

Zárójelentés

„Extracelluláris szignálok vizsgálata az axonnövekedésre ép és kóros körülmények között *in vitro* és *in vivo* gerinctelen modellekben” című OTKA PD75276 pályázat
(2009-2011)

Vezető kutató: Dr. Serfőző Zoltán

A kutatómunka előrehaladása, eredményessége általában

A pályázat első évében történt eszköz-beruházás lehetővé tette egy önálló laboratórium létrehozását, ahol a preparatív munkától a tömeg és térfogatmérésen át az oldatkészítésig és szövetelőkészítési (feltárás, tárolás) munkákig bezáróan a szövettani-biokémiai-molekuláris biológiai módszerek alapozó munkálatai végrehajthatók. A pályázati tervben szereplő regenerációs modellek közül a tapogató-regenerációs modellt használtuk, mely a lehetőségeknek a leginkább megfelelt. A kísérleti munkát az állatok aktív időszakában (május-szeptember) tudtuk eredményesen végezni, mert az ezen időszakon kívüli periódusban az állatok biológiai órája a laboratóriumi körülmények ellenére (megfelelő hőmérséklet, fény, páratartalom, táplálás) megakadályozta a kísérletek végigvitelét (15 hét): a hibernációs periódusban kapott eredmények nem bizonyultak konzekvensnek. A kutatómunka a pályázati tervnek megfelelően két részre oszlott, mely időben elkülönült egymástól. A központi idegrendszer extracelluláris mátrix komponenseinek hisztokémiai és molekuláris vizsgálatát a kísérletes munkához képest kevésbé zavarta az állatok éves ciklusa, ezért ezt a kutatási részt a pályázat első évében, illetve az őszi-téli időszakokban végeztük. Két faj példáján leírtuk a szárazföldi és vízi élettérben élő csigák központi idegrendszerének extracelluláris terének mátrix molekuláit, kimutattuk, hogy a dúcok anatómiailag elkülönülő mátrixainak eltérő a molekuláris összetétele, utaltunk a mátrix gangliogenezis idején betöltött szerepére, és értelmeztük a központi idegrendszer burkának mátrix összetételét tekintettel az állatok élőhelyének abiotikus tényezőire. A kapott eredmények megalapozzák azokat a vizsgálatokat, melyben a mátrix összetétel axon növekedést befolyásoló hatásait kívánunk vizsgálni. Ebből a témából két SCI közleményt és egy könyvfejezetet jelentettünk meg. A másik pályázati cél a nitrogén-monoxid (NO) és az általa indukált jelátviteli folyamatok szerepének vizsgálata volt a regenerálódó tapogatóban. A szezonalitáson túl a nehézséget a NO szintáz (NOS) aktivitásának mérése jelentette. Az arginin-citrullin átalakuláson alapuló izotópos mérési módszer a jelentős argináz (szubsztrát-kompetítor) aktivitás miatt nem bizonyult alkalmasnak. Az oxidatív metabolitok (NOx) visszamérése még érzékenyített módszerrel is csak a méréshatár körüli értékeket kaptunk kolorimetriás detektálás esetén. Csak abban az esetben volt értékelhető az eredmény, ha teljes redukció után NO gáz analízátorral történt a mérés. A kísérleti eredmények alapján kijelenthető, hogy a NO-cGMP-PKG jelkaszád szerepet játszik a tapogató regenerációjában, különösen a késői időszakban, az idegsejt-idegsejt kapcsolatok kialakulása idején. Kimutattuk, hogy a regeneráció során fentitől eltérő úton NO-indukálta nitroziláció is történik, és több fehérje foszforiláltsága változik mind a sérült, mind pedig az ép tapogatóban. A témából egy SCI közlemény, egy konferencia előadás és három poszter készült. Jelenleg a foszforilált és nitrozilált fehérjék azonosítása folyik, melyek befejeztével két SCI közlemény megjelentetése várható. A pályázati támogatás lehetővé tette még egy korábbi, NO idegrendszeri szerepével kapcsolatos munka befejezését (Serfőző et al., 2009. *Neuroendocrinology*, 89:337-50), és a pályázat témájával szorosan összefüggő NO-indukált jelátvitel szerepének kutatását a tapogató központi projekcióiban, melyet egy doktorandusz hallgató közreműködésével vizsgálunk 2010 szeptembere óta. A pályázat eredményei és tervei alapján 2011-ben Bolyai János kutatói ösztöndíjat nyertem. Összességében a pályázat célkitűzéseiből többet sikerült megvalósítani, ugyanakkor az értékelés teljesebbé tételéhez a

közeljövőben várható két közlemény megjelenítése jelentősen hozzájárulna. Gyermekem születése (2010) miatt is a pályázat megvalósítása időben csúszott. Ezért a szabályzat értelmében élni kívánnék azzal a lehetőséggel, hogy az értékelés kiegészíthető legyen a várható publikációk ismeretében. Mindazonáltal az OTKA pályázat kiemelkedő segítséget adott tudományos elképzeléseim megvalósításához és több évre előremutatva meghatározza azt az irányt, amelyet szeretnék a jövőben még teljesebben kibontakoztatni.

A kutatómunka részletes eredményei:

1. Klasszikus hisztokémiai és ritkábban alkalmazott differenciál festési eljárások segítségével jellemeztük a központi idegrendszer (CNS) redox és sav-bázis sajátosságait és utaltunk az extracelluláris mátrix (ECM) molekuláris összetételére. Egy új eljárást dolgoztunk ki a neuronok közötti terek és glia sejtek megjelenítésére. Ennek lényege, hogy a szövetszövetet toluidin-kékkel pH 4.0-n megfestve a mintát ex546/em580 nm megvilágítással a neuronokon kívüli terület intenzív vörös autofluoreszcenciája jelentkezik. A dúcok sejttestjei közötti tér gazdag semleges szénhidrát oldalláncokat tartalmazó fehérjékben (PAS festés). A neuropilben csak szárazföldi életmódú állatokban találtunk negatív töltésű (savas) molekulákat (alcian-kék, akridin narancs festések) mely feltehetően a neuropil víztartalmának megőrzését szolgálja észtváció vagy hibernáció alatt. A vízben élő csigák CNS neuropiljében az ECM komponensek szegényesek és csak a késői posztembrionális fejlődés során jelennek meg. Bázikus festékek (azúr A) és lektin próbák (burgonya lektin) alkalmazásával SDS-PAGE-n igazoltuk, hogy a hisztokémiában kapott savas karakterű fehérjék szénhidrát oldalláncokat hordozó glikoproteinek. Munkánk először írta le a csiga idegrendszer ECM kémiai jellemzőit, hasznos adatokat szolgáltatva az idegsejtek környezetének molekuláris továbbvizsgálatára.

(Micron, 2010. 41:461-471)

2. A CNS-t körbevevő kötőszövetes burok (periganglionális kötőszövetes hüvely, PGKH) jelentős szerepet játszik az idegsejtek homeosztázisában. Hisztokémiai festékek és lektin próbák segítségével szövetszöveten és SDS-PAGE szeparált homogenizátumban vizsgáltuk a PGKH molekuláris összetételét. Megállapítottuk, hogy a PGKH idegsejtek felőli oldala (lamina basalis) egy savanyú szénhidrát oldalláncokkal impregnált retikuláris rostköteg. A PGKH belsejében kollagén váz van, amely között diffúzan PAS pozitív anyag (mucin) és heterogén eloszlásban erősen oxidatív (argentaaffin) elemek helyezkednek. A rostok között erősen savas molekulák jelenlétére utaló alcian-kék, akridin narancs festések adtak jelet. A PGKH mind N-acetil-glükózamint (GlcNAC), mind N-acetil-galaktózamint (GalNAc) gazdagon tartalmazó terület. A szárazföldi állatoknál a molekula gazdagság kisebb, mint a vízieknél, de az egyes molekulák mennyisége jelentősen többnek bizonyult. Az előforduló szénhidrát oldalláncok végét szárazföldieknél galanin, míg vízieknél GalNAc zárja. Az összetételbeli különbség a két, eltérő fiziko-kémiai adottságokkal rendelkező környezetben élő állat PGKH-ben talált különbségek az eltérő vízigény és ebből fakadó vízmegtartási stratégiák megjelenésével magyarázható.

(Gastropods: Diversity, Habitats, Genetics, Nova Science Publ. 2011. Ch. 6)

3. Lektin-jelölt glükózamino-glikán (GAG) molekulákat és glikozilált fehérjéket mutattunk ki egy szárazföldi (*Helix pomatia*) és egy vízi (*Lymnaea stagnalis*) felnőtt és fejlődő csiga központi idegrendszerének (CNS) extracelluláris mátrix tereiben hisztokémiai és fehérje

elválasztási (SDS-PAGE, blott) módszerekkel. Megállapítottuk, hogy szemben az emlősökkel, a csiga idegrendszerben az N-acetil-glukózámin (GlcNAc) tartalmú glikozilált fehérjék előfordulása dominál az N-acetil-galaktózámin (GalNAc) tartalmazókkal szemben. Öt GlcNAc oligomerekkel intenzíven glikozilált nagy molekulatömegű fehérjét mutattunk ki, mely az idegsejtek környezetében nagymennyiségben előfordul. A vizsgált fajok esetén a glikozilált fehérjék összetételében a neuropilben találtunk jelentős különbséget, mely eltérő plasztikusságra, vagy homeosztatiszikus potenciálra utalhat. GalNAc oligomereket a periganglionális kötőszövetben és a CNS-kötőszövet határát képező lamina basalisban találtunk. Leírtuk azokat a GAG molekulákat, amelyek az idegrendszer fejlődése során átmenetileg vannak jelen, illetve azokat, melyek a fejlődéssel párhuzamosan változnak. Eredményeinkkel a CNS szerveződésében és regenerációjában szerepet játszó adhéziós molekulák meghatározásához és jellemzéséhez szolgáltattunk alapot.

(Brain Structure and Function, 2009. 214:67-78)

4. A tentaculum afferens kapcsolataiban (procerebrum) fény és elektronmikroszkópos hisztokémiai és immunhisztokémiai módszerrel, valamint specifikus gyökfogó (DAF-2DA) molekula segítségével azonosítottuk a NO szintáz (NOS) tartalmú elemeket. A NOS jelenlétét Western és dot blott specificitási kísérletekben egyértelműen és elsőként azonosítottuk csiga CNS-ben. A NOS immunreaktív és NO-t felszabadító sejtek a procerebrum globulus sejtjeinek 60%-ában volt kimutatható, közülük 84%-ban a kis méretű, nem tüzelő, és 16%-ban a nagy méretű, tüzelő sejtekben. A globulus sejtek intrinsic terminálisai a mediális neuropilban található, mely terület intenzíven jelölődött NOS-ra. Ultrastrukturálisan a NOS-t NADPH-diaforáz reakcióval jelenítettük meg, mely hisztokémiai termékét fénymikroszkópos szinten azonosítottuk a NOS-immunreaktív elemekkel. Az endoplazmás retikulum, sejtmembrán, transzmitter vezikulák csoportjait körbevevő belső membránok és egyes vezikulák membránja az idegterminálisokban mutattak NADPH-diaforáz reakciót. A kimutatáshoz és lokalizációhoz alkalmazott módszerek alapot szolgáltattak a NOS követéséhez a regenerációs kísérletekben is.

(Acta Biologica Hungarica, 2012. 63. Suppl. 2); 5 konferencia kivonat

5. Vizsgáltuk a NO-indukált jelátviteli utak és a NO által módosított fehérjék megjelenését az éti csiga tapogató újrászerveződése során. Tizenöt héten keresztül követtük *Helix pomatia* ommatophor distalis végének (tentacularis ganglion és szem) regenerációját NADPH-diaforáz (NADPH-d) hisztokémiai festéssel. Minden páratlan héten, összesen 8 alkalommal 10-10 db állat jobb oldali tapogatójának eltávolítását végeztük; a bal oldali épen hagyott tapogatót kontrollnak tekintettük. A tentacularis ganglionban NADPH-d reaktív sejteket azonosítottunk, melyek axonjai a tentacularis idegen keresztül az előagy ventralis neuropiljébe vetülnek, amely a rhinophorból is kap NADPH-d innervációt. A rostok kisebb hányada az előagy globulus sejtjeit is innerválja. Szemnyél irtást követő 1 héten belül a disztális axonvégek még halványan NADPH-d reaktivitást mutatnak. A tentacularis ideg elvágása nem befolyásolta az előagy NADPH-d reaktivitását. A regenerálódó tentacularis ganglion szövetében a 10. héten jelenik meg diffúzan a NADPH-d reaktivitás, mely a 13. hét végére az ép állapothoz hasonló elrendeződést mutat.

NOS aktivitás mérésére, az érzékenységi szint csökkentése végett, az eddig ismert módszerek kombinációját alkalmaztuk. *In vitro* NOS esszé során a keletkező oxidációs végtermékeket (nitrát, nitrit, összefoglalóan: NO_x) visszaredukáltuk, és a NO-t inert körülmények között (N₂ atmoszférában) ózonnal reagáltattuk. A reakció fénykibocsátása arányos a jelenlévő NO mennyiségével, és NO-analízis készülékben (Sievers, DE-OEC, OVI)

pmol érzékenységben mérhető. A magas szenzitivitást a mérést egyébként zavaró kofaktor NADPH feleslegének oxidálásával és hosszú inkubációs idővel (1 h) érték el. Ezzel a módszerrel 120.3 ± 7.2 nmol NO/ μ g protein/h értéket mértünk ép tentaculumban. Az aktivitás 0.1 mM L-NAME NOS-gátlóval 85%-ban csökkenthető volt. A hegyszövet NOS aktivitása a kimutathatósági határ alatt volt az irtást követő 3. hétig, majd megemelkedett, és a 13. héten tetőzött 894.5 ± 14.5 nmol NO/ μ g protein/h értéknél. A morfológiailag teljesen regenerálódott szövetben (15. hét) a NO produkció az éphez közelített (152.5 ± 7.2 nmol NO/ μ g protein/h). Az ellenoldali (ép) tapogatóhoz képest a regeneráció 6-8. hetében a regenerálódó tapogatóban a NOS expresszió kiegyenlítődt, majd a regeneráció későbbi periódusában jelentősen meghaladta a kontrollnál mért NOS-immunreaktív sávintenzitást. Az aktivitás regeneráció alatti változása összhangban van a NOS antitesttel végzett Western blotton megfigyelt enzimszint, valamint a szöveti NADPH-diaforáz hisztokémiai reakció időbeli változásával.

A regeneráció során egy ~ 90 kDa molekulatömegű fehérje nitrozilációját mutattuk ki. A fehérje nitrozilációja a regeneráció 8. hetéig volt megfigyelhető, amikor az ép tapogatóban is megjelent a nitrozilált fehérje. A 8. héttől a 15. hétig az ép tapogatóban fokozatosan emelkedett a ~ 90 kDa nitrozilált fehérje mennyisége. A fehérje nitrozilációja ellentétes megjelenést mutatott a NOS expresszióval.

A regeneráció 9. hetétől annak befejeztéig (15. hét) hetente 10 mg/kg L-NAME NOS inhibitorot injektáltunk 0,5 ml *Helix*-Ringerben oldva az állatok testüregébe. A 13. héten mért NOS aktivitás a kontroll 18%-a volt. Az L-NAME-vel injektált állatok tapogatójának (szerkezeti) regenerációs ideje a kontroll 15 hét helyett 20 hétre tolódott ki.

A NO-indukált guanilat-cikláz aktivitását annak termékén (cGMP) keresztül mértük kolorimerikus enzim-immunesszé segítségével. Az ép tentacularis ganglion 12.3 ± 4.5 pmol/mg protein cGMP-t tartalmazott, mely értéket $472 \pm 15\%$ -al, illetve $629 \pm 45\%$ -al lehetett megnövelni, ha a nyers kivonatot 1mM SNAP NO-donorral, illetve 10 μ M YC-1 nem NO-donor guanilat-cikláz aktivátorral inkubáltuk 1 mM IBMX foszfodiészteráz-gátló jelenlétében. Amennyiben ODQ-t (10 μ M, guanilat-cikláz inhibitor) adtunk a mintához, az előbbi cGMP-szint növekedés nem volt megfigyelhető. A cGMP szint változása a regeneráció alatt a NOS-aktivitáshoz hasonlóan alakult, a 13. héten érte el a csúcst 38.4 ± 8.4 pmol/mg protein értékkel.

PKG aktivitást foszfo-Akt szubsztrát ELISA mérésével végeztük, PKG inhibitor (RKRARKE, 1 μ M) jelenlétében és hiányában. A színreakció relatív optikai denzitás értékei azt mutatták, hogy a foszfo-Akt szubsztrát jelenléte az ép tapogatóban ($100 \pm 17\%$), a regeneráció korai fázisában (1-5 hét, átlagban $212 \pm 25\%$), valamint a regeneráció végén (11-15 hét, átlagban $152 \pm 20\%$) magas. PKG-inhibitor hatására csak az ép szövetben és a regeneráció utolsó periódusában sikerült ezt az értéket jelentősen csökkenteni ($85 \pm 8\%$, illetve $102 \pm 23\%$), ami arra utal, hogy (i) a PKG-n kívül más kinázok (pld. PKA és PKC) is foszforilálnak az ép és regenerálódó tentaculumban, (ii) csak az ép tentaculumban és a regeneráció utolsó periódusában van jelentős PKG aktivitás. Western blot kísérletekben mintegy 10 fehérje (molekulatömegek: 135, 110, 90, 75, 60, 52, 48, 45, 40, 30 mt) foszforilálódik Akt/PKA/PKG/PKC közös foszforilációs helyén az ép és regenerálódó tapogatóban. Közülük az ép tapogatóban tapasztaltunk erősebb foszforilációt a 135, 90, 60, 52, 48, 45 kDa mt fehérjéknél, míg a regenerálódó tapogatóban volt intenzívebb foszforiláció a 75, 30 kDa mt fehérjéknél. A 110 kDa fehérje foszforilációs szintje mind a kontroll, mind a regenerálódó tapogatóban állandó volt. A 40 kDa mt fehérje foszforilációja a 6-8. hétig a regenerálódóban, majd ettől fogva az ép tapogatóban volt jelentősebb.

Megfigyeléseink alátámasztják azt a hipotézist, miszerint a NO-cGMP-PKG szignálút szerepet játszik az idegsejtek regenerációjában.

(4 konferencia előadás és poszter kivonat)

5. Vizsgáltuk a MAPK aktivitását (foszforilációját) is a regeneráció során. A 6-8. héten mind a regenerálódó, mind az ép tapogatóban tapasztaltuk a MAPK-P megjelenését. A regenerálódó tapogatóban a MAPK foszforilációja a regeneráció végéig fokozódott és mindig meghaladta az ép tapogatóban tapasztalt aktivitást.

(1 konferencia poszter kivonat)

6. Dopamin D1A receptor kimutatását, eloszlását írtuk le csiga idegrendszerben, és igazoltuk a dopaminerg innerváció szerepét a táplálkozást moduláló óriás interneuron működésében.

(Acta Biologica Hungarica, 2012. 63 Suppl. 2)

7. K-csatornák kimutatását és eloszlását vizsgáltuk *Helix pomatia* szaglóközpontjában (procerebrum).

(Acta Biologica Hungarica, 2012. 63 Suppl. 2)

8. Vizsgáltuk, hogy a pajzsmirigy hormonok a kisagy strukturális fejlődését befolyásoló hatásában szerepet játszik-e a NO-cGMP szignál. Négy napos patkányokat kezeltünk egy-két- és három hétig i.p. 1 µg tiroxin/10 g testsúly kg/ 4 nap, valamint p.o. 100 µg 6-n-propil-2-tiouracil (PTU)/10 g testsúly kg/nap. A kisagy posztembrionális fejlődésével párhuzamosan a NOS- és a cGMP-immunreaktív elemek megjelenését regisztráltuk a szemcsesejtek és parallel rostokban, valamint a Purkinje sejtekben és a molekuláris rétegben, külön-külön. Tiroxin gyorsította, míg PTU lassította a NOS- és cGMP-immunreaktív elemek megjelenését a fejlődő kisagyban. A kezelések kompenzálása a folyamatot normalizálta. Az eredmények igazolták a NO-cGMP szignál szerepét a pajzsmirigy hormonok-indukálta agyi fejlődést szabályozó folyamatokban.

(Endocrinology, 2009. 89:337-350)