

**A MEGEMELKEDETT KALCIUM SZINT ÉS A KALCIUMKÖTŐ FEHÉRJÉK
SZEREPE A MOZGATÓ IDEGSEJTEK AKUT ÉS KRÓNIKUS DEGENERÁCIÓJÁBAN**

A doktori értekezés téziséhez

Patai Roland

Témavezető: Dr. Siklós László



Neuronális Plaszticitás Kutatócsoport
Molekuláris Neurobiológia Kutatóegység
Biofizikai Intézet
Magyar Tudományos Akadémia Szegedi Biológiai Kutatóközpont

Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola
Általános Orvostudományi Kar
Szegedi Tudományegyetem

Szeged

2017

BEVEZETÉS

A mozgató idegsejtek degenerációja mindazon kórképek gyűjtőneve, melyekre jellemző a mozgató idegsejtek szelektív pusztulása. Ez a kifejezés magába foglal számos krónikus betegséget, mint például a progresszív izomatrofiát, az örökletes spasztikus paraplégiát és az amiotrófiás laterálszklerózist (ALS). Ugyanakkor e definíció nem csak a krónikus kórképekre, de akut idegrendszeri elváltozások — mint például a neuropátiák és egyéb baleseti sérüléshez köthető neurodegeneratív események — jellemzésére is használható. A degeneráció típusától és az azt kiváltó primer tényezőktől függetlenül hasonló patológiás események zajlanak le, melyek közül a kalcium (Ca) mennyiségének megváltozása kiemelkedő fontosságú. Ezek a patológiás tényezők szimultán figyelhetők meg, mivel egymás hatásának felerősítésén túl a Ca képes a különböző toxikus folyamatokat egyesíteni és egyetlen öngerjesztő degeneratív mechanizmussá extrapolálni.

Az ALS-ben szenvedő páciensekben megfigyelhető, hogy bizonyos mozgató neuroncsoportok sérülékenyek, míg például a szemmozgató neuronok és a szfinkter izmokat beidegző szakrális mozgató idegsejtek ellenállónak tekinthetők. Bizonyított, hogy a rezisztencia összefüggést mutat a kalciumkötő fehérjék (CaBP) mennyiségével. A protektív terápiás eljárások lehetséges alapja, hogy befolyásoljuk a sérülés indukálta Ca-emelkedést a Ca-beáramlás csökkentésével vagy a CaBP által megvalósított Ca-puffereléssel. A Ca homeosztázisra gyakorolt hatásán kívül a magas CaBP tartalmú sérült mozgató neuronok körül megfigyelhető csökkent mikroglia aktiváció bizonyítja, hogy e protektív terápiás stratégiák képesek csökkenteni a környező gyulladáshoz vezető reakciókat is.

Számos tulajdonság állhat a különböző mértékű sérülékenység hátterében, ugyanakkor az intracelluláris Ca-szint szabályozása és Ca-ionok plazmamembrán receptorokon keresztül történő beáramlásának módosítása kiemelkedően nagy szerepet tölt be. Transzgenikus úton megemelt parvalbumin (PV) CaBP tartalommal rendelkező kísérleti állatok mozgató idegsejtjeit akut csípőideg átvágásnak, vagy krónikusan, mutáns szuperoxid dizmutáz 1 (mSOD1) transzgenikus ALS egér

modellel történő keresztezésnek vetettünk alá. Eredményeink alapján a PV szintjének megemlése ígéretes neuroprotektív terápiás stratégiának bizonyult. A mozgató idegsejtek szelektív pusztulásának hátterében álló hipotézis alapja, hogy a posztzinaptikus neuronokon található AMPA receptorok Ca permeabilitása megváltozik. E tulajdonság meghatározó tényezője a 2-amino-3-(5-metil-3-oxo-1,2-oxazol-4-il) propánsav (AMPA) receptorok 2-es típusú glutamát receptor alegységének (GluR2) hiányában keresendő. Bár a szakirodalmi adatok nem konzisztensek a GluR2 alegység hiánya és a mozgató idegsejtek sérülékenysége kapcsán, több közlemény is arról számolt be, hogy a sérülékeny mozgató idegsejtekben csökkent a GluR2 mRNS-ének és fehérjéjének mennyisége.

CÉLKITŰZÉS

Az AMPA receptor antagonistá hatású talampanel (Tal) kezelés kísérleti megfigyelései alapján — miszerint csökkenti a mozgató idegsejtekbe áramló Ca mennyiségét — a betegség progressziójának lassítása céljából klinikai kísérletet hajtottak végre. E protektív stratégia végül megbukott, mivel nem felelt meg az elsődleges elvárásoknak. Korábban bemutattuk, hogy a klinikai kísérlet kudarcának oka a betegség progressziójához mért késői terápiás beavatkozásban keresendő. Mivel célunk, hogy bizonyítsuk e protektív stratégia létjogosultságát, megvizsgáltuk, hogy a kezelés lehetséges buktatója nem a disztális axonterminálisokra gyakorolt pozitív hatás hiányában keresendő. Ebből kifolyólag az első célkitűzésünk a következő volt:

1. Bemutatni, hogy a sejttestre irányuló Tal kezelés egyaránt képes megvédeni mSOD1 transzgenikus egerek sejttestjeit és disztális axonterminálisait a Ca-szint megemelkedésétől abban az esetben, ha a kezelést megfelelően korai időponttól kezdve alkalmazzuk.

Közismert, hogy a Ca által mediált degeneráció neuronokra gyakorolt káros hatása a Ca-beáramlás csökkentésével megelőzhető. Korábban bemutattuk, hogy krónikus stressz hatására a mozgató idegsejtek CaBP mennyiségének megemlése növeli a mozgató idegsejtek degeneratív faktorokkal szembeni rezisztenciáját. A Ca

pufferkapacitáson kívül a gyulladásoos reakcióknak is jelentős szerepe van a sérült mozgató idegsejtek sorsának szempontjából. A két tényező közötti lehetséges kapcsolatok vizsgálatára a második célkitűzésünk a következő volt:

2a. Megvizsgálni, hogy a sérült mozgató idegsejtek környezetében jelentkező mikroglia aktiváció amplitúdóját és időbeli lefutását miképp befolyásolja a különböző mértékű Ca-emelkedés, ami eltérő PV mennyiséggel rendelkező mozgató idegsejtekkel jól szemléltethető.

2b. Egy olyan metodika kidolgozása, amivel standardizálhatóvá válik az intracelluláris Ca-szint mennyiségének pontos kiértékeléséhez elengedhetetlen paraméter, a metszetvastagság meghatározása.

A mozgató idegsejtek PV tartalmának növelésével a sérülés által indukált Ca-szint megemelkedése és a lokális mikroglia aktiváció egyaránt csökkenthető. Hogy megvizsgáljuk a gyulladásoos reakciók további csillapításának lehetőségét, olyan protektív eljárás során, ami egyszerre lép fel a környező mikroglia aktivációval és a Ca-szint megemelkedéssel szemben, harmadik célunk a következő volt:

3a. Akut idegátvágást követően, különböző mértékben sérülékeny mozgató magokban meghatározni a diazoxid kezelés hatását a mikroglia aktivációra, mivel a kezelés a gyulladásgátló hatáson kívül képes befolyásolni az intracelluláris Ca mennyiségét is.

3b. Egy mikroglia aktiváció számszerűsítésére alkalmas festési eljárás kidolgozása, amivel a mozgató mag térfogatának fluoreszcens festékekkel történő meghatározására és a nem-fluoreszcens jelölésen alapuló mikroglia reakció kvantifikációjára is egyaránt lehetőség nyílik.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Talampanel és diazoxid kezelés

A SOD1 gén G93A mutáns formáját expresszáló egereket Tal vagy vehikulum kezelésnek (Veh) vetettük alá. Az intervenciót az állatok 10 és 17 hetes korában kezdtük, ami megfeleltethető az ideg-izom szinapszisok degenerációjának

tünetmentes és a klinikai manifesztációt reprezentáló fázisának. A szövetminták begyűjtését, két hét kezelést követően, a 12 és a 19 hetes állatokon végeztük el. A Balb/c nem-transzgenikus egereket a sebészeti beavatkozásoknak megfeleltethetően, egyoldalú enukleáción, *hypoglossus* vagy *facialis* ideg átmetszésen átesett csoportokba rendeztük. Csoportonként az állatok felét, vagyis öt-öt állatot diazoxiddal kezeltünk, míg a másik alcsoport kontrollként szolgált. A CaBP szerepét vizsgáló kísérletünkben PV túltermeltetett (PV+/+) transzgenikus egértörzset használtunk. A PV gerincvelői mozgató idegsejtekben történő megjelenését transzkripcionálisan és transzlációsan is igazoltuk.

Immunhisztokémiai festés és annak számszerűsítése

A vizsgálni kívánt anatómiai régióból származó metszetsorozatot az avidin-biotin technikának megfelelően immunfestettük, hogy meghatározzuk a C-C motívum kemokin ligand 2 (CCL2) és a fejlődési antigéncsoport 11b (CD11b) jelölt sejtek pontos elhelyezkedését. Ezen felül a PV vagy az ionizált Ca-kötő adaptor molekula 1 (Iba1) profilokat is meghatároztuk kolin acetiltranszferáz (ChAT) másodlagos jelölésű fluoreszcens kettős festéssel. Végül, egy avidin-biotin és egy fluoreszcens kombinált festési eljárás alapján kidolgoztunk. Az immunhisztokémiai eljárás során jelölt sejteket a laboratóriumunkban fejlesztett interaktív képfeldolgozó algoritmussal számszerűsítettük. A szignifikánsan jelölt sejtek parciális területét meghatároztuk, majd a műtött és a kontroll vizsgálati terület százalékos értékben kifejezett algebrai különbségét kiszámítottuk. Ezt követően összeadtuk a metszetsorozathoz tartozó értékeket, hogy állatonként egy számmal karakterizálhassuk a területi lefedettségben végbement nettó változást.

A kalcium transzmissziós elektronmikroszkóppal történő detektálása

Az elektronenz depozitumok (EDD) Ca-tartalmát elektrongerjesztéses röntgen mikroanalízissel bizonyítottuk. Az EDD-k relatív térfogatának meghatározásához pontszámolási sztereológiai módszert alkalmaztunk. Ezzel a számszerűsítési eljárással meghatároztuk az EDD-k parciális térfogatát egy kiválasztott

referenciaterben, feltételezve, hogy a vizsgálati objektumunk infinitezimálisan vékony. Mivel ez fizikailag lehetetlen, így elektron tomográfias eljárással megvizsgáltuk a metszetek vastagságát, aminek eredménye a paraméter standardizálásához szükséges technika kidolgozásának fontosságát sugallta. Ehhez egy *in situ* vizsgálati eljárást fejlesztettünk ki, ami a Bouguer-Beer-Lambert törvényen alapulva az elektronmikroszkópon belül meghatározhatóvá teszi a metszetek vastagságának mérését. A metodika pontosságának vizsgálatához korrelációt végeztünk az általunk számított metszetvastagság és az atomerő mikroszkóppal (AFM) meghatározott tényleges vastagság között.

Statisztikai analízis

A statisztikai elemzéshez az *R statistical computing software* programot használtuk az *RStudio* integrált fejlesztői környezettel kiegészítve. Az adatokat az átlagértékkel \pm standard hibával fejeztük ki.

EREDMÉNYEK

A talampanel mozgató idegsejtek kalcium szintjére kifejtett hatása

A vizuális megfigyelés alapján, az mSOD1 egerek axonterminálisaiban mindkét vizsgálati időpontban megnövekedett mennyiségű EDD-t detektáltunk a kontrollhoz képest, ami bizonyítja az mSOD1 egerek ideg-izom szinapszisainak emelkedett Ca-szintjét. A kvalitatív eredmények alapján az intracelluláris Ca-szint megemelkedése megelőzhető abban az esetben, ha a klinikai tünetek megjelenése előtt alkalmazzuk a Tal kezelést. Az EDD-k axoplazmikus térfogatának számszerűsítésén alapuló eredmények 1.27-szeres emelkedést mutatnak 12 hetes korban, míg a 19 hetes egerekben az *interosseus* izmok axonterminálisaiban ez az érték már 1.75-ször nagyobb növekedést mutatott. E Ca-eleváció a 10 hetes korban kezdett Tal kezeléssel megelőzhető, de 17 hetes korban a protektív stratégia már elveszti hatását. Az axonterminálisokhoz hasonlóan a mozgató idegsejtek sejttestjeiben is hasonló mértékű Ca-emelkedés volt megfigyelhető mindkét időpontban a nem-transzgenikus kontrollhoz képest. Pozitív protektív hatást szintén csak a preszimptomatikus

fázisban indított kezelés tudott kiváltani. A Ca-szint emelkedésre rezisztens magcsoportot reprezentáló szemmozgató mag idegsejtjeit 12 és 19 hetes mSOD1 állatokban vizsgáltuk. Kvalitatívan, a kontroll állatokhoz képest sem a sejttestekben, sem az ideg-izom szinapszisokban sem látható strukturális elváltozás vagy megnövekedett mennyiségű EDD. A precipitátumok mennyiségének meghatározását követően kijelenthetjük, hogy az EDD-k térfogata nem mutat különbséget az mSOD1 mozgató idegsejtek és a nem-transzgenikus kontrollból származó minták között. Ezen felül ez a tendencia egyaránt jellemző a 12 és a 19 hetes korú állatokra is.

Az elektronmikroszkópos kalcium hisztokémia hitelességének ellenőrzése

Véletlenszerűen kiválasztott EDD-ket fókuszált elektronsugárral bevilágítottunk, majd az emittált másodlagos röntgensugarakat detektáltuk. Ezt követően a kapott spektrumról dekonvolúció segítségével leválasztottuk a Ca-ra specifikus spektrumot az átfedő antimon-csúcsról. Ezek alapján bizonyítható az EDD-k Ca-tartalma, tehát a precipitátumok alkalmasak a Ca szöveti eloszlásának meghatározására. Elektron tomográfias képalkotással rekonstruáltuk az EDD-ket az elektronmikroszkópos vizsgálatokhoz rutinszerűen használt vastagságú metszeteken. A térfogati átvilágítással történő leképzés kimutatta, hogy a metszetvastagságban megfigyelhető eltérések jelentős variabilitással bírnak. Mivel ez befolyásolhatja a precipitátumok projekciós képét és azok számszerűsítését, így kiemelkedően fontos a metszetek vastagságának standardizációjához szükséges metodika kifejlesztése. AFM-es mérésekkel igazoltuk, hogy a hagyományos módszerek alkalmatlanok a metszetvastagság megfelelő érzékenységu meghatározására. Ugyanakkor a Bouguer-Beer-Lambert törvény elektronnyalábra történő interpretálása kiemelkedően precíz meghatározást tesz lehetővé elektronmikroszkópon belüli *in situ* módszerként. E technikát alkalmazva lehetőségünk nyílt, hogy a standardizálatlan metszetvastagságból származtatható varianciát kiszűrjük a számszerűsítésből.

A csípőideg átvágásával indukált változások a PV^{+/+} egerek gerincvelőjében

A csípőideg átvágás következtében a sérült mozgató idegsejtekben jelentős CCL2 expresszió és a neuronok közvetlen környezetében mikroglia aktiváció is látható. A műtött és műtetlen oldal közötti CCL2 jelölés intenzitásában bekövetkező változást a sebészeti beavatkozást követő 1., 4., 7., 14., 21. napon vizsgáltuk. A CCL2 immunfestés csak az operált oldal mozgató idegsejtjeiben volt megfigyelhető. A műteti oldal CCL2 festésének intenzitásában a 7. napig emelkedés volt megfigyelhető, ami ezt követően csökkenni kezdett. Ennek mértéke különböző a kontroll és a PV^{+/+} törzsben. Amíg a PV^{+/+} törzsben a CCL2 expresszió az operációt követő 14. napon már visszaállt az alapértékre, addig e változás a kontroll törzs gerincvelői mozgató idegsejtjeiben csak a 21. napon történt meg. A műtét utáni 14. napon a kontroll és a PV^{+/+} állatok között jelentős különbség volt mérhető a CCL2 immunfestésben. Ugyanakkor a PV^{+/+} állatokban szignifikáns festési intenzitás csökkenés a 7. és a 14. műteti utáni napok között volt detektálható. Hasonlóképp a CD11b jelölt területi kiterjedés a csoporttól függetlenül minden kísérleti állatban megemelkedett, aminek maximuma 7–14 nappal a műtét után volt megfigyelhető, majd fokozatosan csökkent a 21. napig. Hasonlóképp a CCL2 festéshez, a CD11b jelölés intenzitása is gyorsabban csökkent a PV^{+/+} állatokban a kontrollhoz képest, de szignifikáns eltérés csak a 21. napon volt megfigyelhető. A kontroll és a PV^{+/+} állatok Ca mennyiségét a gyulladáshoz kapcsolódó reakciók maximumának idején, a 7. napon határoztuk meg. Az axotomizált és a műtetlen mozgató idegsejtek kompartmentjeiben mérhető EDD hányados kimutatta, hogy a kontroll egerekben a műtét hatására 2-szer nagyobb Ca-szint növekedés volt megfigyelhető a PV^{+/+} állatokhoz képest. Ezen eredményeket kiegészítve elmondhatjuk, hogy a PV^{+/+} törzsben nem emelkedik meg a Ca-szint egyetlen vizsgált kompartmentben sem.

A diazoxid kezelés hatása idegátvágást követő mikroglia reakciókra

A szemmozgató-, a *hypoglossus*- és a *facialis*- mag különböző érzékenységgű mozgató idegsejtjeit axotomizáltuk, majd vizsgáltuk a diazoxid kezelés gyulladásgátló hatását. E protektív stratégia eredményének számszerűsítéséhez az

idegátvágással indukált mikroglia reakciót kívántuk vizsgálni, miközben a motoros magok anatómiai határait is feltérképezzük. Mivel a kettős fluoreszcens jelölés a kontrollálhatatlan paraméterek miatt nem használható megbízhatóan számszerűsítésre, így egy DAB-fluoreszcens kombinált kettős jelölési eljárást dolgoztunk ki. A számszerűsítendő paraméter fluoreszcens jelölését lecseréltük egy DAB alapú vizualizációra, míg a másik sejtípust — amivel az anatómiai határokat definiáljuk — fluoreszcensen jelöltük. E technikával a vizsgált mozgató magok pontos határai feltérképezhetőek és a magok oldalai közötti mikroglia aktiváció különbsége meghatározható. E különbséget az általunk vizsgált összes motoros magban metszetről-metszetre ábrázoltuk a *rostrorocaudalis* tengely mentén. Ezt követően az eredményeket mindegyik vizsgálati csoportban átlagoltuk, ami a szemmozgató mag axotomizálása kapcsán több mint 3.75-ször kisebb mikroglia aktivációt mutatott a diazoxid kezelést követően a kontrollhoz képest. Ezen felül statisztikailag szignifikáns protektív hatás volt mérhető a *facialis* magban (165-ször kisebb mikroglia aktiváció) és a *hypoglossus* magban (72-szer kisebb gyulladási marker) is. Ugyanakkor meg kell jegyezni, hogy a *facialis* és a *hypoglossus* magokban sokkal kifejezettebb mikroglia aktiváció volt látható a diazoxiddal nem kezelt állatokban. E megfigyelés szintén alátámasztja a szemmozgató mag mozgató idegsejtjeinek degenerációval szembeni rezisztenciáját.

MEGBESZÉLÉS

Az AMPA receptorok szerepe a krónikus motoneuron degenerációban

Korábbi kísérletünkben bemutattuk, hogy Tal kezelés hatására az mSOD1 egerek mozgató idegsejtjei megvédhetőek a Ca-indukálta degeneratív folyamatokkal szemben. E kísérletben a protekció csak abban az esetben volt számottevő, ha a kezelés a betegség klinikai fázisa előtt kezdődött. A pozitív hatás elmarad a klinikai fázisban, aminek mibenléte a degeneráció progresszív jellegéből fakadhat. Mindmáig kérdéses, hogy a sejtpusztulás a felső mozgató idegsejtek felől az alsó, ventrolaterális gerincvelő mozgató idegsejtek felé terjed (“*dying forward*”), vagy

retrográd folyamatként az ideg-izom szinapszisok irányából kezdődik (“dying back”). Eredményeink szerint a klinikai fázis előtt alkalmazott Tal kezelés mind az *interosseus* izmokat beidegző neuronok sejttestjeiben, mind azok axonterminálisaiban csökkenti a Ca szint megemelkedését. Az egyetlen strukturális elváltozás a 19 hetes mSOD1 egerekben látható mitokondriális expanzió. E jelenség összeegyeztethető a krónikus neuronális pusztulás során megfigyelhető excitotoxicitással, amit az AMPA receptorok túlműködése okoz. Ugyanakkor a sejttestre irányuló kezeléssel megmenthetőek a közel autonóm entitásként kezelhető ideg-izom szinapszisok is, mivel a korai mitokondriális károsodás kihatással lehet az abnormális sejttest-terminális kommunikációra. Ennek oka, hogy a hasonló amplitúdójú stresszre a limitáltabb homeosztatis- és Ca pufferkapacitással rendelkező axonterminális nagyobb patológiás választ ad. A válaszreakciója a túlerhelt Ca pufferkapacitásra egy lokális kaszkádreakció, ami korai szinaptikus degenerációban nyilvánul meg. E folyamatok már önmagukban elegendők a betegség iniciálására. Ezen eredmények alapján a késői időpontban indított terápiás eljárások sikertelenségéért a retrográd útvonalon terjedő degeneratív mechanizmusok felelősek. Vagyis az mSOD1 állatok mozgató idegsejtjeiben megfigyelhető stressz a sejttest Ca-emelkedésének következtében jelentkező nem megfelelő axonális homeosztázisban keresendő. Mivel e folyamatok retrográd degenerációt indítanak a homeosztázis szempontjából leggyengébb struktúrákban, ezért mind a sejttestet, mind az axonterminálisokat meg kell védeni. Ezt az elképzelést alátámasztja, hogy az agresszívan progrediáló mSOD1 formában a sejttestekhez képest sokkal kifejezettebb az ideg-izom szinapszisok degenerációja. Ugyanakkor, ha a Ca-mediált folyamatok központi szerepet játszanak a degenerációban, akkor alacsonyabb vagy később jelentkező Ca-emelkedés feltételezhető az mSOD1 állatok szemmozgató idegsejtjeiben, amik rezisztensnek tekinthetők az ALS-ben. Vizsgálatunkban a gerincvelő érzékeny sejtjeiben (12 hetes korban) 1.61-szer nagyobb Ca-szint emelkedés volt a sejttestben és 1.27-szer nagyobb a terminálisokban, míg 19 hetes korban ezek az értékek már 1.63-szor és

1.75-ször nagyobbak voltak. Ezzel egy időben a szemmozgató mag mozgató idegsejtjeinek egyik struktúrájában sem volt Ca-szint emelkedés, amit magyarázhat a magasabb CaBP mennyiség, például a nagyobb PV koncentráció.

A neuron-mikroglia kommunikáció szerepe a motoneuronok pusztulásában

A *photobleaching* és a nem-standardizálható megvilágítási időtartam a fluoreszcens képalkotás elkerülhetetlen jellemzői, így a megfelelő számszerűsítéshez egy fotostabil vizualizációs módszer kidolgozása elengedhetetlen. Az általunk bemutatott technika torzítatlan adatokat biztosít a számszerűsítéshez, ugyanakkor rendelkezésre áll az anatómiai orientáció meghatározásához nélkülözhetetlen másodlagos jelölés is. Ezt az immunfestési eljárást diazoxiddal, egy mitokondriális homeosztázist befolyásolni képes szerrel történő kezeléssel alapuló kísérletben teszteltük. A protektív stratégiánk sikeresen csökkentette a mozgató idegsejtek pusztulását több akut degeneratív modellben. Bár a gyulladásgátló kezelés neuroprotektív hatásmechanizmusa nem teljesen ismert, a mikroglia aktiváció csökkentése egy megfelelő terápiás irányvonalnak tekinthető. A szakirodalmi adatok alapján, a diazoxid az ATP-függő kálium csatornákon keresztül hiperpolarizációt indukál a plazmamembránon, aminek hatására a feszültségfüggő Ca-csatornákon keresztül megvalósuló Ca-beáramlást megakadályozza. Bemutattuk, hogy a diazoxid kezeléssel az eltérő érzékenységű mozgató magokban egyaránt csökkenthető a gyulladással kapcsolatos folyamatokat reprezentáló mikroglia sejtek aktivációja akut idegátvágásos degeneratív eseményt követően. Ugyanakkor a vizsgálat alapját képező anatómiai régiók meghatározása kulcsfontosságú, mivel a határvonalak kijelölése és az esetleges ellenoldali reakciók befolyásolhatják a vizsgálati eredményeket.

A kalciumkötő fehérjék protektív hatása mozgató idegsejteket ért sérülést követően

Bemutattuk, hogy a PV^{+/+} transzgenikus egértörzs mozgató idegsejtjeiben megemelkedett a Ca pufferkapacitása, amivel akut sérülést követően csökkenthető a

citoplazmikus Ca mennyisége. Ezen felül a mozgató idegsejtek által kibocsájtott stressz-szignálok lefutási idejét is csillapítja, ami szintén elősegíti a mozgató idegsejtek közelében elhelyezkedő mikroglia sejtek aktivációjának gyorsabb csökkenését. Hogy további eredményekkel támasszuk alá a CaBP-k univerzális protektív szerepének hipotézisét, és hogy kizárjuk az egértörzsek között fennálló különbségek lehetőségét, kísérleteinket mindkét kontrolltörzsen elvégeztük. A 7. posztoperatív napon, amikor a Ca-szint növekedés feltehetőleg eléri maximumát, mindkét kontrolltörzs gerincvelői mozgató idegsejteiben kétszeresére nőtt a Ca-tartalom. Ezen felül a PV^{+/+} törzsben nem figyelhető meg Ca-szint növekedés a gerincvelői mozgató idegsejtekben, ami arra enged következtetni, hogy a PV jelenléte által biztosított hatás átalakítja a sérülékeny idegsejteket, a szemmozgató neuronokhoz hasonló rezisztens típusúvá. Mivel az immunválaszt megelőzi a citokin/kemokin szignalizáció, így kísérletünkben a CCL2-t választottuk a mozgató idegsejtek akut lézióját követő stressz-szignál nyomon követésére. Az ALS-ben elhunytak kórbontani eredményei alapján egy fokozatos mikroglia reakció figyelhető meg, ahol a motoros agykéreg környéknek mikroglia reakciója összefüggést mutat a felső mozgató idegsejtek degenerációjának súlyosságával. Kísérletünkben bemutattuk, hogy az eltérő PV koncentrációval rendelkező mozgató neuronokban idegátvágást követően a krónikus degenerációra jellemző patológiás folyamatokkal összeegyeztethető mikroglia aktivációt detektáltunk. A CCL2 expresszió és a mikroglia reakciók időbeli lefutását figyelembe véve megállapíthatjuk, hogy egy átmeneti emelkedés mindkét paraméterben megfigyelhető a 3 hetes posztoperatív periódus alatt. Bemutattuk, hogy a PV^{+/+} egerek gerincvelői mozgató idegsejteiben csökkent a gyulladáso reakció, akár a CCL2, akár a mikroglia aktiváció számszerűsítése alapján. Ezen felül a CCL2 festés gyorsabban, már a 14. műtét utáni napon visszatért az alapállapotba, míg a CD11b csak a 21. napon. Feltételezve, hogy a degenerációra különbözőképp érzékeny mozgató idegsejtek ugyanúgy reagálnak a Ca-indukálta stresszre, akkor nem a reakciók amplitúdójában, hanem azok időtartamában várhatunk jelentős csökkenést.

Így az immunkompetens, CD11b festett sejtek aktivációjának/migrációjának csökkenése a folyamatot vezérlő CCL2 szignál megszűnését követő időpontra tehető. Ezen felül alacsonyabb Ca-mennyiség figyelhető meg a PV^{+/+} állatok gerincvelői mozgató idegsejtjeiben, ami feltételezhetően a CaBP-k által megvalósuló rezisztenciának köszönhető. Ugyanakkor, a megemelt Ca pufferkapacitás az mSOD1 modellben jelentkező krónikus stresszre nem jelentett protektív hatást a PV^{+/+} × mSOD1 kettős transzgenikus törzsben, ahol bár a betegség progressziója lelassult, de megállítani nem sikerült. A gyenge protektív hatás oka abban keresendő, hogy a megemelt pufferkapacitás is limitált, tehát a folyamatos krónikus stressz alatt előbb vagy utóbb telítődik e rendszer. Bár a megnövelt Ca-puffer nem jelentett teljeskörű védelmet, ugyanakkor ezek az adatok arra engednek következtetni, hogy a Ca homeosztázis stabilizálásával megvalósítható neuroprotektív stratégia egy biztató terápiás lehetőség a mozgató idegsejtek degenerációjával szemben.

ÖSSZEFOGLALÁS

- Az ALS mSOD1 modelljében protektív hatást mutattunk ki Tal kezeléssel a sérülékeny izmok axonterminálisaiban. A hatása a Ca-permeábilis AMPA receptorokon kifejtett Ca-beáramlás csillapításán alapul. E protektív stratégia elveszti hatékonyságát, ha a kezelést a klinikai tünetek megjelenése után alkalmazzuk. Ugyanakkor bizonyítható, hogy e sejttestre ható terápiás stratégiával egyaránt megvédhetőek a sejttestek és az axonterminálisok is.
- A szemmozgató mag neuronjai egy olyan speciális tulajdonsággal rendelkeznek, ami megvédi őket a Ca által indukált degenerációtól. Ez a képesség a megemelkedett mennyiségű CaBP tartalomnak köszönhető. Mivel e mozgató idegsejtek nagyobb rezisztenciát mutatnak a degenerációval szemben, így az mSOD1 egerekben nem figyelhető meg a degenerálódó mozgató idegsejtekre jellemző citoplazmikus Ca-szint megemelkedése. Ezen felül, a Tal kezelés nem volt képes a kontroll értéknél tovább csökkenteni a Ca-tartalmat.

- Mivel az élő szervezetben különböző CaBP tartalommal rendelkező magcsoportok is megtalálhatóak, így e fehérjék hatását akut sérüléssel modellben is vizsgálni kívántuk. Kimutattuk, hogy a gyulladási folyamatokra jellemző mikroglia aktiváció szignifikánsan kisebb a magasabb CaBP tartalommal rendelkező szemmozgató magban, az alacsonyabb CaBP fehérjemennyiséggel rendelkező mozgató magokhoz képest.
- Diazoxid kezeléssel csökkentettük az akut sérülések következtében fellépő mikroglia aktivációt. E terápiás kísérlet szignifikáns gyulladáscsökkentő hatást váltott ki az általunk vizsgált összes mozgató magban. A protektív hatás alapja, a gyulladás gátlása, ugyanakkor a diazoxid farmakológiai hatása kiterjed a Ca-indukálta stressz csökkentésére is.
- A Ca-indukálta degeneráció és a mikroglia sejtek aktivációja közötti kapcsolatok feltérképezésére PV^{+/+} egereket egyoldalú idegátvágásnak vetettünk alá. A sebészeti beavatkozást követően emelkedett Ca-szint csak a kontrolltörzsben volt megfigyelhető, míg a PV^{+/+} egerek mozgató idegsejtjeiben az intracelluláris Ca-szint nem változott. Ez alapján kijelenthetjük, hogy a megnövelt mennyiségű CaBP képes csökkenteni a Ca-indukálta degeneratív folyamatok hatását.
- Ezen felül a PV^{+/+} állatokban a CCL2 immunfestéssel jellemzett kemokin szignalizáció hamarabb csengett le, ami gyorsabb csillapodást eredményezett a mikroglia aktiváció által mediált gyulladási folyamatokban.

Eredményeink alátámasztják a hipotézist, miszerint a Ca a krónikus degeneratív folyamatok központi szereplője, sőt bizonyíthatóan fontos szerepet tölt be akut degeneratív folyamatokban is. Kimutattuk, hogy mind az AMPA receptorokat célzó, mind a CaBP-k mennyiségének növelésén alapuló terápiás stratégia képes a káros Ca-szintet csökkenteni. Ugyanakkor a Ca homeosztázisban bekövetkező elváltozás képes a mikroglia aktivációjára, ezáltal kihatással van a környező gyulladási folyamatokra. E mikroglia aktiváció csökkenthető, ha megfelelő védelemmel megerősítjük a Ca homeosztázist. Eredményeink alapján a Ca-szint megemelkedése és a gyulladási folyamatok közötti kapcsolat megértése új neuroprotektív terápiás

eljárások kidolgozását teszi lehetővé. A jövőben ezáltal sokkal nagyobb szerep juthat a neuronok és a mikroglia közötti “párbeszéd” megértésére, ami a patológiai folyamatok pontosabb megismerését tenné lehetővé.

A doktori értekezés alapját képező *in extenso* tudományos közlemények:

- I. Roland Patai, Bernát Nógrádi, József I. Engelhardt, László Siklós:** Calcium in the pathomechanism of amyotrophic lateral sclerosis – Taking center stage? *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2017; 483: 1031–1039. **Hatástényező: 2.466; Presztízs: Q1 (Biofizika)**
- II. Roland Patai, Melinda Paizs, Massimo Tortarolo, Caterina Bendotti, Izabella Obál, József I. Engelhardt, László Siklós:** Presymptomatically applied AMPA receptor antagonist prevents calcium increase in vulnerable type of motor axon terminals of mice modeling amyotrophic lateral sclerosis. *Biochimica et Biophysica Acta – Molecular Basis of Disease*, 2017; 1863: 1739–1748. **Hatástényező: 5.476; Presztízs: Q1 (Molekuláris biológia)**
- III. Melinda Paizs, Roland Patai, József I. Engelhardt, Zoya Katarova, Izabella Obál, László Siklós:** Axotomy Leads to Reduced Calcium Increase and Earlier Termination of CCL2 Release in Spinal Motoneurons with Upregulated Parvalbumin Followed by Decreased Neighboring Microglial Activation. *CNS and Neurological Disorders – Drug Targets*, 2017; 16(3): 356–367. **Hatástényező: 2.506; Presztízs: Q1 (Orvostudomány)**

| | |
|--|---------------|
| A doktori értekezés alapját képező közlemények száma: | 3 |
| A tudományos közlemények összesített hatástényezője: | 10.448 |