

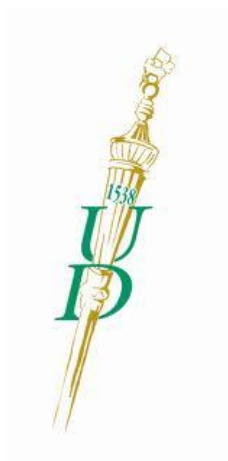
Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

Új jelátviteli útvonalak vizsgálata a fogfejlődés során: a Toll-like receptor

4 és a Hősokk fehérje 60 feltételezett szerepe.

Jelölt: dr. Papp Tamás

Témavezető: dr. Felszeghy Szabolcs



DEBRECENI EGYETEM

Fogorvostudományi Doktori Iskola

Debrecen, 2016

Új jelátviteli útvonalak vizsgálata a fogfejlődés során: a Toll-like receptor

4 és a Hősokk fehérje 60 feltételezett szerepe.

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
a klinikai orvostudományok tudományágban

Írta: Dr. Papp Tamás, okleveles általános orvos

Készült a Debreceni Egyetem Fogorvostudományi doktori iskolája
keretében

Témavezető: Dr. Felszeghy Szabolcs, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Márton Ildikó, az MTA doktora

tagok: Dr. Gerber Gábor, kandidátus

Dr. Szűcs Péter, PhD

A doktori szigorlat időpontja: DE Fogorvostudományi Kar, 210. tanterem,
2016. április 19. 11 óra

Az értekezés bírálói: Prof. Dr. Nánási Péter Pál, az MTA doktora
Prof. Dr. Zelles Tivadar, az MTA doktora

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Márton Ildikó, az MTA doktora

tagok: Prof. Dr. Nánási Péter Pál, az MTA doktora

Prof. Dr. Zelles Tivadar, az MTA doktora

Dr. Gerber Gábor, kandidátus

Dr. Szűcs Péter, PhD

Az értekezés védésének időpontja:

Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet „A” épületének tanterme;
2016. április 19. 13 óra.

Irodalmi áttekintés

A fogcsíra fejlődése folyamatos és reciprok kölcsönhatásokon alapul a stomódeum hámsajtjei és crista neurális eredetű ektomezenhimális sejtek között. Az odontogenesis során fogcsíra szövetei közti kölcsönhatásokat jelátviteli útvonalak által kialakított „párbeszéd” biztosítja (hasonlóan egyéb ektodermális függelékekhez (pl.: haj, köröm)). Habár a fogfejlődés során több mint egy tucat jelátviteli útvonalat azonosítottak, kiemelkedő jelentőséggel az alábbi útvonalak bírnak: TGF (transzformáló növekedési faktor), Notch, WNT, FGF (fibroblaszt növekedési faktor), TNF (tumor nekrosis faktor) és SHH (sonic hedgehog). Az irodalom 3 fő részre osztja a fogfejlődést, melyek: kezdeti szakasz, morfológiai fejlődés és a szöveti differenciáció.

- A kezdeti szakasz során (11. embrionális napon történik a rágcsőban) az ektomezenhimális sejtek FGF és BMP molekulákat szekretálnak, melyek a felettük elhelyezkedő hám osztódását indukálják. Ez a terület hám megvastagodásként tűnik fel a leánysejtek nagy száma miatt. Később a fiatal sejtek benyomulnak az mezenhimába.
- A morfogenesis során a fogcsíra elnyeri végleges alakját (12.5-E18.5 embrionális nap között). Az irodalom három szakaszra osztja: bimbó, sapka és harang stádium. A morfogenesis során a hám eredetű sejtek kialakítják a zománcszervet. A későbbiekben a zománcszerv a következő részekre szeparálódik: külső és belső zománchám, sztrátum intermedium és reticulum sztellátum. A zománcszerv létrehozza a gyökérványokat, melyek pluripotens sejteket tartalmaznak rágcsőban. Ezen pluripotens sejtek felelősek a fog folyamatos növekedéséért. A zománcszerv ektomezenhimális szövetet is közrezár növekedése során, mely a dentális papillát

hozza létre. A zománcszervet a dentális folliculus borítja be, mely mezodermális eredetű.

- A szöveti differenciálódás (15.5. embrionális naptól) során a zománcszerv és dentális papilla éretlen sejtjei specializálódnak és a fog keményszöveteit hozzák létre. A morfológiai fejlődése a fogcsíranak időben átfed a szöveti differenciálódással. A specializálódott sejtek csak egy funkciót képesek a továbbiakban ellátni. Az ameloblasztok, melyek a zománcmátrix szintéziséért felelősek, a belső zománchámból alakulnak ki. A differenciálódásuk során több szakaszt tudunk elkülöníteni: morfogenetikus, hisztodifferenciációs, preszekretoros, szekretoros, posztsekreteros és protektív szakaszokat. A zománcmátrix szintézise a szekretoros fázisban zajlik. A szekretoros ameloblasztokérésének markere az ameloblasztin zománc mátrix fehérje megjelenése. A zománc csomó is a belső zománchám származéka, mely mint szignalizációs center működik a fogfejlődés során. A dentális papilla legkülső rétege odontoblasztokká alakul, melyek a dentin alapállományát termelik. Az állatok születése után is aktív marad a hisztodifferenciációs szakasz az állat élete végéig.

Fontos kiemelni, hogy a fogcsírák intakt szervek- jóllehet különböző csiralemezek interakciója kapcsán alakulnak ki-, mely tulajdonságuk jó lehetőséget kínál jelátviteli útvonalak vizsgálatára, melyek a morfogenesiset befolyásolhatják.

A Toll-like receptorok odontológiai vonatkozásai

A Toll-like receptorokat közel 40 éve azonosították a *Drosophila melanogaster* dorso-ventrális tengelyének fejlődés kapcsán. A klinikai gyakorlatban azonban napjainkban a fejlődéstani szerep háttérbe szorult, és elsősorban a patogének detektálása kapcsán kutatják ezen receptor család tagjait. A baktériumok, vírusok specifikus komponenseit különböző TLR-ek ismerik fel

az antigén prezentáló sejteken. Minden TLR egy -csak rá jellemző- specifikus agonistával bír, jóllehet számos nem specifikus agonista képes egyszerre több TLR receptor aktiválására. A fogszuvasodás során az odontoblasztok képezik az első védelmi vonalat, melyek detektálni pathogéneket, ennek megfelelően az odontoblasztok számos Toll-like receptort expresszálnak (TLR2, 4, 7, 8, 9). Ezen túlmenően a Toll-like receptorok által közvetített jelátviteli kaszkád az odontoblasztok által termelt mátrix proteinek mennyiségét is képesek növelni, ezáltal a terciér dentin képződését elősegíteni. Szintén jól ismert funkciója a Toll-like receptornak a mineralizációs folyamatok befolyásolása a kemény szövetek érése kapcsán (dentin, csont).

Kísérleteink során a Toll-like receptor 4 (TLR4) esetleges szerepére kívántuk vizsgálni a fogfejlődés során. A TLR4 egy régóta ismert és kutatott fehérje az odontoblaszt sejtvonalakon, mely hatására a dentin mátrix mennyisége növekszik, illetve az odontoblasztok érését és proliferációját is pozitívan szabályozza. A TLR4 széles körben elfogadott specifikus agonistája a lipopoliszacharid (LPS) a Gramm negatív baktériumok sejtfalának komponense. A TLR4 komplex aktivizációja (MD2, CD14 és TLR4) az I κ B lebomlását okozza, mellyel az NF- κ B jelátviteli út vonal felszabadul a gátlás alól, így gyulladásos faktorok transzkripciója lehetővé válik. Mindazonáltal nemcsak exogén (pathogén) partikulumok, hanem számos endogén (fiziológiás) ligand is képes aktiválni a Toll-like receptorokat (számos hősokk fehérje, proteoglikánok). Ezek közül a hősokk fehérje 60 egy széles körben ismert agonistája a TLR4-nek mely a fejlődő fogcsírában kifejeződik.

Hősokk fehérjék szerepe a fogfejlődésben

A hősokk fehérjék (Hsp) nélkülözhetetlen elemei minden élőlénynek, hiányuk életképtelenséget okoz már az egyedfejlődés korai szakaszában. A hősokk fehérjék rapid kifejeződése és mennyisége jelen kutatási adatok alapján kiemelkedő a sejtsztódás és az apoptózis közötti egyensúly kialakításában pathológiás környezetben. A hősokk fehérjéket a molekulasúlyuk és

sejten belüli elhelyezkedés alapján különíthetjük el. A fogfejlődés során az expressziós mintázata, valamint a feltételezett funkciója már ismert többek között a Hsp 25, 27, 86, Hsc73 és Hsj2 fehérjéknek. A Hsp 25 a leginkább vizsgált ezen csoportból a fejlődő egér fogcsírákon, vizsgálatok szerint emelik a sejtostódás gyakoriságát a zománcszervben, illetve az odontoblasztok erősen expresszálják az szekréciós fázisuk során. A preodontoblasztok és ameloblasztok átmenetileg szintén expresszálják a Hsp25 fehérjét. A Hsp27 a fogfejlődés korai stádiumaiban fejeződik ki, és alapvetően a morfológiai fejlődését befolyásolja a fogcsírák.

Online *in situ* hibridizációs adatbázis alapján a Hsp 60 kifejeződési mintázata drámaian megváltozott a fogfejlődés során, mely utalhat fejlődéstani szerepre is. A Hsp 60 egy konzervatív fehérje, mely minden pro- és eukarióta sejtben kifejeződik. A döntő többsége a Hsp 60 fehérjének a mitokondriumokban található, körülbelül 20 % a citoszólban míg egészséges körülmények között kis mennyiségben az extracelluláris térben is megtalálható. Hypoxia, láz percekben belül képes jelentősen megemelni a hősokk fehérjék szintjét mind intra-, mind extracellulárisan. A magas extracelluláris Hsp 60 mennyiség, mint veszély szignál működik funkcionál a környező sejteknek. A mitokondriális Hsp 60 a mitokondriumba frissen transzlokálódott fehérjék refoldingját képes segíteni, lehetőséget adva azoknak a natív konformáció ismételt felvételére. A citoszólban található Hsp 60 a frissen szintetizálódott fehérjék foldingját segíti, illetve az NF- κ B jelátviteli útvonal befolyásolásában játszik szerepet, mely során az IKK komplexhez csatlakozik. Az IKK-nak három alegysége van: IKK α , IKK β és IKK γ . Irodalmi adatok alapján az IKK α -hoz és IKK β -hoz is képes csatlakozni a szabad citoszolikus Hsp 60, ezzel az IKK komplex funkcióvesztést okozva. Az IKK α habár klasszikusan az NF- κ B jelátviteli útvonalat befolyásolja, önálló fejlődéstani szereppel is bír. Az IKK α az ektodermális eredetű szervek (fog, szőrtüsző) invaginációját koordinálja a mezenhimába, hiánya többek között a fogcsíra abnormális morfológiáját okozza.

Célkitűzéseink:

- Az irodalomban elsőként tűztük ki célul Toll-like receptor 4 esetleges expressziós mintázatának és funkciójának a vizsgálatát a fogfejlődés során.
- Második célként pedig egy olyan természetes endogén ligandot (Hsp 60) kívántunk detektálni, mely fiziológias körülmények között képes a TLR-4 segítségével befolyásolni az odontogenezist.

Anyag és módszer

Kísérleti állatok

Kísérleteinket a *Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottságának ajánlása alapján végeztük, engedély szám: DE FSZ/2010/10*. A terhes nőstényeket cervikális diszlokációval eutanizáltuk, az embriókat pedig dekapacitálással. Az embrionális kort a vaginális plugból, illetve az embriók külső morfológiai jegyeiből állapítottuk meg.

In situ hibridizáció, RT-qPCR

A mintavételezéshez a terhes NMRI nőstényeket sodiumpentobarbitálal altattuk, majd a kiperparált embriókat PBS-ben jégre helyeztük Hsp 60 mRNS detektálása esetén. Az ameloblasztin mRNS detektálása során pedig tenyésztett 16.5 napos fogcsírákat használtunk.

A próbákat a gyártó ajánlott protokolljának megfelelően terveztük és használtuk (Integrated DNA Technologies Inc., Coralville, IO, USA). A próbák szekvenciája:

Hősokk fehérje 60 (GenBank accession No: NM_010477.4)

T3 flanked sense: 5'-ATTAACCCTCACTAAAGGTCCCTGCTCTTGAAATTGCT,

T7 flanked antisense: 5'-AATACGACTCACTATAGGCTCCACAGAAAGGCTGCTTC;

Ameloblasztin (GenBank accession No: NM_016519.5)

T3 flanked sense: 5'-AATTAACCCTCACTAAAGGCAGAAGGCTCTCCACTGCAA,

T7 flanked antisense: 5'-TAATACGACTCACTATAGGAGCAGTCAGGGTTTTCCACC.

A mintákat RNÁze mentes friss 4 %-os paraformaldehiddel fixáltuk 4°C-on egy éjszakán át. A fixálást követően 3X10 percig PBS-ben, majd 15 percig 0.1 m-os PBST-ben inkubáltuk a mintákat, melyet ismételt PBS-es mosás követett. Proteináz K enzimet használtunk (4 µg/mL koncentrációban) a proteinek emésztésére TE pufferben 20 percig 37 °C-on. A mintát

prehibridizáltuk formamiddal 30 percig 60 °C-on, majd a próbákat egy éjszakán át 70 °C-on hagytuk a mintákon. A hibridizációs puffer 50 % formamidot, 5× SSC, 10 % dextranszulfátot, Denhardt's solution-t és 2.5 mg/mL próbát tartalmazott. Inkubáció után a mintákat 2× SSC, SSC és 0.2× SSC, mostuk 20-20 percig. A nem kötődött próbákat RNÁze A-val bontottuk (20 µg/mL) 30 percig 37 °C-on. Végül a mintákat 3-szor TBS-ben mostuk. A hívás során 1 % Boehringer Blocking Reagenst, 10 % kecske szérumot tartalmazó TBS-t használtunk. Az alkalikus foszfatáz konjugált anti-digoxygenin antitestet (Roche, Mannheim, Germany) 8 órán át 4 °C-on alkalmaztunk a mintáinkon. A nem kötődött antitestet TBS-el mostuk ki a mintákból 3×10 percig. A színreakcióhoz 20 µL NBT/BCIP (Roche, Mannheim, Germany) reagens használtunk 1 mL TRIS-ben. A reakció leállítását követően a mintákat Scale A2 oldatban tároltuk.

A RT-qPCR kísérleteket során a teljes RNS mennyiséget Trizolban preparáltuk a gyártó utasításának megfelelően (7 kezelt és 7 kontrol mintából). A cDNS 200 ng RNS felhasználásával volt szintetizálva High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit-tel (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). A q-PCR reakció során 10 ng cDNS-t használtuk fel. A reakció LightCycler 480 készülékben (Roche, Basel, Switzerland) qPCR supermix (PCR Biosystems) hozzáadásával került kivitelezésre a következő primerekkel: ameloblasztin (fwd: 5'-CATGCAGGACTTCTTGCTTTC; rev: 5'-GGTGCACTTTGTTTCCAGGTA) és cyclophilin mint kontroll (fwd: 5'-TGGAGAGCACCAAGACAGACA; rev: 5'-TGCCGGAGTCGACAATGAT) Az ameloblasztin expressiót a cyclophilin szintjéhez normalizáltuk a kísérleteink során.

Organoid szövetkultúra

A korábbi cikkeknek megfelelően Trowel típusú szövettenyészetet készítettünk 16.5 napos fogcsírákból. A fogcsírák szeparálása során mindkét alsó metszőfogat kipreparáltuk NIKON SMZ 1000 sztereomikroszkóp segítségével (Nikon, Tokyo, Japan). A fogcsírákat 0.1 µm pórus

átmérőjű Nucleopore filterre (Sigma, St. Louis, MO, USA) helyeztük. A tenyésztés során a mintákat inkubátorba (37 °C és 5% CO₂) helyeztük. A párok közül egyet kezelésben részesítettünk, melynek az egyedi párja volt a kontrollja. A kezelt és kontroll fogcsírák így azonos állatból származtak, mely biztosítja a lehető legnagyobb hasonlóságot a minták között. A DMEM (Gibco Brl, Gaithersburg, MD USA) médiumhoz 15% FBS-t (Gibco Brl, Gaithersburg, MD, USA) adtunk, melybe a kezelés során 1 µg/mL LPS-t (InvivoGen, San Diego, USA) vagy 1 µg/mL Hsp 60-t (Abcam, Cambridge, UK) adagoltunk. A tenyészetek médiumát minden 48 órában cseréltük, és a kísérleteket az ötödik napon fejeztük be. A mintákat az első, harmadik és utolsó tenyésztési napon fotódokumentáltuk.

Morfológiai analízis

A morfológiai elváltozás pontos megítélésért morfológiai analízist végezzük a tenyésztett mintákon, mely során a linguális és labiális gyökérnyúlvány, valamint a zománccsomó közötti szöveget mértük le. A morfológiai elemzés során ImageJ 1.46 (National Institutes of Health, Maryland, USA) szoftvert használtunk, mely során 7-7 kezelt és kontroll mintát vizsgáltunk legalább 3 különböző tenyésztésből. A méréseket az *in vitro* tenyésztés adatai alapján végeztük, mellyel elkerülhető a szövetek zsugorodásából (pl. dehidráció során) eredő torzító hatás.

ALP aktivitást mérő esszé

A mineralizációs folyamatok vizsgálata során alkalikus foszfatáz aktivitását mérő kísérletet végeztünk 16.5 napos fogcsírákon a tenyésztést követően. A kezelt és kontroll mintákat -70 °C tároltuk pufferben a felhasználásig. A mintákat 30 másodpercig 40 A-mal tártuk fel (Cole-Parmer, Illinois, USA). Majd 10.000g-vel 10 percig centrifugáltuk, a felülúszóból végeztük el a kísérletünket, mely során a gyártó utasításait követtük (Abcam, Cambridge, UK).

Western Blot

A monoklonális Hsp 60 antitest tesztelését (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) a tenyésztés során alkalmazott exogén Hsp 60 fehérjén végeztük el (Abcam, Cambridge, UK). A Hsp 60 és TLR4 kimutatására irányuló Western blot kísérleteket 13.5-18,5 napos fogcsírákon kerültek kivitelezésre. A szeparált fogcsírák sérülésmentesek voltak, felszínük nem tartalmazott kötőszövetet. A fogcsírákat homogenizáló pufferbe helyeztük (50 μ L homogenisation buffer containing 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0), 10 μ g/mL Gordox, 10 μ g/mL leupeptin, 1 mM phenylmethylsulphonyl-fluoride, 5 mM benzamidine, and 10 μ g/mL trypsin inhibitor). Következő lépésben szonikálással feltártuk a mintákat (Cole-Parmer, East Bunker Court Vernon Hills, IL, USA) a későbbiekben a teljes lizátumot használtuk a kísérleteink során. A 7.5% SDS-PAGE géltre 10-20 μ g protein mintát vittük fel, a Hsp 60, TLR4 és aktin detektálása céljából. A fehérjéket nitrocellulóz membránra transzferáltuk. A blokkolást követően 1:200-as koncentrációban monoklonális anti Hsp 60 (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) vagy anti-TLR4 egérellenes antitestet (Abcam, Cambridge, UK) és 1:10000 koncentrációban aktin ellenes antitesttel (Sigma, St. Louis, MO, USA) inkubáltuk a mintákat 4 °C egy éjszakán át. PBST-t mosást követően (3X10 perc) egér ellenes IgG szekunder antitestet használtunk 1:1500-as koncentrációban 1 órán át szobahőmérsékleten. Az előhívás során kapott jelet röntgenfilmen detektáltuk.

Immunistokémia detektálása a TLR4-nek

A mintákat a tenyésztést követően 30 percig 4 °C Sainte-Marie fixálóban helyeztük, majd PBS-ben mostuk. A tenyésztés során használt biotin jelölt LPS detektálására 1:100-as hígításban Vectastain Elite ABC Kit-et (Vector Laboratories Ltd., Peterborough, UK) alkalmaztunk. A kontroll fogcsírákon az ABC Kit-et PBS-sel helyettesítettük. A reakció detektálását

tormaperoxidáz reakcióval tettük láthatóvá. A kifejlődött DAB csapadékot 3 független kutató értékelte. A kontroll minták specifikus jelet nem adtak.

Hsp 60 immunhisztokémiai detektálása

A mintáinkat (E10.5-E18.5) Sainte-Marie fixálóban 30 percig 4 °C fixáltuk, majd 16.5 napos stádiumtól 10 %-os EDTA-ban tároltuk 2 hétig a mintákat. A dehidráció során felszálló alkohol sort alkalmaztunk, majd xilolt, mely után végül paraffinba ágyztuk a mintákat. Az immunhisztokémiai reakció során deparaffináltunk, majd rehidráltuk a metszeteket. A metszeteket 1% ló szérummal blokkoltunk, majd 3%-os H₂O₂-al gátoltuk az endogén peroxidáz aktivitást. A monoklonális anti-Hsp 60-as antitestet (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) 1:200-as hígításban alkalmaztuk PBS-ben egy éjszakán át 4 °C-on. A mosásokat követően a másodlagos anti egér IgG antitestet (Vector Laboratories Ltd., Peterborough, UK) 1:400-as hígításban 2 órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk a metszeteken. A mosásokat követően a Vectastain ABC Kit-et (Vector Laboratories Ltd., Peterborough, UK) alkalmaztunk a szekunder antitesteket konjugálására, melyet tormaperoxidáz módszerrel vizualizáltunk. A kontroll minták során a primer antitestet vízzel helyettesítettük, melyek specifikus jelet nem adtak. A hisztológiai festést picosirius F3B-vel végeztük, a korábbi protokolloknak megfelelően.

BrdU inkorporációs teszt

A fogcsírák tenyésztésének befejezése előtt 2 órával 10 µL BrdU jelölő reagenst (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) adtunk a minták médiumához. A tenyésztést követően a fogcsírákat Sainte-Marie oldatban fixáltuk 4 °C-on 30 percig, majd dehidráltuk a mintákat felszálló alkoholsorban és xilolban, végül paraffinba ágyztuk őket. A szövettani feldolgozás során 5 µm vastag szövettani metszeteket készítettünk, majd a BrdU Detection Kit (Zymed, Carlsbad, CA, USA) gyártói protokolljának alapján elvégeztük a BrdU jelölt sejtek előhívását.

A pozitív kontroll a gyártó által volt biztosítva.

ELISA

A tenyésztett fogcsírákat a tenyésztést követően $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ tároltuk a felhasználásig. A mintákat a feldolgozása során mechanikailag homogenizáltuk TRIS-glicerinbe mely 1%SDS-t és proteáz inhibitorokat tartalmazott. NUNC Maxisorp plate lyukaiba $10\text{ }\mu\text{g}$ proteint tartalmazó fedő puffer volt töltve ($15\text{ mM Na}_2\text{CO}_3$, 35 mM NaHCO_3 , $0.02\% \text{ NaN}_3$, $\text{pH}=9,6$). A szabad kötőhelyeken blokkolására 1%-os BSA-t használtunk, majd a mosásokat követően 10-es típusú kollagén elleni antitestet alkalmaztunk a felszíneken (Abcam, Cambridge, UK). Az inkubálás és mosások után a kötődött primer antitestek detektálása tormaperoxidáz enzimmel konjugált nyúl ellenes IgG-t alkalmaztunk (DAKO, Glostrup, Denmark). A színreakció o-phenylene-diamine szubsztrát mellett fejlődött ki melynek abszorbanciáját 492 nm -en mértük. A pozitív kontroll során szintén ezeket a lépéseket alkalmaztuk, de a minta epiphysis porc volt.

Alizarin-vörös hisztokémiai festés

A tenyésztett fogcsírákat paraformaldehidbe fixáltuk 2 órán át szobahőmérsékleten közvetlenül a tenyésztés után, majd desztillált vízben öblítettük a mintákat. Az alizarin-vörös festéket 10 percig szobahőmérsékleten alkalmaztuk a mintákon. A felesleges festéket desztillált vizes mosással majd 20 % glicerollal távolítottuk el. A mintákat a dokumentálás előtt 10 percig Scale A2 oldatban derítettük.

Dokumentáció és statisztika

A szövettani metszeteket Nikon Eclipse 800 (Tokyo, Japan) fénymikroszkópra szerelt Olympus DP 70 digitális kamerával (Olympus, Tokyo, Japan) dokumentáltuk. A képeket Adobe PhotoShop Software CS4 (Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA) segítségével

szerkesztettük. A morfológiai elemzés során ImageJ 1.46 (National Institutes of Health, Maryland, USA) szoftvert használtunk, mely során 7-7 kezelt és kontroll mintát vizsgáltunk legalább 3 különböző tenyésztésből. A paneleken feltüntetett adatok az átlagot \pm SEM-et ábrázolják. A BrdU inkorporációs teszt során Mann-Whitney statisztika próba alkalmaztunk. Az ELISA és WB kísérleteknél Student's tesztet használtunk.

Eredmények

Funkcionálisan aktív TLR4 detektálható a fogfejlődés során

WB módszerrel detektáltuk TLR4 kifejeződését a fogfejlődés sapka stádiumától, mely időponttól folyamatosan megtalálható a fejlődő fogcsírában. *In vitro* tenyésztése a 16.5 napos fogcsírának szignifikáns mértékben csökkentette az I κ B mennyiségét a LPS-sel kezelt fogcsírákban. A tenyésztés során kötődött biotin jelölt LPS-t immunhisztokémiai módszerrel detektáltuk, mellyel az aktív TLR4 receptorokat tettük láthatóvá. Elmondhatjuk, hogy a következő részei tartalmaztak aktív TLR4 receptorokat a fogcsírának: preszekretoros, szekretoros ameloblasztok, sztrátum intermédiüm és preodonblasztok. Érdekeség, hogy a posztsekreteros ameloblasztok nem jelölődtek.

Az LPS kezelés csökkentette a fogcsíra mineralizációját, miközben a fogcsíra morfológiáját nem változtatta meg.

A tenyésztés öt napja során nem változott meg az LPS kezelt fogcsírák morfológiája. Alizarin vörössel történő hisztokémiai festés alapján viszont nagymértékben csökkent a fogcsíra mineralizációja az LPS kezelés hatására. A kontroll mintákban jelentős mennyiségben jelenlévő Ca ion mennyisége nagymértékben csökken a kezelés hatására mind a linguális mind a labiális oldalán a kezelt fogcsírának. Továbbiakban ELISA módszerrel vizsgáltuk a 10-es típusú kollagén mennyiségét a mintákban és szignifikánsan csökkent szintet detektáltunk a kezelt fogcsírák esetén. További vizsgálattal az alkalikus foszfatáz enzim csökkent aktivitását detektáltuk a kezelt fogcsírákban.

LPS kezelés elősegíti az ameloblasztok érését

In situ hibridizációval vizsgáltuk az ameloblasztin mRNS kifejeződését, mely csak a fogcsírák zománcszervében a labiális oldalán volt detektálható. A kezelt mintákban egyértelműen megemelkedett a kifejeződés szintje, melyet RT-qPCR-el számszerűsítettük, mely szignifikánsan emelkedett expressziót igazolt.

A hősokk fehérje 60 nagy mennyiségben fejeződik ki a zománcszervben

A Hsp 60 elsőként a fogfejlődés iniciációs szakában volt megfigyelhető (E11.5), majd a bimbó és sapka stádiumokban egyértelműen a zománcszerv területén fejeződött ki. A következő rétegei a zománcszervnek tartalmazták nagy mennyiségben Hsp 60 fehérjét: belső zománchám, külső zománchám, zománccsomó. A fogcsírák körülölelő fogzacsok csak bazális expressziót mutatott, mely minden szövetben detektálható volt. A harang stádium során frissen differenciálódott struktúrák is immunpozitivitást mutattak, melyek: sztrátum intermédium, preszekretoros, szekretoros ameloblasztok a fent említett szövetrészek mellett. A dentális papilla sejteiből differenciálódó preodontoblasztok, odontoblasztok szintén immunpozitivitást mutattak. A sztrátum intermédiumban extracelluláris Hsp 60 is detektálható volt. Western blot módszerrel a Hsp 60 kifejeződését E13.5-E18.5 kor között megerősítettük.

In situ hibridizációval detektáltuk a Hsp 60 mRNS expressziós mintázatát

Az *in situ* hibridizációval elsősorban az extracellulárisan a sztrátum intermédiumban lévő Hsp 60 eredetét vizsgáltuk. Kísérleteinkhez 16.5 napos fogcsírákat használtunk, mellyel később *in vitro* tenyésztéseink során feldolgozásra kerültek. Az egész minta áttekintése alapján a Hsp 60 mRNS-e elsősorban a labiális részén található a fogcsíráknak, ezzel szemben a linguális és középső területek gyengén jelölődtek. Elmondhatjuk, hogy az immunhisztokémiai eredményeink megerősítést nyertek, hiszen a külső, belső zománchám, sztrátum intermédium,

szekretoros ameloblasztok, preszekretoros ameloblasztok, preodontoblasztok és odontoblasztok tartalmazták nagy mennyiségben a Hsp 60 mRNS-t. Valószínűsíthetően az extracelluláris Hsp 60 fehérje a sztrátum intermédiüm sejteiből származik.

Az exogén Hsp 60 alaktani elváltozást okozott a tenyésztés során

Kísérleteinkhez 16.5 napos fogcsírákat használtunk, mert ez a morfogenezis és hisztodifferenciós fejlődéstani stádiumokkal is átfed a fogfejlődés során. Illetve a későbbiekben kialakuló fogzománc gátolni képes a Hsp 60 felvételét a fogcsíra centrumának irányába, ez 16.5 napos fogcsírák esetén nem áll fent. A tenyésztés első napja során nem volt alaktani eltérés a minták morfológiája között. A harmadik napon a Hsp 60 kezelt fogcsírák csúcsi része kissé tompábbá vált, a proximális része a fogcsíráknak viszont azonos morfológiát mutat kontroll mintákhoz viszonyítva. Egyértelmű eltérés a kezelés ötödik napján alakult ki. A kezelt fogcsírák csúcsi része egyértelműen megnagyobbodott, tompa a kontroll mintákhoz képest, a proximális részek azonosak. A statisztikai elemzés szerint szignifikáns különbség alakul ki a gyökérsírnálványok és a zománccsomó között mérhető szögben kezelt minták esetén ($21,01^\circ$; SD:3,77; SEM:1,68) kontroll minták esetén ($11,88^\circ$; SD:2,94; SEM:1,31). A megfigyelt morfológiát picosirius festéssel tettük jól dokumentálhatóvá.

Sejtciklus analízis

A csúcsi része a kezelt és kontroll minták esetén sem tartalmazott osztódó sejteket. Számos sejt jelölődött azonban a fogcsírák labiális gyökérsírnálványának a területén. Habár kis különbség kialakult a kezelt és kontroll csoportban a sejtek számát és eloszlásának tekintetében, ezen eltérés nem szignifikáns Mann-Whitney test, $p > 0.84$.

Megbeszélés

A TLR4 kifejeződése a fejlődő fogcsírában, mely zománc mineralizációt befolyásolja.

Kísérletünk alapján elmondhatjuk, hogy a TLR 4 receptor 14.5 napos embrionális kortól folyamatosan expresszálódik egerek alsó metszőfogában, mely alapján vélhetően fejlődéstani szerepet is betölt az odontogenezis során. A kísérleteink alapjául szolgáló mintákat 16.5 napos alsó incisorok TLR4 specifikus agonistájával történő kezelése során nyertük. Specifikus agonistával (LPS) történő kezelése a fogcsíráknak, szignifikánsan csökkentette az I κ B mennyiségét, mely az NF- κ B jelátviteli útvonal negatív regulátora és a TLR4 szignalizáció egyik effektora. Ezek alapján valószínűsíthető, hogy a TLR4 funkcionálisan már aktív 16.5 napos fogcsírák esetén, tehát az esetleges hatásait ebben a stádiumban már vizsgálható. A TLR4 egyik jól ismert hatása a keményszövetek mineralizációjának befolyásolása. Alizarin vörös festéssel összehasonlítva az LPS kezelt és kontroll fogcsírákat elmondhatjuk, hogy a kezelt mintákban drámain kevesebb a Ca ion mennyiség a zománc mátrixban a tenyésztés 5. napján. Irodalmi adatok alapján a TLR4 ezen hatását az alkalikus foszfatáz enzim gátlásán keresztül fejti ki, ezt megerősítendő a kezelt mintáinkban nagymértékben lecsökkent az enzim aktivitást találtunk. ELISA módszerrel csökkent mennyiségű 10-es típusú kollagént detektáltunk, mely csak a zománc mátrixban található a fogfejlődés során, ezen adat szintén csökkent mineralizációra enged következtetni. A 10-es típusú kollagének kiemelkedő szerepe van az enchondrális csontosodásban, mely során a hidroxipapatit kristályok optimális környezetét alakítja ki. Két megfontolással tudjuk ezen eredményeket magyarázni, elsősorban az irodalomban már jól ismert szerepével a TLR4-nek mely az ALP enzim gátlását okozza odontoblasztokon így a biomineralizációs folyamatokat gátolja. Másrészt a szabad LPS képes szabad Ca ionokat kötni, mely közvetve szintén gátolja a zománc és dentin mátrix mineralizációját az ameloblasztok és odontoblasztok érésének a gátlása miatt. Az ameloblasztok érésének gátlását az *in situ* hibridáció és RT-qPCR kísérletek cáfolják, ahol éppen ellenkezőleg

felgyorsult érést detektáltunk, tehát a LPS Ca^{2+} kötő hatása kevésbé valószínű. Az *in situ* hibridizációval és RT-qPCR-el vizsgált ameloblasztin mRNS egy zománc mátrix fehérjét kódol, melyet szekretoros ameloblasztok szintetizálnak, habár kis mennyiségben időszakosan a dentin mátrixban is megtalálható. *In situ* hibridizáció vizsgáltuk a kifejeződési mintázatát az ameloblasztinnak E16.5 stádiumban, mely kísérleteink alapján ezen stádiumban az AMBN csak a zománcmátrixban volt megtalálható. RT-qPCR-el vizsgálva elmondhatjuk, hogy szignifikánsabb magasabb volt az AMBN szintje a kezelt mintákban, mely mennyiség csak a zománc mátrixból származott. A felgyorsult mátrix szekréciót már korábban ismertették kutatók az odontoblasztok végzett kísérletek során. Fontos megjegyezni, habár mi direkt TLR4 hatásnak tulajdonítjuk a felgyorsult ameloblaszt, felvetendő a MAPK jelátviteli útvonal szerepe ezen folyamatban, melyet ez idáig sem csoportunk, sem pedig más szerzők nem vizsgáltak.

Kifejeződési mintázata és feltételezett szerepe a Hsp 60 fehérjének

Második célként egy olyan endogén ligand detekcióját tűztük ki, mely aktiválhatja a TLR4-et az egyedfejlődés során. Az irodalom alapján számos ilyen fehérje fellelhető például: hősokk fehérjék, HMPG, proteoglikánok. Ezen jelöltek közül a Hsp 60 fehérje vizsgálatát végeztük el, hiszen ez közvetlen a TLR4-et is képes aktiválni, illetve TLR4 mediált endocitózis útján is képes bekerülni a citoszolba ahol az NF- κ B jelátviteli útvonalat képes módosítani. Korábbi cikkek már ismertették a Hsp 25, 27, 28, Hsc73, Hsj2 kifejeződését és szerepét a fogfejlődés során, melyek szintén a hősokk fehérje családba tartoznak. Elmondhatjuk, hogy a Hsp 25 elsősorban a morfológiai fejlődését, illetve a hisztodifferenciációt szabályozza őrlő fogakon végzett kísérletek alapján. A Hsp 25 kifejeződése folyamatos a fogfejlődés során odontoblasztokban és a pulpa sejteiben, míg a preodontoblasztok, ameloblasztok időlegesen fejezik ki. A Hsp 27 szintén elsősorban a morfológiai fejlődését határozza meg a fejlődő fognak, és a harang stádiumtól fejeződnek ki elsősorban a zománcszervben. Hsc73, Hsj2 elsősorban a belső

zománchában és a zománccsomóban expresszálódik a harang stádium során. Elmondhatjuk, hogy a Hsp 60 hasonló mintázatot mutat, mint a fent felsorolt rokon fehérjék. A zománchám, odontoblasztok fejezték ki legerősebben a Hsp 60-at a fogfejlődés során, jóllehet bazális expresszió minden szövetben megfigyelhető volt, mely a Hsp 60 kardinális szerepével magyarázható. Az *in situ* hibridizáció megerősítettük az immunhisztokémiai eredményeinket. Ezzel az érzékenyebb módszerrel is eltérő expressziós mintázatot találtunk a fogcsíra különböző szöveteiben. Fontos megjegyezni, hogy az *in situ* hibridizáció során felhasznált mintákat közel fiziológiás körülmények között végeztük, tehát az emelkedett Hsp 60 mRNS szint nem patológiai folyamatok következménye.

Ismert, hogy patológias körülmények pl. láz, hypoxia, acidózis, percek alatt képes a Hsp 60 szintjét megemelni. Mivel K.O. nem elérhető, ezért az emelkedett Hsp 60 koncentrációt vizsgáltuk *ex vivo* szövettenyészés során 16.5 napos fogcsírák esetében. Az alkalmazott mennyiségű Hsp 60 abnormális, tompa csúcsi részt okozott a kezelt fogcsírákon. Ezen alaktani elváltozás lehet az NF- κ B jelátviteli útvonal befolyásolása révén létrejött változás. Közelmúltban felmerült adatok alapján, a Hsp 60 képes a citoszolban az IKK komplexhez kötődni, mely a centrális regulátora az NF- κ B útvonalnak. Az IKK komplex 3 alegysége: IKK α , IKK β és IKK γ . Régóta ismert, hogy az IKK α KO állatoknak tompa csúcsi résszel fejlődik ki az első metszőfoguk, míg az IKK β , IKK γ funkcióvesztése nem okoz fogfejlődési anomáliát. Ezek alapján feltételezhető, hogy a metszőfogak morfológiai elváltozása az IKK komplex befolyásolása révén jön létre. Egy másik lehetséges válasz az abnormális tompa csúcsi részű metszőfogakra az ektodysplasin/TNF jelátviteli útvonal, mely az ektodermális függelékek morfológiai fejlődéséért felelős. Az effektor molekula ebben az esetben is az NF- κ B transzkripciós faktor. Az ektodysplasin génkiütött egerek szintén az általunk megfigyelt fogfejlődési anomáliával születnek. Érdekesség, hogy az IKK komplex által szabályozott I κ B elvesztése miért nem okoz fogfejlődési rendellenességet. A BrdU inkorporációs teszt során,

nem találtunk lényegi eltérést sem a dentális sejtek osztódási gyakoriságában, sem pedig azoknak a számában.

A Hsp60 fehérje kapcsolata valószínűsíthető a TLR4 receptorral

Adataink alapján a TLR4 a hisztodifferenciációban és a mineralizációs folyamatok kapcsán vesz részt a fogfejlődés során. A TLR4 folyamatosan jelen van a fejlődő fogcsírákban a sapka stádiumtól. Eredményeink szerint elsősorban a zománcszervben és preodontoblasztokban találhatóak meg. A TLR4 aktivációja 16.5 napos fogcsírán csökkentette a mineralizációt a fog keményszöveteiben. Az LPS kezelés másik szignifikáns elváltozása pedig az ameloblasztok érésének elősegítése volt. Az általunk használt LPS egy exogén ligand volt, habár számunkra kardinális kérdés volt, hogy milyen esetleges endogén ligand tudja aktiválni a TLR4-et. A kísérleteinkhez a Hsp 60 fehérje vizsgálatát tűztük ki, mely alkalmas lehet a fenti funkció betöltésére. Az immunhisztokémia alapján elmondhatjuk, hogy a Hsp 60 elsősorban a zománcszervben, illetve odontoblasztokban fejeződik ki nagyobb mennyiségben. Eredményeinket *in situ* hibridizációval erősítettük meg. Ha összehasonlítjuk az TLR4 (exogén) és Hsp 60 (endogén) ligand közötti eredményeket, elmondhatjuk, hogy mindkét fehérje elsősorban a zománcszervben fejeződik ki. A jelátviteli útvonal mindkét esetben az NF- κ B útvonal, habár a TLR4 a MAPK útvonalat is képes aktiválni. Másrészt az eredményeink nem támogatják azt a hipotézist, hogy a Hsp 60 aktivizálná a TLR4 receptort. Az LPS kezelés nem okozott alaktani elváltozást, mint a Hsp 60 exogén adagolása. Ezek alapján valószínűsíthetően a Hsp 60 endocitózis kapcsán kerül be a sejtekbe pl. TLR4 által, ahol a citoplazmában az IKK komplexen keresztül fejti ki hatását. Fontos megjegyezni, hogy a Hsp 60 számos TLR receptort képes aktiválni, mint tipikus endogén ligand, így tovább bővül nyitott kérdéseink köre.

Összefoglalás

Célként tűztük ki, hogy kimutassuk a feltételezett jelenlétét és szerepét a Toll-like receptor 4-nek a fogfejlődés során, illetve egy feltételezett ligandjának a mintázatát és funkcióját (Hsp 60) kívántuk monitorozni a fogfejlődés alatt.

Az adataink a következő következtetéseket vontuk le.

- A TLR4 a sapka stádiumtól folyamatosan kifejeződik a rágcsáló fogcsírában elsősorban a zománcszerv struktúráiban.
- A TLR4 aktivációja ne okozott morfológiai elváltozást, azonban csökkentette a fogcsírák mineralizációját és gyorsította az ameloblasztok érését.
- Egy lehetséges endogén ligand a Hsp 60 folyamatosan kifejeződik a fogfejlődés alatt, elsősorban szintén a zománcszervben található meg nagy mennyiségben.
- A Hsp 60 abnormális morfológiát okozott a fejlődő fogcsírákon, azonban nem változtatta meg a sejtek osztódási aktivitását.
- Összességében elmondhatjuk, hogy sikerült a Hsp 60 és TLR4 expressziós mintázatát leírni, azonban nagy valószínűséggel az eltérő hatásaik miatt egyéb jelátviteli útvonalakat is befolyásolhatnak.



Nyilvántartási szám: DEENK/2/2016.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Papp Tamás
Neptun kód: FY4L4R
Doktori Iskola: Fogorvostudományi Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10037441

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Papp, T.**, Polyák, A., Papp, K., Mészár, Z., Zákány, R., Mészár-Katona, É., Terdik, T., Chang, H.H., Felszeghy, S.: Modification of tooth development by heat shock protein 60.
Int. J. Oral. Sci. "Accepted by Publisher" (2016), p. 1-8.
IF:2.531 (2014)
2. **Papp, T.**, Holló, K., Mészár-Katona, É., Nagy, Z., Polyák, A., Mikó, E., Bai, P., Felszeghy, S.: TLR signalling can modify the mineralization of tooth germ.
Acta Odontol. Scand. "Accepted by Publisher" (2016), p. 1-7.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3109/00016357.2015.1130853>
IF:1.03 (2014)





További Közlemények

3. Albert, R., Vásárhelyi, G., Bodó, G., Kenyeres, A., Wolf, E., **Papp, T.**, Terdik, T., Módis, L., Felszeghy, S.: Computer-assisted microscopic analysis of bone tissue developed inside a polyactive polymer implanted into an equine articular surface.
Histol. Histopath. 27 (9), 1203-1209, 2012.
IF:2.281

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 5,842

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
3,561

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2016.01.06.



Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom feleségemnek, Dr Maka Eszternek, a megértéséért és segítőkészségéért melyet az évek folyamán tanúsított. A fenti munka a Debreceni Egyetemen, Anatómiai, Szövet – és Fejlődéstani Intézetében készült. Szeretnék köszönetet mondani a témavezetőmnek Felszeghy Szabolcsnak. Szintén köszönettel tartozok Antal Miklós és Módis László professzoroknak, Terdik Tünde és Mészár Zoltánnak, Mészár-Katona Évának, Holló Krisztának, Zákány Rózának valamint az Anatómia Intézet minden tagjának az évek alatt nyújtott támogatásukért. Dr Bai Péternek és dr Mikó Editnek az Orvosi Vegytani Intézet munkatársainak az általuk nyújtott segítségért.