

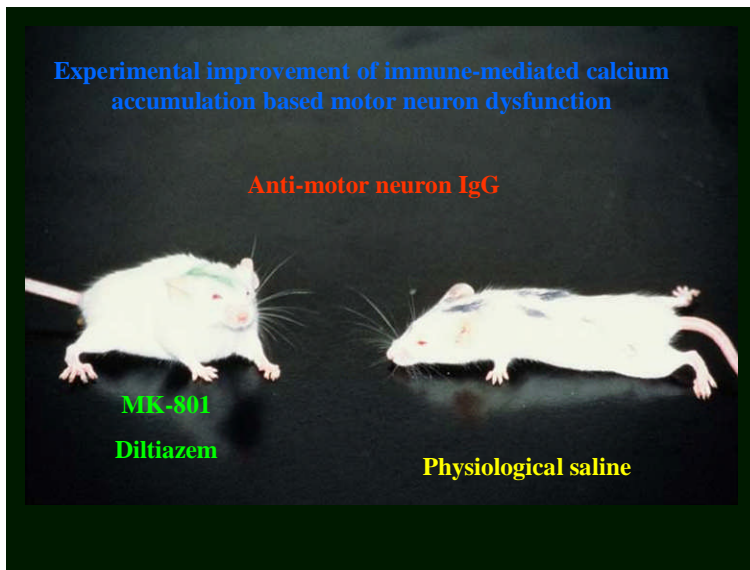
# Immun tényezők, parvalbumin és PARP aktiváció jelentősége neurodegeneratív kórképekben

A neurodegeneratív betegségekben vizsgáltuk, hogy a szelektív neuronális károsodásban milyen mechanizmusok játszanak szerepet.

## **A parvalbumin és a calcium háztartás szerepe neurodegenerációban**

A motoros neuron (MN)degeneratiojának legelfogadottabb, már jól ismert pathomechanizmusú modelljeiben (szabad gyökök okozta, excitotoxicus, immun-mediált) a neuron károsodás közös tényezője az intracelluláris calcium szint emelkedése (1). A sejtek az egyik calcium-kötő fehérje, a parvalbumin mennyiségének a növelésével próbálják kompenzálni a calcium szint emelkedést. A külső szemmozgató agyidegek motoros magjaiban a kompenzáció sikeres, megvédi a sejteket a pusztulástól, mind az ALS transzgenikus egér (SOD-G93A) modelljében (2), mind az axotomiával előidézett neuronkárosításban. Az oculomotorius agyideg MN-jai az axotomia okozta stresszt az immunohisztokémiai módszerekkel is kimutatható parvalbumin tartalmuk fokozásával kompenzálják. Az elektronmikroszkópos hisztokémiai reakcióval kimutatható intracelluláris calcium tartalmuk nem lényegesen emelkedik. Az oculomotoros ideg neuronjai a humán ALS-ben sem károsodnak. Ugyanakkor a vulnerábilis hypoglossus ideg neuronjainak az axotomiára létrejövő intracelluláris calcium emelkedése tartós, bennük nem detektálható parvalbumin növekedés (3). Hasonlóan vulnerábilisak a spinális MN-ok is az acut calcium stresszre, melyet anti-MN IgG intraperitoneális adásával hoztunk létre. Anti-MN IgG-t ALS betegek szérumából ill. szarvasmarha gerincvelői mellső szarv homogenizátummal immunizált kecskék szérumából izoláltuk. Az utóbbiból 10 mg ip. injectálása Balb/c egerekbe 1-3 nap alatt lethális MN károsodást okoz. Ezt az acut modellt használva kimutattuk, hogy az intracelluláris calcium emelkedés ismert szerrekel fékezhető (NMDA receptor antagonistá

MK-801, calcium csatorna gátló diltiazem), s az állatok megmenthetők.



1. ábra. A jobb oldali egér megbénult 10 mg anti-MN IgG adását követően. A bal oldali egér nem mutat gyengeséget, bár ugyannyi anti-MN IgG-t kapott, de NMDA receptor antagonistá vagy calcium csatorna gátlóval együtt.

Az intracelluláris toxicus calcium emelkedés kivédhető a spinális MN-ok parvalbumin tartalmának emelésével is (parvalbumin gén terápiá, D3 vitamin adása) (1).

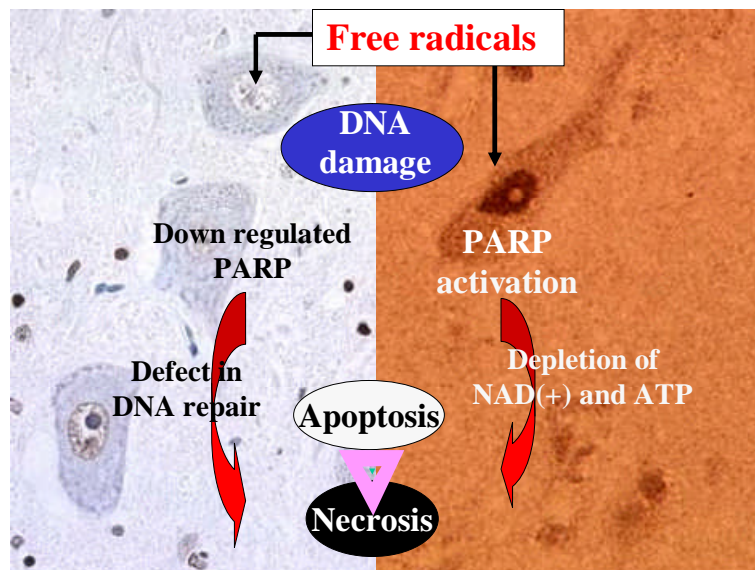
Az oxidatív stress okozta (4-hydroxynonenal intrathecalis adása), és az anti-MN IgG hosszan tartó, de kis adagú (1 mg) adásának hatását a spinális motoneuronok a calcium szintjük alacsonyan tartásával tudják ellensúlyozni úgy, hogy parvalbumin szintjük emelkedik (4, 5).

Immunhisztokémiai vizsgálattal kimutatott parvalbumin emelkedés tapasztalható a Parkinson kóros betegek épen maradt dopaminerg sejtjeinek cytoplasmájában is (6).

### **A PARP expressio változásainak a szerepe a neurodegenerációban.**

A poly(ADP-ribose) polymerase DNS javító nucleáris enzim. A DNS szál törésekor, vagy az **intracelluláris calcium emelkedésekor** aktiválódik. A túlzott aktivációja kórosan csökkenti a sejt energia készletét, s apoptosissal, vagy teljes energiahiány esetén necrosissal a sejt elpusztulásához vezet. Western blot analysissel ALS betegekből származó gerincvelői szövetben háromszoros mennyiségét mutattuk ki a PARP fehérjének, a nem neurológiai betegségekben elhunytakhoz viszonyítva. Immunhisztokémiai vizsgálattal azonban a fokozott PARP mennyiség nem a spinális MN-okban volt lokalizálható, hanem microglia,

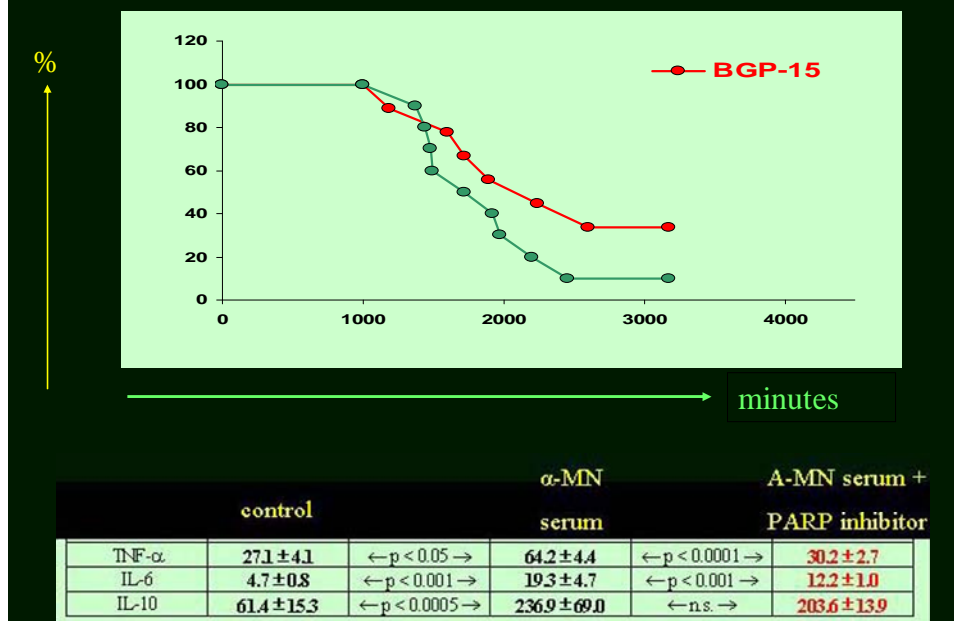
astroglia sejtekben, macrophagokban. A spinális MN-ok PARP fehérje mennyisége csökkent (7). Szemben ezzel, az ALS-ben elhunytak cortexében az immunoblot technikával meghatározott PARP fehérje mennyiségének növekedése immunohisztokémiai módszerrel a motoros kéreg pyramidális sejtjeiben volt elsősorban kimutatható. Emellett a cortexben, a subcorticális állományban az astrocyták, a microglia-macrophag sejtek PARP expressiója is nőtt (8, 9). Ennek alapján a PARP fokozott működése feltételezhető a corticális motoneuronokban ALS-ben, mely hozzájárul azok pusztulásához. A spinális motoneuronokban a PARP alulműködik, ami a DNS elégtelen kijavításával okozhat sejthalált. Az astrocyták fokozott PARP tartalma tükrözheti a sejtek normálistól eltérő működését, mely a glutamát transzport zavarával járul hozzá a MN-ok degenerációjához. A microglia sejtek és a macrophagok intenzív PARP tartalma azok aktivációjának a jele, mely szintén károsítja a MN-okat (10, 11, 12).



2. ábra. ALS autopsiás anyag. Bal oldalon a spinális MN-okban nincs PARP immunoreaktivitás a magban. A sejtek nem tudják kijavítani a szabad gyökök által okozott DNS károsodást. Jobb oldalon a corticális MN-okban fokozott PARP immunoreaktivitás látszik a magban. A PARP túlaktiválódása elfogyasztja a sejt energiáját. Mindkét folyamat sejthalálhoz vezethet.

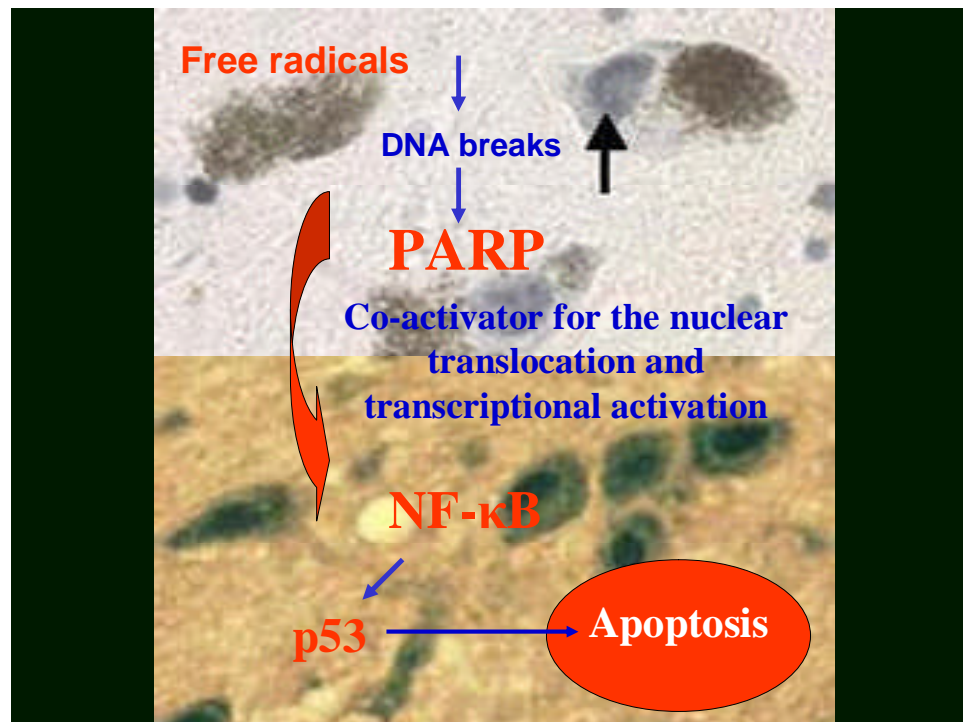
Az eredmények alapján várható, hogy PARP gátlók adásával a complex kóros folyamat kezelhető. A felső MN-ok energia deficitje nem jön létre, mérséklődik az astrocyták anyagcsere zavara és a microglia aktiváció, így a kísérő gyulladósos reakció is csökken. Az anti-MN IgG egerbe történő intraperitoneális oltásával létrehozott acut MN betegséget a PARP gátló adása kedvezően befolyásolja.

### The effect of PARP inhibitors on the survival in PT-MN disease model



3. ábra. A zöld görbe mutatja az anti-MN IgG-vel ip. oltott egerek túlélési idejét. PARP gátló adása meghosszabbítja az állatok túlélését (piros görbe), s 40%-uk túléli az anti-MN IgG adását. A táblázatban az látszik, hogy az anti-MN IgG adása után a feláldozott egerek gerincvelőjében megnő a gyulladást serkentő TNF- $\alpha$  és IL-6, valamint a gyulladást csökkentő IL-10 mennyisége. A PARP gátló szimultán adásával csak az IL-10 mennyisége nő meg szignifikánsan.

Parkinson kórban, diffus Lewy-test betegségben elhunytak substantia nigrájának (SN) dopaminerg sejtjeiben is megnő az immunohisztokémiai vizsgálattal a magban kimutatható PARP mennyisége a kontrollokhoz viszonyítva. Ugyanezen sejtokban a nuclear factor  $\kappa$ B magban történő felszaporodása is detektálható. A PARP túlaktiválódása a dopaminerg neuronokban is energia deficethez vezet (elfogyasztja a NAD-ot, így az ATP-t), s mivel co-aktivátora a transcriptió faktor NF- $\kappa$ B-nek, ami a nucleusba transzlokálódik és fokozza a p53 gén expressióját, így ezen az úton is apoptosist indukál.(13, 14, 15, 16). A PARP túlaktiváció a trigeminus neuralgia ingerléses modelljeiben is kimutatható a Gasser dúc idegsejtjeiben (17).



4. ábra. A Parkinson kóiban a dopaminerg sejtekben a PARP túlaktiválódása energia deficitet okoz, valamint az NF-κB nucleáris translokációjához vezet, mely aktiválja a p53 gént. Mindkét folyamat eredménye apoptózis.

### Immun-gyulladásos folyamatok szerepe a neurodegenerációban

#### Az ALS IgG jelentősége

Elektrophysiológiai, immunoblot és ELISA módszereket használva kimutattuk, hogy az ALS IgG calcium csatornához kötődik. MN sejt kultúrához adva növeli az intracelluláris calcium mennyiségét és cytotoxicus hatása van.

A humán ALS szövetben, s a betegség immun-mediált modelljeiben (tengerimalacokat immunizálva tisztított MN-kal ill. gerincvelői mellső szarvi homogenizált szövettel) a MN-ok cytoplasmájában IgG mutatható ki immunohisztokémiai módszerekkel. ALS IgG-t intraperitoneálisan egerekbe oltva az IgG felvevődik a MN-ok perikaryonjába, míg a normál humán IgG-nek csak nyomait látni. Ez arra utal, hogy a calcium csatornán kívül más releváns antigén is lehet a MN-okban.

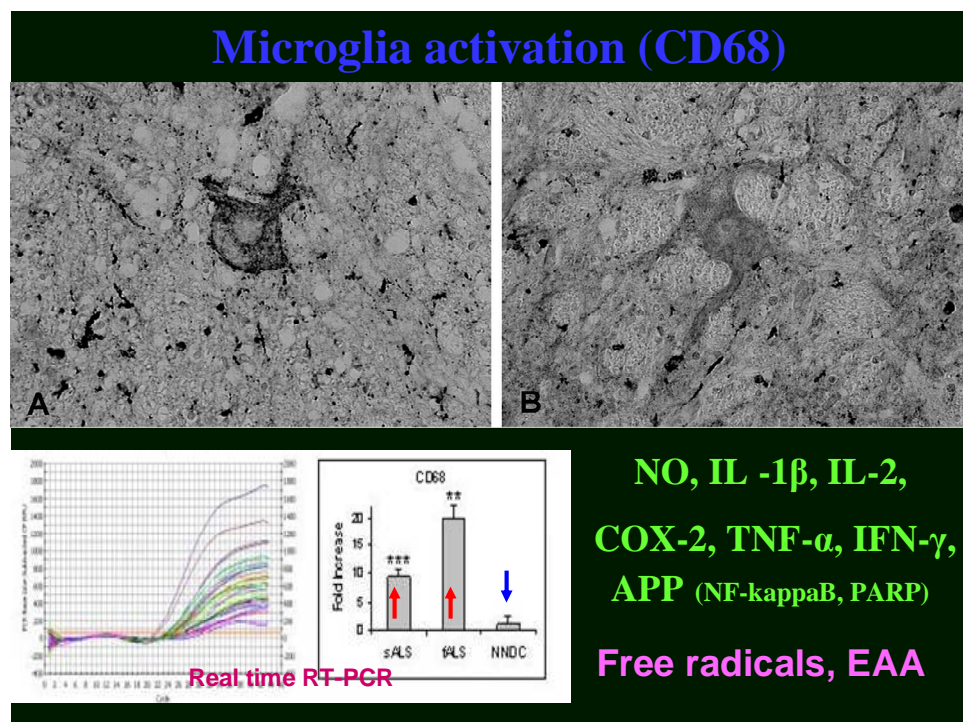
Ultrastruktúrális immunohisztokémiai módszerekkel igazoltuk, hogy egerekbe történő ip. oltás után az ALS IgG a motoros axon terminálba vevődik fel a synapticus vesiculumokhoz kötődve. A sejttestbe a mikrotubulusokhoz kapcsolódva szállítódik, majd



megjelenik az endoplasmás reticulumban. ALS betegek spinális MN-jaiban is az IgG az endoplasmás reticulumban és a microtubulusok közelében található meg. Az endoplasmás reticulumban az IgG interferálhat a fehérje szintézissel, a belső raktárból calciumot szabadíthat fel. A mikrotubulusokhoz kötődő IgG alterálhatja a gyors axon transportot, s mivel a neurofilamentumokkal hidak kötik össze, a lassú transport is akadályozott lehet. Az ALS IgG-t detektálni tudtuk a központi idegrendszer endothel sejtjeiben is, vagyis nemcsak az axon terminálon érheti el a neuront, hanem az extracelluláris tér felől is. Így érthető, hogy kimutatható a spinális MN-okon végződő axon terminálokban, s megemeli ott is az intraterminális calciumot, s gyorsítja a glutamát felszabadulást. (18).

### A microglia aktiváció jelentősége

1.) A spinális MN-okba történő ALS IgG, vagy anti-MN IgG felvétel eddig ismeretlen mechanizmussal aktiválja a mellő szarvban a microglia sejteket. (19) Azok megnagyobbodnak, a motoneuronok köré csoportosulnak. Metabolikusan is aktiválódnak, s szabad gyököket, glutamátot, NO-t, a neuronok számára ártalmas cytokineket secretálnak ("silent executioner").

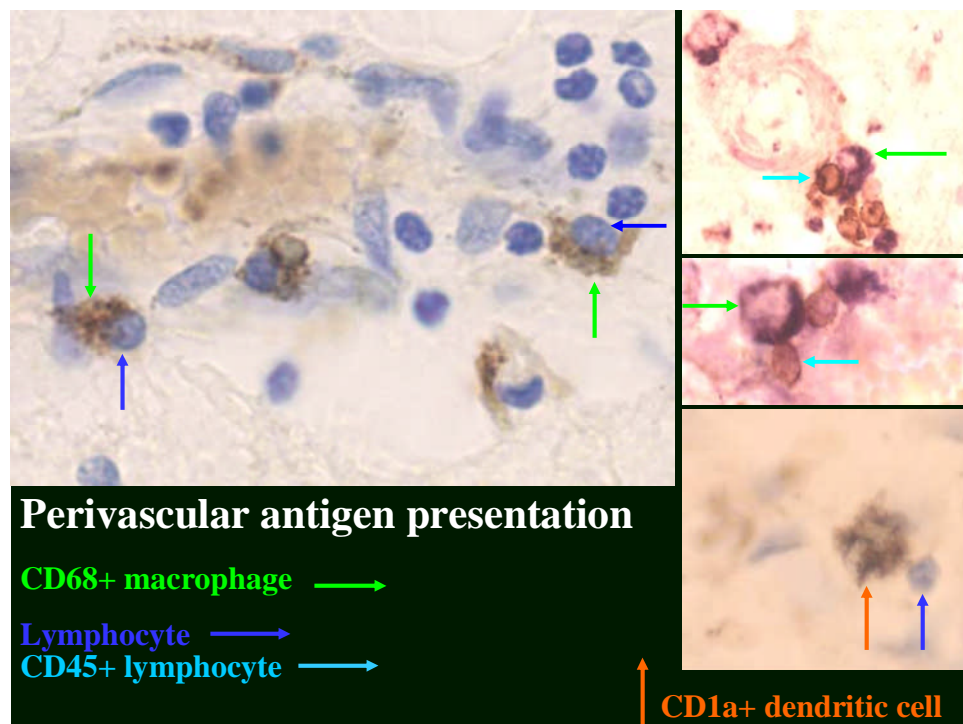


5. ábra. CD68 markerral jelölődő aktivált microglia sejtek veszik körül a bal oldali MN-t ALS gerincvelőben. A jobb oldali normál gerincvelőben a MN körül nincs microglia reakció. Real

time RT PCR igazolja, hogy szövetben a fehérje expressiojának a message is megnőtt (piros nyilak), a kontrollhoz viszonyítva (kék nyíl). A jobb alsó sarokban az aktivált mikroglia sejt biológiailag hatékony anyagai vannak felsorolva.

2.) Phagocytá tevékenységük során macrophágokká alakulnak, s antigént prezentálnak a T lymphocyták számára

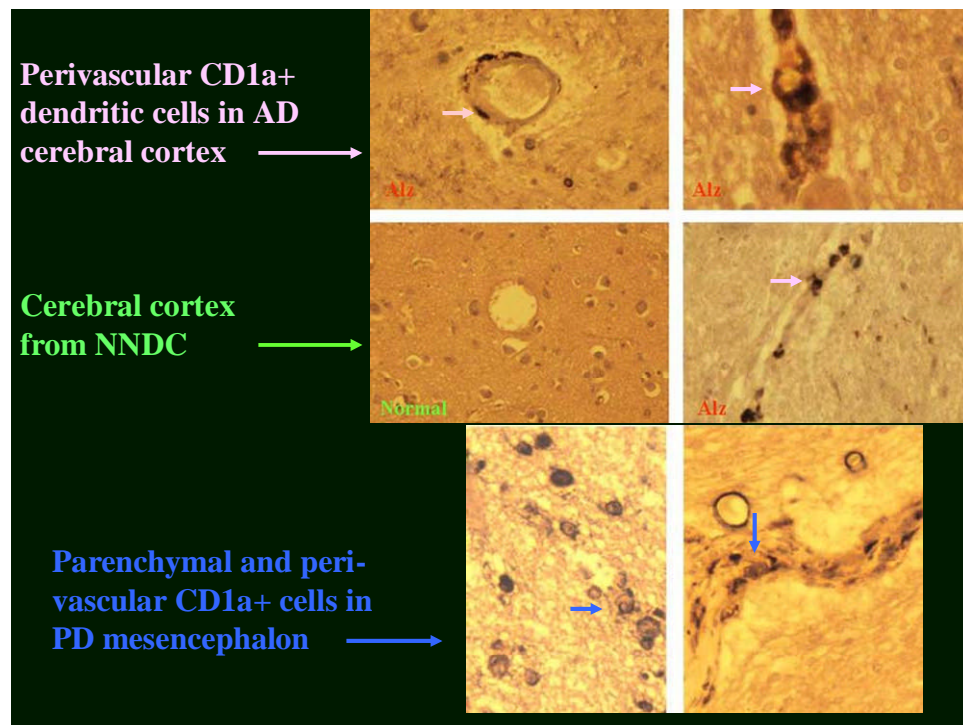
3.) Egy részük dendritikus sejtekké alakul át, amelyek a leghatékonyabb antigén presentáló sejtek. Valószínűleg itt lokálisan érzékenyítődnek a T helper sejtek, s az idegrendszerből kijutva serkentik anti-MN IgG termelődését a B sejtekben. (20). Hasonló jelenségek megfigyelhetők a familiáris ALS transzenikus állatmodelljében is (21)



6. ábra. Bal felső kép: CD68+ macrophag (zöld nyillal jelölt) interakciójának a képe lymphocytákkal (kék nyillal jelölt). A két jobb felső képen CD45+ markerrel jelölt T lymphocyták (kék nyíl) interakciója látszik macrophágokkal (zöld nyíl). A jobb alsó képen CD1 markerrel jelölt dendritikus sejt (narancs nyíl) interakciója látszik lymphocytával (kék nyíl).

A locális immun-gyulladásos folyamat részeként az astrocyták macrophag chemoattractant protein -1 et termelnek (MCP-1) (immunohisztokémiai és real time RT-PCR), az endothel sejteken VCAM expressio, az interstitiumban pedig ICAM pozitív infiltráló sejtek jelennek meg, mutatva a vér-agy gát locális alterációját.

Hasonló dendritikus sejt megjelenés, T lymphocytá infiltráció mutatható ki Parkinson betegségben elhunytak substantia nigrájában, az Alzheimer betegségben elhunytak cerebrális cortexében, Pick atrophíában a frontális lebenyben, s Huntington betegségben a caudatusban és a frontális lebenyben. (22, 23, 24, 25, 26). Még a motoros axon átvágását követő spinális MN degeneráció is jár enyhe gyulladással jelenségekkel (27).

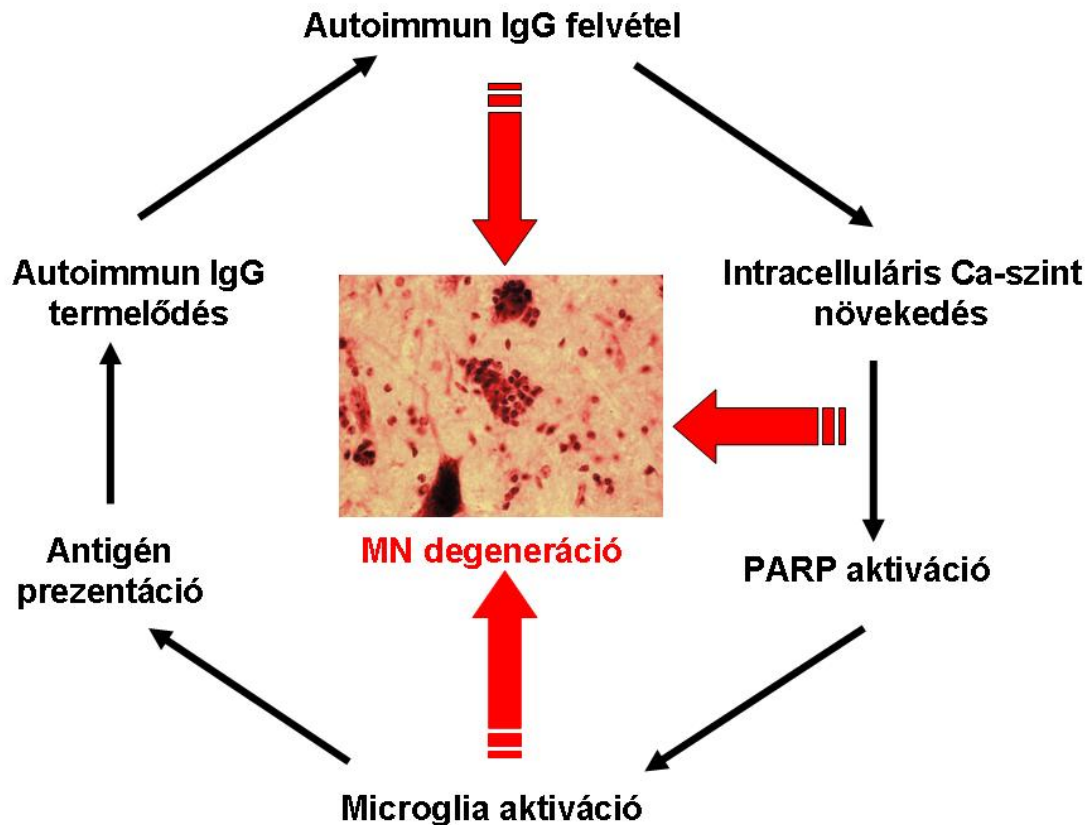


7. ábra. Felső panel. CD1a markerű perivascularis dendritikus sejtek Alzheimer kórban elhunyt agyában (rózsaszín nyíl). Normál cerebral cortexben (nem neurologiai betegségben elhunyt kontroll) nincsenek ezzel a markerrel kimutatható dendritikus sejtek. Alsó panel: CD1a+ parenchymális és perivascularis dendritikus sejtek a substantia nigra szomszédságában Parkinson kóros elhunyt agyában.

Az adatok alapján elkezdtek a neurodegeneratív betegségekben a microglia aktivációjának a gátlását minocyclinnel, ill. COX-2 gátlókkal. A kezdeti eredmények nem egységesek. Azon a megfigyelésen alapulva, hogy csontvelő transzplantáción átesett leukaemiások gerincvelőjében a microglia állomány 1/3 kicserélődik donor macrophagokkal másfél évvel a transzplantáció után, elindult az ALS betegek haematopoeticus őssejt transzplantációs kezelése. A kezelést illetően az elvárás kettős: a transzplantált betegek új immun rendszert kapnak, mely kevésbé autoreaktív a MN-ra, és a károsan aktiválódott microglia sejtek idővel lecserélhetők a



donor sejtekkel. (28). Periphériás idegrendszeri autoimmun-gyulladásos betegségben (CIDP) a haematopoeticus őssejt transzplantáció eredményes volt. (29)



8. ábra. Az immun-mediált MN károsodás összefoglaló folyamatábrája

Közlemények, előadások:

1. Engelhardt JI, Siklós L, Adalbert R, Soos J, Appel SH. Increased intracellular calcium and motoneuron (MN) degeneration. XVth International Congress of Neuropathology. 2003. September 14-18. Torino, Italy. Brain Pathology S1-S169: 120. 2003. IF: 3.958 (3.838)

2. Siklós L, Appel SH: Calcium binding proteins in selective vulnerability of motor neurons. In "Neurodegenerative Diseases. Neurobiology, Pathogenesis and Therapeutics." Ed.: Beal MF, Lang AE, Ludolph AC. pp.:65-79. Cambridge University Press

3. Obál I, Engelhardt JI, Siklós L: Axotomy induces contrasting changes in calcium and calcium binding proteins in oculomotor and hypoglossal nuclei of Balb/c mice. J Comp Neurol 499: 17-32. (2006) IF: 3.4

**4. Vigh L, Smith RG, Soós J, Engelhardt J, Appel SH, Siklós L: Sublethal dose of 4-hydroxynonenal reduces intracellular calcium in surviving motor neurons in vivo. Acta Neuropathol 109: 567-575. (2005) IF: 2.503**

5. Obál Izabella: Ph. D tézisek. Immun-mediált neuron károsodások és az intracelluláris calcium szerepe a neuronális degenerációban. SZTE ÁOK 10/2003.

**6. Soós J, Engelhardt JI, Siklós L, Havas L, Majtényi K: The expression of PARP, NF- $\kappa$ B and parvalbumin is increased in Parkinson disease. NeuroReport 15: 1715-1718. (2004). IF: 2.351**

**7. Kim SH, Henkel JS, Beers DR, Sengun IS, Simpson EP, Goodman JC, Engelhardt JI, Siklos L, Appel SH: PARP expression is increased in astrocytes but decreased in motor neurons in the spinal cord of sporadic ALS patients. J Neuropathol Exp Neurol 62(1); 88-103. (2003) IF: 5.037**

**8. Kim SH, Engelhardt JI, Henkel JS, Siklos L, Soos J, Goodman C, Appel SH: Widespread increased expression of the DNA repair enzyme PARP in brain in amyotrophic lateral sclerosis. Neurology 62; 319-322. (2004). IF: 5.973**

**9. Engelhardt JI, Soos J, Siklos L, Kim SH, Henkel J, Appel SH. Increased PARP expression in sporadic amyotrophic lateral sclerosis (sALS). XVth International Congress of Neuropathology. 2003. September 14-18. Torino, Italy. Brain Pathology S1-S169: 119. 2003. IF: 3.958**

*10. Siklos L, Adalbert R, Obal I, Engelhardt JI, Literati Nagy P, Rablóczy Gy: The distribution of PARP in ALS and its passive transfer models – The examination of PARP inhibitors. MITT IX. Conference. Balatonfüred. 2003. 01. 22-24.*

*11. Soós J, Engelhardt JI, Obál I, Siklós L, Kim SH, Appel SH. Poly (ADP-Ribose) Polymerase (PARP) in ALS. 3rd European ALS Consortium Research Workshop. June 10-12, 2005. Umea. Sweden. Abstract book: O19*

*12. Soós J, Obál I, Seung K, Henkel J, Appel S, Siklós L, Engelhardt J. Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) a motoneuron károsodás pathomechanizmusában. MIET 34. Nagygyűlése Szeged 2005. okt. 13-15. Cephalalgia Hungarica 15, 104, 2005.*

**13. Soós J, Engelhardt JI, Siklós L, Havas L, Majtényi K: The expression of PARP, NF- $\kappa$ B and parvalbumin is increased in Parkinson disease. NeuroReport 15: 1715-1718. (2004). IF: 2.265**

**14. Soós J, Honti V, Engelhardt J, Vecsei L: The expression of PARP, NF-kappa B and parvalbumin is increased in Parkinson disease. Parkinson and Related Disorders 11: Suppl. 2: 168. 2005. IF: 1.250.**

*15. Engelhardt JI, Soós J, Siklós L, Majtényi K, Havas L, Henkel J, Appel SH. Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) in ALS and in Parkinson's disease. VIth Conference of the Hungarian Society of Neuropathology. Budapest 2004. május 6-8. Abstract book page: 48.*

16. Soós J, Obál I, Siklós L, Majtényi K, Havas L, Engelhardt J. PARP, NF- $\kappa$ B és parvalbumin expressio a substantia nigra (SN) dopaminerg sejtjeiben Parkinson kórban. MIET 34. Nagygyűlése Szeged 2005. okt. 13-15. Cephalalgia Hungarica 15, 105, 2005.
- 17. Tajti J, Varga H, Soós J, Ungureán A, Vécsei L, Párdutz Á, Chadaide Z, Engelhardt J. The effect of stimulation of the trigeminal ganglion on the poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) activity of the trigeminal nucleus caudalis (TNC) in the rat. Cephalalgia 23/7: 655. 2003. IF: 3.133**
- 18. Engelhardt JI, Soós J, Obál I, Vigh L, Siklós L: Subcellular localization of IgG from the sera of ALS patients in the nervous system. Acta Neurol Scand 112: 126-133. (2005) IF: 1.712**
19. Vigh L, Engelhardt JI, Appel SH, Siklós L. Microglia reaction in brain stem nuclei and spinal cord after passive transfer of antimotoneuronal antibodies to mice. MITT-IBRO X. Conference. Budapest. 2004. Jan. 29-31.
- 20. Henkel JS, Engelhardt JI, Siklos L, Simpson EP, Kim SH, Pan T, Goodman JC, Siddique T, Beers DR, Appel SH: The presence of immature and mature/activated dendritic cells, increased chemokine MCP-1, and activated microglia/macrophages in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord tissue. Ann Neurol 55 (2); 221-235. (2004). IF: 8.097.**
- 21. Henkel JS, Beers DR, Engelhardt JI, Siklos L, Simpson E, Siddique T, Goodman C, Appel SH. Presence of immature and activated dendritic cells and increased MCP-1 chemokine expression in spinal cord tissues from ALS patients and mutant SOD mice. Neurology 60/5 Suppl. 1. P02.107. 55<sup>th</sup> Annual Meeting of The American Academy of Neurology. Honolulu, Hawaii. March 29-April 5, 2003. IF: 5.973**
- 22. Engelhardt JI, Soos J, Siklos L, Majtenyi K, Havas L, Henkel J, Appel SH. Immune-inflammatory reaction in neurodegenerative diseases. XVth International Congress of Neuropathology. 2003. September 14-18. Torino, Italy. Brain Pathology S1-S169: 113. 2003. IF: 3.958**
23. Engelhardt JI, Soós J, Siklós L, Majtényi K, Havas L, Henkel J, Appel SH. Immune-inflammatory reaction in neurodegenerative diseases. VIth Conference of the Hungarian Society of Neuropathology. Budapest 2004. május 6-8.
24. Engelhardt JI, Soós J, Obál I, Siklós L, Henkel J, Appel SH. Immune-inflammatory reaction in ALS. 3rd European ALS Consortium Research Workshop. June 10-12, 2005. Umea. Sweden. Abstract book: P9
25. Engelhardt J, Siklós L. Immun-gyulladásos jelenségek neurodegeneratív betegségekben. MIET 34. Nagygyűlése Szeged 2005. okt. 13-15. Cephalalgia Hungarica 15, 51, 2005.

26. Obál I, Soós J, Henkel J, Appel S, Siklós L, Engelhardt J. *Immun/gyulladásos reakció ALS-ben. MIET 34. Naggyűlése Szeged 2005. okt. 13-15. Cephalalgia Hungarica 15, 100, 2005. I díjat nyert poster.*

27. Paizs M, Engelhardt JI, Siklós L. *Immune/inflammatory reactions in the spinal cord after axotomy. International IBRO Workshop Budapest, Hungary. 26-28, January 2006. Poster 155.*

28. Appel SH, Engelhardt JI, Simpson E, Henkel J, Lou Y, Brenner M, Popat U. *Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in ALS. 11<sup>th</sup> Annual Meeting, International Alliance of ALS/MND Associations and 15<sup>th</sup> International Symposium on ALS/MND. Philadelphia, USA. 2004. 2003. Dec. 2-3.*

29. **Reményi P, Masszi T, Borbényi Z, Soós J, Siklós L, Engelhardt JI. CIDP cured by allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Eur J Neurol. (in press) IF: 2.244**