

**STRESSZ INDUKÁLT VÁLTOZÁSOK VIZSGÁLATA ALZHEIMER – KÓR  
PATOMECHANIZMUSÁBAN SZEREPET JÁTSZÓ GÉNEK  
TRANSZKRIPCÍÓJÁBAN ÉS TRANZLÁCIÓJÁBAN**

Ph.D. értekezés téziseinek összefoglalója

**Sántha Petra**

Szegedi Tudományegyetem  
Általános Orvostudományi Kar  
Pszichiátriai Klinika  
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

Témavezetők:

**Dr. Pákáski Magdolna, M.D., Ph.D.**  
**Prof. Kálmán János, M.D., Ph.D., D.Sc.**

SZEGED

2014

## 1. BEVEZETÉS

A stressz egy ingerre adott válaszreakció a szervezet részéről, mely különböző élettani változásokat idéz elő. Egyes stresszhelyzetek jobb teljesítményre sarkallnak és hozzájárulnak a pozitív érzelmi és szellemi fejlődéshez. Ezzel szemben a többszörösen ismétlődő, negatív hatások következményeként a stressz növeli a különböző betegségek, mint például a magas vérnyomás, a cukorbetegség és az érlemeszesedés kialakulásának kockázatát. Az elmúlt években egyre több irodalmi adat igazolta, hogy a stressz egyike az Alzheimer – kór (AK) patogenezisében szerepet játszó exogén tényezőknek. Epidemiológiai vizsgálatok bizonyították, hogy a különböző stresszhatások több mint kétszeresére növelik az AK kialakulásának rizikóját. E mellett a depresszió és az AK komorbiditása sem ritka. Azoknál a betegeknél, akik hajlamosak a depresszióra gyakrabban figyelhető meg kognitív hanyatlás és az AK is gyakoribb.

A tanulási folyamatok romlásában fontos szerepet játszanak a stresszhatást követő morfológiai változások, mint például a dendrittüskék valamint a szinapszisok számának a csökkenése az agy kortikális és hippokampális régióiban. A dendrittüskék számának csökkenése megfigyelhető AK – ban is, mely korrelál a mentális leépüléssel. A dendrittüskék fő citoskeletális komponense a  $\beta$  – aktin, melynek szabályozásában az aktin depolimerizáló faktor (ADF)/kofilin családba tartozó kofilin fontos szerepet játszik. A neurodegeneratív folyamatok az aktin citoskeleton átrendeződéséhez vezetnek és a kofilin – aktin pálcák kialakulását eredményezik.

Az AK jellemző neuropatológiai sajátossága az extracellulárisan megjelenő amyloid plakkok (AP) és az intracelluláris neurofibrilláris kötegek (NFT). Az AP fő komponense a  $\beta$  – amyloid peptid, mely az amyloid prekursor protein (APP) kóros hasításának terméke. A keletkező amyloid peptid  $\beta$  – lemez – konformációt vesz fel,

mely aggregációra hajlamosít és a szinapszisok funkcionális károsodását illetve a sejtek degenerációját eredményezi. Az intracelluláris NFT – ket hiperfoszforilált tau építi fel. A tau a mikrotubulus – asszociált protein (MAP) család tagja, mely fiziológiásan fontos szerepet tölt be a neuron növekedésben és az axonális transzportban. Kóros esetben ez a fehérje hiperfoszforilálódhat, mely celluláris transzportfolyamatok sérüléséhez valamint a neuronok pusztulásához vezet. A tau foszforilálásáért többek között az általunk vizsgált mitogén – aktivált protein – kináz – 1 (MAPK – 1) enzim a felelős.

A stresszre adott válaszreakció eltérő nők és férfiak esetében. A nőknél kétszer gyakoribb a pszichiátriai betegségek valamint az AK megjelenése. Egyre több irodalmi adat bizonyítja, hogy a hormonális különbségek csak részben felelősek a különböző stressz – válasz megjelenéséért. A nemi különbségek mellett a stresszre adott válasz függ a stressz típusától és időtartalmától. Az ideális állatmodell képes reprodukálni a stresszválaszt és a betegség teljes lefolyását, így esett a választás az általunk használt négy stressztípusra.

Bár az elmúlt években számos vizsgálat történt a depresszió és demenciák közötti biokémiai kapcsolat tisztázására vonatkozóan, még mindig vannak megválaszolatlan kérdések. Az alkalmazott stressz modellek által kiváltott citoskeletális és az AK patomechanizmusában szerepet játszó APP és MAPK – 1 gének transzkripciós és translációs változásainak összehasonlítása lehetőséget nyújt egy érzékeny rendszer megismerésére, melynek fontos szerepe lehet egyes stressz – indukálta pszichiátriai betegségek, mint például a depresszió és az AK kialakulásában.

## 2. CÉLKITŰZÉS

Munkánk célja annak vizsgálata volt, hogy a különböző kísérletes stressz modellek miként befolyásolják az AK – ra jellemző jellegzetes neuropatológiai változások háttérében álló folyamatokat. Ennek megismerése érdekében célkitűzéseink a következők voltak:

1. Széles körben használt négy stressz modellben bekövetkező citoszkeletális rendszer fő alkotóinak ( $\beta$  – aktin és kofilin) transzkripciós és translációs változásának összehasonlítása.
2. Az AK kórjelző MAPK – 1 gén és fehérje vizsgálata a négy különböző stressz – típus hatása.
3. Az AK patomechanizmusában szerepet játszó APP mRNS és fehérje lehetséges változásának vizsgálata a különböző stressz modellekben.
4. Az akut és krónikus stresszválasz tanulmányozása a vizsgált gének és fehérjék transzkripciós és translációs változása során.
5. Az egyes agyi területek stressz – érzékenységének vizsgálata.
6. Nemek közti különbség és a stressz együttes hatásának tanulmányozása az aktin citoszkeleton és annak szabályozására

### 3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

#### 3.1. Vizsgálati csoportok

A kísérlet során felnőtt Wistar patkányokat (200 – 300 g; n = 6 – 10/ csoport) a szakirodalomban gyakran használt immobilizáció (RS), elektromos talp – sokk (EFFS), erőltetett úsztatás (FSS), pszichoszociális stressz (PSS) kezeléseknak tettük ki. Minden stressz eljárás során az állatokat 5 csoportba osztottuk. A kontroll csoport (1. csoport) semmilyen stressz kezelésben nem részesült. A stressznek kitett állatok (2., 3., 4. és 5. csoport) akut (3 nap) és krónikus (7, 14 és 21 nap) stressz kezelést kaptak. Az utolsó kísérleti napot követően az állatokat elaltattuk, majd hideg fiziológiás sóoldattal történő transzkardiális perfúzió után mindkét hemiszfériumot eltávolítottuk és mintát vettünk a frontális kortexből és a hippocampusból, amelyeket felhasználásig -80°C – on tároltuk.

#### 3.2. Stressz modellek

##### 3.2.1. Immobilizációs stressz

A stresszkezelés során Pitman és mtsai (1988) által leírt protokollt használtuk. Az állatokat napi 5 órán keresztül (8:00 – 13:00 között), 25 – 30 cm hosszú, 10 cm átmérőjű műanyag csövekben tartottuk élelem és víz nélkül.

##### 3.2.2. Elektromos talp – sokk

Az elektromos talp – sokk stressz kezeléskor a patkányok akut (1 mA áramerősség, 750 ms ideig, 20 sec szünet, 3 napig) és krónikus (0,6 mA áramerősség, 2 sec ideig, 30 sec szünet, egymást követő 7, 14 és 21 nap) stresszhatásnak voltak kitéve, a korábban Tsukada és mtsai. (2003) és Robbins és Ness (2008) által leírt protokollnak megfelelően.

### 3.2.3. *Erőltetett úsztatás*

Porsolt és mtsai. (1978) által leírt erőltetett úsztatás stressz modell alkalmazásakor az állatokat egy 23°C – os vízzel teli műanyag hengerbe (45 cm magas, 19,4 cm átmérőjű) helyeztük 10 percig.

### 3.2.4. *Pszichoszociális stressz*

Kísérletünkben Gerges és mtsai. (2001) által leírt protokollt használtuk. A patkányokat azt követően, hogy megszokták ketrectársaik jelenlétét és kialakult a szociális hierarchia közöttük, két állatot véletlenszerűen kiválasztottunk és másik ketrecbe helyeztük át. A protokollt egymás követő 3, 7, 14 és 21 napon keresztül ismételtük.

## **3.3. Totál RNS izolálás, reverz transzkripció, valós idejű polimeráz láncreakció**

A frontális kortexből és hippokampuszból vett mintákból teljes sejt RNS – t izoláltunk Macherey – Nagel, NucleoSpin II protokoll alapján. A totál sejt RNS – t tartalmazó oldatot 60 µl ribonukleáz – mentes vízzel oldottuk le a membránról. Végül ribonukleáz gátlót adtunk hozzá és az oldatokat felhasználásig -80°C – on tároltuk.

Az oldatok totál mRNS koncentrációját spektrofotometriás módszerrel Nanodrop készülékkel mértük meg, majd 2 µg/15 µl koncentrációra hígítottuk. A totál mRNS – ről copy DNS – t (cDNS) szintetizálunk és a cDNS – ek mennyiségét RotoGene 3000<sup>®</sup> (Corbett Research) készülékkel határoztuk meg. A vizsgált mRNS expressziós szintek normalizálása gliceraldehid – 3 – foszfát dehidrogenáz (GAPDH) mRNS meghatározással történt. Az eredmények kiértékelése során a  $2^{-\Delta\Delta CT}$  módszert alkalmaztuk.

### 3.4. Western blot

A kísérlet során a citoszelektális  $\beta$  – aktin és a szabályzásában szerepet játszó kofilin, valamint az AK patomechanizmusában szerepet játszó MAPK – 1 és APP fehérjéket vizsgáltuk. A frontális kortexből és hippokampuszból származó mintákat lizáló pufferrel történő homogenizálást követően centrifugáltuk majd a felülúszó fehérje mennyiségét bikinolinil – dikarbonsav (BCA) segítségével határoztuk meg. Denaturálás után a fehérjét SDS poliakrilamid gélen futtattuk meg, majd a nitrocellulóz membránra történő blokkolást követően a nem specifikus kötőhelyeket száraz tejpórral blokkoltuk. A membránt először egy éjszakán keresztül a vizsgálni kívánt fehérjék elsődleges ellenanyagával, majd a következő nap a membrán többszörös mosását követően a tormaperoxidáz jelölt másodlagos antitesttel inkubáltuk, mely lehetővé tette a vizsgálni kívánt fehérjék detektálását. A jel intenzitását képanalizáló program segítségével elemeztük. A relatív fehérje szintet a vizsgálni kívánt fehérje és a normalizálásra használt gliceraldehid – 3 – foszfát dehidrogenáz (GAPDH) hányadosából számoltuk. A kontroll csoportot 100% – nak tekintettük és a különböző csoportokat ehhez viszonyítottuk.

### 3.5. Statisztika

A hím állatok esetében a stressz – típusok adatait két szempontos ANOVA (SPSS 15.0 szoftver) segítségével elemeztük. A szignifikáns változás valamint a stressz – típusok (RS, EFSS, FSS, PSS) és a kísérleti idő (3, 7, 14 és 21 nap) közötti kölcsönhatást az általános lineáris modell segítségével vizsgáltuk. Mind a hím mind a nőstény állatok esetében az azonos csoporton belüli összehasonlításához Student – féle  $t$  – próbát valamint egy szempontos ANOVA analízist követően Bonferroni post hoc tesztet végeztünk (SPSS 15.0 program). Az adatokat átlag  $\pm$  SEM formában jelenítettük meg. A szignifikancia szint:  $p < 0.05$  volt.

## 4. EREDMÉNYEK

### 4.1. Stressz által kiváltott változások vizsgálata hím patkányokon

#### 4.1.1. *Testsúly, mellékvese – és a tímusz súlyának változása stressz hatására*

Mind a négy stressz modell alkalmazása során követtük a testsúly változását. RS és EFSS hatására az állatok testsúly gyarapodása szignifikánsan csökkent. Az FSS és PSS nem eredményezett változást az állatok testsúly gyarapodásában a kontroll állatokéhoz képest.

Szignifikáns relatív mellékvese súlynövekedést tapasztaltunk RS és EFSS hatására. Relatív tímusz súlycsökkenést egyedül RS hatására detektáltunk. A másik három stressz modell alkalmazásakor a kezdeti emelkedést követően egy csökkenő tendencia figyelhető meg.

#### 4.1.2. *Stressz hatása $\beta$ – aktin transzkripcióra és translációra*

A 3 napos stressz kezelés mind az RS, EFSS és FSS esetén szignifikánsan növelte a  $\beta$  – aktin mRNA expressziós szintjét a hippocampusban. Az RS és EFSS esetén ez a változás egy jellegzetes U – alakú kinetikai görbét mutat. Az RS hatására a kezdeti (3 nap) szignifikáns emelkedést követően a  $\beta$  – aktin mRNA szintje 7 és 14 napos stressz kezelést követően a kontroll értékre állt vissza majd 21 napos stressz után ismételt szignifikáns növekedést tapasztaltunk. Az EFSS hatására a 3 és 7 napos stresszkezelés szignifikáns  $\beta$  – aktin mRNA expresszió növekedést követően a 14 napos stressz hatására csökkent, majd 21 napos RS ismételt szignifikánsan emelte az expressziós szintet. Az FSS a 3 és 7 napos stressz után szignifikáns növekedést eredményezett. A PSS hatására sem a hippocampusban sem a frontális kortextben nem tapasztaltunk változást a  $\beta$  – aktin mRNA expressziós szintjében.



RS és EFSS hatására a  $\beta$  – aktin fehérje szintje az expressziós szinthez hasonlóan U – alakú kinetikai görbét eredményezett a hippocampális régióban. FSS és PSS kezelések nem okoztak jelentős változást egyik agyterületen sem.

#### 4.1.3. *Stressz hatása kofilin transzkripcióra és translációra*

A vizsgált stressz típusok közül egyedül az RS okozott szignifikáns eltérést a kofilin mRNS és fehérje szintjében a hippocampális régióban. A többi stressz modell hatására nem tapasztalunk változást.

#### 4.1.4. *Stressz hatása MAPK – 1 transzkripcióra és translációra*

A MAPK – 1 mRNS expressziós szintje egyedül az RS hatására mutatott változást a hippocampusban, mely hasonlóan a  $\beta$  – aktinhoz és a kofilinhez jellegzetes U – alakú kinetikai görbét eredményezett. Fehérje szinten nem tapasztaltunk eltérést egyik vizsgált régióban sem a kontroll csoporthoz viszonyítva.

#### 4.1.5. *Stressz hatása APP transzkripcióra és translációra*

Az APP mRNS expressziós szintjében csak az RS okozott változást. Krónikus 21 napos stressz hatására növelte az APP mRNS expressziós szintet a hippocampusban. RS kezelés az APP fehérje szintjének szignifikáns emelkedését eredményezte 3, 7 és 21 nap elteltével.

## **4.2. Stressz által kiváltott változások vizsgálata nőstény patkányokon**

### 4.2.1. *Testsúly, mellékvese – és a tímusz súlyának változása stressz hatására*

RS hatására szignifikánsan csökkent a nőstény patkányok testsúly gyarapodása 21 napos stressz kezelés után, míg a mellékvese relatív súlya a testsúlyhoz viszonyítva

nem mutatott jelentős eltérést. A tímusz relatív súlyának a csökkenését figyeltük meg 14 és 21 napos stressz kezelt csoportokban.

#### 4.2.2. *RS hatása a $\beta$ – aktin transzkripcióra és translációra*

Hasonlóan a hím patkányok  $\beta$  – aktin mRNA szintjéhez a nőstény állatoknál is jellegzetes U – alakú kinetikai görbét detektáltunk, de szignifikáns változás csak a 21. napon volt. A  $\beta$  – aktin fehérje szintjében az RS nem eredményezett változást.

#### 4.2.3. *RS hatása a kofilin transzkripcióra és translációra*

RS szignifikánsan növelte a frontális cortex kofilin mRNA szintjét 3 és 7 napos stressz kezelés hatására. A kofilin fehérje szintje szignifikáns növekedést mutatott a frontális cortexben 7 napos stressz kezelést követően.

## 5. ÖSSZEFOGLALÁS

Kutatómunkám során alkalmazott fizikai és pszichológiai stressz modellekben az AK – ra jellemző neuropatológiai változások hátterében álló biokémiai paraméterek jelentős változása következett be.

A citoskeletális rendszer felépítésében fontos szerepet játszó  $\beta$  – aktin és a szabályzó kofilin mRNA és fehérje expressziója az RS és EFSS kezelés hatására jellegzetes U – alakú mintázatot eredményezett a hím Wistar patkányok hippocampusában, míg FSS és PSS során nem tapasztaltunk hasonló változást. Mindezek a stressz típusok által kiváltott különböző válaszreakciók megjelenését valószínűsítik.

RS mind a MAPK – 1 mind az APP transzkripciójának növekedését eredményezte. Ez a megfigyelés az AK patomechanizmusában szerepet játszó fenti gének stresszindukált expressziós változásait igazolja.

A molekuláris vizsgálatok során a hippokampális régióból származó mintákban tapasztaltunk jelentős változást mely a régió stressz – érzékenységet bizonyítja. Az RS és EFSS stresszkezelés U – alakú kinetikai görbét mutat a  $\beta$  – aktin, kofilin és MAPK – 1 gének mRNS és fehérje expressziójában, mely a stresszhatások időfüggésére illetve krónikus stressz esetén a kompenzációs mechanizmusok kimerülésére hívja fel a figyelmet.

Hím és nőstény állatokon végzett RS kezelés az aktin szabályzó rendszer nemtől függő változását valószínűsíti, mely kapcsolatba hozható azzal a ténnyel, hogy a neurodegeneratív betegségek megoszlása eltér a két nemből.

Eredményeink a citoskeletális rendszer és az AK patomechanizmusában szerepet játszó MAPK – 1 és APP gének egy nagyon érzékeny stressz-, idő- és nemtől – függő szabályozását feltételezik, amely különösen fontos szerepet játszik különböző, stressz okozta humán betegségek kialakulásában. Mindezek a változások hozzájárulhatnak az AK során megjelenő kognitív funkciók romlásához.

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek Dr. Pákáski Magdolnának és Prof. Kálmán Jánosnak, akik támogatták munkámat és folyamatos szakmai segítséget nyújtottak számomra.

Köszönet Janka Zoltán professzor úrnak, hogy lehetőséget adott és hogy tudományos munkámat a SZTE Pszichiátriai Klinikán készíthettem.

Hálával tartozom Dr. Deli Máriának szakmai tanácsaiért, önzetlen segítségéért és bátorításért.

Köszönöm Fodor Eszter Klárának és Fazekas Örsike Csillának a baráti légkört és hogy munkám során mindig számíthattam rájuk.

Hálás vagyok családomnak és Sike Ádámnak. Köszönöm mindazt a segítséget, támogatást, melyet nyújtottak és nyújtanak számomra.

## AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁT KÉPEZŐ KÖZLEMÉNYEK

**I.** Sántha P, Pákáski M, Fazekas OC, Fodor EK, Kálmán S, Kálmán J Jr, Janka Z, Szabó G, Kálmán J. Restraint Stress in Rats Alters Gene Transcription and Protein Translation in the Hippocampus.

*Neurochemical Research* 37:958 – 964 (2012)

**IF: 2,240**

**II.** Sántha P, Pákáski M, Fazekas Ö, Szücs Sz, Fodor EK, Kálmán J, Jr., Kálmán S, Szabó Gy, Janka Z, Kálmán J. Acute and chronic stress induce changes in gene transcriptions related to Alzheimer’s disease

*Clinical Neuroscience* 65:195 – 200 (2012)

**IF: 0,348**

**III.** Sántha P, Pákáski M, Fodor EK, Fazekas OC, Kálmán S, Kálmán J Jr, Janka Z, Szabó G, Kálmán J. Cytoskeletal protein translation and expression in the rat brain are stressor – dependent and region – specific

*PLoS ONE* 8: e73504 (2013)

**IF: 3,730**

## EGYÉB KÖZLEMÉNYEK

**I.** Tóth AE, Walter RF, Bocsik A, Sántha P, Veszeka S, Nagy L, Puskás GL, Couraud OP, Takata F, Dohgu S, Kataoka Y, Deli MA. Edaravone Protects against Methylglyoxal – Induced Barrier Damage in Human Brain Endothelial Cells.

*PLoS ONE* (2014)

**IF: 3,730**

**II.** Kálmán Ifj., J, Pákáski M, Szűcs Sz, Kálmán S, Fazekas Ö, Sántha P, Szabó Gy, Janka Z, Kálmán J. The effects of immobilization stress and sertindole on the gene expression of APP, MAPK – 1 and  $\beta$  – actin in rat brain.

*Clinical Neuroscience* 65:394 – 400 (2012)

**IF: 0,348**

**III.** Fodor EK, Pákáski M, Santha P, Janka Z, Kálmán J. Cytoskeletal alterations in Alzheimer's disease: the "skeleton" of therapeutic hope? *Neuropsychopharmacologia Hungarica* 13:163 – 171 (2011)

IF:-

**IV.** Kalman S, Pakaski M, Szucs S, Kalman J Jr, Fazekas O, Santha P, Szabo G, Janka Z, Kalman J. 9 – hydroxy – risperidone (9OHRIS) prevents stress – induced  $\beta$  – actin overexpression in rat hippocampus.

*Neuropsychopharmacologia Hungarica* 12:425 – 431 (2010)

IF:-

**V.** Kiss M, Dallos A, Kormos B, Sántha P, Dobozy A, Husz S, Kemény L. Sortilin is expressed in cultured human keratinocytes and is regulated by cutaneous neuropeptides.

*The Journal of Investigative Dermatology* 130:2553 – 2560 (2010)

**IF: 6,270**

**Összesített impakt faktor: 16,666**