

SZAKMAI ZÁRÓJELENTÉS

OTKA ny.szám: T37834
Témavezető: Dr. Deli Mária
Téma: **Neurodegeneratív betegségek kialakulása során létrejövő vér-agy gát változások vizsgálata *in vivo* és *in vitro* kísérletes modelleken**
A kutatás időtartama: 2002-2005
Kutatóhely: MTA SZBK Biofizikai Intézet
Támogatás összege: 11000 eFt

A KUTATÁS CÉLJA

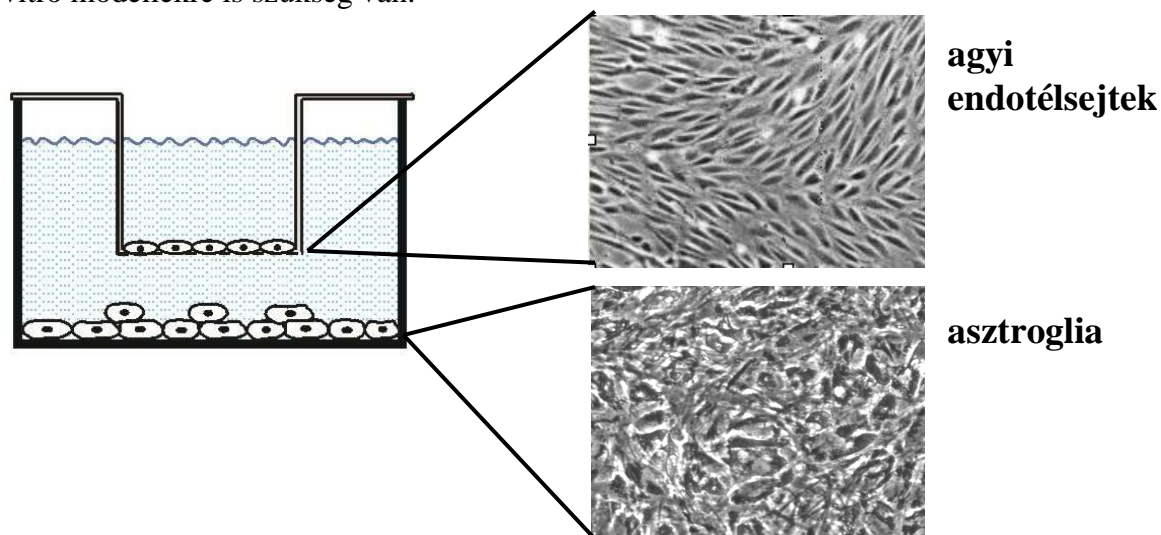
Vizsgálni kívántuk a neurodegeneratív betegségek pathológiájában szerepet játszó amyloid peptidek, valamint a HIV-1 vírus fehérjéinek hatását agyi endotélsejtekre, és azok különböző vér-agy gát funkcióira. Olyan vegyületet kerestünk, amely a vér-agy gát működését károsan befolyásoló hatások kivédésére akár potenciálisan terápiás vegyületként is alkalmas.

EREDMÉNYEK

Permeabilitási tesztekre is alkalmas tenyészetben alapuló vér-agy gát modell

A vér-agy gát nem pusztán egy endotélsejtek közötti szoros zárókapcsolatokon (tight junction, TJ) alapuló paracelluláris permeabilitási barrier, hanem influx és efflux transzporterei, metabolikus enzimei révén többszörös védelmi rendszert képez az idegrendszer számára. Ezeket a speciális működéseket szervspecifikus hatás, vagyis az idegrendszer sejtjeivel (asztroglia, perivaszkuláris pericita, mikroglia, neuronok) való kölcsönhatás hozza létre.

Az idegrendszeri hatóanyagok gyógyszerre fejlesztése során kulcsfontosságú a vér-agy gáton való átjutás tesztelése. Ehhez az állatkísérletek mellett tenyészeteken alapuló, *in vitro* modellekre is szükség van.



A perifériás endotélsejtek, és az eddig előállított agyi endotél sejtvonalak erre a célra a nem elég szoros paracelluláris barrier, illetve az egyéb vér-agy gát jellemzők hiánya miatt nem alkalmasak. A primer endotélsejtek esetében a legnagyobb gondot a tenyészetek tisztasága jelentette. A viszonylag nagy számban előforduló periciták egy idő után túl is nőhetik az endotélsejteket.

Sikerült kidolgozni egy olyan egyszerű módszert, amellyel a nem agyi endotélsejtek szelektíven elpusztíthatóak. A frissen izolált agyi kapilláris fragmentumokban az endotélsejteken a P-glikoprotein efflux pumpa expressziója sokkal magasabb, mint a pericitákon, vagy más kontamináló sejteken. Ez a transzporter a xenobiotikumokat tartja távol az agytól. A P-glikoprotein több ligandját is letesztelve a 2 napos 4 µg/ml dózisú puromicin kezelés bizonyult a leghatékonyabbnak tiszta tenyészetek előállítására; a pumpát expresszáló endotélsejtekbe nem jutott be a puromicin, míg a nem-expresszáló sejtekbe bejutott, és kifejtette toxikus hatását. A puromicines kezeléssel megtisztított endotélsejtekkel asztrogliá ko-kultúrában létrehozott modellen 500 Ω×cm² transzendenteliális elektromos ellenállást (TEER) mértünk, míg a fluoreszcencia permeabilitási koefficiense 0,75 × 10⁻⁶ cm/s volt. Ezek az értékek azt jelzik, hogy a modell szoros barriert alkot, és permeabilitási tesztelésre is alkalmas.

Megjelent közlemény

Deli MA, Ábrahám CS, Kataoka Y, Niwa M. Permeability studies on *in vitro* blood-brain barrier models: physiology, pathology and pharmacology. *Cell. Mol. Neurobiol.*, **25**: 59-127, 2005 (IF₂₀₀₄: 1.970)

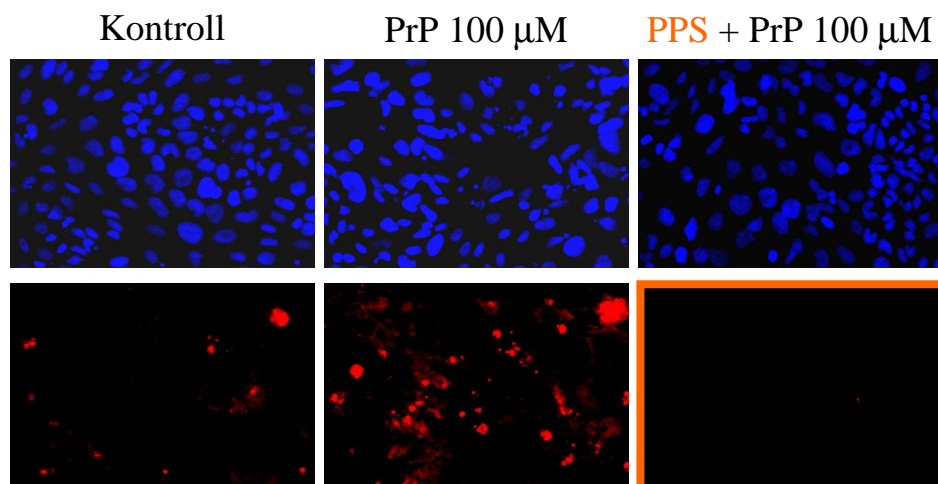
Deli MA: The role of blood-brain barrier in drug delivery to the central nervous system. *Eur. J. Pharm Sci.*, **25S1**: 14-15, 2005 (abstr)

Perriere N, Demeuse P, Garcia E, Regina A, Debray M, Andreux JP, Couvreur P, Schermann JM, Tamsamani J, Couraud PO, **Deli MA**, Roux F. Puromycin-based purification of rat brain capillary endothelial cell cultures. Effect on the expression of blood-brain barrier specific properties. *J. Neurochem.*, **93**: 279-289, 2005 (IF₂₀₀₄: 4.824)

Amyloid peptidek hatásának vizsgálata agyi endotélsejteken

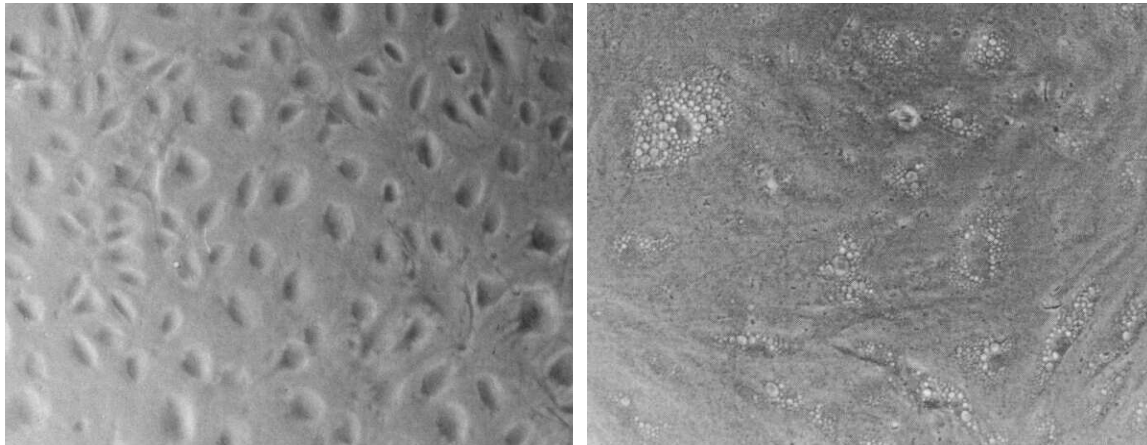
Szakirodalmi adatok és korábbi kísérletes eredményeink (Deli és mtsai, *Neuroreport*, **11**:3931-3936, 2000) arra utaltak, hogy egyes súlyos neurodegenerációs kórfolyamatokban, mint amilyen az Alzheimer kór, a prion betegségek csoportja, a vér-agy gátat létrehozó agyi endotélsejtek is károsodnak.

A prion fehérje (PrP) 106-126 aminosavak közötti peptid szakaszának agyi endotélsejtekre kifejtett hatásának vizsgálata során primer agyi endotélsejtekhez hasonlóan GP8 agyi endotélsejt vonalon is sikerült kimutatni, hogy a peptid citotoxikus. A PrP106-126 dózisfüggő módon (50-200 µM) szignifikánsan csökkentette az endotélsejtek MTT festék redukcióját, és fokozta a sejtekből felszabaduló laktát dehidrogenáz mennyiségét, ami a sejtek membránjának károsodására, ill. nekrotikus sejtpusztulásra utalt. A sejteket kettős fluoreszcencia magfestéssel (bis-benzimid és ethidium homodimer-1) vizsgálva



a peptid kezelés után jelentős sejtpusztulást és apoptotikus sejtmagokat figyeltünk meg. Mivel a sejtvonal csak endotélsejteket tartalmazó tiszta kultúra, igazoltuk, hogy a hatás közvetlenül, más sejtek nélkül zajlik.

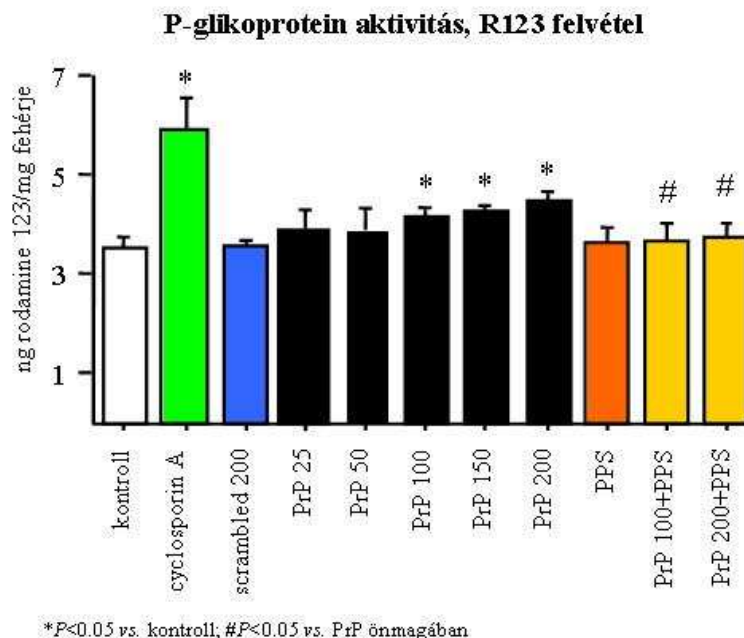
Mind az amyloid- β 25-35, 1-40 és 1-42 peptid szakasz toxikusnak bizonyult agyi endotélsejtekre MTT és laktát dehidrogenáz assay mérésekkel. A toxicitást a sejtek morfológiai változásai is igazolták, mind primer tenyészeteken, mind agyi endotél sejtvonalon jellegzetes citoplazmatikus vakuolizáció jött létre amyloid β peptid kezelés után.



Kontroll

Amyloid- β 1-40, 10 μ M

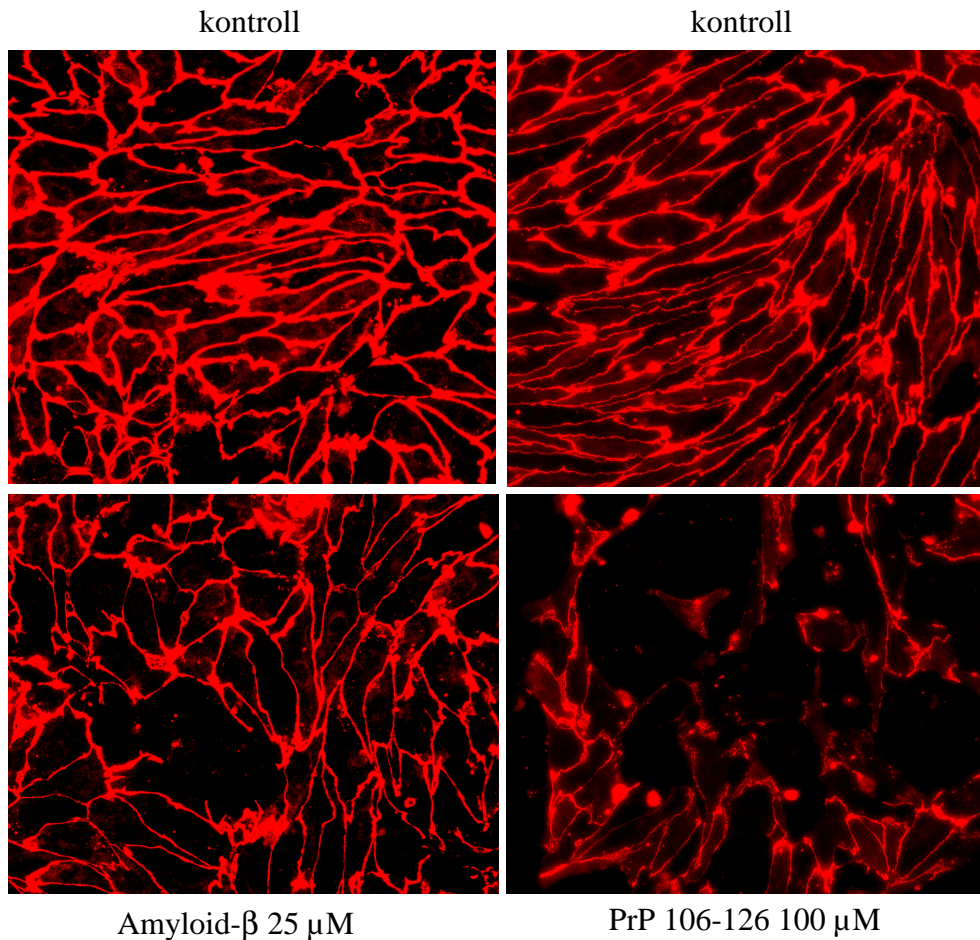
A PrP106-126 a vér-agy gát két fontos efflux pumpájának, a P-glikoproteinnek és multidrug rezisztencia asszociált fehérjének (MRP-1) aktivitását is gátolta *in vitro* kísérleteinkben.



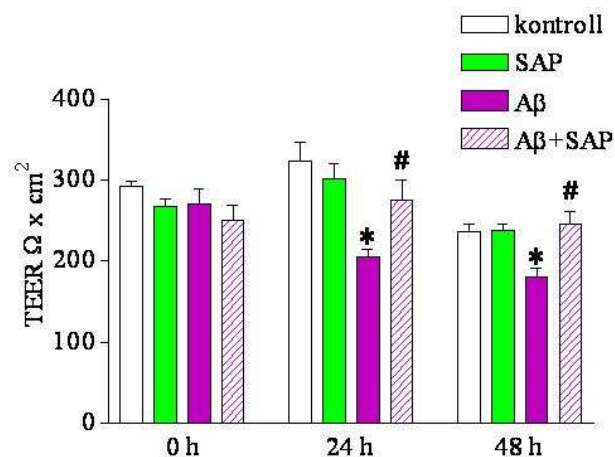
Peptid kezelés specifikus módon csökkentette a P-glikoprotein *mdr1a* expresszióját, míg más efflux pumpa gének (*mdr1b*, *mdr2*, *mrp1*) ill. más vizsgált gének (*Prnp*, *G3PDH*) expressziója nem változott.

Asztrocita ko-kultúrában tenyésztett primer agyi endotélsejtek ellenállását mind a PrP106-126, mind az amyloid- β peptid kezelés csökkentette, s növelte a fluoreszcein és az albumin átjutását a sejtrétegen. A TEER csökkenése és a markerek permeabilitási

koefficiensének emelkedése azt jelenti, hogy a peptid hatására az endotélsejtek közti szoros zárókapcsolatok működése károsodott. Ezt sikerült igazolni a TJ fehérjéinek, ZO-1 (ábrán), claudin-5, occludin, immunfluoreszcens festésével is. A sejtek kontúrját folyamatosan kirajzoló ún. kortikális festődés felszakadozott, a sejtek között rések jelentek meg, a kortikális festődés intenzitása csökkent, míg a citoplazmatikus jel aránya nőtt.



A szérumban amyloid P komponens (SAP) élettani körülmények között nem jut át az agyba. Alzheimer kórban azonban nagy mennyiségben kimutatható az agyi perivaszkuláris amyloid lerakódásokban és az intraparenchymális plakkokban, ahol a patológiás amyloid struktúrát stabilizálja. Megvizsgáltuk, hogyan változtatja az agyi endotélsejt barriert az amyloid- β kezelés SAP jelenlétében. Érdekes módon, a SAP jelenlétében kevésbé érvényesült a peptid TEER csökkentő hatása.



A SAP vér-agy gát permeabilitást csökkentő hatása állatmodellen is érvényesült, LPS-indukálta fokozott extravazációt egereken mérsékelni tudta.

Adataink alátámasztják azt a hipotézist, hogy neurodegeneratív betegségekben az endotélsejtek célpontjai a kórfolyamat során termelt, s az agyi erek körül fölhalmozódott patológiás amyloid típusú fehérjéknek és azok peptid fragmenseinek, ennek következtében a vér-agy gát működése zavart szenved, ami hosszabb távon nemcsak az agyi endotélsejteket, hanem az általuk védett központi idegrendszert is károsíthatja.

Megjelent közlemény

Deli MA, Ábrahám CS, Veszelka S, Niwa M: Effect of amyloid peptides on brain endothelial cells in vitro. *FENS Abstr.*, vol.2, A123.5, 2004

Veszelka Sz, Urbányi Z, Pázmány T, Németh L, Obál I, Dung NTK, Ábrahám CS, Szabó G, **Deli MA**. Human serum amyloid P component attenuates the bacterial lipopolysaccharide-induced increase in blood-brain barrier permeability in mice. *Neurosci. Lett.* **352**: 57-60, 2003 (IF 1.967)

Deli MA. The role of blood-brain barrier in neurodegenerative diseases In: *Molecular bases of Neurodegeneration*, Research Signpost, Diliagro I (Ed.), pp. 137-161, 2005

Tervezett közlemény

Veszelka S, Kopáček J, Ábrahám CS, Nakaoka R, Katamine S, Niwa M, **Deli MA**: Pentosan polysulfate protects brain endothelial cells from PrP 106-126 peptide-induced toxicity and blood-brain barrier dysfunction. *J Neurochem*

Csiszar B, Veszelka S, Ábrahám CS, Niwa M, Penke B, **Deli MA**: Amyloid-beta peptides damage blood-brain barrier functions. *J Neurosci Res*

Pentozán poliszulfát protektív hatása amyloid peptiddel kezelt agyi endotélsejteken

A poliszulfatált anionok közé tartozó pentozán poliszulfát, a bükkfakéregből nyert félszintetikus molekula szerkezeti rokonságot mutat az emlőssejtek felszíni glukózaminoglikánjaival. Ebből fakadóan igen széles spektrumú - antikoaguláns, gyulladásgátló, antiretrovirális és antiangiogenetikus - farmakológiai hatásait írták le. Jelenleg a klinikai gyakorlatban mint antikoaguláns és interstitialis cystitis elleni gyógyszert alkalmazzák. A fertőző spongiform encephalopathiák gyógyítása nem megoldott, ezért minden potenciális terápiás vegyület nagy érdeklődésre tart számot.

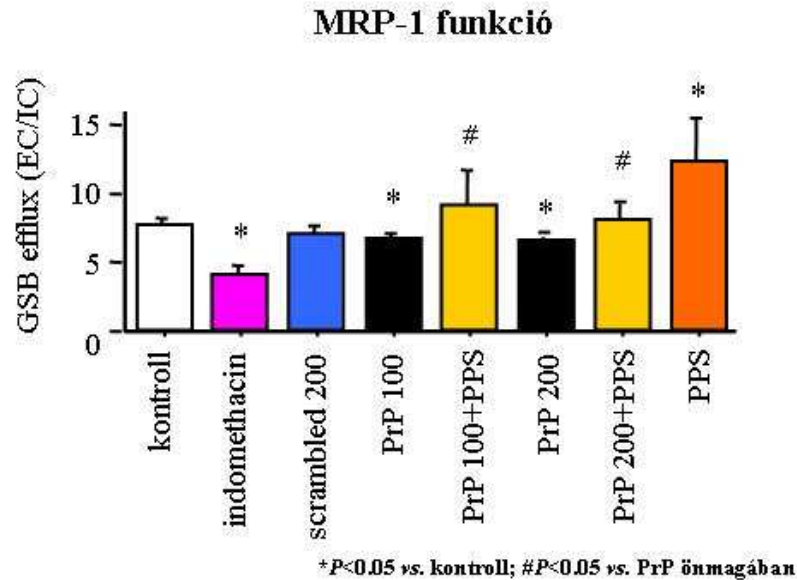
A pentozánt egereken végzett kísérletekben igen hatékonyan találták a prion betegségek közé tartozó scrapie, azaz súrlókór kezelésében, illetve megelőzésében. A pentozán hatásmechanizmusa azonban nem ismert. Mivel a nagy felszíni negatív töltéssűrűséggel rendelkező pentozán nem jut át a vér-agy gáton, felmerült, hogy az agyi endotélsejtek a pentozán célsejtjei között lehetnek. Ennek alapján kezdtük el kísérleteinket amyloid peptidokkal kezelt patkány és egér agyi endotélsejtek primer tenyészetein és GP8 agyi endotélsejt vonalon.

A pentozán 0.1-200 µg-ml dózisban nem befolyásolta sem a sejtek morfológiáját, sem a fiziológias vér-agy gát paramétereit, így az agyi endotélsejtretegek elektromos ellenállását sem. Hasonlóképpen nem változtatta meg az endotél egysejtretegek permeabilitását fluoreszcen és albumin jelzőmolekulákra. Érdekesen módon a vér-agy gát két fontos efflux transzporterét, a P-glikoproteint és az MRP-1 pumpákat dózistól függően aktiválta.

A PrP106-126 peptid (25-200 µM) általunk korábban leírt toxikus hatását primer egér agyi endotélsejteken (MTT festék redukciója, LDH felszabadulás, morfológia) pentozán (50-100 µg/ml) dózis-függő módon csökkenteni tudta.

Kísérleteinket elvégeztük GP8 immortalizált agyi endotélsejteken is. A PrP106-126 peptid (100-200 µM) erős sejtvakulációt és sejtpusztulást hozott létre. Pentozán kezelés (100 µg/ml) csökkentette a károsító hatást. A sejteket kettős fluoreszcens magfestéssel vizsgálva megállapítottuk, hogy mind a peptid kezelés, mind szérum depriváció apoptózist

indukált GP8 sejtekben, melyet a pentozán gátolni tudott. Ezen felül a pentozán GP8 sejtekben a peptid által létrehozott MTT redukció csökkenést is kivédte mind szérumos, mind szérummentes tápfolyadékban. A prion peptid a P-glikoprotein és az MRP-1 efflux pumpák aktivitását gátolta *in vitro* kísérleteinkben. A pentozán ezt a káros hatást is jelentősen enyhítette.



Adataink arra utalnak, hogy a pentozán az amyloid peptidek károsító hatását jelentősen mérsékli agyi endotélsejteken, miközben semleges, illetve kedvező hatást fejt ki a vér-agy gát funkciókra. Mindez felveti a pentozán általános endotélsejt protektív hatását is, amit további kísérletekkel lehetne igazolni. A téma jelentőségét kiemeli, hogy együttműködő partnereink a Nagaszaki Egyetem Ideggyógyászati Klinikáján elkezdtek Creutzfeldt-Jakob kórral diagnosztizált betegek pentozán kezelését.

Megjelent közlemény

Deli MA, Ábrahám CS, Veszelka S, Niwa M: The effects of pentosan polysulfate on the blood-brain barrier *in vitro*. *Fund. Clin. Pharmacol.* **18:** 106, 2004 (abstr.)

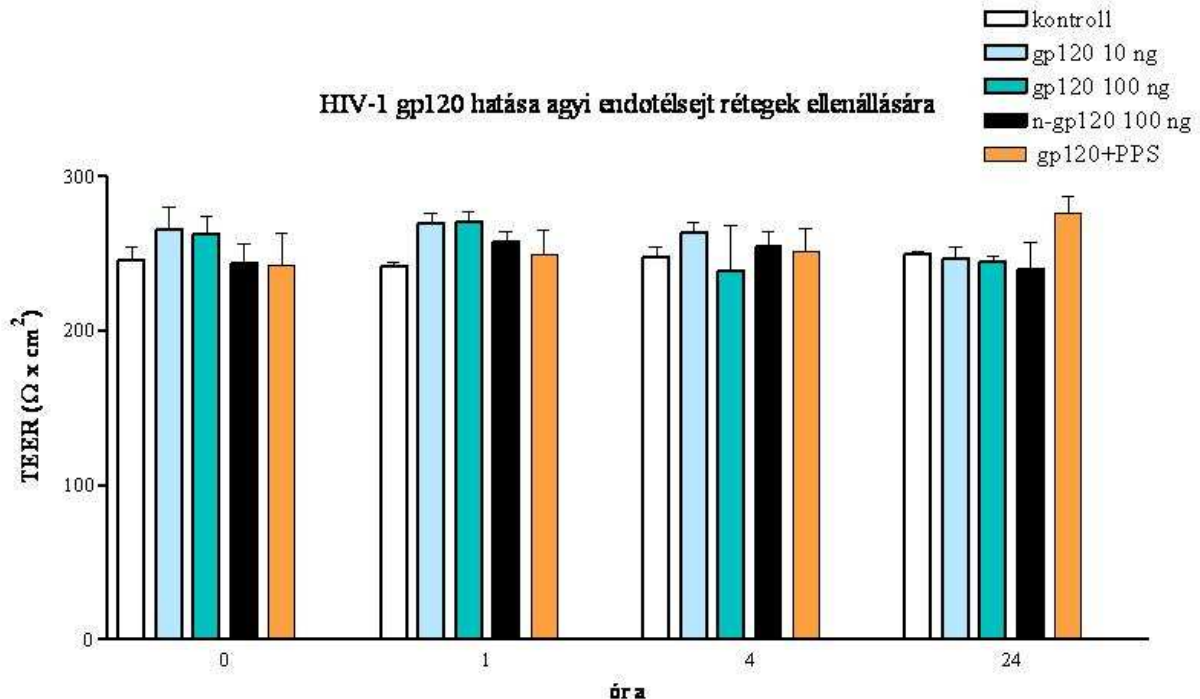
Tervezett közlemény

Deli MA, Veszelka S, Ábrahám CS, Niwa M: Effects of pentosan polysulfate on the blood-brain barrier under physiological and pathological conditions. *Curr Pharm Design*

A HIV-1 vírus gp120 és Tat fehérjének hatása agyi endotélsejtekre

A szerzett immundeficiencia szindróma idegrendszeri kórképének (neuroAIDS) létrejöttében más tényezők mellett oki szerepet tulajdonítanak a HIV-1 vírus fehérjének (gp120, és gp41 vírusburok glikoproteinek, Tat, Nef). A szabad HIV-1 vírus és a gp120 endocitózissal átjut a vér-agy gáton, és a humán agyi endotélsejtek fertőződnek a T-limfocita-tróp vírussal. Noha a vírusnak közvetlen szerepe lehet az AIDS betegekben kialakuló vér-agy gát működési zavarokban, a vírusfehérjék kölcsönhatása a vér-agy gátat alkotó agyi endotélsejtekkel nem tisztázott.

A gp120 fehérjének a vér-agy gát permeabilitására kifejtett hatása ellentmondásos, ezért megvizsgáltuk agyi endotélsejt modellünkön a fehérjének mind a glikozilált, biológiailag aktív, mind a nem-glikozilált formáját. Nem mértünk változást a barrier funkciókban sem a tesztmarkerek permeabilitására, sem a TEER értékekben.



Együttműködésben végzett kísérleteinket ezután a HIV-1 vírus Tat fehérjére koncentráltuk. A Tat fehérje a fertőzött sejtekből szabadul fel, könnyedén átjut a sejtmembránokon, és kritikus szerepet játszik a vírus szaporodásában. Emellett kimutatták a Tat fehérjét és mRNS-t AIDS betegek agyszövetében. Mivel a TJ struktúra rendkívül fontos a vér-agy gát működésében, megvizsgáltuk patkány agyi endotélsejteken a Tat fehérje hatását a TJ occludin, claudin-1 és claudin-5, ZO-1 és ZO-2 fehérjéire.

Agyi endotélsejtek 24 órás kezelése Tat₁₋₇₂ fehérjével a claudin-1, claudin-5 és ZO-2 TJ fehérjék mennyiségét szignifikánsan csökkentette (western blot), és sejten belüli eloszlásukat is megváltoztatta (immunfluoreszcens festés). A sejtek perifériájáról, ahol a TJ fehérjék folyamatos, kontúrszerű jelet adnak agyi endotélsejtekben, a Tat₁₋₇₂ hatására a citoplazmába helyeződik át az immunfestés nagy része, míg a periférián szaggatottá válik, gyengül (ZO-2), sőt, teljesen el is tűnik (claudin-1 és claudin-5). A Tat₁₋₇₂ fehérjének ezt a hatását sikerült állatkísérletben is megerősíteni. Egerek jobb oldali hippocampusába injektált Tat₁₋₇₂ jelentősen csökkentette az erek endotélsejtjeinek claudin-5 festését.

A Tat₁₋₇₂ hatás szelektívnek bizonyult, mivel nem érintett azonosan minden TJ fehérjét. Az occludin és a ZO-1 fehérjéknek sem a mennyisége, sem a festődési mintázata nem változott meg a kezelés hatására agyi endotélsejtek primer tenyészeiben..

Ezek az adatok arra utalnak, hogy a HIV-1 vírus fehérjéi befolyásolni képesek az agyi endotélsejtek közötti zárókapcsolatokat, s ezen keresztül a vér-agy gát működését. A Tat fehérje által okozott szelektív változás a TJ fehérjék expressziójában és sejten belüli megoszlásában is szerepet játszhat a neuroAIDS-ben létrejövő vér-agy gát károsodásban.

Megjelent közlemény

András IE, Pu H, **Deli MA**, Nath A, Hennig B, Toborek M. HIV-1 Tat protein selectively disrupts tight junctions in cultured brain endothelial cells. *J. Neurosci. Res.* **74**:255-265, 2003 (IF 3.374)

András IE, Pu H, Tian J, **Deli M**, Nath A, Hennig B, Toborek M. Signaling mechanisms of HIV-1 TAT-induced alterations of claudin-5 expression in brain endothelial cells. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* in press (IF 5.370)

SAMP8 egerekben az agyi hajszálerek morfológiájának, illetve a szubcelluláris kalcium megoszlásának vizsgálata

Az AKR/J egértörzsből kitenyésztett korai öregedést mutató vonalak közül a SAMP8-ban már 4 hónapos korban tanulási és memória deficit található. A kortól függő magasabb hippocampalis amyloid prekursor protein termelődés és agyi amyloid- β lerakódás jól korrelál a memória romlásával, melynek háttérében a septohippocampalis interakciók sérülése áll. SAMP8 egerekben egyes kutatócsoportok vér-agy gát változásokat és emelkedett permeabilitást találtak, míg mások az albumin permeabilitást változatlanak mérték. Mivel a vér-agy gát permeabilitást többek között az agyi endotélsejtek intracelluláris kalciumszintje szabályozza, az agyi hajszálerekben a szubcelluláris kalcium megoszlását vizsgáljuk elektronmikroszkópos szinten.

A SAMP8 egerek vizsgálatát, melyet eredetileg a 3. évre terveztünk, a kutatás 4. évére halasztottuk. Külföldi együttműködő partnerünk (Saint Louis University, USA) csak a 2005. évre tudta biztosítani a kísérleteinkhez szükséges, nehezen szaporítható, az átlagosnál szigorúbb állatházi feltételek mellett tartható endogén vírus mentes SAMP8 egereket. A 2 hónapos fiatal és a 12 hónapos, memória deficitet mutató állatok a hasonló korcsoportba tartozó kontroll CD1 egerekkel együtt 2005 októberében érkeztek meg. Az oxalát-piroantimonátos kalcium rögzítési módszernek megfelelően Borger's fixálóval történt transcardiális perfúzió után az alábbi agystruktúrákból metszettünk ki mintákat feldolgozásra: szaglógumó, kisagy, agytörzs, hippocampus. A kimetszett minták posztfixálása 1% ozmiumot és 2 % kálium piroantimonátot tartalmazó oldatban történt. Dehidrációt követően Durcupanba ágyasztuk be a mintákat. A polimerizációt követően elkezdtük a blokkok szisztematikus félvékony metszését. A négy állatsoporból készült mintegy 300 blokk közül a félvékony metszetek alapján kiválasztottakból ultravékony metszeteket készítünk, amelyeket uranil acetátos és ólomcitrátos festés után Zeiss CEM902 elemvizsgálóra alkalmas elektronmikroszkóppal vizsgálunk.

Tervezett közlemény

Kablan M, Csiszar B, Veszeka S, Vigh L, Siklos L, Banks WA, Deli MA: Blood-brain barrier changes in SAMP8 mice, an electron microscopic study. *Acta Neuropathol*

A KUTATÁSI TÉMA TOVÁBBI LEHETSÉGES IRÁNYAI

A pentozán poliszulfát agyi endotélsejtekre kifejtett védőhatása olyan eredmény, ami alkalmazott kutatást és fejlesztést követően hasznosítható lehet. Mivel már bevezetett gyógyszer esetleges új alkalmazásáról lenne szó, elsősorban a hatásmechanizmus tisztázása (génexpressziós vizsgálatok, mátrix metalloproteináz kísérletek), illetve a hatás állatkísérletes megerősítése jelentheti a következő lépést.