

A KALMODULIN GÉN MŰKÖDÉS SZABÁLYOZÁSA OROFACIÁLIS BŐR EREDETŰ
KRÓNIKUS GYULLADÁS ALATT ÉS AZT KÖVETŐ SZTEROID KEZELÉS SORÁN A
PATKÁNY AGYTÖRZSI–NYÚLTVELŐI RÉGIÓBAN

Dr. Oroján Iván, MD

Témavezető: Dr. Gulya Károly, PhD, DSc
tanszékvezető egyetemi tanár,
a biológia tudomány doktora

Sejtbiológia és Molekuláris Medicina Tanszék
Általános Orvostudományi Kar, Természettudományi és Informatikai Kar
Szegedi Tudományegyetem
Szeged

Szeged, 2008

Bevezetés

A dithranol (anthralin) egyike a psoriasis (pikkelysömör) gyógyítására leggyakrabban használt és leghatásosabb helyi szereknek. A dithranol hatásmechanizmusa még ismeretlen, de valószínűleg összefügg a szabad (oxigén és egyéb) gyökök termelődését kiváltó intracelluláris redox folyamatokkal, amelyek végül apoptózist is eredményezhetnek. Vannak arra utaló kísérleti adatok, hogy az epidermális proliferáció és/vagy keratinizáció, illetve a bőr gyulladása (esetleg mindkettő együtt) fontos lehet a dithranol antipszoriaticus hatásának kialakításában. Az ilyen gyulladás hatását a perifériás idegben korábban az ubiquitin karboxil-terminális hidroláz L1 (UCH-L1; más elnevezések: pan-neuronal marker protein gén termék (PGP) 9.5, ubiquitin tiolészteráz, PARK5) immunhisztokémiai vizsgálatával már bizonyították. Az UCH-L1 a citoszol enzime, amely a gerinces idegszövetben különösen erősen expresszálódik. Kísérleteink egyik részében azt vizsgáltuk, vajon a dithranol kezelés hatással van-e a patkány orofaciális régiója bőrében lévő nociceptív szerzoros rostok immunhisztokémiailag detektálható UCH-L1 tartalmára.

A bőr eredetű szöveti gyulladás vagy egyéb fájdalmas temporomandibuláris megbetegedés gyakran kiváltja a trigeminális rendszer nociceptív elemeinek hosszan tartó aktiválódását – és ennek következtében a krónikus fájdalom kialakulását –, amelynek klinikai jelentősége nyilvánvaló. Számos adat áll rendelkezésre azokról a molekuláris, a sejt- és a rendszer szintű mechanizmusokról, amelyek kapcsolatban vannak a központi idegrendszer gyulladással összefüggésben kialakuló krónikus fájdalommal vagy annak csillapításával. A különböző szignalizációs folyamatok révén szállított nociceptív (vagy a fájdalommal kapcsolatos egyéb) információkat a központi idegrendszer különböző szinteken dolgozza fel; kísérleteink szempontjából azok az adatok a legfontosabbak, amelyek rávilágítanak a kalciummodulin (CaM) és célfehérjéi szerepére a gyulladással összefüggő központi idegrendszeri válaszaiban.

A minden eukarióta sejtben megtalálható CaM fehérjét, egy multifunkcionális kalcium (Ca^{2+}) receptor proteint, emlősökben három független gén kódolja. A fehérje az idegszövetben különösen nagy mennyiségben van jelen. Agyi regionális megoszlása és expressziós mintázata – az ontogenetikus fejlődés alatt és a kifejlett állatban egyaránt – jól ismert. A CaM génekről átíródó specifikus mRNS populációk analízise azt bizonyítja, hogy a központi idegrendszerben e gének egymástól erősen eltérő, differenciált expressziót mutatnak.

Tekintettel arra, hogy a CaM az általa aktivált célfehérjéin keresztül fejt ki biológiai hatásait, amelyek maguk is nagyszámú celluláris szabályzó folyamatban vesznek részt, ezért nem is meglepő, amit sok immunhisztokémiai és in situ hibridizációs vizsgálat is bizonyított, hogy a CaM immunoreaktivitás, illetve az egyes CaM génekre specifikus transzkriptumok gyakran a célnzimeik immunoreaktivásaival vagy transzkriptumaival egyazon neuronális struktúrában kolokalizálhatók. A CaM fehérje megoszlására a középagyí–nyúltvelői régióban az ehhez a struktúrákhoz is kapcsolható nagyszámú CaM-függő neuronális mechanizmus ellenére csak kevés adat áll rendelkezésre. A CaM fontos szerepet játszik például egy kulcsfontosságú célnzimének, a Ca^{2+} /CaM kináz II-nek a trigeminális rendszeren belüli szabályzásában is (például gyulladásos folyamatok, neuropátiás fájdalom, idegi sérülés stb. kapcsán), ezért a CaM génexpresszió pontos, nagy térbeli feloldású feltérképezése segítheti a trigeminális rendszer működésének megértését a normál és a kóros állapotokban egyaránt.

Kísérleteink másik részében kvantitatív in situ hibridizációs analízis segítségével vizsgáltuk meg az egyes CaM génekre specifikus, [^{35}S]-jelölt cRNS próbák megoszlását a trigeminális rendszer egyes területeiben, illetve az egyes agyi magok rostrocaudalis tengelye mentén. A CaM expresszáló sejtek feltérképezése segített annak felderítésében és megértésében is, hogyan befolyásolja a krónikus, bőr eredetű (esetünkben orofaciális) gyulladás a CaM génexpresszió szabályzásának mintázatát. Olyan kísérleteket is elvégeztünk tehát, amelyek kimutatták a CaM génexpresszió azon változásait, amelyek a krónikus dithranol és/vagy az azt követő szteroid kezelés hatására következtek be a felnőtt patkány trigeminális rendszerében.

Célkitűzések

Kísérleteink során az volt a célunk, hogy feltérképezzük azokat a szövettani, immunhisztokémiai és Western blot analízissel kimutatható jellegzetességeket, amelyek a dithranol kezelés hatására gyulladásba jött vagy szteroiddal gyógyított orofaciális bőrben figyelhetők meg, illetve lokalizáljuk és megkülönböztessük a trigeminális rendszer egyes területein az egyes CaM génekről átíródó mRNS populációkat az orofaciális bőr krónikus gyulladása és azt követő szteroid kezelése után. Ezekhez a kísérletekhez az egyes CaM transzkriptumokra specifikus, [^{35}S]UTP- vagy digoxigenin (DIG)-jelölt cRNS próbákat használtunk fel.

Konkrét célkitűzéseink a következők voltak:

- 1) a krónikus dithranol kezelés által kiváltott gyulladás és/vagy a kortikoszteroid kezelés hisztokémiai és immunhisztokémiai (UCH-L1 immunhisztokémia) vizsgálata a patkány orofaciális bőrében és nociceptív érző rostjaiban;
- 2) a különböző CaM génekről átíródó mRNS populációk lokalizációjának és egymástól való elkülönítésének szemikvantitatív analízise a felnőtt patkány középagyí–nyúltvelői régiójában;
- 3) a különböző CaM gének középagyí–nyúltvelői régióban megfigyelhető expressziója esetleges rostrocaudalis változásának vizsgálata az egyes génekre specifikus [³⁵S]UTP- vagy DIG-jelölt cRNS próbákkal;
- 4) a különböző CaM génekről átíródó mRNS populációk lokalizálása és kvantitatív in situ hibridizációval történő differenciálása a patkány trigeminális rendszer két prominens magjában, a trigeminus motoros (Mo5) és a principális szenzoros magvában (Pr5) az infraorbitális régió orofaciális bőrének krónikus gyulladása, illetve kortikoszteroiddal történő gyógyítása során.

Az eredmények összefoglalása

- 1) Az orofaciális bőrfelszín dithranollal történő krónikus kezelése a bőrdegek UCH-L1 immunreaktivitásának teljes elvesztését eredményezte, míg az ezt követő szteroid kezelés visszaállította az UCH-L1 immunreaktivitást ezekben az idegi elemekben. Ezeket az eredményeinket a Western blot analízisek is megerősítették.
- 2) A CaM I, II és III génekre specifikus radioaktív cRNS próbák in situ hibridizációja kimutatta, hogy ezen gének transzkriptumai specifikus és egyedi mintázatot mutatnak ebben az agyi régióban. A középagyí–nyúltvelői terület CaM mRNS tartalmának megoszlása általában a CaM III > CaM I > CaM II sorrendet követte. A DIG-jelölt “színes” in situ hibridizációs kísérleteink ezekben a magokban számos, elsődlegesen közepes méretű, multipoláris neuront mutattak ki.
- 3) A trigeminális rendszer egyes magvainak rostrocaudalis tengelye mentén az egyes CaM gének transzkriptumainak mennyiségében jelentős különbségeket figyeltünk meg. A CaM génekre specifikus transzkriptumok általában nagyobb mennyiségben voltak jelen a magok rostralis végében, bár a trigeminus motoros magban a rostralis vég csak a CaM I gén transzkriptumaiban volt gazdagabb.
- 4) Az orofaciális bőr krónikus dithranol kezelése szelektíven befolyásolta a középagyí–nyúltagyí régió CaM génexpresszióját: kvantitatív in situ hibridizációs vizsgálataink a CaM gének területfüggő, differenciális expresszióját mutatta ki a trigeminális

rendszer két magvában, a Mo5 és a Pr5 területén. A CaM génexpressziót a kortikoszteroid kezelés érzékenyen befolyásolta, mivel a krónikus szteroid kezelés különböző mértékben csökkentette a krónikus dithranol kezelés során megemelkedett CaM populációk mennyiségét.

Következtetések

Eredményeink arra hívják fel a figyelmet, hogy összefüggés lehet a trigeminális rendszer rostralis és caudalis részeihez tartozó afferens és efferens idegi kapcsolatok (és az ezekhez köthető funkciók), illetve ezen neuronális rendszerek differenciális CaM génexpressziója között. Génexpressziós vizsgálataink eredményei ezek alapján úgy is magyarázhatók, mint a CaM génexpresszió két ellentétes hatásra bekövetkező transz-szinaptikus regulációja: az egyik a dithranolnak a szadad gyökök képződésén át a fehérjékre (így a CaM-ra és a deubiquitináló UCH-L1 fehérjére is) kifejtett hatása, amely differenciált CaM génexpresszióban manifesztálódik, a másik pedig a kortikoszteroidoknak a CaM génexpresszióra gyakorolt moduláló (általában gátló) hatása, amely e génnek csökkent transzkripcióját okozza. Adataink azt bizonyítják, hogy a krónikus gyulladás és az azt követő kortikoszteroid kezelés többszörös szinaptikus kontaktusokon át befolyásolhatja a neuronális CaM génexpressziót. A periférián érvényesülő krónikus noxák, így a gyulladás vagy a szteroid kezelés is, tartós változásokat idézhetnek elő a központi idegrendszeri funkciókban, és ezek a folyamatok a neuronális génműködés fontos, akár transz-neuronális plaszticitást okozó szabályzó faktori is lehetnek.

Ezek a kísérleti adatok összességükben arra utalnak, hogy a CaM génnek differenciált szabályzása a középagyi–nyúltagyi területeken ipsilaterálisan és transz-szinaptikusan szabályozottak, valószínűleg többféle szignalizációs utakon át. A pontos molekuláris mechanizmusok, amelyek ezt az ellentétes szabályzást fenntartják, egyelőre ismeretlenek.

A disszertáció alapjául szolgáló publikációk:

Bakota L., Orojan I., Gulya K. (2005) Intranuclear differences in calmodulin gene expression in the trigeminal nuclei of the rat. *Acta Biol. Szeged.* 49:9-14. [IF: 0.0]

- Orojan I., Bakota L., Gulya K. (2006) Differential calmodulin gene expression in the nuclei of the rat midbrain–brain stem region. *Acta Histochemica* 108:455-462. [IF: 1.167]
- Orojan I., Szigeti C., Varszegi S., Gulya K. (2006) Dithranol abolishes UCH-L1 immunoreactivity in the nerve fibers of the rat orofacial skin. *Brain Research* 1121:216-220. [IF: 2.341]
- Orojan I., Bakota L., Szigeti C., Varszegi S., Gulya K. (2008) Experimentally induced orofacial inflammation and subsequent corticosteroid treatment differentially regulate calmodulin gene expression in the trigeminal nuclei of the rat. *Neurochem. Internat.* 52:265-271. [IF: 3.159 (2006-ra, a legutolsó ismert évre)]

A disszertáció alapjául szolgáló előadások és poszterek:

- Orojan I., Bakota L., Szigeti C., Varszegi S., Gulya K. (2005) Orofacial skin inflammation upregulates calmodulin gene expression in the trigeminal nuclei of the rat. 3rd International Workshop for the Study of Itch, Heidelberg (poster No. 8) *Acta Derm. Venereol.* 85:477.
- Orojan I., Bakota L., Gulya K. (2005) Experimentally induced orofacial skin inflammation upregulates calmodulin (CaM) gene expression in the medullar nuclei of the rat. 14th Congress of the European Academy of Dermatology & Venereology, London (abstract reference No. 805) . *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 19(2) P04.67.
- Orojan I, Bakota L, Szigeti C, Varszegi S, Gulya K (2005) Az orofaciális bőr gyulladása serkenti a calmodulin génexpressziót a patkány nyúltvelői magvaiban. *Bőrgyógyászati és Venerológiai Szemle* 81(6):258/59
- Oroján I. (2006) Dithranol által kiváltott orofaciális gyulladás befolyásolja a calmodulin génexpressziót a patkány nyúltvelői magvaiban. *Magyar Bőrgyógyászok Nagygyűlése*, a Magyar Dermatológiai Társaság Fekete Zoltán Alapítványának nyertes díjazotti előadása, Budapest.