

A jelen OTKA támogatás segítségével megvalósított kutatásaink alapját az a munkahipotézis képezi, hogy az idegrendszeri sejtek és az extracelluláris mátrix közötti kapcsolat alakításában – az izomrostokhoz hasonlóan – szerepet játszik egy membránon átívelő fehérjekomplex, a disztrofin/disztroglikán komplex (DGC). Ennek a komplexnek meghatározó jellegű intracelluláris komponense a disztrofin- vagy a rokon utrofin- fehérjecsalád valamelyik tagja. Irodalmi adatokkal alátámasztott feltevésünk szerint a központi idegrendszerben több, funkciójában és lokalizációjában eltérő DGC fordul elő, melyek szerepet játszanak a neuronok és glia sejtek struktúrális és funkcionális egységének kialakításában és megtartásában. Munkánk legfőbb célja, hogy lokalizáljuk a DGC egyes tagjait neuronokban és glia sejtekben, hozzájárulva egyrészt a két sejt típusban lévő DGC molekuláris összetételének tisztázásához, másrészt azok funkciójának felderítéséhez.

I. A szerződés tárgyát képező munkaterv két pontja csak részben, illetve módosított formában valósult meg. Ezek a következők.

I.1. Célul tűztük ki egy immunhisztokémiai és immuncitokémiai vizsgálatokra alkalmas poliklonális ellenanyag előállítását, amely képes a Dp71 hasítási formától független felismerésére. E célból birkákat immunizáltunk. A kapott nyers szérumok a kívánt antigéneken kívül más fehérjékkel is reagáltak, ezért affinitáskromatográfiás tisztítás vált szükségessé. Ennek segítségével sikerült megfelelő specificitású frakciókat nyernünk, az ily módon előállított specifikus ellenanyag csekély mennyisége miatt azonban ezirányú próbálkozásainkat időlegesen felfüggesztettük. A még rendelkezésünkre álló nyers szérumok tisztítása és vizsgálata ezévi terveink között szerepel.

I.2. Munkatervünkben szerepel a saját korábbi tapasztalataink és mások közlése szerint is igen nehezen tenyésztendő disztrofin-hiányos *mdx^{3cv}* egértörzs tenyésztésének megoldása az Állatorvos-tudományi Karon. Egyre több laboratóriumból érkeztek azonban olyan adatok, melyek szerint ebben az egértörzsben a mutáció (amely pontmutáció típusú) ellenére csökkent mennyiségben ugyan, de előfordul egyes disztrofin izoformák expressziója. Ezért más mutáns egértörzs felhasználását vettük tervbe. Az *mdx^{βgeo}* transzgénikus törzshöz tartozó egerekben egy „gene trap” vektor alkalmazása révén gátolt az összes disztrofin izoforma expressziója (Wertz K, Fuchtbauer EM. (1998) *Dev Dyn.*212:229-41). Ez az egértörzs kollaborációs partnerünk, D. Górecki (Portsmouth, Anglia) laboratóriumában rendelkezésre áll. A törzs hazai tenyésztésére egyelőre nem törekszünk, mivel a vizsgálatainkhoz szükséges fixált szerveket partnerünk rendelkezésünkre bocsátja.

II. Szerződésben leírt további terveinkkel kapcsolatos eredményeink a következők.

II.1. Célul tűztük ki annak vizsgálatát, hogy az extracelluláris mátrix fehérjekomponenseinek jelenléte milyen hatással van a DGC sejten belüli lokalizációjára a retina Müller glia sejtjeiben. Prímer sejttenyészetek immunfluoreszcenciás vizsgálatával lokalizáltuk a komplex egyes tagjait vándorló, illetve nyugvó sejtekben (közlemény: Méhes és mtsai., 2003). Kettős jelölés segítségével kimutattuk, hogy a Dp71f sejten belüli eloszlása független a disztroglikántól, az utrophin és a disztroglikán pedig csoportokba tömörülve kolokalizál. A vizsgált három fehérje lokalizációja, illetve a kolokalizációs mintázat alapvető jellegetességeit tekintve azonosnak tekinthető nyugvó és vándorló sejtekben, és nem változik meg laminin jelenlétében.

II.2. Korábbi munkánk során kimutattuk, hogy a Müller glia sejtek motilitásának jellegetességei laminin jelenlétében megváltoznak (Mehes E, Czirok A, Hegedus B, Vicsek T, Jancsik V. (2002) *Cell Motil Cytoskeleton.* 53:203-13). A kísérletek során, amelyeket az ELTE TTK Biológiai Fizika Tanszékével kollaborációban végeztünk, a különböző felszíneken mozgó sejtek útvonalát számítógépes videomikroszkópiával regisztráltuk, majd a kapott eredményeket statisztikai analízissel értékeltük. A jelen pályázat keretében végzett kísérleteink során azt vizsgáltuk meg, hogy a sejtek motilitási jellegetességeinek

megváltozásában szerepet játszik-e a lamininnak a DGC-vel való kölcsönhatása. Ennek felderítésére a laminin jelenlétében kapott eredményeket összehasonlítottuk azoknak a vizsgálatoknak az eredményeivel, melyek során a laminin-DGC kötődést két, egymást kiegészítő módszerrel meggátoltuk. Az egyik során a DGC extracelluláris tagjának, az alfa-disztroglikánnak funkcióját gátoltuk specifikus ellenanyag segítségével. Másik típusú kísérleteinkben a lamininnak a disztroglikánhoz való kötődésében részt vevő felületét „fedtük el” heparin segítségével. A motilitásnövelő hatás jelentős részben a laminin-DGC kölcsönhatástól függőnek bizonyult, míg a sejtek nyúlvány-dinamizmusát és irányváltoztatási gyakoriságát gátolt és gátolatlan esetekben megegyezőnek találtuk. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy az extracelluláris mátrix egyik fontos alkotó elemének, a lamininnak a Müller glia sejtekhez való kötődésében a DGC-n kívül más, valószínűleg az integrin családba tartozó sejt felszíni receptorok is részt vesznek (közlemény: Méhes és mtsai., 2005).

II.3. Munkánk legnagyobb részét az a vizsgálatsorozat tette ki, melynek során korrelált fény- és elektronmikroszkópos módszerek segítségével kutattuk a DGC különböző tagjainak lokalizációját a központi idegrendszeren belül.

II.3.1. DGC komponensek a neuronokban.

II.3.1.1. A disztrofin fehérjecsalád tagjai közül a 71 kDa molekulatömegű izoforma (Dp71) fordul elő legnagyobb mennyiségben az idegrendszerben. A Dp71 expressziója különösen jelentős a hippocampusban, ezért megvizsgáltuk e fehérjének egyik alternatív splicing révén kialakuló variánsának (Dp71f) lokalizációját a hippocampus CA3 régiójában (közlemény: Hazai és mtsai., 2006). Immunreakciót észleltünk a dendritekben és a dendrit-tüskékben lévő kis aszimmetrikus szinapszisokhoz tartozó poszt-szinaptikus megvastagodásokban. Dp71f jelenléte nem volt kimutatható azokban a szinapszisokban, melyeknek preszinaptikus eleme a moharostok nagyméretű axon-végződése. A stratum lucidumban kötegekbe rendeződött moharostok membránja erőteljes immunreaktivitást mutatott. Ugyanebben a rétegben egyes kis átmérőjű myelinhüvelyes axonokon belül is tapasztaltunk immunreaktivitást. Eredményeink új adatokat szolgáltatnak a megvizsgált speciális disztrofin izoforma idegsejteken belüli lokalizációjáról.

II.3.1.2. A DGC citoplazmatikus komponensei közül különleges figyelmet érdemelnek a disztrobrevin (DB) család proteinjei. Ennek a fehérjecsaládnak a tagjai adaptor fehérjékkel kölcsönhatásba lépve lehetőséget nyújtanak arra, hogy a DGC egyrészt intracelluláris jelátviteli utakban részt vevő fehérjékhez, másrészt sejtmembránban található (pl. csatorna-) fehérjékhez kapcsolódjon. Korábbi vizsgálatok (Lien CF, Vlachouli C, Blake DJ, Simons JP, Gorecki DC. (2004) *Gene Expr Patterns*. 4:583-93) szerint az alfa-DB az embrionális egér agy neuronjaiban jelen van, azonban fiatal posztnatális állatokban neuronális expresszió már nem mutatható ki. A jelen pályázat keretében végzett vizsgálataink során úgy találtuk, hogy felnőtt egér és patkány agyban a laterális hypothalamikus terület (lateral hypothalamic area) neuronjainak egy szubpopulációja alfa-disztrobrevin (alfa-DB) pozitív. Az immunreaktivitást mutató neuronok változatos formájú és nagyságú csoportokat alkotnak, melyek koronális metszeteken Bregma -1.22 mm-től Bregma -1.94 mm-ig észlelhetőek. A szemcsés megjelenésű immunreakció a perikaryonokban és egyes nyúlványokban is jelen van. Az immunprecipitátum a sejttesteken belül elektronmikroszkópos megfigyeléseink szerint az endoplazmatikus retikulum membránján lokalizálódik. Annak megállapítására, hogy a fentiekben jellemzett disztrobrevin lokalizáció függ-e a disztrofin család fehérjének jelenlététől, vizsgálatainkat kiterjesztettük disztrofin-hiányos *mdx^{Bgeo}* törzshöz tartozó egerekre. Előzetes eredményeink szerint a disztrofin-hiányos egerek agyában az alfa-DB neuronális előfordulása változatlan, ami azt valószínűsíti, hogy a DGC felépítésében ebben a sejt típusban az utrophin fehérjecsalád tagjai vesznek részt.

Kettős immunfluoreszcenciás jelölés segítségével megállapítottuk, hogy az alfa-DB-t expresszáló neuronok galaninra és neuropeptid-Y-ra (NPY)-ra nézve negatívok, azonban valamennyi alfa-DB pozitív neuron egyben melanin koncentrááló hormon (MCH) immunreaktivitást is mutat. Ez az eredményünk felveti annak a lehetőségét, hogy a DGC szerepet játszik a táplálékfelvétellel kapcsolatos fiziológiai folyamatok regulálásában.

Az itt leírt vizsgálatokat D. Górecki csoportjával (Portsmouth, Anglia) kollaborációban végezzük. Az eredményeket két poszteren mutattuk be (közlemények: Hazai és mtsai. 2005, Hazai és mtsai. 2006). Néhány folyamatban lévő kiegészítő vizsgálat befejezése után tervezzük az eredményeinket összefoglaló kézirat közzétételére való benyújtását. Kérem, hogy ennek adatait utólag, a publikáció elfogadása után csatolhassam a zárójelentéshez.

II.3.2. DGC komponensek glia sejtekben.

II.3.2.1. Megvizsgáltuk hogy a Dp71f eloszlását patkány agyban, figyelmünket elsősorban az asztrocitákra koncentrálna. A vizsgálatokat immunfluoreszcenciás módszer alkalmazásával végeztük, Kálmán Mihály kutatócsoportjával (SE, Anatómiai Intézet) kollaborációban. Eredményeinket egy publikációban foglaltuk össze (közlemény: Szabó és mtsai., 2004). Prominens jelölést tapasztaltunk asztrociták sejtestében és nyúlványaiban egyaránt. Megvizsgáltuk a Dp71f és az asztrocita-markerként alkalmazott gliális fibrilláris savas protein (GFAP) kolokalizációját. A Dp71f pozitív képletek egyben GFAP pozitívok is voltak, figyelemreméltó azonban, hogy egyes GFAP pozitív asztrocita populációk Dp71f negatívnak bizonyultak. A cikkben részletesen leírtuk és bemutattuk a főbb Dp71f pozitív struktúrákat. Ezek a következők: glia limitans, a perivascularis glia az idegszövetbe belépő erek körül, az ependyma, subependymalis asztrogliá, az ependymával laza kapcsolatban álló poligonális struktúrák, a circumventricularis szervek, a Bergman glia sejtek (elsősorban a submeningeális területen). Ezek az eredmények arra mutatnak, hogy a Dp71f elsősorban azokban az asztrocita populációkban expresszálódik, amelyek a laminint (is) tartalmazó lamina basalissal érintkeznek.

II.3.2.2. A vér-agy gát fenntartásában feltételezhetően szerepet játszó DGC összetételének felderítésére irányuló munkánk során kutattuk a perivascularis alfa-DB lokalizációját. Felnőtt egér és patkány agyban, kollaborációs partnerünk korábbi eredményeivel (Lien CF, Vlachouli C, Blake DJ, Simons JP, Gorecki DC. (2004) Gene Expr Patterns. (2004) 4:583-93) összhangban, prominens perivascularis alfa-DB immunreaktivitást tapasztaltunk.

Elektronmikroszkópos vizsgálatokkal bizonyítottuk, hogy az alfa-DB a perivascularis glia végtalpakban, ezen belül az endothel sejteket és végtalpat elválasztó lamina basalissal érintkező membránon lokalizálódik.

A disztrofín-hiányos *mdx*^{*βgeo*} egerek agyának vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy perivascularis alfa-DB immunreaktivitás kisebb mértékben ugyan, de ezekben az állatokban is megfigyelhető. Elektronmikroszkópos vizsgálataink szerint a fehérje a mutáns állatok agyában is a glia végtalpak lamina basalissal érintkező membránján lokalizálódik, azonban annak jelenléte – a vad típusú egereknél észlelttől eltérően – a membránnak csak viszonylag kis részére korlátozódik. Feltevésünk szerint a mutáns egerek esetében a perivascularis glia végtalpakban a hiányzó disztrofint a rokon tulajdonságokkal rendelkező utrofin képes részlegesen helyettesíteni.

Ez az eredményünk tovább gazdagítja azt a képet, amely saját korábbi vizsgálataink és más kutatócsoportok eredményei alapján kialakulóban van a vér-agy gát fenntartásában fontos szerepet játszó perivascularis glia végtalpakban található DGC molekuláris összetételéről.

A fentiekben bemutatott eredményeinket, az alfa-DB lokalizációjának más szövetekben végzett elektronmikroszkópos meghatározásával együtt, egy nagyobb cikk részeként, D. Górecki munkacsoportjával közösen tervezzük publikálni. Az adatokat ebben az esetben is később, a publikáció elfogadása után szeretném csatolni a zárójelentéshez.