* modelljében nem purinreceptorokkal kapcsolatos kísérletet végeztünk, hanem egy új MAO-B gátló hatóanyagot teszteltünk a rotenon-indukálta sejtpusztulással szemben. A major depresszió a népesség jelentős hányadát érintő kedélybetegség, ami levertséggel, fáradtsággal, ingerlékenységgel, a motiváció hiányával, tehetetlenség érzésével, alvászavarokkal, súlyproblémákkal jelentkezik. Ezek a tünetek hosszú távon kihatnak a beteg normális életvitelére, ezzel az egyént érintő pszichés problémák mellett a depresszió igen komoly társadalmi és gazdasági teher. A kezelése során alkalmazott gyógyszerek többsége a monoamin neurotranszmisszióban bekövetkező zavarokat állítja helyre, azonban heteket kell várni a pozitív hatások megjelenéséig, illetve a páciensek nagy részénél egyáltalán nem következik be javulás. Az autizmus spektrumzavar hátterében genetikai faktorok, pre- és perinatális események és környezeti tényezők interakcióját

feltételezik, ami az idegrendszer rendellenes fejlődéséhez vezet. Jelenleg kevés sikeres terápiás lehetőség ismert, többnyire a viselkedési tüneteket próbálják enyhíteni pszichoszociális fejlesztő módszerekkel, súlyosabb esetekben antipszichotikumok adásával. A Parkinson-kór progresszív neurodegenerációval járó krónikus betegség, melyre jellemző a dopaminerg rendszer csökkent működése, ami motoros tünetekhez (bradikinézia, nyugalmi tremor, izom rigiditás) vezet, majd idővel más transzmitter rendszereket is érint a neurodegeneráció, és megkezdődik a páciensek kognitív leromlása. Terápiájaként a dopamin mennyiségét növelik a szervezetben, amit a metabolizmus gátlásával vagy prekursorok adásával érnek el. Mindhárom említett idegrendszeri megbetegedés kezelése elégtelen a jelenlegi formájában, ezért különösen fontos az új gyógyszercélpontok azonosítása.

2. Célkitűzések

Két komplex állatkísérletben, a depresszió tanult tehetetlenség modelljében és az autizmus anyai immunaktivációs modelljében vizsgáltuk, hogyan befolyásolja a P2X7 receptor aktivációja és inhibíciója a betegségek kialakulását, valamint egy *in vitro* Parkinson-modellben végeztünk összehasonlító morfológiai elemzést egy új MAO-B gátló vegyület alkalmazását követően

I. A P2X7 receptor szerepének feltárása a depresszió tanult tehetetlenség modelljében tapasztalható magatartási és idegrendszeri változásokban.

Mivel saját kísérleteink és más csoportok eredményei is igazolták, hogy a P2X7 receptor genetikai és farmakológiai gátlása antidepresszáns fenotípust hoz létre, további kísérleteket végeztünk a fenotípus hátterében álló útvonal megismerésének érdekében. A következő kérdésekre kerestük a választ:

- Hogyan befolyásolja a P2X7 receptor genetikai gátlása a depresszió-jellegű magatartást a tanult tehetetlenség modellben?
- Van-e különbség a két genotípus hippocampális tüskeszinapszis plaszticitásában?
- Hogyan változnak bizonyos szinaptikus markerek (struktúrfehérjék, serkentő receptor alegység) a tanult tehetetlenség modellben?

II. A P2X7 receptor funkciójának vizsgálata az autizmus spektrumzavar anyai immunaktivációs modelljében megjelenő viselkedési, morfológiai és biokémiai változásokban.

Egyre elfogadottabb a terhesség alatti immunaktiváció indukálta neuronális fejlődési zavar elmélete az autizmus spektrumzavar kialakulásával kapcsolatban. Mivel a P2X7 receptor központi szerepet játszik a gyulladási folyamatok szabályozásában, feltételeztük, hogy akár az autisztikus jellemzők létrejöttében is közreműködhet. Az alábbi kérdéseket vizsgáltuk:

- Hogyan hat az anyai immunaktiváció az utódok viselkedésére és az idegrendszerük felépítésére P2rx7^{-/-} egerekben?
- Milyen biokémiai változások követik az anyai immunaktivációt?
- Megelőzhető-e az immunaktiváció hatása a vemhes nőstények P2X7 szelektív antagonistá előkezelésével?
- Ha a felnőtt utódban gátoljuk a P2X7 receptort, elfedhető-e az autista-fenotípus?

III. SZV558 protektív hatása az *in vitro* rotenon-indukálta Parkinson modellben

Dolgozatomban ezen részében nem purinerg receptorral kapcsolatos eredményeket mutatok be, hanem egy új heteroarilalkenil-propargilamin vegyület, az SZV558 hatását vizsgáltuk egy *in vitro* rotenonos Parkinson modellben. Kísérletünk célja a következő volt:

- Kivédi az új vegyület a dopaminerg sejtek pusztulását a szubsztancia nigrában? Hatékonyabb a jelenleg alkalmazott rasagilinnél?

3. Módszerek

3.1 Kísérleti állatok

A depresszió modellben 8-12 hetes P2rx7^{-/-} C57/B16 háttérű egereken és ezek kontrolljaként vad típusú egereken végeztük vizsgálatainkat. Az autizmus modellhez tenyésztő triókat hoztunk létre egy 8-12 hetes hím és kettő, még nem szült 12-14 hetes nőstény összepárosításával. A születendő hím utódok 8-12 hetes kor között vettek részt

kísérletekben. A viselkedésszteszteket az MTA KOKI Viselkedésvizsgáló Egységében végeztük 9-14 óra között. A tanult tehetetlenség modellben az egerek egyesével voltak elhelyezve a kísérlet előtt egy héttel kezdődően. Az *in vitro* Parkinson modellhez 200-220 grammos hím Wistar patkányokat használtunk az MTA KOKI saját tenyészetéből. Minden állatot állandó standard körülmények között tartottunk az állattartó szobákban, 12-12 órás fény-sötét ciklusban, ahol megfelelő mennyiségű és minőségű táplálék és víz folyamatosan rendelkezésükre állt. A kísérleteinket az NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals szerint, az MTA KOKI Állatkísérleti Etikai Bizottságának engedélyével (PEI/001/773-6/2015, PEI/001/778-6/2015, 22.1/3671/003/2008) végeztük.

3.2 A depresszió állatmodellje

3.2.1. Tanult tehetetlenség

A tanult tehetetlenség, angolul learned helplessness modell a depressziós állapot egyik jellemző viselkedési elemét, a kilátástalan helyzetbe való beletörődést veszi alapul. Az állatkísérleteket úgynevezett "shuttle box"-ban végeztük, ami két térfélre osztott plexi falú doboz, az elválasztó falon egy számítógéppel vezérelhető ajtóval, alján fémrácsokkal, melyeken keresztül elektromos ingerlés lehetséges. A tanulási fázis során gyenge áramütéseknek tesszük ki a kísérleti állatokat a zárt térfélben, majd a teszteléskor az ajtó kinyitásával lehetőség nyílik a sokkolás elkerülésére. Ha kialakult a tehetetlen állapot, az egerek nem képesek átmenekülni a sokk-mentes térfélre. A kontroll egerek a tanulás alatt nem kaptak áramütéseket a shuttle boxban, ezért teszteléskor azonnal menekülnek a sokkolás hatására. A teszteléskor 30 próbát végeztünk, majd összesítettük a sikertelen menekülések számát és az átszaladásig eltelt időt.

3.2.2. Elektronmikroszkópos sztereológiai analízis

A tanult tehetetlenség tesztelése után 24 órával perfúziósan fixáltunk 3-3 egeret, majd a kivett agyakból 100 μ m vastag koronális metszeteket készítettünk a dorzális hippokampusz terjedelmében, és öt-öt metszetet beágyaztunk az elektronmikroszkópos munkához. Az ozmium-tetroxidos (0,5%, 30 percig) és uranilacetátos (1%, 30 percig) utófixálást követően felszálló alkohol sorban víztelenítettük a metszeteket, majd epoxi gyantába ágyazva

polimerizáltattuk őket. Apró szövet blokkokat vágunk ki a gyrus dentatus molekuláris régióból, minden metszeten azonos területről (kettőt a felső karéjból, kettőt az alsó karéjból), majd ultravékony sorozatmetszeteket, és elektronmikroszkópos felvételeket készítettünk belőlük. Egymást követő metszeten végeztük a számolást 12000x-es nagyításon, megjelölve az újonnan megjelenő, vagyis csak az egyik felvételen szereplő tüskeszínapszisokat, ezáltal egyik színapszist sem számoltuk kétszer. A megbízható eredmények érdekében a számolást ketten, egymástól függetlenül is elvégeztük.

3.2.3. RT-PCR

A viselkedésteszték után 6 és 24 órával kipreparáltuk P2rx7^{+/+} egerek hippocampusát, majd a mintákat felhasználásig -80°C-os mélyhűtőben tartottuk. Az RNS izolálást a gyártó utasításait követve végeztük az RNeasy Lipid Tissue Mini Kit felhasználásával. Az így kapott RNS minták koncentrációját és integritását a Lab-on-a-chip nanotechnológiai platformon alapuló Agilent 2100 Bioanalyzer készülék segítségével, Agilent RNA 6000 Pico Kit-tel határoztuk meg, szintén a gyártó protokollja szerint. 1 µg RNS-t tartalmazó mintából komplementer cDNS templátot szintetizáltunk AB GeneAmp PCR system 2700 készülékkel, Tetro cDNA Synthesis Kit segítségével, random hexamer primer felhasználásával. A RT-PCR reakcióhoz a cDNS minták koncentrációját Qubit ssDNA Assay kit segítségével határoztuk meg a leírás szerint, majd a megfelelő mennyiségű cDNS templátot TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (2×) No AmpErase® UNG és P2rx7 TaqMan® Gene Expression Assay Mix (20X) hozzáadásával amplifikáltuk. A P2rx7 expresszióját a belső kontroll Gapdh génhez képest határoztuk meg.

3.2.4. Western blot

Western blot analízissel szinaptikus fehérjék (synaptopodin, PSD95) mennyiségi változását követtük a tanult tehetetlenség modellben, P2rx7^{+/+} és P2rx7^{-/-} egerek hippocampusában. A tesztelés után 6 vagy 24 órával kivett hippocampusokat 250 µl lízis pufferben homogenizáltuk, majd centrifugáltuk, és a kapott felülúszókat használtuk fel. A mérés előtt BCA Protein Assay kit-et használva meghatároztuk az egyes minták fehérjetartalmát. SDS-PAGE módszerrel 10%-os gélben elválasztottuk a fehérjéket, transzferáltuk PVDF

membránra, majd ezt a blot-ot inkubáltuk először blokkoló oldatban, majd egy éjszakán át az első antitestet tartalmazó oldatban. TBST-s mosás után a HPR-konjugált második antitestekkel inkubáltunk 2 órán keresztül szobahőn, majd ismételt mosást követően előhívtuk a megfelelő immunreaktív sávokat kemilumineszcencia segítségével, melyeket végül ImageJ szoftverben kvantifikáltunk.

3.2.5. Hippokampális szemcsesejtek vizsgálata

40 µm vastag koronális metszeteken Hoechst 33342 sejtmagfestést végeztünk. A hippocampális szemcsesejtekről 20x-os nagyítású képeket készítettünk, majd egymást követő metszeteken összesítettük a sejtmagok számát. A szemcsesejtek sejtmagja jellegzetes kerek alakjukról könnyen felismerhetőek voltak.

3.2.6. NR2B/GluN2B alegység kvantitatív immunhisztokémiai vizsgálata

60 µm vastag koronális fixált szeleteket permeabilizáltunk pepszines-sósavas oldattal, hogy az NR2B/GluN2B antitest be tudjon jutni a szövetbe. Pufferes mosás után blokkoltuk a nem-specifikus antigén kötőhelyeket, majd a szeleteket az első antitestet tartalmazó TBS oldatban inkubáltuk 24 órán keresztül 4°C-on. TBS-es mosást követően másodlagos fluoreszcens antitesttel inkubáltunk 2 órán át szobahőmérsékleten, majd ismételt mosás után tárgylemezre felhúztuk a metszeteket, és fényvédő médiummal fedtük le őket. A hippocampusról 20x és 60x nagyítással készítettünk képeket, és a festés intenzitását ImageJ programmal kvantifikáltuk.

3.3. Az autizmus állatmodellje

3.3.1. Kísérleti elrendezés - az anyai immunrendszer aktiválása

A terhesség során bekövetkező magzati idegrendszer fejlődési rendellenességét az anyai immunaktivációs modellel hoztuk létre. A vemhesség meghatározott napjain, az embrionális 12,5. és 17,5. napon a nőtény egereket poli(I:C) injekcióval kezeltük intraperitoneálisan, első alkalommal 3 mg/kg dózisban, másodjára 1,5 mg/kg dózisban. A kontroll nőtények fiziológiás sóoldat injekciót kaptak. 8 hetes korban kezdtük elvégezni a viselkedésvizetéseket a hím utódokon, mindig a meghatározott sorrendben (szociális

preferencia, repetitív tisztálkodás, üveggolyó ásás, rotarod). A tesztek után, az állatok 80-90 napos korában feláldoztuk őket további vizsgálatokra. Amikor az anyai vagy magzati mintákra volt szükségünk a vizsgálatokhoz, a vemhességet megszakítottuk a 12,5. vagy 14,5. napon a mintagyűjtéshez. A P2X7 receptor szelektív gátlása JNJ47965567 (JNJ) adásával történt 30 mg/kg dózisban, 30%-os kaptizol oldatban oldva. Az anyai JNJ előkezelés 2 órával a poli(I:C) vagy só injekciót megelőzően történt. Az utódkezeléskor az állatok egyszeri 30 mg/kg JNJ vagy 30%-os kaptizol injekciót kaptak a viselkedéstesztek első napján, a szociális preferencia teszt előtt 1 órával. Az egereket véletlenszerűen osztottuk be az egyes kezelési csoportokba.

3.3.2. Szociális preferencia

A szociális preferencia tesztet három térfélből álló plexi arénában végeztük el, melyben a két oldalsó térfelére egy-egy ketrecet tettünk. Habitúciót követően az egyik ilyen ketrecbe egy ismeretlen fajtársat helyeztünk, míg az ellenkező oldalon levő ketrecet üresen hagytuk. A teszt során megmértük, hogy a teszt állat mennyi időt tölt az idegen fajtárs szimatolásával, valamint az üres ketrec körül, és a kettő hányadosaként adtuk meg a szociális preferenciát.

3.3.3. Repetitív tisztálkodás (self-grooming)

Az állatokat egyenként tiszta, üveg megfigyelőkamrába helyeztük és viselkedésüket videokamerával rögzítettük 10 percen keresztül. A tesztet követően manuális elemzést végeztünk, melyben két, egymást kizáró cselekvést rögzítettünk: amikor az állat tisztálkodik (grooming) és amikor bármi mást csinál (non-grooming).

3.3.4. Üveggolyó ásás (marble burying)

Szintén a repetitív viselkedési formákhoz tartozik az üveggolyók eltemetése, melynek vizsgálatához üveggolyókat tettünk a tiszta alom felszínére egyenletesen elosztva, majd óvatosan a ketrecbe helyeztük az állatokat. 10 perc elteltével kivettük a kísérleti állatot és megszámloltuk az elásott (legalább 50%-ban befedett) üveggolyókat.

3.3.5. Rotarod teszt

Az állatok mozgáskoordinációját és egyensúlyérzékelését rotaroddal, vagyis fokozatosan gyorsuló forgó rudakon teszteltük. Az első két napon az egerek feladathoz szoktatása, tanítása zajlott. Ilyenkor lassú fordulatszámú mozgó rudakon kellett fennmaradniuk minimum 30 másodpercig. A tréninget egy nap egymás után háromszor megismételtük, amelyik állat a második nap végére sem tudta megtartani a rúdon az egyensúlyát a minimum ideig, azokat kizártuk a kísérletből. A harmadik és negyedik napon 4x5 percig teszteltük az állatok mozgáskoordinációját a fokozatosan gyorsuló forgó rudakon, az egyes ismétlések között 45 perc szünettel. A leesési látencia értékeket másodpercben fejeztük ki, és összesítettük a 2 nap négy-négy ismétlését.

3.3.6. Exploráció nyílt térben (open field)

Négyzet alapú arénában 10 percig vizsgáltuk az egerek alap lokomotoros viselkedését. A kísérleti állatokat a tér közepére helyeztük, és habituáció nélkül felvettük a mozgásukat, majd megkaptuk az egér által bejárt út hosszát centiméterben kifejezve.

3.3.7. Kisagyi Purkinje sejtek kvantitatív immunhisztokémiai vizsgálata

A viselkedésteszték után 3-3 állatot véletlenszerűen kiválasztottunk az immunfestéshez. Perfúziósan fixált agymintákból 50 μm vastag parasagittalis metszeteket készítettünk a kisagy vermisz területén. A blokkolást követően a Purkinje sejteket specifikusan jelölő calbindin elsődleges antitesttel kezeltük a mintákat 4 °C-on 24 órán keresztül, majd alapos pufferes mosást követően másodlagos fluoreszcens antitesttel inkubáltunk szobahőmérsékleten 2 órán át. Végül a metszeteket tárgylemezre felhúztuk, lefedtük a fluoreszcens festést védő folyadékkal és fedőlemezzel. 20x nagyítással felvételt készítettünk a kisagy VII. lebenyéről, majd a jelölt sejtmagokat megszámláltuk és az ImageJ programmal meghatároztuk a lebeny hosszát, így a Purkinje sejtek számát sejt/mm egységben fejeztük ki.

3.3.8. Szinaptoszóma preparátumok

Dekapitálást követően egész agyból készítettük a szinaptoszóma frakciót. A mintákat szukróz oldatban homogenizáltuk, majd centrifugálást követően a felülúszót tiszta centrifugacsőbe mértük és újból centrifugáltuk. Az így nyert P2-es pelletet 45%-os Percoll-Krebs oldatba vettük fel, majd ismét centrifugáltuk. Ezt követően az oldat tetején képződő szinaptoszómában gazdag réteg alól egy fecskendővel kiszívtuk a Percoll oldatot, és az így nyert szinaptoszóma frakciót még kétszer Krebs oldattal átmostuk, majd fixáló oldatot mértünk az üledékre. A mintákat beágyaztuk elektronmikroszkópos vizsgálathoz (mint a 3.2.2. fejezetben), majd ultravékony metszeteket, és 20000x vagy 30000x nagyításon felvételeket készítettünk belőlük. A szinaptoszómák számolását manuálisan végeztük, a kezelési csoportokat csak az összesítés után fedtük fel.

3.3.9. Magzati agykéreg fejlődési zavara

48 órával az első poli(I:C) kezelést követően az embriók agyát immerziósan fixáltuk, majd pufferes mosást követően krioprotektív oldatba tettük. Kriosztáttal 20 µm vastag metszeteket készítettünk, majd immunfestést végeztünk rajtuk. Ehhez a rehidratált mintákon 100 mM Na-citráttal feltártuk az antigén-kötőhelyeket 65 °C-on 30 percig, majd blokkolást követően elsődleges antitestekkel (SATB2, TBR1) inkubáltuk a metszeteket 4 °C-on másnapig. Pufferes mosást követően a másodlagos antitestekkel és a sejtmag jelölővel inkubáltuk a metszeteket 1 órán át szobahőmérsékleten, végül háromszori mosás után lefedtünk a metszeteket fényvédő médiummal és fedőlemezzel, majd 20x-os nagyításon képeket készítettünk a fejlődő agykéregről. A TBR1 festés intenzitását a kortikális lemezben az ImageJ szoftver segítségével hasonlítottuk össze az egyes kezelési csoportok között.

3.3.10. Citokinek Multiplex bead array analízise

A vemhes nőstényeket a 12,5. napon történő poli(I:C) vagy só injekciót követően 2 órával izofuránnal bealtattuk, majd vért vettünk tőlük 50 µl Na-citrát-ot tartalmazó fecskendővel. Ezt követően az embriókat gyorsan kivettük és az agyat tartalmazó koponyarészt eppendorf csövekben szárazjégre tettük. Az anyai vérmintákat centrifugáltuk, hogy felülúszóként

megkapjuk a vérplazmát. Az embriókból származó agymintákat proteáz-inhibitorral tartalmazó lízis pufferben homogenizáltuk, centrifugáltuk, és a felülúszó mintákat használtuk a citokinek mérésére. A gyulladásos mediátorok (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α és KC) koncentrációjának mérése BD FACSVersé áramlásos citométerrel, Cytometric Bead Array Kit használatával történt, a kapott adatokat pedig az FCAP Array v5 Software segítségével analizáltuk. Az egyes agyminták citokin koncentrációit a minták fehérje-tartalmára vonatkoztatva adtuk meg, melyet BCA Protein Assay Kit használatával állapítottunk meg.

3.3.11. HPLC analízis

2 órával a 12,5. napon beadott poli(I:C) injekciót követően mintákat gyűjtöttünk HPLC analízishez. Izofurános altatás alatt vért vettünk a vemhes nőstények alsó üres vénájából 50 μ l K-citrát tartalmú fecskendővel, majd gyorsan kiperaráltuk az embrió agyakat. A vérmintákat 15 percig jeges vízfürdőben inkubáltuk, majd centrifugálási lépésekkel eltávolítottuk a sejteket és vérlemezkéket. Az így kapott plazma mintához 4 M-os perklórsav oldatot adtunk, amely 100 μ M teofilint (belső standard) tartalmazott. A fehérje precipitátumot centrifugálással távolítottuk el, majd semlegesítettük a felülúszót 4 M K₂HPO₄ oldattal. Az embrióagy mintákat folyékony nitrogénben azonnal lehűtöttük, mértük a tömegüket és jéghideg 0,1 M perklórsav oldatban ultrahanggal homogenáltuk, majd a fehérje csapadékot centrifugálással távolítottuk el. A homogenáló oldat 10 μ M teofilint és 0,5mM nátrium-metabiszulfidot tartalmazott. A szöveti felülúszót 1 M KOH-val semlegesítettük, a keletkezett kálium-perklorátot ismételt centrifugálással távolítottuk el. A szöveti csapadékból fehérje tartalmat mértünk. Shimadzu LC-20 AD szoftver vezérelt kromatográfiás rendszert használtunk a minták tartalmi vizsgálatához. A minták dúsítása és tisztítása Discovery HS C-18 töltött oszlopon, online SPE column-switching technika alkalmazásával történt. A komponensek szeparálására Discovery HS C-18 analitikai oszlopot használtunk. Az adenin nukleotidok, adenzin és a teofilin belső-standard mennyiségi meghatározására UV detektort használtunk, a jellemző elnyelési (253 nm) hullámhosszon. A katekol- és indolaminok mérése BAS típusú, 730 mV polarizáló

feszültségen amperometriás detektálással történt. A mennyiségi meghatározást két pontos, belső-standard módszerrel validáltuk.

3.4. A Parkinson-kór *in vitro* modellje

3.4.1. Dopaminerg neuronok jelölése a szubsztancia nigrában

Az *in vitro* modellhez a patkányokat dekapitáltuk, majd az agyakat jégen kettévágtuk és a két féltékét külön-külön csoportként használtuk fel. A frontális és kaudális agyrészeket eltávolítottuk, csak a szubsztancia nigrát tartalmazó szövetblokkal dolgoztunk tovább. Öt különböző kezelést alkalmaztunk: kontroll, rotenon, rotenon + H₂O₂, rotenon + H₂O₂ + rasagilin, SZV558 (100 nM). A kontroll mintákat Krebs oldatban inkubáltuk 60 + 120 percig 37°C-on. A következő csoportot 10 µM rotenonnal inkubáltuk a 60 perc alatt, majd tisztán Krebs oldatot áramoltattunk át 120 percig. A rotenon + H₂O₂ csoportba tartozó agyszövetet a 60 perc rotenonos inkubálás után 70 percig Krebs-oldattal perfuzáltuk, majd 50 percig H₂O₂-t tartalmazó Krebs oldattal folytattuk a perfúziót. A rotenon + H₂O₂ + rasagilin és rotenon + H₂O₂ + SZV558 kezelések esetén a 60 perc rotenonnal történő inkubációt követően 50 percig Krebs-oldattal mostuk a blokkokat, ezt követte 20 perc 100 nM rasagilin/SZV558 perfúzió, végül pedig H₂O₂ és 100 nM rasagilin/SZV558 tartalmú oldatot áramoltattunk 50 percig. Az *in vitro* kezeléseket után az agyakat másnap reggelig immerziósan fixáltuk, majd pufferrel átmostuk. A szubsztancia nigrát tartalmazó középagyi területből 40 µm vastag koronális metszeteket készítettünk, majd 10 egymást követő szeletet használtunk az immunfestéshez. Az endogén, nem specifikus peroxidáz enzimeket H₂O₂-t tartalmazó metanol oldattal gátoltuk 20 percen át szobahőmérsékleten. Blokkolást követően a metszeteket anti-tirozinhidroxiláz antitestben inkubáltuk egy éjszakán keresztül. Háromszori mosás után az ImmPRESS univerzális másodlagos antitestjét és a hozzá tartozó ImmPACT DAB kromogént alkalmaztuk a felhasználói kézikönyv utasításai szerint. Minden metszeten ugyanarról a területről készítettünk felvételt 40x-es nagyításon, majd a jelölt sejtesteket egymástól függetlenül ketten is megszámláltuk manuálisan, a Panoramic Viewer 1.15.4 program jelölő funkcióját használva.

4. Eredmények

4.1. A P2X7 receptor szerepe a depresszió tanult tehetetlenség modelljében

4.1.1. P2rx7^{-/-} egerek antidepresszáns viselkedési fenotípust mutatnak

A depresszió-szerű állapotot a tanult tehetetlenség paradigma segítségével hoztuk létre és tanulmányoztuk vad típusú és P2rx7^{-/-} egereken. A P2rx7^{+/+} genotípusnál kialakult a tanult tehetetlenség, az elkerülhetetlen áramütések statisztikailag szignifikánsan befolyásolták az egerek menekülési reakcióját, megnövelve az elbukott próbák számát, valamint a sikeres menekülésig eltelt időtartamot. P2rx7 hiányos egerek esetében a sikertelen próbák száma nem sokkal maradt el a vad típusú kezelt csoport átlagához képest, azonban a kontroll génkiütött egereknél is hasonlóan magas értékeket kaptunk. A menekülésig eltelt időben sem tapasztaltunk szignifikáns különbséget a két csoport között. Ezért megállapítottuk, hogy az elkerülhetetlen áramütéseknek nincs hatása a P2rx7^{-/-} egerek viselkedésére. Az esetükben tapasztalt magas értékektől függetlenül nem beszélhetünk a tanult tehetetlenség kialakulásáról, mivel a teszteléskor alkalmazott áramütés intenzitását növelve bizonyítottuk, hogy a P2rx7^{-/-} egerek is képesek reagálni a stresszre.

4.1.2. Tüskeszínapszis sűrűség változása a modellben

A tanult tehetetlenség tesztelése után 24 órával a vad típusú egerek esetében jelentősen lecsökkent a tüskeszínapszis sűrűség a sokkolások hatására a kontroll csoportból származó mintákhoz képest. Megfigyelhető a naiv mintákhoz képest is egy nagy mértékű csökkenés, ami azzal magyarázható, hogy tesztelés során mindkét csoport stresszhatásnak volt kitéve. P2rx7^{-/-} egereknél a viselkedés tesztben kapott eredményekhez hasonlóan a sztereológiai összehasonlítás sem hozott különbséget az egyes csoportok között. Ezzel az eredménnyel megerősítettük az eddig tapasztaltakat, miszerint a P2X7 receptor hiányában a depresszió-szerű állapotra jellemző változások nem következnek be a kísérleti állatainkban.

4.1.3. Szemcses sejtek mennyisége azonos a kezelést követően

Mivel a szemcses sejtek proximális dendritjein vizsgáltuk a tüskeszínapszokat, ezért a sejtek számát is összevetettük. Azonban a tanult tehetetlenség modell nem okozott sejtpusztulást

egyik genotípusnál sem, tehát a tüskeszínapszis sűrűség lecsökkenése nem ennek következtében történt.

4.1.4. A tanult tehetetlenséget követően downregulálódik a P2rx7 expresszió

A tanult tehetetlenség tesztelését követően real-time PCR technikával vizsgáltuk a P2rx7 mRNS jelenlétét és időfüggő mennyiségi változását a hippocampusban. A mintavételezés a tesztet követő 6. és 24. órában történt. Az első mért időpontban a P2rx7 mRNS expressziójának csökkenését tapasztaltuk a sokkolás következtében, ami post hoc teszttel szignifikáns különbségnek bizonyult. Ezt követően, 24 óra elteltével már nem láttunk csoportok közti különbséget a P2rx7 mRNS expresszió szintjében.

4.1.5. Szinaptikus markerek Western blot analízise

A szinaptopodin fehérje hippocampális mennyisége szignifikánsan kevesebb volt a vad típusú sokkolt egerek csoportjában a viselkedéstesztet követően 6 órával. Ehhez képest a P2rx7^{-/-} egerek hippocampusában jelentősen alacsonyabb szinaptopodin szintet mértünk a vad típusú kontrollhoz képest, azonban a kezelés nem befolyásolta a fehérje mennyiségét. 24 óra elteltével a P2rx7^{+/+} sokkolt csoportban még mindig szignifikánsan alacsonyabb értéket találtunk, mégha kisebb különbséggel. A kezelés hatását ekkor sem tapasztaltuk a P2rx7^{-/-} egerekben, mindkét csoport a vad típusú kontrollhoz hasonló fehérje mennyiséget mutatott. Ezt követően a PSD95 fehérjét analizáltuk, azonban ezt a szinaptikus markert nem befolyásolta a tanult tehetetlenség kialakulása egyik genotípusban sem.

4.1.6. Tanult tehetetlenség nincs hatással a NR2B/GluN2B alegységre

Az NR2B/GluN2B receptor alegységnek nincs szerepe a tehetetlen állapot kialakulásában, mivel nem tapasztaltunk változást a hippocampális festés intenzitásában. Azonban megerősítettük a korábban már megfigyelt genotípusos különbséget, miszerint a génkiütött egerek hippocampusában nagyobb intenzitással jelenik meg az NR2B/GluN2B immunjelölés.

4.2. A P2X7 receptor közreműködése az anyai immunaktivációs autizmus modellben

4.2.1. P2X7^{+/+} és P2rx7^{-/-} egerek fenotípusának összehasonlítása

A vad típusú egereknél poli(I:C) hatására eltűnt a szociális preferencia, nem volt különbség a fajtárs vagy az üres ketrec szimatolásának időtartamában. A P2rx7^{-/-} egerek szociális viselkedésében nem találtunk kezelés függő különbséget. Az állatok repetitív viselkedéseit tanulmányozva megfigyeltük, hogy a poli(I:C) kezelés növeli a tisztálkodással töltött időt és az elásott üveggolyók számát P2rx7^{+/+} egerek esetében, míg a P2rx7^{-/-} génkiváltott társaiknál nem volt jelentős különbség a kezelési csoportok között. Vad típusú egerek mozgáskoordinációját lerontotta a poli(I:C) injekció, azonban a P2rx7^{-/-} genotípusra nem volt hatással ebben a tesztben sem. Az alap lokomóciót a várakozásoknak megfelelően nem befolyásolta az immunaktiváció. A poli(I:C)-vel kezelt utódoknál szignifikáns mértékű Purkinje sejtvesztést tapasztaltunk a kisagyban a kontroll csoportban mért sejtsűrűséghez képest. Hasonlóképpen a P2rx7^{-/-} egereknél is megfigyeltünk a poli(I:C) kezelést követő sejtszám csökkenést, de kisebb mértékű volt a különbség, mint a P2rx7^{+/+} genotípusnál. A károsodott szinaptoszómák aránya vad típusú kontroll állatoknál közel 20% volt, míg a poli(I:C)-vel kezelt egereknél közel egyenlő arányban találtunk normál és károsodott szinaptoszómákat. Érdekes eredmény, hogy a P2rx7^{-/-} csoportoknál hasonló mértékben voltak sérült szinaptoszómák, mint sértetlenek, függetlenül az anyai kezeléstől. A vad típusú nőstények vérplazmájában a poli(I:C) kezelés szignifikánsan növelte az IL-1 α és KC mennyiségét, az IL-6 esetében pedig robosztus indukciót tapasztaltunk. A P2rx7^{-/-} egereknél szintén látható volt szignifikáns poli(I:C) indukálta IL-6 és KC aktiváció, azonban a vad típusnál mérténél sokkal kisebb intenzitással. A magzati agyban, hasonlóan az anyai vérplazmához, az IL-6 és a KC mennyisége is emelkedett a poli(I:C) hatására a vad típusú embriók esetében. A poli(I:C) injekció az ATP-t is indukálta P2rx7^{+/+} anyai vérplazmában és az embrionális agymintákban egyaránt. P2rx7^{+/+} egerekben a fejlődő kortikális lemezében a TBR1 mennyisége szignifikánsan lecsökkent az immunaktiváció követően, míg a P2rx7^{-/-} csoportoknál egyenletes intenzitást tapasztaltunk a kezeléstől függetlenül.

4.2.2. P2X7 antagonistá előkezelés hatása

A vemhes nőstényeket P2X7 szelektív JNJ antagonistával kezeltük, egyszeri 30 mg/kg dózisban, 2 órával a poli(I:C) injekciót megelőzően. Ez az előkezelés elegendő volt a poli(I:C) kezelés hatásának blokkolásához. A viselkedésszettekben nem alakult ki szociális deficit, nem tapasztaltunk fokozott repetitív viselkedést, és az egerek mozgáskoordinációja is zavartalan volt. A JNJ kezelés megakadályozta a Purkinje sejtek pusztulását, illetve az abnormális szinaptoszómák arányának eltolódását. A citokinek mennyiségében is változásokat mértünk, pl. az IL-6 indukciója sokkal visszafogottabb volt a poli(I:C)-t megelőző antagonistá kezelés esetében, hasonlóképpen a génkiütött állatokban tapasztalt eredményekhez. Ez a hatás az anyák vérplazmájában és az embriók agyában is egyformán alakult. A P2X7 receptor farmakológiai blokkolása kivédte a poli(IC) okozta agyi fejlődési zavarokat, nem találtunk különbséget a kortikális lemez TBR1 jelölésében.

4.2.3. Posztnatális utódkezelés P2X7 antagonistával

A felnőtt utód egerek egyszeri JNJ injekció kezelése elfedte a korábbi poli(I:C) indukálta jellemzőket: ismét megfigyelhető volt a szociális preferencia, a kontrollal megegyező ideig tisztálkodtak, ugyanannyi üveggolyót temettek be az alomba, és nem tapasztaltunk egyensúlybeli problémákat sem. A JNJ utódkezelés a poli(I:C) által kiváltott kisagyi neuron csökkenést és a szinaptoszómák szerkezetét is normalizálta.

3. SZV558 protektív hatása rotenon-indukálta *in vitro* Parkinson modellben

Patkány szubsztancia nigra tartalmazó szöveti blokkban sejtpusztulást indukáltunk *in vitro* rotenon kezeléssel, melynek következtében a dopaminerg sejtek mintegy 40%-a eltűnt. A sejtpusztulás kivédéséhez rasagilinnel, illetve egy újonnan szintetizált MAO-B gátló hatású vegyülettel, az SZV558-cal kezeltük az agymintákat a rotenonos inkubálást követően. A rasagilin kezelés nem volt hatásos a kísérletben, a tirozinhidroxiláz pozitív sejtek nagy mértékben károsodtak. Azonban az SZV558 vegyület teljesen kivédte a rotenon hatását, a kontroll csoporthoz képest egyáltalán nem alakult ki sejtpusztulás.

4. Következtetések

Kutatásaink során három központi idegrendszert érintő kórkép állatmodelljén dolgoztam: a depresszió tanult tehetetlenség modellje, az autizmus anyai immunaktivációs modellje, illetve *in vitro* rotenon kezeléssel kiváltott, Parkinsonra jellemző károsodások. Vizsgálatainkkal az első két modellben a purinerg P2X7 receptor közreműködésére kerestünk bizonyítékokat, míg a Parkinson-kór modelljében egy új MAO-B gátló vegyület védő szerepét teszteltük. Eredményeinkkel a következőket igazoltuk:

- ✓ Korábbi tanulmányainkkal összhangban egy komplex depresszió modellel is demonstráltuk a P2rx7^{-/-} egerek antidepresszáns fenotípusát. Vad típusú társaikkal ellentétben a kivédhetetlen áramütések nem váltottak ki tanult tehetetlenséget a receptor hiányos állatoknál. Enyhén magasabb intenzitású sokkolással a kapott magasabb alapértékek eltűntek, továbbra sem mutatva különbséget a kontroll és kezelt csoportok között. A P2rx7^{-/-} egerek valóban rezisztensebbek a stresszre, de képesek reagálni rá.
- ✓ A tehetetlen állapot kiváltása downregulálta a P2rx7 mRNS expresszióját, tehát a modellünk és a P2X7 receptor aktivációja kapcsolatban áll egymással.
- ✓ Depressziós pácienseknél és állatkísérletekben is megfigyelhető a szinaptikus kapcsolatok pusztulása, azonban a P2rx7 génkiütött egerek ellenállóak a hippocampális tüskeszinapszisok elvesztésével szemben. Fehérje szinten sem mutattunk ki változást a szinaptikus plaszticitásban, nem találtunk eltérést a tüskeszinapszisokra, dendrittüskékre specifikus szinaptopodin marker mennyiségében. Ezzel tovább erősítettük a P2X7 receptor aktiváció szerepét a depressziós állapot és a jellegzetes tünetek kiváltásában.
- ✓ Vizsgáltuk az egyik glutamáterg receptor alegység érintettségét is a modellben, azonban úgy tűnik, hogy a tanult tehetetlenség nincs hatással az NR2B/GluN2B hippocampális expressziójára. A korábban kimutatott genotípusos különbséget, miszerint a P2rx7 génkiütés következtében magasabb a NR2B/GluN2B intenzitása viszont sikerült visszakapni.

- ✓ Kísérleteinkkel bemutattuk, hogy a P2X7 receptor aktív működése szükséges az immunaktivációval kiváltott autisztikus tünetek megjelenéséhez az utódokban. Akár genetikai inhibícióval, vagy antagonistá adásával gátoltuk a receptort, az utódoknál nem alakultak ki az autizmusra jellemző viselkedési változók és morfológiai eltérések.
- ✓ Poli(I:C) injekció hatására fokozódik a nukleotidok mennyisége az anyai vérben és a magzatok agyában egyaránt, mely vegyületek a purinerg neurotranszmisszió, így a P2X7 receptor aktivációjához szükséges endogén ligandok.
- ✓ P2rx7^{-/-} anyai vérben a vad típusú állatokban mérthez képest mérsékelt IL-6 és KC emelkedést tapasztaltunk, a magzati agyban pedig egyáltalán nem emelkedtek ezek az immunmediátorok. Hasonló eredményt kaptunk a receptor farmakológiai blokkolásakor is. P2X7 receptor működésének hiányában nem indul be elégséges mértékben az autisztikus fenotípus létrehozásáért felelősnek tartott immunaktiváció.
- ✓ A magzati agykéreg fejlődése nem tér el rendellenes irányba, a génkiütés és JNJ injekció is kivédi a neuronális progenitor marker TBR1 mennyiségét a kortikális lemezben. Ennek hátterében szintén állhat az előző pontban említett megfigyelés, miszerint a citokinek mennyisége nem ért el patológiás mértéket, így folytathatták normál neurotrofikus hatásukat, nem befolyásolva az idegsejtek fejlődését.
- ✓ *In vitro* modellezve a rotenon és az oxidatív stressz hatását a szubsztancia nigra dopaminerg neuronjaira kimutattuk, hogy a sejtpusztulás nagy mértékben kivédhető egy új heteroarilalkenil-propargilamin vegyület, a MAO-B gátló hatású SZV558 adagolásával. A szer hatékonyabbnak bizonyult a széles körben alkalmazott razagilinnél, ezzel új terápiás lehetőséget teremtve a Parkinson-kór kezelésében.

Saját publikációk

Az értekezés témájában megjelent közlemények:

1. **Otrokocsi L**, Kittel Á, Sperlág B.: *P2X7 Receptors Drive Spine Synapse Plasticity in the Learned Helplessness Model of Depression* (2017) *Int J Neuropsychopharmacol* 20(10):813-822. doi: 10.1093/ijnp/pyx046.
2. Baranyi M, Porceddu PF, Göloncsér F, Kulcsár S, **Otrokocsi L**, Kittel Á, Pinna A, Frau L, Huleatt PB, Khoo ML, Chai CL, Dunkel P, Mátyus P, Morelli M, Sperlág B.: *Novel (Hetero)arylalkenyl propargylamine compounds are protective in toxin-induced models of Parkinson's disease* (2016) *Mol Neurodegener* 11:6. doi: 10.1186/s13024-015-0067-y

Az értekezés témájában bírálat alatt álló közlemény:

1. Horváth G*, **Otrokocsi L***, Bekő K, Baranyi M, Kittel Á, Sperlág B.: *Maternal and offspring P2X7 receptors drive autism-like behavior in mice* (2018) *Biological Psychiatry*
* Megosztott első szerzőség

Egyéb publikációk:

1. Beamer E, Göloncsér F, Horváth G, Bekő K, **Otrokocsi L**, Koványi B, Sperlág B.: *Purinergic mechanisms in neuroinflammation: An update from molecules to behavior* (2016) *Neuropharmacology* 104:94-104. doi: 10.1016/j.neuropharm.2015.09.019.
2. Lőrincz ÁM, Timár CI, Marosvári KA, Veres DS, **Otrokocsi L**, Kittel Á, Ligeti E.: *Effect of storage on physical and functional properties of extracellular vesicles derived from neutrophilic granulocytes.* (2014) *J Extracell Vesicles* 3:25465. doi: 10.3402/jev.v3.25465.