

P2 receptorok részvétele a központi idegrendszer fiziológiás és kóros működésében: a neurotranszmitter felszabadulástól a teljes genom microarray analízisig

Doktori tézisek
Csőlle Cecília



Semmelweis Egyetem
Idegtudományi Doktori Iskola

Programvezető: Dr. Vizi E. Szilveszter egyetemi tanár, MTA r. tagja
Témavező: Dr. Sperlág Beáta egyetemi tanár, MTA doktora
Hivatalos bírálók: Dr. Buzás Edit egyetemi tanár, MTA doktora
Dr. Pintér Erika, egyetemi tanár, MTA doktora
Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Tekes Kornélia egyetemi tanár, CSc
Szigorlati bizottsági tagok: Dr. Köles László egyetemi docens, Ph.D
Dr. Zádori Zoltán egyetemi adjunktus, Ph.D

Budapest
2013

Bevezetés

Az idegtudományi kutatások egyik legfontosabb és eddig megválaszolatlan kérdése a neurodegenerációhoz, azaz az idegsejtek pusztulásához vezető folyamatok okainak és pontos mechanizmusának feltárása. A neuronális sejtelhalás folyamatába való beavatkozásra az eddigieknél eredményesebb megközelítés lehet olyan receptorok serkentése vagy éppen gátlása, amelyek élettani körülmények közt csak kismértékben játszanak szerepet, ugyanakkor patológiás körülmények közt több támadásponton is befolyásolhatják a neuronok túlélését. Ilyen új terápiás lehetőséget rejthet magában a purinerg jelátvitel mélyebb megismerése. Az ATP, mint szinaptikus jelátvivő anyag, illetve, mint preszinaptikus modulátor fontos szerepet tölt be a központi idegrendszer ingerületátvitelében, fiziológias és patológiás körülmények között egyaránt. Az ATP hatásait az extracelluláris térben ionotróp P2X (P2X₁₋₇) és metabotróp P2Y (P2Y_{1, 2, 4, 6, 11, 12, 13, 14}) receptorok közvetítik. Ismert, hogy az ATP mind a központi- mind, pedig a perifériás idegrendszerben együtt szabadul fel katekolaminokkal. Annak ellenére, hogy a monoaminerg sejtek száma meglehetősen alacsony az agyban, ezek a sejtek jelentős hatást fejtenek ki a központi idegrendszer működésének szabályozásában. A noradrenerg sejteknek számottevő populációja található a nyúltvelő A1-A3-as magvaiban és a híd területén található A4-A7-es magokban. Ezek közül a legjelentősebb a locus coeruleus (A6-os mag), melyből kiinduló rostok adják a hippocampusz noradrenerg innervációját is. Munkacsoportunk eddigi kutatási eredményei alapján a noradrenerg végződés a periférián és a központi idegrendszerben is serkentő hatású P2X₁ és P2X₃ receptorokat fejeznek ki, ugyanakkor gátló P2Y receptorokat eddig még nem írtak le a hippocampális noradrenerg afferenseken. A hipoxia és az ischémiás inzultus hatásaival szemben különösen érzékeny hippocampuszban patológiás körülmények között fokozódik a noradrenalin kiáramlása, amely hozzájárulhat a neurotranszmitter egyensúly ilyenkor megfigyelt felborulásához, illetve magához a neuronális sejtelhaláshoz is. A reperfüzió során ugyanis a monoaminokból autooxidáció révén toxikus szabadgyökök is

keletkezhetnek, amelyek súlyosbíthatják az ischémia által már elindított, a sejtelhaláshoz vezető kóros eseménysort. A noradrenalin felszabadulást befolyásoló gátló purin receptorok azonosítása révén tehát újfajta terápiás célpontokat jelölhetünk ki az ischémias neurodegeneráció kezelésére, illetve olyan terápiás területeken, amelyekben a noradrenerg rendszer jelenlegi ismereteink szerint fontos szerepet játszik (pl. depresszió, hipertenzió, alvás-ébrenlét szabályozása).

A noradrenalin felszabadulás szabályozása azonban nem az egyetlen lehetséges támadáspont, amely által a neurodegeneráció vagy más kóros agyi történések purinerg mechanizmusokon keresztül szabályozható. Az ionotróp P2X receptorok közül a lassan deszenzitizálódó P2X7 receptor abban különbözik társaitól, hogy karboxi végződése hosszabb, melynek közelében egy bakteriális lipopolyszacharid (LPS) kötőhelyet is felfedeztek, továbbá magasabb koncentrációjú ATP (mM) aktiválja, és hosszabb vagy ismételt ingerlésre egy reverzibilis plazmamembrán pórust formál, melynek áteresztőképessége 800Da is lehet. A P2X7 receptorok a mikroglia, asztrocita sejteken és idegvégződéseken expresszálódnak és súlyosbító szerepük lehet az idegrendszer neurodegeneratív és gyulladós betegségeiben (pl. ischémia, Alzheimer kór, szklerózis multiplex), mivel számos gyulladáskeltő citokin (pl. IL-1 β , TNF- α , IFN- γ), kemokin (pl. MIP-makrofág gátló protein) felszabadulásában, a neurotranszmitter felszabadulás szabályozásában (glutamát), valamint ezek jelátvivő kaszkádjainak (pl. MAPK-ok, PLA2/PLD, kaspázok, NF-kB, AP-1, CREB) aktiválásában is részt vesznek. A P2X7 receptorok a megnövekedett idegi aktivitás molekuláris szenzoraként közreműködhetnek emellett a memória (LTP, LTD) és tanulási folyamatok alapját képező plaszticitási jelenségekben. A gyulladós citokinek, így az interleukin-1 β (IL-1 β) az ischémiát követően elsősorban a nem idegi sejtekből, tehát a mikrogliaból és asztrocita sejtekből szabadulnak fel. Idegi sejtelhalást súlyosbító hatásai már régóta ismertek, ugyanakkor az IL-1 β jelenlegi ismereteink szerint az LTP gátlásán keresztül a rövid-távú memória és a tanulási folyamatok szabályozásában is fontos szerepet tölt be. Az érett IL-1 β felszabadulásához két egymást követő aktivációs stimulus szükséges: míg bakteriális endotoxin (LPS) ingerléssel önmagában csak pro-IL-

1 β szabadul fel, egy második stimulus szükséges ahhoz, hogy az éretlen IL-1 β hasítása megtörténjen és az érett IL-1 β felszabaduljon. A periférián a bakteriális endotoxin hatására létrejövő, biológiailag aktív IL-1 β produkcióhoz szükséges másodlagos externális szignál a P2X7 receptor aktiváció biztosítja. Számos in vitro gyulladásozó modellben már sikeresen igazolták a P2X7 receptorok szerepét az LPS kezelést követően detektálható, érett IL-1 β produkció kiváltásában. Vizsgálataink második szakaszában a P2X7 receptorok funkcióját a hippocampális IL-1 β termelés szabályozásában tártuk fel in vivo endotoxin stimulációt követően.

Munkacsoportunk időközben elvégzett saját kutatásai és irodalmi adatok kimutatták, hogy a P2X7 receptor hiánya vagy farmakológiai gátlása állatkísérletekben antidepresszáns fenotípust okoz, a hatás közvetítő mechanizmusa azonban eddig még feltáratlan volt. Vizsgálataink harmadik részében a P2X7 receptor aktiváció génextpresszióra gyakorolt hatásait térképeztük fel a limbikus rendszer egyik fontos területén, az amigdalában.

Célkitűzések

Vizsgálataink a következő főbb területeket érintették:

I. A hippocampális noradrenalin felszabadulás gátló purinerg szabályozásának receptor szintű feltérképezése fiziológiai körülmények között. Vizsgálatainkban arra a kérdésre kerestük a választ, hogy a nukleotid érzékeny P2 receptorok aktivációja gátolja-e a noradrenalin (NA) felszabadulást az agyi katekolaminerg pályák hippocampális végződéseiből, és ha igen, milyen purinoreceptor altípusok közvetítik ezt a hatást.

II. A hippocampális noradrenalin felszabadulás purinerg szabályozásának kimutatása patológiás, ischémia-szerű körülmények között. Célkitűzésünk ebben az esetben az endogén ATP által közvetített moduláció kimutatása volt, P2Y és P2X receptorok lehetséges részvételével.

III. A P2X7 receptor szerepe az IL-1 β termelődés szabályozásában rágsáló hippocampusban in vivo gyulladásos modellben. A P2X7 receptorok részvételére a perifériás endotoxin stimulust követő centrális IL-1 β termelődésre vonatkozóan kerestünk bizonyítékot, a hatásmechanizmus vizsgálatok egy további megoldatlan kérdése pedig az volt, hogy alapvetően perifériás vagy centrális eredetű-e az IL-1 β produkció P2X7 receptor által szabályozott hánýada.

IV. P2X7 receptor génkiütés hatása a depresszióhoz köthető gének kifejeződésére teljes egér genom microarray alapú génexpressziós analízis segítségével. A legújabb kutatási irányvonalnak megfelelően a P2X7 receptor génkiütésnek a depresszióval kapcsolatba hozható gének, illetve a P2X7 receptor által regulált eddig megismert funkciókban szereplő inter és intracelluláris komponensek expressziós mintázatára gyakorolt hatását vizsgáltuk. A génexpressziós microarray analízissel a P2X7 receptor aktivitásával és a depresszió patomechanizmusával összefüggő új biológiai útvonalakat szerettünk volna azonosítani és feltárni.

Alkalmazott módszerek

A kísérletekhez hím Wistar patkányokat és 2-3 hónapos hím P2X7 receptor nullmutáns (-/-) transzgén egereket és vad típusú (wild type; WT) alomtársaikat használtuk fel. A homozigóta P2X7 receptor vad típusú (P2X7R+/+) törzs genetikai háttere a C57Bl/6J egértörzs.

In vitro [³H]noradrenalin felszabadulás mérése patkány hippocampusz szeletekből szövetperfüziós technika segítségével
A kísérleti állatok dekapitálását követően az agyat a koponyaüregből kiemeltük és jégáideg, karbogenizált Krebs's oldatban végeztük el a megfelelő agyterület, a hippocampusz kimetszését. A hippocampuszokat (megtisztítva a környező szövetből), 400 μ m vastag keresztirányú szeletekre (3-5 mg) vágtuk McIlwain típusú szövetseleletelével, melyeket ezt követően 1 ml módosított Krebs oldatban (összetétele mM-ban: NaCl 115, KCl 4.7, KH₂PO₄ 1.2,

MgSO₄ 1.2, CaCl₂ 2.5, NaHCO₃ 25, glükóz 10, aszkorbinsav 0.03, Na₂EDTA 0.1, pH 7.4) 1 ml 5 μ Ci/ml trícíált noradrenalin ([³H]NA) jelenlétében inkubáltuk 45 percig 37 °C-on.

IL-1 β citokin termelés mérése enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) technikával

6 órás intraperitoneális LPS kezelést követően gyűjtött patkány és eger hippokampusz minták homogenizátum felülúszói, valamint eger vérszérum minták interleukin-1 β (IL-1 β) tartalmát szilárd fázisú sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) technika segítségével határoztuk meg. Az R&D system patkány és eger specifikus ELISA DouSet IL-1 β kitjeit és a Quantikine Mouse IL-1 β /IL-1F2 kitet használtuk, a kísérletek kivitelezésénél a gyártó protokollját követtük.

Microarray alapú génexpresszió mérés

A génexpresszió microarray vizsgálatokhoz Agilent Whole Mouse Genome Oligo custom Microarray 4x44K (Agilent Technologies, Palo Alto, CA; egyedi azonosító: 16392) lemezeket használtunk, mely összesen 41,041 transzkriptum analizisére alkalmas egy hibridizáció során. Intraperitoneálisan kezeltük a C57Bl/6J és a P2X7 receptor null mutáns (-/-) egereket sóoldattal, illetve LPS-sel, majd az injekciózást követő 7. órában dekaptáltuk az állatokat és kiemeltük az amigdala régiót. Az RNS izolálást követően a minták reverz transzkripcióját és az array hibridizációját a Semmelweis Egyetem Genetikai-, Sejt- és Immunobiológiai Intézet Agilent Microarray Core Facility laboratóriumában végezték el (<http://www.dgci.sote.hu/microarray>). A műveletek során alkalmazott összes lépés a gyártó utasításainak megfelelően történt (Agilent Technologies). A leolvasás során nyert TIFF képeket a Feature Extraction software version 9.5 programmal tömörítették ki, majd a kapott adatokat az egyszínű oligonukleotid microarray formátumokra javasolt paraméterek alkalmazásával normalizálták. A további bioinformatikai valamint a statisztikai értékeléseket az Agilent GeneSpring GX 9.0. (Agilent Technologies) szoftver segítségével analizáltuk és végeztük el. A kiértékelés során a legalább kétszeres változást mutató géneket (up- vagy down-regulált) vetettük statisztikai analízis alá.

Gene Ontology elemzés

A Gene OntologyTM (GO) konzorcium adatbázisa a géntermékek jellemző elnevezéseinek (úgynevezett GO terminusok, osztályok) ellenőrzött rendszere, melyben tájékoztatást kaphatunk a génekről kifejeződő fehérjék molekuláris funkciójáról, valamint a különböző biológiai folyamatokban való részvételéről. Az egyes GO terminusok az mutatják meg, hogy az adott gének a microarray adatfeldolgozás során kapott génlistán belül milyen gyakorisággal fordulnak elő ahhoz a gyakorisághoz képest, amivel a teljes NCBI GenBank adatbázis által szolgáltatott adathalmazon belül előfordulnak.

TaqMan alapú real-time PCR módszer

A microarray analízis során kapott génexpressziós profilok eredményét 79 kiválasztott génnél TaqMan alapú real-time PCR módszerrel, TLDA kártyák (TaqMan Low Density Array) alkalmazásával erősítettük meg. A real-time PCR primerek kiválasztása a gyártó honlapján elérhető TaqMan inventoriéd primer adatbázisból történt a felhasznált Agilent Probe ID számok alapján. A real-time PCR ciklus paraméterei a következők voltak: 2 perc 50 °C-on, 10 perc 95°C-on, 40 cikluson át, 30 mp 97°C-on és 1 perc 59.7 °C-on.

Eredmények

I. A hippokampális noradrenalin felszabadulás preszinaptikus gátló purinerg szabályozásának vizsgálata és receptor szintű feltérképezése

1. A disszertáció első részében az eddig még kevésbé ismert preszinaptikus gátló purinerg szabályozást vizsgáltuk a hippokampális noradrenalin felszabadulásban. Elsőként azt teszteltük, hogy kísérleti modellünk alkalmas-e a neuronális [³H]NA felszabadulás tanulmányozására. Mivel az egymást követő két, alacsony frekvenciájú elektromos téringelés által kiváltott [³H]NA

kiáramlás hasonló mértékűnek adódott ($FRS2/FRS1=1.09\pm 0.03\%$) továbbá nagymértékben TTX-függő ($1-3\mu\text{M}$) volt, elmondható, hogy a [^3H]NA felszabadulás döntő hányada neuronális eredetű, és akciós potenciál-függő.

A noradrenerg végkészülékben a noradrenalin főként vezikulákban tárolódik. A Dale által ajánlott neurotranszmitter kritériumok egyike, hogy az idegvégződésben raktározott anyag fiziológias ideg ingerlésre felszabadul az extracelluláris térbe. Ennek klasszikus formája az ideg ingerléssel belépő Ca^{2+} ionok által kiváltott vezikuláris exocitózis. Kísérleteinkben 1 mM EGTA-val kiegészített Ca^{2+} mentes oldat perfúziója csaknem teljesen gátolta az elektromos ingerlés által kiváltott [^3H]NA felszabadulást ($FRS2/FRS1=0.047\pm 0.01\%$). A [^3H]NA kiáramlás döntő hányada tehát a konvencionális neurotranszmitterfelszabadulásra jellemző módon történik idegi aktivitás alatt.

2. Ezt követően P2 receptor agonisták hatását vizsgáltuk az elektromos téringerlés által kiváltott [^3H]NA felszabadulásra. A következő agonisták hatását teszteltük: a nem szelektív P2 receptor agonista ATP ($3\mu\text{M} - 1\text{ mM}$), ADP ($0.1- 3\mu\text{M}$), a szelektív P2Y receptor agonista 2MeSADP ($3-30\mu\text{M}$) és a szelektív P2Y1 receptor agonista MRS2365 ($0.1-100\text{nM}$), melyeket 18 perccel a második téringerlés előtt adtuk a perfúziós folyadékhoz. Mindegyik P2 receptor agonista koncentráció-függő módon csökkentette az elektromos téringerlés által kiváltott [^3H]NA felszabadulást. Az ATP esetében a maximális gátlás $\sim 43\%$ -nak adódott, melyet $300\mu\text{M}$ -os koncentrációjú ATP jelenlétében tapasztaltunk. Az ATP hatásának IC_{50} értéke $30\mu\text{M}$ - nak bizonyult. A dózis hatás görbék további elemzése alapján az agonisták hatás-erősség sorrendje a következő volt: $\text{MRS2365} \gg \text{ADP} > \text{2MeSADP} > \text{ATP}$, mely elsősorban a P2Y₁ receptorokra jellemző sorrend.

3. Kísérleteinket a P2Y receptor altípusok farmakológiai azonosításának irányában folytattuk: az ATP ($300\mu\text{M}$) által közvetített gátló hatást ($FRS2/FRS1=0.652\pm 0.025$) a [^3H]NA kiáramlásra megvizsgáltuk különböző antagonisták jelenlétében. Valamennyi vizsgált antagonistát, a nem szelektív P2 receptor

antagonista PPADS (30 μ M), a P2Y₁₂ és P2Y₁₃ receptor antagonistá 2MeSAMP (10 μ M) és a P2Y₁ receptor antagonistá MRS2179 (10 μ M) kivédte az ATP gátló hatását. Ezek közül az MRS2179 az alkalmazott koncentrációban P2Y₁ receptor szelektívnek tekinthető, továbbá ismert, hogy a P2Y₁ receptor aktiváció blokkolja a neuronális N-típusú Ca²⁺ csatornák működését, mely a vezikuláris NA felszabadulás gátlásához vezet. Míg a 2MeSAMP hasonló hatékonysággal antagonizálja a P2Y₁₂ és P2Y₁₃ receptorokat, addig a nem szelektív P2 receptor antagonistá PPADS P2Y₁ és P2Y₁₃ receptor preferenciával bír. Az elektromos téringerralés által kiváltott [³H] na felszabadulást gátló irányban moduláló receptorok farmakológiai profilja tehát a P2Y₁ és P2Y₁₃ receptorok farmakológiai fenotípusával mutatott hasonlóságot. A P2Y₁₂ receptorok részvétele az ATP gátló hatásának közvetítésében kevésbé valószínű, de teljesen nem zárható ki.

Érdekes módon agonista nélkül adva egyik P2Y receptor antagonistá sem volt önmagában hatással az elektromos téringerralés által kiváltott [³H]NA felszabadulásra. Ez az eredmény azt mutatja, hogy a mi kísérleti körülményeink között, endogén ATP hiányában, mely csak magas frekvenciájú elektromos téringerralésre szabadul fel a hippocampusban, a P2Y receptorok feltételezhetően nem aktiválódnak. Ismert, hogy a hippocampusban magas ektoATPáz aktivitás is jellemző, mely az ATP gyors extracelluláris lebontását eredményezi. Mindezek alapján erősen kétséges, hogy az általunk is alkalmazott fiziológias idegi aktivitást modellező alacsony frekvenciájú elektromos téringerralés olyan mennyiségű ATP-t szabadítana fel, amely a jelen lévő gyors lebontó enzimrendszert túlélve aktiválni tudná a noradrenalin felszabadulást gátló P2Y receptorokat. Ugyanakkor korábbi munkákból ismert, hogy olyan patológias állapotokban, mint az in vitro és in vivo ischémia-szerű körülmények, az ATP már nagyobb mennyiségben szabadul fel a hippocampusból, amely akár elegendő lehet a noradrenalin kiáramlás gátló szabályozásában résztvevő P2Y receptorok aktiválásához is.

II. Kombinált oxigén és glükózmegvonás hatása a [³H]noradrenalin felszabadulásra patkány hippocampusz szeletekben

1. Az ischémiával szemben megkülönböztetett érzékenységet mutató patkány hippocampusz szeletekben in vitro ischémia-szerű körülmények (30 perces kombinált oxigén és glükózmegvonás, OGD) hatására a [³H]NA felszabadulás késleltetetten, de igen jelentős mértékben megemelkedett ($8.32 \pm 1.97\%$) majd 30 perc múltán tért vissza az alapvonalra, vagyis hatása reverzibilis volt. A [³H]NA felszabadulás mechanizmusát feltáró kísérleteinkben az előperfúzió kezdetétől Ca^{2+} -mentes ($[\text{Ca}^{2+}]_o$) módosított Krebs oldatot használtunk, ez további robusztus emelkedést ($20.03 \pm 0.09\%$) váltott ki a transzmitter kiáramlásban. Ezzel szemben, a feszültségfüggő Na^+ csatornák reverzibilis gátlószere, a tetrodotoxin ($1 \mu\text{M}$) csaknem teljesen gátolta ($2.11 \pm 2.45\%$) a kombinált oxigén és glükózmegvonással kiváltott [³H]noradrenalin felszabadulást. Ezen eredmények alapján elmondható, hogy a 30 perces OGD a patkány hippocampuszban túlnyomórészt a feszültségfüggő Na^+ csatornák aktivációja, azaz az axonális depolarizáció révén váltotta ki a [³H]NA kiáramlást, amely azonban nem vezikuláris, hanem citoplazmatikus raktárakból szabadult fel, externális Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_o$) -független módon. Megfigyeléseinket korábbi vizsgálatok eredményei is alátámasztják, melyek in vitro ischémia szerű körülmények között a gerincvelő és hippocampusz szeletekben mutattak ki a citoplazmatikus raktárakból, TTX-függő noradrenalin felszabadulást. A kombinált oxigén és glükózmegvonással kiváltott robusztus noradrenalin felszabadulást, a Na^+K^+ pumpa elégtelen ellátottsága miatt intracellulárisan akkumulálódó Na^+ váltja ki, a Na^+ függő transzporter megfordulása révén.

2. Ezt követően a P2 receptorok hatásközvetítő szerepét vizsgáltuk az ischémia szerű körülmények által kiváltott [³H]NA felszabadulásban. A szelektív P2Y₁ receptor antagonistá MRS2179 ($10 \mu\text{M}$) szignifikánsan fokozta ($18.19 \pm 1.05\%$, vs. ischémiás kontroll $8.32 \pm 1.97\%$) az ischémia által kiváltott [³H]NA felszabadulást, mely a P2Y₁ receptor patológiás aktivációjára utal. A

nem szelektív P2 receptor antagonistá PPADS (30 μ M) nem volt szignifikáns hatással az ischémiás stimulussal kiváltott [³H]noradrenalin felszabadulásra, melyet azzal magyaráztunk, hogy egy másik PPADS-érzékeny receptor hatása állhat a háttérben, amely ellenkező irányban modulálja az ischémia-által kiváltott [³H]NA kiáramlást. Mivel ismert, hogy a P2X1 és P2X3 receptor aktiváció fokozza a hippokampális noradrenalin felszabadulást, feltételezésünk szerint az ischémia által kiváltott endogén ATP P2X1 és P2X3 receptorokat aktiválva járul hozzá az ischémia által kiváltott [³H]NA kiáramláshoz. A P2X1 és P2X3 receptorok közvetítte serkentő és a P2Y₁ receptor közvetítte gátló hatás tehát ellentétes szabályozás formájában jelenik meg egyidejűleg az ischémia szerű körülmények között, mely összességében a PPADS antagonistá hatástalanságát eredményezi. Elméletünket alátámasztandó, megvizsgáltuk a feltételezett P2X receptor-mediált serkentő szabályozást is az ischémia szerű körülmények között. A PPADS (100 μ M), a szelektív P2X1 receptor antagonistá jelenlétében valóban szignifikáns csökkenést tapasztaltunk a [³H]NA felszabadulásban, mely igazolja a serkentő hatású P2X1 receptor részvételét (PPADS 0.74 \pm 0.711%, n=8 vs. ischémiás kontroll 8.32 \pm 1.97%, 90%-os gátló hatás). Ezzel szemben, a 2MeSAMP (10 μ M), a P2Y_{12/13} receptor antagonistá nem változtatta meg a [³H]NA kiáramlás mértékét (8.20 \pm 0.711%) azaz a noradrenalin felszabadulás gátló modulációjában ischémia szerű körülmények között ezen P2Y receptor altípusok nem vesznek részt.

III. A P2X7 receptor aktivációjának vizsgálata az Interleukin-1 β termelődés szabályozásában rágsáló hippokampuszban in vivo gyulladáso modellben

1. Patkány kísérleteinkben beállítottunk egy in vivo gyulladáso modellt. A szisztémás LPS kezelés hatására jelentős, dózis- (300-500 μ g/kg) és időfüggő (2-6 óra) emelkedést mutattunk ki a hippokampális IL-1 β termelődésben (6 óra bazális IL-1 β : 70.32. \pm 5.92 pg/ml; LPS: 300 μ g/kg: 227.6 \pm 14.4 pg/ml, 500 μ g/kg: 332.9 \pm 35.2 pg/ml, n=4), mely megfelel az irodalmi adatoknak.

2. Ismert, hogy a vér-agy gát védelmi rendszere számos esetben sérülhet, így bakteriális-fertőzésekben is, ezáltal nő az átteresztőképessége, amelyhez a periférián felszabaduló citokinek is nagy mértékben hozzájárulnak. Ezek alapján feltételezhető, hogy a perifériás LPS kezelésnek egyszerre lehet direkt (a központi idegrendszerben kifejtett) és indirekt (a periférián indukált) hatása a hippokampális IL-1 β termelődés szabályozására. Az azonban, hogy a hippokampuszban ilyenkor megjelenő IL-1 β produkció milyen mértékben perifériás és lokális eredetű, korábban nem volt ismert. Erre a kérdésre kerestünk választ azáltal, hogy megvizsgáltuk, hogy az IL-1 β produkció a szérumban a P2X7 receptorok regulációja alatt áll-e, illetve, hogy az agy vértelenítésével (transzkardiális perfúzió) felfüggeszthető-e a hippokampális IL-1 β produkció P2X7 receptor mediált komponense. A vérszérumban, hasonlóan korábbi megfigyelésekhez, intenzív IL-1 β emelkedést mutattunk ki a 6 órás LPS hatására és az itt mért pg/ml-ben kifejezett koncentráció értékek nagyságrendben hasonlóknak adódtak, mint amit a hippokampusz kísérleteinkben kaptunk (307.6 \pm 36.1 pg/ml vs. só kezelés: 19.2 \pm 9.6 pg/ml). A transzkardiális perfúzióval az agyat vértelenítettük a dekapitálást megelőzően, így zártuk ki a vérkeringéssel a hippokampuszba jutó véréjtek és humorális faktorok jelenlétét. Noha a 6 órás peritoneális LPS injekció ebben az esetben is szignifikáns emelkedést váltott ki a hippokampális IL-1 β szintben, de jóval alacsonyabb koncentráció értékeket mutattunk ki (LPS: 24.3 \pm 0.3 pg/ml). Ez a jelentős mennyiségi különbség a nyugalmi IL-1 β produkcióban is megmutatkozott (11.9 \pm 0.9 pg/ml). Eredményeink tükrében úgy tűnik, hogy mind nyugalomban, mind a szisztémás LPS kezelést követően a perifériás eredetű IL-1 β produkció a meghatározó a hippokampális citokin szint emelkedésében.

3. Az általunk elvégzett kísérletek elsődleges célja volt, hogy a P2X7 receptorok közvetítő szerepét tárjuk fel a hippokampális IL-1 β termelődésben in vivo modellekben. Mivel faji különbségek is lehetnek a P2X7 receptor mediált szabályozásban célszerűnek tűnt patkány és egér csoportokon is elvégezni ezeket a vizsgálatokat. A farmakológiai profilt többféle, szelektív és nem P2X7 receptor

szelektív antagonistá bevonásával határoztuk meg: teszteltük a nem altípus-specifikus P2 receptor antagonistá, a PPADS (25mg/kg) hatását majd a kandidáns P2X7 receptorra szelektivitást mutató antagonisták következtek, a BBG (100 mg/kg) és az oATP (0.9 mg/kg). Patkány hippocampusban mindhárom antagonistá, a PPADS, a BBG és az oATP jelenléte is erőteljesen csökkentette aaz LPS által indukált IL-1 β termelődést (PPADS+LPS: 169.61 \pm 5.92%; oATP+LPS: 124.9 \pm 93.37%; BBG+LPS: 58.84 \pm 12.85% vs. LPS: 327.34 \pm 10.91%, a só kezelés százalékában kifejezve). Hasonló gátló hatást tapasztaltunk vad típusú egér hippocampusában is a gyulladáshos stimulust követően (oATP+LPS: 75.14 \pm 10.91%; BBG+LPS: 28.14 \pm 11.11% vs. LPS: 395.52 \pm 13.10%).

4. Patkány kísérleteinkben a receptor azonosításhoz szükséges agonista hatásokat P2X7 receptorra érzékeny koncentrációtartományban vizsgáltuk, az endogén ligand ATP (9 mg/kg), és a kb. tízszer potensebb BzATP (6.4 mg/kg) bevonásával. Az ATP jelenlétében tapasztalt hatás a kezelési idő függvényében változott. Amikor az endotoxin kezelést követően 4 órával adtuk az ATP-t, intenzív emelkedést tapasztaltunk az IL-1 β produkcióban, ahogy azt mások is megfigyelték mikroglia sejteken és makrofágokon (ATP+LPS: 185.71 \pm 14.70% vs. LPS kezelés 151.11 \pm 1.61% a só kezelés százalékában kifejezve). Ezzel szemben, amikor hosszabb kezelési időt alkalmaztunk, azaz az agonista i.p. injekciózása megelőzte az LPS kezelést, az ATP és a BzATP egyaránt jelentősen csökkentette a gyulladáshos IL-1 β termelődés mértékét. Feltételezésünk szerint a P2 receptor agonistáknál tapasztalt gátló hatást az ATP metabolikus terméke, az adozin közvetítte, mivel az ATP és származékai életideje rövid az extracelluláris térben, és az idegvégződésben jelenlevő ektoenzimek az ATP-t a P2 receptorokon inaktív AMP-vé és adozinná hidrolizálják. Ismert korábbi tanulmányokból, hogy az A1 adozin receptorok gátló hatást közvetítenek a perifériás idegrendszerben, de munkánkat megelőzően az A1 adozin receptorok szerepét a centrális citokin termelés szabályozásában még nem vizsgálták. Patkány kísérleteinkben a szelektív A1 adozin receptor antagonistá, DPCPX (10mg/kg) kivédte az ATP gátló hatását, mely

igazolja felvetésünket ezen receptorok hatásközvetítő szerepét illetően (ATP+DPCPX+LPS: $140.59 \pm 11.11\%$ vs. ATP+LPS: $76.33 \pm 7.29\%$ a só kezelés százalékában kifejezve).

5. Természetesen, a P2X7 receptorok hatásközvetítő szerepéről a legmeggyőzőbb bizonyítékot a P2X7 receptor null mutáns egerek vizsgálata jelentette: a szisztémás bakteriális endotoxin indukálta IL-1 β termelés szignifikáns mértékben alacsonyabb volt ezeknek az egereknek a hippocampusában, mint vad típusú társaik esetében (LPS 320.4 ± 51.3 pg/ml a vad típusú egér esetében vs. 215.5 ± 16.1 pg/ml a P2rx7 $^{-/-}$ egér esetében). A P2X7 receptor antagonisták gátló hatása kimutatható volt, de kisebb mértékben, egyúttal azt is bizonyítva, hogy jelenlétükben tapasztalt gátló hatást a P2X7 receptorok specifikus gátlása eredményezte. Eredményeinket alátámasztják olyan korábbi adatok, amelyek az i.p. LPS által kiváltott hipotalamikus IL-1 β mRNS expresszióban mutattak ki, szignifikánsan kisebb mértékű emelkedést a P2X7 génkiütött egerek esetében vad típusú társaikhoz képest. P2X7 receptor null mutáns egér vérszérum analízisünk hasonló csökkent IL-1 β választ mutatott ki a szisztémás LPS kezelésnél (307.6 ± 36.1 pg/ml vs. só kezelés 19.2 ± 9.6 pg/ml vad egér, 136.99 ± 39.54 pg/ml vs. só kezelés 27.47 ± 3.86 pg/ml P2rx7 $^{-/-}$ egér esetében), míg a transzkardiális perfúziót követően nem volt lényegi különbség a P2X7 receptor génkiütött egér hippocampus és vad típusú társaik hippocampusában mért citokin termelés között. Az LPS kezelést kísérő, megemelkedett perifériás IL-1 β produkcióban a P2X7 receptor aktiváció szerepét már korábban leírták, és a fenti, saját eredményeink tükrében is a perifériás eredetű szabályozás tűnik a legvalószínűbbnek: az LPS injekciót kísérő centrális citokin produkcióban a perifériás makrofág, leukocita és egyéb vesejteken kifejeződő P2X7 receptorok részvétele a meghatározó. Ezt számos korábbi megfigyelés is alátámasztja, melyek a perifériás immunsejtek P2X7 receptor függő IL-1 β termeléséről számolnak be.

IV. A P2X7 receptor génkiütés hatása a depresszióhoz köthető gének kifejeződésére teljes egér genom microarray alapú génexpressziós analízis segítségével

Funkcionális genomikai vizsgálataink során egér modellrendszerben vizsgáltuk a P2X7 receptor génkiütést kísérő génexpressziós változásokat a limbikus rendszer egyik fontos területén, az amigdalaiban. E célból amigdala minták teljes egér genom génexpressziós mintázatát elemeztük 6 órával perifériás LPS kezelést (250 µg/kg i.p.) követően.

1. A P2X7 receptor génkiütés rendkívül nagyszámú gén esetében eredményezett a klasszikus microarray adatelemző módszerekkel értékelve statisztikailag szignifikánsan eltérő expressziót a kontrollnak tekintett vad típusú csoporthoz képest. Minegy 8165 transzkriptum esetében mutattunk ki, a P2X7 receptor deficienciával összefüggő minimum kétszeres expressziós változást. Ez az eredmény már önmagában is rendkívül érdekesnek tűnt, de a P2X7 receptor génkiütést kísérő génexpressziós változások mélyebb, átfogóbb megértésének céljából GO elemzést is végeztünk el a kapott microarray adathalmazon.

2. A GO analízis világosan kimutatta a szinaptikus transzmisszióhoz, iontranszportoz, az intracelluláris jelátviteli hálózathoz, a G-fehérje kapcsolt receptor jelátviteli útvonalhoz, az ATP szintézis kapcsolt proton transzportoz, illetve a transzkripció szabályozáshoz kapcsolódó géncsaládok elemeinek erőteljes feldúsulását. Ezen eredmények alapján állítottuk össze azt a depresszióra biológiai plauzibilitást tükröző génlistát, amelyet a további TaqMan alapú real-time PCR analízisnél is vizsgáltunk.

3. Több mint, 60, a P2X7 receptor génkiütés hatására szignifikánsan megváltozó expressziót mutató gén vonatkozásában végeztük el a minta és a kezelés validálást. Real-time PCR eredményeink többekévé jó korreláltak a microarray adatokkal, 29 olyan gént validáltunk, melyek a szinaptikus jelátvitel, a neuroplaszticitás és a depresszió patomechanizmusával hozhatóak összefüggésbe. A P2X7 receptor deficiens egércsoportban alulexpresszált gének közül

kimutattunk ionotróp glutamát receptorok alegységeket (AMPA2, AMPA4), egy metabotróp glutamát receptort (Grm7), valamint a gliális neurotrofikus faktort (GDNF) kódoló géneket, melyek jól korrelálnak a napjainkban a depresszió patomechanizmusát a megnövekedett glutamáterg neurotranszmisszióval és szinaptikus plaszticitással magyarázó elméletekkel. Ezzel ellentétes irányultságú, túlexpressziós változást azonosítottunk az NMDA típusú ionotróp glutamát receptor NR2B alegységét kódoló gén (Grin2b) esetében. A GABA_A receptor alegysegeket kódoló gének között egyaránt találtunk alul-, és felülexpresszált géneket is (Gabrb2, Gabrb3, Gabrg2, Gabrg3 gének expressziója csökkent, akárcsak a GABA szintetizáló enzim, a GAD expressziója, míg a GABAC egyik alegységét kódoló gén, a Gabrr1 emelkedett expressziót mutatott). Ezek az eredmények a P2X7 receptor szabályozó szerepére utalnak a glutamát és GABA receptorok expressziójának vonatkozásában.

4. A perifériás bakteriális endotoxin kezelést követő génexpressziós változások nagyságrendben messze elmaradtak a P2X7 receptor génkiütést kísérő változásoktól. Ez részben annak tudható be, hogy hat órával a viszonylag alacsony dózisban alkalmazott LPS kezelés csak a gyulladásos és immunválaszhoz, valamint a citokin és kemokin funkciókhoz kapcsolódó gének expresszióját volt képes nagymértékben indukálni. Amigdala mintáinkban az LPS kezelést követően a megváltozott expressziót mutató transzkriptumok közül mintegy 287 esetben azonosítottunk kizárólag az endotoxin kezeléssel összefüggő legalább kétszeres, szignifikáns expresszió növekedést. Eredményeink jól korrelálnak olyan korábbi adatokkal, amelyek hasonló szisztémás endotoxin kezelést követően azonosították a gyulladásos immunválasz jellegzetes kemokin és citokin profiljait, a megnövekedett humorális immunválaszhoz és fagocitózishoz köthető szignálmolekulák fokozott expresszióját.

Következtetések

I./1 A hippocampális noradrenalin felszabadulás preszinaptikus purinerg szabályozásában gátló hatást közvetítő P2Y receptorok részvételét mutattuk ki.

I./2. Az elektromos téringerléssel kiváltott noradrenalin felszabadulás konvencionális, vezikuláris transzmitterfelszabadulásra jellemző, Ca^{2+} függő módon ment végbe. Idegi aktivitás alatt, az ingerléssel kiváltott noradrenalin kiáramlás a P2Y receptor agonisták jelenlétében csökkent. A hatásközvetítő receptorok agonista érzékenysége / antagonistá profilja a P2Y₁ és P2Y₁₃ receptorok farmakológiai fenotípusának felelnek meg. A preszinaptikus P2X és P2Y receptorok fiziológiás körülmények között tehát kettős, ellentétes hatás közvetítésével vesznek részt a neurotranszmitter szabályozásában.

II. Az ischémia in vitro modelljében, a kombinált oxigén és glükózmegvonás alkalmazása jelentős növekedést idézett elő a hippocampális noradrenalin felszabadulásban. A 30 perces ischémia szerű stimulussal kiváltott noradrenalin externális Ca^{2+} -független módon szabadult fel. A citoplazmatikus raktárakból kiáramló nagy mennyiségű, többlet noradrenalin két irányban volt modulálható purin ligandokkal. A farmakológiai profil alapján a gátló hatás a P2Y₁ receptorokon közvetítődik, míg a serkentő hatásért a P2X1 receptorok felelősek. A hippocampális noradrenalin felszabadulás tehát fiziológiás (alacsony frekvenciájú elektromos téringerlés) és patológias körülmények (kombinált oxigén és glükózmegvonás) között egyaránt P2 purin receptor mediált kettős szabályozás alatt áll.

III./1. A P2X7 receptor patológias aktivációja nem csak a perifériás, hanem a centrális IL-1 β termelés szabályozásában is részt vesz. A szisztémás endotoxin stimulációt követően P2X7 receptor függő módon emelkedett a hippocampális IL-1 β produkció. Az A₁ adenosin receptorok gátló hatás közvetítésével neuroprotektív szerepet tölthetnek be.

III./2. Transzkardiális perfúziót követően, a szisztémás LPS kezelés emelte ugyan a hippocampális IL-1 β szinteket, de az emelkedés

mértéke abszolút értékben lényegesen kevesebb volt, akárcsak a nyugalmi citokin szintek esetében. Eredményeink azt mutatják, hogy a hippokampusban a nyugalmi és gyulladásoz IL-1 β produkció is nagyobb részben perifériás eredetű. Transzkardiális perfúziót követően sem a bazális, sem az LPS kiváltott IL-1 β produkció nem mutatott függést a P2X7 receptorok jelenlététől.

A P2X7 receptorok hatásközvetítő szerepe tehát igazolódott a hippokampális nyugalmi és gyulladásoz IL-1 β produkció szabályozásában, de ezen receptorok nagyrészt nem a központi idegrendszerben, hanem a periférián fejtik ki hatásukat, feltehetően a vér sejtes elemein vagy az immunkompetens sejteken találhatóak.

IV./1. Mintegy 8165 transzkriptum esetében mutattunk ki, a P2X7 receptor deficienciával összefüggő minimum kétszeres mRNS expressziós változást egér amigdalában.

IV./2. A P2X7 receptor deficiens egércsoportban alulexpresszált gének közül validáltuk az ionotróp glutamát receptorok alegységeket (AMPA2, AMPA4), illetve metabotróp glutamát receptort (Grm7) kódoló géneket, melyek jól korrelálnak a napjainkban a depresszió patomechanizmusát a megnövekedett glutamáterg neurotranszmisszióval és szinaptikus plaszticitással magyarázó elméletekkel. Ezeket az eredményeket alátámasztják olyan korábbi vizsgálatok, amelyek az idegvégződésekből és asztrocita sejtekből fokozott glutamát és azt követő GABA felszabadulásról számolnak be P2X7 receptor aktivációt követően. Mindezeket és egyéb itt nem bemutatott eredményeinket is figyelembe véve, feltételezésünk szerint a P2X7 receptor aktiváció túlműködése részt vehet a depresszív kórképek hátterében álló patomechanizmusok kialakulásában, P2X7 receptor hiányában ugyanakkor olyan kompenzatórikus mechanizmusok lépnek életbe, melyek már mRNS szintén érintik a különböző glutamát és GABA receptor altípusok expresszióját.

Saját publikációk jegyzéke

Az értekezés témájában megjelent publikációk

1. Csölle C., Heinrich A, Kittel A, Sperlagh B.: P2Y receptor mediated inhibitory modulation of noradrenaline release in response to electrical field stimulation and ischemic conditions in superfused rat hippocampus slices. (2008) J Neurochemistry.: 106:(1) 347-360, IF: 4.500

2. Csölle C., Sperlág B.: Peripheral origin of IL-1beta production in the rodent hippocampus under in vivo systemic bacterial lipopolysaccharide (LPS) challenge and its regulation by P2X(7) receptors. (2010) J Neuroimmunology: 219(1-2):38-46., IF:3.159

3. Csölle C., Andó RD., Kittel Á., Gölöncsér F., Baranyi M., Soproni K., Zelena D., Haller J., Németh T., Mócsai A., Sperlág B. (2013): The absence of P2X7 receptors (P2rx7) on non-haematopoietic cells leads to selective alteration in mood-related behaviour with dysregulated gene expression and stress reactivity in mice. Int J Neuropsychopharmacol.: 16(1):213-33, IF:4.578

Egyéb publikációk

1. Sperlág B, Heinrich A, Csölle C.: P2 receptor-mediated modulation of neurotransmitter release--an update. (2007) Purinergic Signaling: 3: 269-284

2. Heinrich A, Kittel A, Csölle C., Vizi ES, Sperlagh B.: Modulation of neurotransmitter release by P2X and P2Y receptors in the rat spinal cord (2008) Neuropharmacology: 54:(2) 375-386 , IF: 3.383

3. Csölle C., Sperlág B.: Endocannabinergic modulation of IL-1 β level/production in mouse hippocampus under basal

conditions and after in vivo systemic LPS stimulation. (2011) Neuroimmunomodulation: (4), 226-231, IF: 2.383

4. Hracskó Zs, Baranyi M, Csölle C, Gölöncsér F, Madarász E, Kittel Á and Sperlág B.: Lack of neuroprotection in the absence of P2X7 receptors in toxin-induced animal models of Parkinson's disease (2011) Mol. Neurodegener.:6: 28: IF: 5.09

5. Andó RD., Bíró J, Csölle C., Ledent C., Sperlág B.: The inhibitory action of exo- and endocannabinoids on [3H]GABA release are mediated by both CB1 and CB2 receptors in the mouse hippocampus. (2011) Neurochem Int.: 60(2):145-52 Volume , IF: 2.857

6. Sperlág B, Csölle C, Ando RD, Goloncser F, Kittel A, Baranyi M. The role of purinergic signaling in depressive disorders. (2012) Neuropsychopharmacol Hung.: (4):231-8.