

**A gasztrikus Cajal-féle intersticiális sejtek depléciójának  
mechanizmusa egér kísérletes diabetes mellitusban**

Horváth Viktor József

I. sz. Belgyógyászati Klinika

Szegedi Tudományegyetem

Ph.D. tézis

2008.

**A PhD tézis alapjául szolgáló közlemények:**

I, **Ördög T, Redelman D, Miller LJ, Horváth VJ, Zhong Q, Almeida-Porada G, Zanjani ED, Horowitz B, Sanders KM.** Purification of interstitial cells of Cajal by fluorescence-activated cell sorting. *Am J Physiol Cell Physiol* 286:C448–C456, 2004

II, **Horvath VJ, Vittal H, Ordog T.** Reduced insulin and IGF-I signaling, not hyperglycemia, underlies the diabetes-associated depletion of interstitial cells of Cajal in the murine stomach. *Diabetes* 54:1528-33, 2005.

III, **Horváth VJ, Vittal H, Lőrincz A, Chen H, Almeida-Porada G, Redelman D, Ördög T.** Reduced stem cell factor links smooth myopathy and loss of interstitial cells of Cajal in murine diabetic gastroparesis. *Gastroenterology* 130:759-770, 2006.

## Bevezetés

Az intersticiális Cajal-sejtek (ICC) a gyomor, a vékony- és vastagbél ritmikus izomműködéséért felelős pacemaker elemek. Számos tanulmány igazolja, hogy ellentétben a tápcsatorna simaizom sejtjeivel, az izolált ICC rendelkezik pacemaker aktivitással. A Cajal-sejtek pacemaker aktivitásának feltérképezése azt követően indulhatott meg, miután kiderült, hogy a gastrointestinalis *tunica muscularis* sejtalkotói közül egyedülállóan ezen sejtek hordozzák aktív formában genomjuk *white spotting* locusán a *c-kit* proto-onkogént, mely a tirozin-kináz receptorcsaládhoz tartozó Kit-receptort kódolja. Az első immunhisztokémiai tanulmányokat knock out (*W/W<sup>v</sup>* és *Sl/Sl<sup>d</sup>* mutáns) egereken végzett kísérletek követték, melyek segítségével további megerősítést nyert az intersticiális Cajal-sejtek mindkét típusának (myenterikus és intramuscularis) a tápcsatornai motilitás szabályozásában betöltött döntő szerepe.

A legtöbb esetben a Cajal-sejtek különböző betegségekben bekövetkező károsodásának pathomechanizmusa ismeretlen, így a károsodás megakadályozására vagy megelőzésére irányuló oki *therapia* sem lehetséges. Az egyik leggyakrabban előforduló krónikus, részben gastrointestinalis komplikációkkal járó betegség a diabetes mellitus. Noha általánosan elfogadott, hogy a diabeteses gastroparesis irreverzibilis autonom neuropathia következtében alakul ki, ennek pathomechanizmusa sokkal inkább multifaktoriális eredetű. Azokban az egértörzsekben, amelyekben I. típusú diabetes mellitus spontán kialakulása gyakori (NOD/LtJ), a gastroparesis megjelenése a disztális gyomor Cajal-sejtjeinek hálózatában észlelhető károsodással mutat korrelációt. Az ICC károsodás a diabetes mellitus megjelenését követő 1.5-3 hónap múlva alakul ki. A folyamat során a diabetes két fő patognosztikai tényezőjének – a hyperglycaemiának és az inzulin hiányának - a szétválasztása *in vivo* körülmények közt meglehetősen nehéz. Ezért a jelen tanulmány első célja egy olyan organotipikus kultúra kifejlesztése volt, mely hosszú távú (több hónapig tartó) vizsgálat során is alkalmas a különböző növekedési faktorok (pl. inzulin, inzulinszerű növekedési faktor-I (IGF-I)) és a hyperglycaemia intersticiális Cajal-sejtekre kifejtett hatásának egymástól független vizsgálatára. Ezen technika használatával igazoltuk az inzulin/IGF-I hiányának központi szerepét a diabetes mellitusban észlelhető ICC károsodásban. Munkánk második felében az említett organotipikus kultúra modell mellett egyéb technikák alkalmazásával kerestük a választ a diabetes mellitus által okozott Cajal-sejt károsodás pathomechanizmusának részleteire.

## Anyag és módszer

### *Organotipikus kultúrák készítése*

Fiatal (9-18 napos) BALB/c egerek intakt corpus és antrum *tunica muscularis* szövetét 35 mm-es, Sylgard 184 műanyaggal kiöntött edény aljához tűztük, majd 37 °C-on normoglycaemiás (5.5 mmol/l), 2%-os antibiotikum-antimycotikum illetve 2 mmol/l L-glutamin tartalmú M199 mediumba helyeztük. Az így kapott oldathoz önmagukban vagy kombinációban adott komponensek: D-glukóz (végső koncentráció: 33.3-55.5 mmol/l), szarvasmarha inzulin (5 µg/ml), egér IGF-I (100 ng/ml). Valamennyi kezelés a kultúrák indítását követő 48 órán belül megkezdődött. Az oldatok hatóanyagtartalmának állandóságát a medium 48 óránkénti cseréjével értük el.

### *Immunhisztokémia*

Kultúrázott és frissen feldolgozott *tunica muscularis* szöveteket aceton fixálást követően immunhisztokémiai feldolgozásra alkalmassá tettük. A következő elsődleges ellenanyagokat használtuk: patkány IgG2b monoklonális anti- c-Kit clone ACK2 (5 µg/ml); nyúl poliklonális anti-inzulin receptor  $\alpha$ , anti-IGF-I receptor  $\alpha$ , anti-SCF; kecske poliklonális anti-inzulin receptor  $\beta$  (2 µg/ml); nyúl poliklonális anti-PGP 9.5 (1:200). A másodlagos ellenanyagok Alexa Fluor 488, 594, illetve Texas red (10 µg/ml) fluoreszcens festékekkel voltak konjugálva. Az ellenanyagok specificitásának ellenőrzése az elsődleges és másodlagos ellenanyagok kihagyásával történt. Élő szöveten történő immunhisztokémiát gyomor és jejunum *tunica muscularis* szövetek 4 °C-on, 3 órán át történő inkubálásával végeztük őssejtfaktor (stem cell factor, SCF, 2 µg/ml) és idegsejt adhéziós molekula (nyúlban termelt, neural cell adhesion molecule, NCAM, CD56, 1:200) ellen termelt ellenanyagokkal. A másodlagos ellenanyagokat ez esetben 4%-os paraformaldehiddel történő fixálást követően használtuk. Az elkészült totálpreparátumokat Zeiss LSM 510 Meta konfokális mikroszkóp segítségével vizsgáltuk. Az ICC hálózat denzitásának kvantitatív analízise a konfokális mikroszkóp által készített kétdimenziós képek szuperimpozíciójával történt.

*Az ICC izolálása fluorescens sejtszeparátor (fluorescence-activated cell sorting (FACS)) segítségével*

Az intakt corpus és antrum *tunica muscularis* szövetet Alexa Fluor 488 konjugált ACK2 és monoklonális phycoerythrin-cyanine 5 (PC5) konjugált anti-F4/80 ellenanyagokkal jelöltük. Ezt követően a szövetekből sejtszuspenziót készítettünk, majd a makrofágokat és dendritikus sejteket CD11b és DC11c ellen termelt paramágneses monoklonális ellenanyaggal jelöltük, majd a makrofágok jelölését további monoklonális PC5-anti-CD11b ellenanyag segítségével erősítettük meg. A hízósejteket és az egyéb leukocytákat monoklonális PC5-anti-CD45 ellenanyaggal jelöltük meg. Ezt követően immunomágneses depléció segítségével csökkentettük a makrofágok és dendritikus sejtek mennyiségét. A Cajal-sejtek fluorescens szortírozása Beckman Coulter EPICS Elite vagy Becton Dickinson FACSVantage készülékekkel történt. A szortírozott sejtek tisztaságát (mintegy 20000-100000 sejt) Beckman Coulter XL/MCL flowcytometer segítségével ellenőriztük. Az egyes kísérletekben kontrollként az immunomagnetikus depléciót megelőzően elmentett kb. 50000 sejtet használtuk.

*Qualitativ és quantitativ PCR*

A teljes RNS mennyiséget Trizol reagens segítségével izoláltuk majd SuperScript II RNase H<sup>-</sup> enzim segítségével végeztük el a reverz transzkripciót. A cDNS-t specifikus primerek segítségével amplifikáltuk. Real-time quantitativ PCR-t SYBR Green reagens segítségével GeneAmp 5700 készüléken végeztünk. Az ismeretlen mennyiségű transzkriptumok előfordulásának arányát  $\beta$ -aktinhoz viszonyítottuk. A következő PCR primereket használtuk: *c-kit* (Y00864, ICC), CD68 (NM\_009853; macrosialin, általános makrofág marker, ugyancsak expresszálják bizonyos myeloid eredetű dendritikus sejtek); mast cell tryptase (MCT; M57626; hízósejt marker); simaizom miozin nehéz lánc (MyHC; NM\_013607; simaizom sejt marker); protein gene product 9.5 (PGP 9.5, más néven ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1, Uchl1, AF172334, általános neuronális marker); prolyl-4-hydroxylase (BC018411; fibroblast marker); CD34 (NM\_133654; fibroblast és endothelsejt marker), inzulin-receptor (Insr; NM\_010568), IGF-1-receptor (Igf1r; AF056187), őssejt faktor (stem cell factor, szolubilis és membrán-asszociált, SCF, NM\_013598). Ha csak egy adott marker jelenléte vagy hiánya volt a kérdés, qualitativ PCR-t alkalmaztunk. Ebben az esetben az amplifikált produktumot (10  $\mu$ l) 2%-os

agaróz/1x TAE (Tris, ecetsav, EDTA) gélen elektroforezis segítségével szeparáltuk, majd a DNS-t ethidium-bromid segítségével vizualizáltuk

#### *A génexpresszió analízise hybridizáció segítségével*

A diabeteses és nem diabeteses kontroll egerek gyomrának *tunica muscularis* szövetét Affymetrix Mouse Genome 430 2.0 génchip segítségével elemeztük, mely az egér teljes genomját (több, mint 39000 gén) reprezentálja. A teljes RNS mennyiséget Trizol reagens és RNeasy Mini Kit segítségével izoláltuk. Az RNS quantifikációja spektrofotometria segítségével történt, minőségét formaldehid gél elektroforézissel ellenőriztük. A komplementer RNS szintézis és hybridizáció a Nevada Genomics Center közreműködésével történt. Az egyes génchipek feltérképezése Affymetrix GeneChip 3000 System segítségével történt, az így nyert adatok analízisére pedig Affymetrix GeneChip Operating Software-t használtunk, majd eredményeinket kvantitatív PCR-rel verifikáltuk.

#### *Elektrofiziológiai vizsgálatok*

Az elektromos lassú hullám aktivitást kultúrázott és frissen előkészített, 14 napos BALB/c egerből származó corpus + antrum *tunica muscularis* szöveten végeztük intracelluláris mérések segítségével. Ennek során a körkörös izomréteg transzmembrán potenciálját KCl-tartalmú üveg mikroelektróddal mértük meg  $37.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$ -on .

#### **Eredmények és megbeszélés**

Fiatál BALB/c egerből származó gyomor *tunica muscularis* szövetének 68-72 napig tartó kultúrázása normoglicaemiás körülmények között a Cajal-sejtek hálózatában szignifikáns mértékű denzitáscsökkenést eredményezett. Meglepő módon a hyperglicaemia részleges, de szignifikáns mértékben megelőzte mindkét típusú Cajal-sejt további elvesztését. A kultúrázó oldat inzulin vagy IGF-I supplementációja teljes mértékben megelőzte az ICC elvesztését. Az immunhisztokémiai vizsgálatok eredményeit kvantitatív PCR vizsgálatokkal erősítettük meg. Azokban a kultúrákban, ahol intakt ICC hálózatot észleltünk (azaz az inzulin vagy IGF-I tartalmú médiumokban nevelt szövetekben), a Cajal-sejtek aktivitását jelző elektromos lassú hullámokat is sikerült detektálnunk.

Ugyanakkor normo- vagy hyperglycaemiás környezetben ez az aktivitás szignifikáns mértékben nem volt észlelhető.

Mivel igazoltuk, hogy az inzulin vagy IGF-I hiánya az ICC hálózat károsodásának meghatározó tényezője, a következő lépésben azt vizsgáltuk, vajon az ICC direkt célpontja ezen hormonoknak, vagy azok hatásukat az összejt faktor (SCF) – az egyetlen ismert növekedési faktor, mely a Cajal-sejtek kifejlődéséért és fenntartásáért felelős – közvetítésével fejtik ki. Ennek megválaszolása céljából első lépésben kvantitatív PCR segítségével elemeztük a FACS-izolált ICC géneexpressziós profilját. Eredményeink egyértelműen igazolták, hogy a Cajal-sejtek nem rendelkeznek inzulin- vagy IGF-I receptorral, ami azt jelenti, hogy ezek a sejtek nem lehetnek a fenti hormonok direkt célpontjai.

A következő lépésben az SCF és az inzulin, IGF-I hiányának kapcsolatát vizsgáltuk. Először immunhisztokémiai módszerek segítségével feltérképeztük az inzulin- és IGF-I receptorok eloszlását a gyomor *tunica muscularis* szövetében. Eredményeink szerint mind a simaizom sejtek (a cirkuláris és longitudinális réteg sejtszelei egyaránt), mind a myenterikus plexus (beleértve a ganglionsejteket, idegkötegeket és intramuscularis axonokat) elemei rendelkeznek ezen receptorokkal. Hasonlóan az inzulin és IGF-I receptorokhoz, egyenletes immunoreaktivitást észleltünk SCF ellenanyaggal végig az izomrétegekben, ugyanakkor – korábbi irodalmi adatokkal megegyezően – a myenterikus neuronok csak egy részének perikarionja tartalmazta az SCF proteint.

Az inzulin- és IGF-I receptorok hiánya a Cajal-sejteken, illetve ezen receptorok jelenléte azokon a sejt típusokon, melyek expresszálják az összejt faktort tovább erősítette azon feltételezésünket, mely szerint a fenti hormonok hatása az összejt faktor által közvetített folyamat. Ezért a következő lépésben azt vizsgáltuk, hogy az ICC elvesztése diabeteses NOD egér gyomrában együtt jár-e a SCF mennyiségének csökkenésével. Organotypikus gyomor *tunica muscularis* kultúrák segítségével igazoltuk, hogy a c-kit, a miozin nehéz lánc, illetve mindkét összejt faktor (szolubilis és membrán-asszociált) típus géneexpressziójának mértéke egymással párhuzamosan csökken. A PGP 9.5 gén expressziója függetlenül a kezeléstől nem volt detektálható. *In vivo* körülmények közt NOD diabeteses egerek használatával közelítettük meg a problémát. Először immunhisztokémia segítségével igazoltuk, hogy az ICC hálózat denzitása az antrumban és corpusban egyértelműen csökken hosszú ideje (> 6 hét) fennálló diabetes mellitus esetén. Ezt követően Affymetrix Mouse Gene Chip és RNS hibridizáció segítségével bebizonyítottuk, hogy a c-kit expresszió csökkenését mindkét típusú összejt faktor

expressziójának kifejezett csökkenése követi; hasonlóan a miozin nehéz lánc expressziójának ezirányú változásához. Ezzel szemben a PGP 9.5 (Uchl1) expressziójának mértéke nem csökkent az NOD diabeteses egér gyomor *tunica muscularis* szövetében. Ezzel párhuzamosan kvantitativ PCR vizsgálatokkal verifikáltuk, hogy a c-kit expresszió csökkenése mindkét típusú őssejt faktor expressziójának hasonló jellegű változásával jár együtt.

Mivel a simaizom sejtek károsodásának változása mindig tükrözte az ICC és az SCF expresszió változását, ugyanakkor a neuronspecifikus génexpresszió hosszú ideje diabeteses NOD egerekben – melyek Cajal-sejt hálózata egyértelműen károsodott - is érintetlen maradt illetve közel nem detektálható értéken volt még inzulin és IGF-I kezelt hosszútávú organotypikus kultúrákban is az ICC hálózat intaktsága ellenére, egyértelmű volt, hogy a tápcsatornai őssejt faktor két fő forrásának ICC-hez való viszonya különbözik. Ezért a következő lépésben azt vizsgáltuk, hogy az őssejt faktor myenterikus neuronokban észlelt intracelluláris elhelyezkedése szerepet játszhat-e a két sejttípus különböző hatásának kialakulásában. BALB/c és nem diabeteses NOD egér *tunica muscularis* élő szövetén végzett immunhisztokémiai vizsgálatok a simaizom sejteken csak membránlokalizációjú őssejt faktort igazoltak, míg a ganglionsejteken ugyanezen elhelyezkedésben SCF nem volt észlelhető. Ebből az következik, hogy a myenterikus neuronok által termelt őssejt faktor a Cajal-sejtek számára nem hozzáférhető.

Az utolsó kísérletünkben azt vizsgáltuk, hogy vajon az őssejt faktor (azaz a c-kit természetes ligandja) immunoneutralizációja felgyorsítja-e a gyomor ICC hálózat károsodását organotypikus kultúrákban. Poliklonális anti-SCF (2 µg/ml) ellenanyagának a kultúrázó oldathoz történő hozzáadása mindkét típusú ICC hálózatának szignifikáns mértékű csökkenését okozta, párhuzamosan a c-kit expresszióban észlelhető, ugyancsak szignifikáns mértékű csökkenéssel, mely arra utal, hogy az őssejt faktor elvesztése *per se* ICC vesztéshez vezethet.

*Eredményeinket összefoglalva megállapíthatjuk, hogy:*

1, a diabetes mellitus által okozott károsodás a gyomor intersticiális Cajal-sejteinek hálózatában az inzulin (és/vagy IGF-I) hiánya, nem pedig a hyperglycaemia miatt alakul ki.



2, noha az inzulin és/vagy az IGF-I szükséges az ICC morfológiájának és funkciójának (lassú hullámok) fenntartásához, a Cajal-sejtek nem közvetlen célpontjai a fenti hormonoknak.

3, az inzulin vagy IGF-I abszolút vagy relatív hiánya a *tunica muscuaris* réteg simaizom sejtjei által termelt őssejt faktor szint csökkenése, nem pedig myenterikus neuronjainak károsodása által vezet az ICC depléciójához.

4, az inzulin és/vagy az IGF-I szignál károsodása a közös nevezője a diabetes-asszociált myopathiának és ICC vesztésnek.

## **Köszönetnyilvánítás:**

Ezúton fejezem ki hálás köszönetem Dr. Ördög Tamásnak, akinek vezetésével és segítségével a dolgozat alapját képező munkáim végezhettem a University of Nevada, Reno Élettani és Sejtbiológiai Intézetében.

Őszinte köszönettel tartozom Prof. Dr. Jancsó Gábornak szakmai karrieremhez a kezdetektől fogva nyújtott önzetlen segítségéért.

Köszönőnettel tartozom Prof. Dr. Lonovics Jánosnak és Prof. Dr. Wittmann Tibornak, a Szegedi Tudományegyetem I. sz. Belgyógyászati Klinika korábbi és jelenlegi intézetvezetőjének dolgozat elkészítéséhez nyújtott támogatásukért.

Ugyancsak szeretném kifejezni köszönetem azon laboritóriumok munkatársainak, akikkel kísérleteim elvégzése során együtt dolgoztam: elősorban Doug Redelman PhD, Dr. Lőrincz Andrea és Michael R. Bardsley (University of Nevada, Reno) közreműködéséért vagyok hálás, továbbá köszönöm a segítséget Dr. Sántha Péternek és Dr. Dux Máriának, a Szegedi Tudományegyetem Élettani Intézete munkatársainak, akik kutatómunkám kezdeti éveiben láttak el hasznos tanácsokkal.

Ugyancsak hálás vagyok a Nancy Horowitz és Lisa Miller által a kísérletek során nyújtott kiváló asszisztenciáért.

Végül köszönöm a türelmét és segítségét barátaimnak és családomnak, akik a munkák elvégzéséhez nélkülözhetetlen biztos háttérrel nyújtották.

Forrás: NIH Grant DK58105 to TO.