



DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**A TOLL-SZERŰ RECEPTOROK, VALAMINT A
DOHÁNYFÜST ÖSSZETEVŐI ÁLTAL KIVÁLTOTT
FUNKCIÓZAVAROK MOLEKULÁRIS
MECHANIZMUSAI AGYI ENDOTÉLSEJTEKBEN**

Nagyószai Péter

Témavezető: Dr. Krizbai István

Tudományos főmunkatárs

SZTE TTIK Biológia Doktori Iskola

MTA SZBK Biofizikai Intézet

SZEGED

2010

BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK

A központi idegrendszeri homeosztázis megteremtésében és fenntartásában kiemelkedő szerepe van a vér-agy gátnak. A gát morfológiai alapját az egymással szorosan illeszkedő agyi endotélsejtek alkotják, amelyek az asztrocitákkal és a pericitákkal együttműködve szabályozzák a keringés és a központi idegrendszer közötti anyagáramlást. A gát funkció kialakítása szempontjából kiemelkedő szereppel bírnak az endotélsejtek között kialakuló szoros és adherens kapcsolatok, amelyek sérülése a vér-agy gát permeabilitásának növekedését eredményezi.

Ismert tény, hogy patológiás körülmények között (gyulladásos betegségek, agyi ischaemia és az azt követő reperfúzió, krónikus neurodegeneratív betegségek, agyi tumorok, traumák) megnőhet a vér-agy gát permeabilitása, ami a központi idegrendszer homeosztázisának megbomlásához vezet, és súlyosbíthatja a betegségek lefolyását. A különböző fertőzések gyakran társulnak szisztémás tünetekkel, amelyek szintén károsíthatják a vér-agy gátat.

Az endotélsejtek a keringés és a központi idegrendszer határfelületének aktív részeseiként számos exogén és endogén stresszfaktor hatásának vannak kitéve. Ezen anyagok felismerésében és a válaszreakció elindításában a szakirodalmi adatok alapján az agyi endotélsejtek Toll-szerű receptorai (TLR) is szerepet játszhatnak. E receptorok különböző mintázatokat ismernek fel, amelyek egyrészt származhatnak kórokozóktól: ezek az úgynevezett patogénasszociált molekuláris mintázatok, amelyek a gazdaszervezetre nem jellemző molekulák. Ugyanakkor a sérült szövetekből felszabaduló endogén anyagok, illetve gyulladásos mediátorok is képesek őket aktiválni.

Gyulladásos válaszreakciót szervezetünk sejtjeiben a dohányfüst számos összetevője is képes kiváltani. A cigarettafüstből több ezer vegyület jut a testünkbe, köztük a nikotin és a policiklusos aromás szénhidrogének is. A dohányzáshoz köthető neurológiai betegségekben szenvedők nagy száma arra utal, hogy a dohányfüst összetevőinek egyik fő célpontja a központi idegrendszer. Annak ellenére, hogy a dohányosok körében igen gyakran fordul elő agyi érkatasztrófa, illetve ismeretes az

is, hogy a vér-agy gát fontos szerepet tölt be e betegség kórfejlődésében, igen kevés információ áll rendelkezésünkre a dohányzás vér-agy gátra gyakorolt közvetlen hatásáról. Az egyik leginkább vitatott kérdés az, hogy maga a nikotin milyen mértékben járul hozzá a központi idegrendszeri megbetegedések kialakulásához, illetve más dohányfüst összetevők e folyamatokban betöltött szerepe is tisztázatlan. Ezen információk tükrében munkánk során a következő kérdésekre kerestük a választ:

1. Mely Toll-szerű receptorok fejeződnek ki az agyi endotélsejteken? Miképpen befolyásolják az agyi endotélsejtek vér-agy gát tulajdonságait a TLR-ek által közvetített stresszhatások?

2. Miképpen hatnak az agyi endotélsejtek működésére a cigarettafüst egyes összetevői, így a nikotin és a policiklusos aromás szénhidrogének?

ALKALMAZOTT MÓDSZEREK

SEJT TENYÉSZTÉS

A hCMEC/D3 humán agyi endotélsejt vonalat patkányfarok kollagénnel bevont csészéken, illetve üveg fedőlemezekten tenyésztettük EBM-2 médiumban, 2,5% FBS (foetal bovine serum) jelenlétében. A sejteket 100%-os páratartalmat biztosító inkubátorban növesztettük, 5% CO₂ tartalmú atmoszférában, 37°C-on. A primér patkány agyi endotélsejteket kéthetes patkányokból izoláltuk, puromicinnel szelektáltuk és patkányfarok kollagénnel bevont üveg fedőlemezekten tenyésztettük.

KEZELÉSEK

A kísérletek során a konfluens agyi endotélsejt tenyészeteket szérummentes tápfolyadékban kezeltük 10, 50 vagy 100 µg/ml zymosan A-val 24 órán át. A zymosan kezelésekk mellett 5 µM DMNQ-val is kezeltük a sejteket. Egyes esetekben pedig a 100 µg/ml zymosannal együtt 10 µM U0126-ot, 100 µM PDTC-t vagy 5 µM

DMNQ-t adtunk a tápfolyadékhoz, a vegyületek együttes hatásainak vizsgálata érdekében. A nikotint különböző időtartamú kezelések során 1 nM, 10 nM, 1 μ M, 10 μ M, a fenantrént és az 1-metilantracént pedig 30 μ M végkoncentrációban adtuk az endotélsejtek tápfolyadékához (24 órás kezelések). Végül a 10 μ M-os nikotin kezelést (24 óra) 10 μ M DMNQ-val is kiegészítettük, a vegyületek együttes hatásaink tesztelésére.

PERMEABILITÁS MÉRÉSEK

Az agyi endotélsejtek gát funkciójának teszteléséhez mértük a konfluens tenyészetek permeabilitását. A permeabilitás mérésekhez a primér patkány agyi endotélsejteket filtereken tenyésztettük, amelyeket asztrocitákat tartalmazó tenyésztőedénybe helyeztünk. A konfluens tenyészeteket 24 órán keresztül együtt növesztettük, addig, amíg az endotélsejt rétegek magas transzendoteliális elektromos ellenállási értékeket nem mutattak. A filterek alsó (abluminális) részéhez Ringer-Hepes-t, míg a felső, lüminális oldalhoz 10 μ g/ml nátrium fluoreszceint, 170 μ g/ml Evans kéket és 10 mg/ml marha szérum albumint (BSA) tartalmazó Ringer-Hepes oldatot adtunk. A jelzőanyagok koncentrációját fluoreszcens leolvasóval mértük, majd a kapott értékekből kiszámítottuk a permeabilitási együtthatót.

A TRANSZENDOTELIÁLIS ELEKTROMOS ELLENÁLLÁS MÉRÉSE

A gát funkció vizsgálatára egy másik módszert, a transzendoteliális elektromos ellenállás mérését is alkalmaztuk. Az endotélsejtek vér-agy gát tulajdonságainak erősítése érdekében a sejteket ezen mérésekhez is asztrocitákkal tenyésztettük együtt. A konfluens endotélrétegek ellenállási értékeit bot elektródok segítségével és EVOM epiteliális Volt-Ohm méterrel mértük. Ezzel a módszerrel 100 $\Omega \times \text{cm}^2$ feletti értékeket lehet mérni.

VALÓS IDEJŰ POLIMERÁZ LÁNCREAKCIÓ

A sejtekből TRIzol reagens segítségével RNS-t izoláltunk, ezt standard protokoll szerint cDNS-sé írtuk át. Az amplifikáció BioRad iQ5 készüléken történt FastStart SYBR Green Mix segítségével. A fluoreszcens jel detektálásához a küszöbértéket és a kvantifikálást a készülék saját szoftverével végeztük. A génexpresszió változásait a $\Delta\Delta C_t$ módszerrel értékeltük ki, az eredményeket pedig a Microsoft Excel 2000 program segítségével ábrázoltuk.

A FEHÉRJEMINTÁK ELŐKÉSZÍTÉSE ÉS WESTERN BLOT

Az agyi endotélsejtek konfluens tenyészetét különböző vegyületekkel kezeltük, majd PBS-sel mostuk le róluk a tápfolyadékot, és a sejteket jéghideg homogenizáló pufferben (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,5% Triton X-100, 0,5% NP-40 (Nonidet P-40), 2 mM $CaCl_2$, 5 mM NaF, 1 mM Na_3VO_4 és 1 mM Pefabloc) mechanikailag feltártuk. A Triton X-100 oldékony, illetve oldhatatlan frakciójú minták előkészítése során a sejteket 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 0,5% Triton X-100, 1 mM Na ortovanadát és 1 mM Pefabloc összetételű pufferben homogenizáltuk. A felülúszókban (Triton X-100 oldékony frakció) a fehérje koncentrációt BCA módszerrel (Bicinchoninic Acid Assay Kit) határoztuk meg, majd e mintákhoz ötszörös koncentrációjú Laemmli puffert adtunk, az üledéket (Triton oldhatatlan frakció) pedig Laemmli pufferbe vettük fel. A Western blot kísérleteket megelőzően a mintákat $95^\circ C$ -on 3 percig denaturáltuk.

Az azonos mennyiségű fehérjét tartalmazó mintákat SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel (SDS-PAGE) választottuk el, majd polivinilidén fluorid (PVDF) vagy nitrocellulóz membránra blottoltuk. A blokkolás után a membránokat az elsődleges ellenanyaggal inkubáltuk, majd TBS-T-vel mostuk. Ezután torma peroxidázzal kapcsolt másodlagos ellenanyaggal inkubáltuk, majd mostuk őket, és az

immunreakciót kemilumineszcens reagens segítségével (Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate) röntgenfilmen vizualizáltuk.

IMMUNKICSAPÁS

A sejtlizátumot 2-5 µg anti-β-catenin ellenanyaggal inkubáltuk 4 órán át. A képződött immunkomplexeket szefaróz gyöngyökhöz kötött G fehérje jelenlétében csaptuk ki, majd mostuk és Laemmli-féle mintapufferben 3 percig 95°C-on denaturáltuk az SDS-poliakrilamid gélelektroforézist megelőzően.

IMMUNFLUORESZCENS FESTÉS

A fedőlemezeken tenyésztett sejteket kezelés után PBS-ben mostuk, majd 10 percig rögzítettük etanol/ecetsav 95/5 arányú keverékével, -20°C-on. Újabb mosás után a fedőlemezeket 1% BSA-val blokkoltuk, ezután az elsődleges, majd a fluoreszcensen jelölt másodlagos ellenanyaggal inkubáltuk. Mosás után a fedőlemezeket víz alapú beágyazó géllal rögzítettük a tárgylemezeken. A képeket fluoreszcens mikroszkóphoz kapcsolt digitális kamerával készítettük.

STATISZTIKAI ELEMZÉS

A statisztikai elemzést minden esetben három független biológiai mintán mért értékek átlagai és szórásai alapján végeztük. Az adatok elemzésekor egy szempontos ANOVA elemzést végeztünk Bonferroni post hoc teszt alkalmazásával. Minden esetben a $P \leq 0,05$ értéket tekintettük szignifikáns különbségnek.

EREDMÉNYEK

1. A TOLL-SZERŰ RECEPTOROK KIFEJEZŐDÉSE AZ AGYI ENDOTÉL- SEJTEKEN

Eredményeink alapján egy humán agyi endotélsejt vonal (hCMEC/D3) kezeletlen sejtjei a TLR2, 3, 4 és 6, míg az izolált patkány agyi endotélsejtek a TLR2, 3 és 6 receptorokat fejezik ki. Ezen receptorok közül a TLR6 jelenlétét agyi endotélsejtekben ismereteink szerint még senki sem írta le. Az azonosított humán receptorok mindegyikének mRNS szintű kifejeződését indukálta az oxidatív stressz, amit DMNQ kezeléssel váltottunk ki. A TLR2/6 receptorok agonistája, a zymosan pedig e két receptor kifejeződését serkentette, míg a TLR3 és 4-re nem volt hatással.

2. A ZYMOBAN, EGY TLR2/6 AGONISTA HATÁSA AZ AGYI ENDOTÉLSEJTEKRE

A zymosan statisztikailag szignifikáns mértékben növelte az endotél tenyészetek permeabilitását. E jelenséget magyarázhatja a zymosan sejt-sejt kapcsolatokra kifejtett hatása: a kezelés eredményeképpen a szoros kapcsolatok két transzmembrán alkotóelemének, az occludinnak és a claudin-5-nek a mennyisége a zymosan koncentrációjától függő módon csökkent a sejtekben és a fehérjék számos helyen eltűntek a sejtkapcsoló szerkezetek területéről. Az occludin esetében bekövetkezett változásokat sikerült kivédeni az U0126 nevezetű ERK 1/2 kináz gátlószerrel, míg a claudin-5 eltűnését NF- κ B gátlószerrel (PDTC) és U0126-tal sem sikerült megakadályozni. Oxidatív stresszel kombinálva (DMNQ kezelés) a zymosan még kifejezettebb változásokat okozott: a kettős kezelés hatására fokozódott az occludin mennyiségi csökkenése és a fehérje szinte teljes mértékben eltűnt a szoros kapcsolatok területéről.

3. A NIKOTIN HATÁSA AZ AGYI ENDOTÉLSEJTEKRE

Munkánk során a dohányfüst néhány alkotóelemét, így a nikotint és két policiklusos aromás szénhidrogént, a fenantrént és az 1-metilantracént is vizsgáltuk. E vegyületek szervezetünkre gyakorolt befolyásának ugyan kiterjedt a szakirodalma, de az agyi endotélsejtekre kifejtett hatásaik alig, vagy egyáltalán nem ismertek. A nikotin esetében Western blottal kimutattuk, hogy a rövidebb idejű, kisebb koncentrációjú kezelések nem voltak hatással az endotélsejtek sejtkapcsoló fehérjéinek kifejeződésére. A vegyület csak a dohányosok vérében mért maximálisnál is nagyobb koncentrációban károsította a sejtkapcsoló szerkezeteket: hatására a szoros kapcsolatokat felépítő egyes fehérjék, így ZO-1 és az occludin, valamint az adherens kapcsolat transzmembrán alkotóeleme, a cadherin mennyisége is csökkent a sejtekben. Az említett fehérjék, valamint a ZO-2 is több helyen eltűnt a sejt-sejt kapcsolatok területéről. A nikotin és a fenantrén együttes hatására is hasonló változásokat tapasztaltunk a sejtkapcsoló fehérjék sejten belüli elhelyezkedését illetően. A nikotin ugyan önmagában nem befolyásolta, de DMNQ-val kombinálva statisztikailag szignifikáns mértékben csökkentette a tenyészetek transzendenteliális elektromos ellenállását, ami az endotélsejtek gát funkciójának sérülésére utal.

4. A POLICIKLUSOS AROMÁS SZÉNHDROGÉNEK HATÁSAI AZ AGYI ENDOTÉLSEJTEKRE

A vizsgált két policiklusos aromás szénhidrogén közül a fenantrén hatására a szoros kapcsolatokat két transzmembrán fehérjéje, az occludin és a claudin-5 is átrendeződött a Triton X-100 oldékony frakcióból az oldhatatlanba, míg az 1-metilantracén a claudin-5 mennyiségét csökkentette kissé az oldhatatlan frakcióban. A fenantrén hatására továbbá az occludin és a ZO-2 néhány helyen eltűnt a sejt-sejt kapcsolatok területéről. Az adherens kapcsolat fehérjéinek mennyiségére ugyanakkor egyik vegyület sem volt hatással, emellett a fenantrén a β -catenin α -cateninnel és cadherinnel való kölcsönhatását sem befolyásolta. Akárcsak a nikotin,

így a fenantrén hatására bekövetkezett változások sem csökkentették a tenyészetek elektromos ellenállását, ami arra utal, hogy ezen vizsgálati körülmények között e két policiklusos aromás szénhidrogénnek önmagában nem volt számottevő hatása az endotélsejtek gát funkciójára.

ÖSSZEFOGLALÁS

Elsőként azonosítottuk a 6-os típusú Toll-szerű receptor kifejeződését az agyi endotélsejtekben, valamint kimutattuk, hogy a TLR2/6 aktivációt követően egy, az ERK 1/2 kinázok által mediált folyamat eredményeképpen az occludin mennyisége csökken a sejtekben és a fehérje eltűnik a szoros kapcsolatok területéről. Hasonlóképpen a claudin-5 fehérje is eltűnik a sejtkapcsoló szerkezetekből. Ez utóbbi folyamat mechanizmusának tisztázása jelenleg is folyik.

A cigarettafüst komponenseivel végzett kísérleteink eredményei összességében arra utalnak, hogy a nikotin, a fenantrén, valamint az 1-metilantracén valószínűleg nem okoznak akut változásokat az agyi endotélsejtek alapvető funkcionális tulajdonságaiban. Ugyanakkor a vegyületek főként más károsító hatásokkal, így oxidatív stresszel együttvéve jelentősen befolyásolhatják a vér-agy gát működését.

TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

Az értekezéshez kapcsolódó közlemények:

Nagyószai P., Wilhelm I., Farkas A.E., Fazakas C., Dung N.T., Haskó J., Krizbai I.A. (2010) Expression and regulation of Toll-like receptors in cerebral endothelial cells. Neurochem. Int. IF₂₀₀₉: 3,541

Hutamekalin P., Farkas A.E., Orbók A., Wilhelm I., **Nagyószai P.**, Veszélka S., Deli M.A., Buzás K., Hunyadi-Gulyás E., Medzihradsky K.F., Meksuriyen D., Krizbai I.A. (2008) Effect of nicotine and polyaromatic hydrocarbons on cerebral endothelial cells. Cell Biol. Int. 32, 198-209. IF₂₀₀₈: 1,619

Az értekezéshez szorosan nem kapcsolódó közlemények:

Wilhelm I., **Nagyószai P.**, Farkas A.E., Couraud P.O., Romero I.A., Weksler B., Fazakas C., Dung N.T., Bottka S., Bauer H., Bauer H.C., Krizbai I.A. (2008) Hyperosmotic stress induces Axl activation and cleavage in cerebral endothelial cells. J. Neurochem. 107, 116-126. IF₂₀₀₈: 4,500

Wilhelm I., Farkas A.E., **Nagyószai P.**, Váró G., Bálint Z., Végh G.A., Couraud P.O., Romero I.A., Weksler B., Krizbai I.A. (2007) Regulation of cerebral endothelial cell morphology by extracellular calcium. Phys. Med. Biol. 52, 6261-6174. IF₂₀₀₇: 2.528

Farkas A., Szatmári E., Orbók A., Wilhelm I., Wejksza K., **Nagyószai P.**, Hutamekalin P., Bauer H., Bauer H.C., Traweger A., Krizbai I.A. (2005) Hyperosmotic mannitol induces Src kinase-dependent phosphorylation of beta-catenin in cerebral endothelial cells. J. Neurosci. Res. 80, 855-861. IF₂₀₀₅: 3.239

Összesített impakt faktor: 15,427

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Hálás köszönet illeti témavezetőmet, Dr. Krizbai Istvánt, az MTA SZBK Biofizikai Intézetének tudományos főmunkatársát, aki egyetemi hallgató korom óta töretlen türelemmel és bizalommal támogatja munkámat, s akinek nemcsak szakmai, de az élet más területein adott tanácsaira is bátran támaszkodhattam.

Köszönettel tartozom Dr. Siklós Lászlónak és Dr. Párducz Árpádnak az MTA SZBK Biofizikai Intézet Molekuláris Neurobiológiai Laboratórium jelenlegi és volt vezetőjének, hogy lehetővé tették az intézetben doktori munkám elvégzését.

Köszönet illeti a Molekuláris Neurobiológiai Laboratórium minden jelenlegi és volt tagját a segítőkészségükért.

Név szerint is köszönettel tartozom továbbá az Agyi Endotél Kutatócsoport jelenlegi és volt tagjainak, elsősorban Dr. Wilhelm Imolának és Dr. Farkas E. Attilának, továbbá Fazakas Csillának, Haskó Jánosnak, Ngo Thi Kue Dungnak, Dr. Pilaiwanwadee Hutamekalinnak, valamint Dr. Orbók Annának munkám kezdetén az alkalmazott technikák elsajátításában nyújtott segítségükért, a további évek során pedig önzetlen támogatásukért, hasznos tanácsaikért és nem utolsósorban az inspiráló, vidám és kellemes légkörért, amit nemcsak a munkahelyen, de a laboron kívül is fenntartottak.

Köszönet a Richter Gedeon Centenárium Alapítványnak az anyagi támogatásért munkám befejezéséhez.

Örök hálával tartozom szüleimnek és testvéremnek, amiért egész életem során mindenben támogattak, és mindig hagyták, hogy a saját utamat járjam.