

## ZÁRÓJELENTÉS OTKA T037956

A központi idegrendszer működése számára elengedhetetlen állandó belső környezet fenntartásában a vér-agy gátnak döntő jelentősége van. A vér-agy gát barrier funkciójának ellátásában kiemelkedő szerepe van az agyi endotélsejteknek illetve ezek interendotheliális és sejtmátrix kapcsolatainak. Számos olyan központi idegrendszeri megbetegedés ismeretes, (agyi ischaemia, traumák, daganatok, neurodegeneratív kórképek) amely a vér-agy gát sérüléséhez, és ezáltal a központi idegrendszer homeosztázisának felbomlásához vezethet. Ennek súlyos következményei lehetnek a kórkép lefolyását illetően. Kutatómunkák egyik legfontosabb célja az interendotheliális junkcionális fehérjék szerepének tisztázása volt a különböző idegrendszeri megbetegedések során kialakuló vér-agy gát károsodások kialakulásában.

### *Oxidatív stressz*

Egyre több kísérleti eredmény utal arra, hogy az agyi mikroerek fontos szerepet játszanak az ischaemiás károsodások patogenezisében. Az agyi ischaemiát követő vér-agy gát károsodások patomechanizmusa még nagymértékben ismeretlen, ezért megvizsgáltuk az oxidatív stressz hatását az agyi endotélsejtekre.

Agyi endotélsejt tenyészeteken végzett kísérleteink azt igazolják, hogy a hipoxia/reoxigenáció illetve a kémiai úton kiváltott oxidatív stressz (DMNQ illetve  $H_2O_2$ ) genotoxikus hatással rendelkezik, amint azt a megnövekedett kromoszomális aberrációk és apoptotikus sejtek számának növekedése mutatja. A változatlan LDH értékek arra engednek következtetni, hogy ezek a változások igen korán, még a sejtek fizikai károsodása előtt bekövetkeznek.

A junkcionális fehérjék expressziójának vizsgálta során azt tapasztaltuk, hogy a hipoxia és az azt követő reoxigenáció az agyi endotélsejtek occludin expressziójának szignifikáns csökkenéséhez vezet, amint azt a Western-blot analíziseink eredménye mutatja. Annak ellenére, hogy a glukózmentes médium önmagában nem okoz csökkenést az occludin mennyiségében, a hipoxia/reoxigenáció által okozott occludin expresszió csökkenés sokkal erőteljesebb volt glukózmentes médiumban mint glukózt is tartalmazó tápfolyadékban. Hasonló eredményeket értünk el DMNQ alkalmazásával is. 1-10  $\mu M$  DMNQ két órán át történő alkalmazása szignifikánsan csökkentette az occludin mennyiségét. Az occludin downregulációs mechanizmusai között fontos szerepet játszhatnak proteolitikus folyamatok is. Kimutattuk, hogy az occludin kapcsolódni képes az

itch nevű ubiquitin ligázhoz, ezáltal ubiquitinilálódik és a proteoszomális degradáció szubsztrátjává válhat.

Az adherens junction fehérjéinek változása kevésbé volt erőteljes. A cadherin expressziója kismértékben csökkent hipoxia/reoxigenáció, és DMNQ hatására, míg a catenin család (alfa, béta és gamma catenin) tagjainak mennyisége változatlan maradt. Ezzel szemben a koimmunoprecipitációs vizsgálatok azt igazolják, hogy a cadherin és béta-catenin közötti kapcsolat sérül oxidatív stressz hatására.

A junkcionális fehérjék expressziójának csökkenése arra készítetett bennünket, hogy megvizsgáljuk a transzendenteliális rezisztencia változását hipoxia/reoxigenáció hatására. A transzendenteliális rezisztencia a junkcionális komplex integritásának fontos paramétere. A DMNQ kezelés a transzendenteliális rezisztencia gyors csökkenéséhez vezetett, értéke már 10 perc után a kiindulási érték 50%-ra csökkent. Egy órás kezelés után gyakorlatilag nem volt transzendenteliális rezisztencia mérhető.

#### *A nikotin és poliaromás szénhidrogén származékok szerepe a vér-agyi gát károsodások patomechanizmusában*

A dohányzás számos olyan központi idegrendszeri megbetegedés kialakulásában játszik szerepet, melyben a vér-agy gát is károsodik. Keveset tudunk azonban a dohányzás vér-agy gátra kifejtett közvetlen hatásáról.

Kísérleteink célja a dohányfüst főbb összetevőinek agyi endotélsejtekre gyakorolt hatásának vizsgálata volt. A vér-agy gát barrier funkció ellátása szempontjából az interendenteliális kapcsolatoknak van kiemelt jelentősége, így a fő junkcionális fehérjék expresszióját és sejten belüli elhelyezkedésének változását tanulmányoztuk primer patkány agyi endotél sejtenyészeteken.

A sejteket  $10^{-5}$ - $10^{-8}$  mol/dm<sup>3</sup> nikotinnal,  $3 \times 10^{-5}$  mol/dm<sup>3</sup> 1-metilantracénnel (MA) vagy fenantrénnel (Ph) kezeltük. Az oxidatív stressz és nikotin összegzett hatásának vizsgálatára  $10^{-5}$  mol/dm<sup>3</sup> DMNQ jelenlétében alkalmaztuk a  $10^{-5}$  mol/dm<sup>3</sup> nikotin kezelést.

Western blot technikával 24 órás,  $10^{-5}$  mol/dm<sup>3</sup> nikotin kezelés hatására az occludin, ZO-1 és cadherin csökkenését mutattuk ki. A fenantrén az occludin és claudin-5 detergens szolubilis frakcióba való redisztribúcióját okozta. Ez a fehérjék membránhoz való kötöttségének csökkenésére utal. Egyik vizsgált poliaromás szénhidrogén sem volt hatással a cadherin és ZO-1 fehérjékre.

A primer tenyészetek immunfluoreszcens festése alátámasztotta a nikotin ZO-1 és cadherin fehérjékre gyakorolt hatását. Nem találtunk változást a sejtek tirozín-foszforyláltságában, sem pedig a beta-catenin illetve a ZO-2 fehérjék festődésében.

A transzendenteliális ellenállást, ami a gátfunkció megbízható mérője, nem befolyásolta sem a nikotin sem pedig a poliaromás szénhidrogének. Ugyanakkor viszont a 24 órás nikotin kezelés oxidatív stressz mellett az ellenállás jelentős csökkenését okozta.

Eredményeink azt bizonyítják, hogy a nikotin károsítja az endothelsejtek közti kapcsolatokat és negatívan befolyásolja a vér-agy gát működését. Ezt a károsító hatást tovább fokozza az oxidatív stressz.

2D elektroforézis segítségével kimutattuk, hogy a nikotin és a poliaromás szénhidrogének számos fehérje expresszióját képes szabályozni az agyi endothelsejtekben. A 2D elektroforézist követő MALDI analízis segítségével a nikotin által indukált fehérjék között jeltovábbító folyamatokban és stressz válaszban szerepet játszó fehérjéket is sikerült azonosítani.

#### *Vérzézéses shock*

Irodalmi adatok utaltak arra, hogy a vérzézéses shock szintén növelheti a vér-agy gát permeabilitását. Ezért kutatásaink során megvizsgáltuk, hogy a haemorrhagias shock miként befolyásolja a vér-agy gát működését és integritását. Kísérleteinkhez hím Wistar patkányokat használtunk, a haemorrhagiás shock létrehozásához egy általánosan elfogadott véreztetési modellt alkalmaztunk.

A vér-agy gát permeabilitás vizsgálataink azt mutatták, hogy a shock dekompenzált stádiumában a vér-agy gát átteresztőképssége elsősorban a kis molekulású anyagok számára nő meg, ami arra enged következtetni, hogy az agyi endothelsejtek közötti kapcsolatok sérülnek. Ezért további vizsgálatainkat az interendenteliális kapcsolatokra, az úgynevezett tight junctionokra (TJ) és adherens junctionokra (AJ) összpontosítottuk. Kísérleti állatokból izolált agyi kapillárisokból kimutattuk hogy a TJ egyik transzmembrán fehérjéjének, az occludinnak a mennyisége jelentősen csökken a shock során, és ez a csökkenés különösen a dekompenzált stádiumban erőteljes. Ebben a folyamatban eredményeink alapján a protein kináz C és a MAPKinázok játszhatnak fontos szerepet.

#### *Foszforyláció szerepe a junkcionális komplexum működésének szabályozásában*

Az interendotheliális kapcsolatok működését igen összetett regulációs mechanizmusok szabályozzák, amit jeleznek a junkcionális komplexumba lokalizálódó jeltovábbító molekulák

is. A szabályozás egyik fontos eleme a junkcionális fehérjék foszforilációja a szerin/threonin illetve tirozin aminosavakon, ezért a protein kinázok és foszfatázok vizsgálata kiemelkedő jelentőségű lehet az interendotheliális kapcsolatok működésének megértésében

Kísérleteink során megállapítottuk, hogy a fenilarzén oxid (PAO), ami a tirozin foszfatázok specifikus gátlószere, erős tirozin foszforilációt okozott az 50-110 kDa-os tartományban levő fehérjéken, és a foszforiláció a Triton X-100 inszolubilis frakcióban volt kifejezett. A patkány agyi endotélsejtek PAO-val történt kezelése az interendotheliális junkciók két transzmembrán fehérjéje, az occludin és a cadherin expressziójának csökkenéséhez vezetett, továbbá a ZO-2, az alfa- és béta-cateninek redisztribúcióját okozta a Triton X-100 inszolubilis celluláris frakcióba. Immunfluoreszcens vizsgálataink változásokat mutattak ki a junkcionális fehérjék elhelyezkedésében is. A claudin-5 esetében a tight junction fehérjékre jellemző folytonos membrán festődés szétszakadozott, a béta-catenin és a ZO-2 esetében pedig teljesen megszűnt. A protein foszfatáz 1 és 2A okadasavval történt gátlása szintúgy az occludin mennyiségének csökkenését okozta agyi endotélsejtekben amit a ZO-2 kevésbé kifejezett redisztribúciója kísért. Ennek megfelelően immunfluoreszcens vizsgálataink során azt találtuk, hogy az occludin festődése a sejtmembránban teljesen eltűnik, míg a ZO-2 és a claudin-5 esetében szakadozottá válik. A barrier funkciók vizsgálata során a transzendotheliális rezisztencia (TER) csökkenését figyeltük meg úgy okadasav mint PAO hatására. Az agyi endotélsejteken kapott eredményeink általánosságát igazolja, hogy hasonló eredményeket kaptuk epithélsejteken is. Immunfluoreszcens vizsgálataink azt mutatták, hogy a fokozott tirozin foszforiláció a membránban a legkifejezettebb.

Eredményeink alapján úgy gondoljuk, hogy a szerin/threonin és/vagy tirozin foszforiláció-függő mechanizmusok direkt vagy indirekt módon befolyásolhatják a junkcionális fehérjék funkcióját, aminek jelentős hatása lehet az agyi endotélsejtek barrier tulajdonságaira.

#### *A beta-catenin szerepe a vér-agy gát hiperozmotikus megnyitásának mechanizmusában*

A vér-agy gát egyik legfontosabb funkciója, hogy relatív impermeabilitása révén megakadályozza különböző káros anyagoknak a központi idegrendszerbe való bejutását. Azonban épp ez az impermeabilitás akadályozza meg azt is, hogy különböző gyógyszerek terápiás koncentrációban jussanak az agyba.

A hiperozmotikus koncentrációban adagolt mannitol, amely egy sejt impermeabilis, nem toxikus cukor, alkalmasnak tűnik a vér-agy gát reverzibilis megnyitására. A sikeres klinikai kísérletek ellenére e jelenség molekuláris háttere még nagyrészt ismeretlen. Mivel

a barrier funkciók ellátásában az interendoteliális kapcsolatoknak a tight junction-oknak és adherens junction-oknak kiemelt szerepük van, ezért elsősorban ezeknek a fehérjéknek a változásait vizsgáltuk. Ugyanakkor kerestük azokat a jeltovábbító mechanizmusokat, amelyek a vér-agy gát reverzibilis megnyitását szabályozzák.

Kísérleteinkhez patkány agyi endotélsejteket használtunk, amelyeket klinikailag releváns koncentrációjú (10-20%) mannitollal kezeltünk 10-30 percig. Mannitol hatására gyorsan csökkent a transzendoteliális ellenállás, ami a junctionális integritás egyik megbízható fokmérője. A mannitol erőteljes tirozin foszforilációt indukált az agyi endotélsejtekben, ami elsősorban az 50-190 kDa közötti fehérjéket érintette. A koncentráció függő foszforiláció igen gyorsan következett be, és a mannitol eltávolítása után egy órával a tirozin foszforiláció visszatért a kontroll szintre. A tirozin foszforilációval párhuzamosan az ERK1/2 reverzibilis aktiválódását is megfigyeltük. Az ERK1/2 aktiválódását jelző ERK1/2 foszforiláció már 10 perccel a mannitol eltávolítása után megszűnt.

A tirozin foszforilációt szabályozó mechanizmusok vizsgálata során megállapítottuk, hogy az Src kináz inhibitor PP-1 képes megakadályozni a fehérjék foszforilációját, míg az ERK1/2 inhibitor U0126-nak, a Rho kináz inhibitor Y27632-nek, az L-típusú kalcium csatorna blokkoló verapamilnak és EDTA-nak nincs gátló hatása.

A tirozin foszforiláció célfehérjéi között anti foszfortirozin ellenanyaggal történt immunprecipitáció segítségével sikerült azonosítanunk a beta-catenint és ZO-1-et, amelyek fontos szerepet játszanak az agyi endotélsejtek összekapcsolásában, és így a gát kialakulásában. Szubcelluláris frakcionálás illetve immunfluoreszcenciás vizsgálatok alkalmazásával kimutattuk, hogy a beta-catenin tirozin foszforilációja e fehérje intracelluláris redisztribúcióját okozza, míg koimmunoprecipitációs vizsgálataink pedig a cadherinnel illetve alfa-cateninnel való kapcsolatának felszakadását bizonyították. A beta-catenin foszforilációját az Src kináz inhibitor PP-1-el sikerült gátolni, míg az ERK1/2 inhibitor U0126, a Rho kináz inhibitor Y27632, az L-típusú kalcium csatorna blokkoló verapamil és EDTA-nak hatástalan volt.. Eredményeink azt igazolják, hogy a beta-catenin Src kináz mediálta tirozin foszforilációja fontos szerepet játszik a mannitol által indukált reverzibilis vér-agy gát megnyílásban.

#### *A ZO2 szerepe a szignáltranszdukcióban*

Junkcionális fehérjékkel végzett vizsgálataink során megfigyeltük, hogy a ZO2 tight junction fehérje képes a magba vándorolni. Megállapítottuk, hogy a ZO2 rendelkezik

nukleáris lokalizációs szignálokkal (NLS) és a magban kolokalizálódik, illetve kapcsolódni képes a SAF-B nevű fehérjével. Eredményeink arra engednek következtetni, hogy a ZO2 fontos szerepet játszhat az epitélisejtek illetve endotélisejtek jeltovábbító folyamataiban.

Kutatásaink során kimutattuk, hogy a központi idegrendszeri megbetegedésekhez társuló vér-agy gát károsodások kialakulásában az interendotheliális junkciók fontos szerepet játszhatnak. Továbbá kimutattuk, hogy patológiás körülmények között az agyi endothélisejtekben számos olyan jeltovábbító utvonala aktiválódik, amelyek szerepet játszanak a junkcionális komplexum szabályozásában. Ezek a jeltovábbító útvonalak új terápiás stratégiák célpontjai lehetnek.