

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

Természettudományi és Informatikai Kar

Sejtbiológia és Molekuláris Medicina Tanszék

XXXI. OTDK Biológia Szekció

Dithranol által kiváltott szövetkárosító folyamatok in vitro modellezése

Martos Diána

II. éves Biológus MSc szakos hallgató

Témavezető: Dr. Légrádi Ádám

egyetemi adjunktus

2012

Tartalomjegyzék

1. Tartalmi összefoglaló.....	3
2. Bevezetés	4
2.1. A Dithranol szerepe	4
2.2. Az apoptózis és a kaszpáz 3.....	5
2.3. A mikroglia és az Iba 1	7
3. Célkitűzések.....	9
4. Anyagok és módszerek	10
4.1. Elsődleges kérgi sejt kultúra készítése 18 napos patkány embriók agykérgéből .	10
4.2. Sejttenyésztés összeszedése Western blotra.....	11
4.3. Lowry-féle fehérje mennyiség meghatározás	11
4.4. Iba- 1 Western blot tenyészetből	11
4.5. Sejtek fixálása fluoreszcens immuncitokémiai vizsgálatokhoz.....	13
4.6. Immuncitokémia sejttenyészetből.....	13
5. Eredmények és értékelésük.....	14
6. Megbeszélés.....	18
7. Irodalomjegyzék	19
8. Köszönetnyilvánítás.....	20
9. Nyilatkozat.....	21

1. Tartalmi összefoglaló

A dithranol (anthralin) a bőrgyógyászatban a pikkelysömör kezelésére használt gyűrűs szénhidrogén származék, amely a DNS- hez kötődik és gátolja a proliferatív hámsejtek osztódását. A szer a szövetekben jelentős mennyiségű szabadgyök felszabadulást okoz, ami szövetkárosodáshoz és a gyulladásos folyamatok elindításához vezet. Korábbi kísérleteinkben in vivo patkánymodellel kimutattuk, hogy a bőrfelszín dithranolos kezelése a trigeminális ganglionban lévő neuronok pusztulását, majd a mikroglia eredetű sejtek felszaporodását okozza. Célunk az volt, hogy sejtenyészeteken in vitro körülmények között gyulladásos folyamatokat modellezzünk és kimutassuk, hogy dithranol kezelés hatására a neuronok elpusztulnak és megnő a fagocitáló mikroglia száma. Munkánk során E18 patkány embriókból készített primer kortikális tenyészeteket kezeltünk különböző koncentrációjú dithranollal eltérő ideig. A mikroglia sejteket jelölő Iba1 fehérje, valamint az apoptotizáló sejteket jelölő kaszpáz-3 molekula expresszióját vizsgáltuk immuncitokémiai és kvantitatív Western analitikai módszerekkel. Az immuncitokémiai felvételeken látszott, hogy megnőtt a kaszpáz-3 pozitív apoptotizáló sejtek száma, míg a Western blot analíziskor kiderült, hogy az Iba1-et expresszáló mikroglia sejtek száma lecsökkent. Kísérleteink alapján megállapítottuk, hogy in vitro körülmények között a dithranol nemcsak a neuronokat, hanem a mikroglia sejteket is elpusztította.

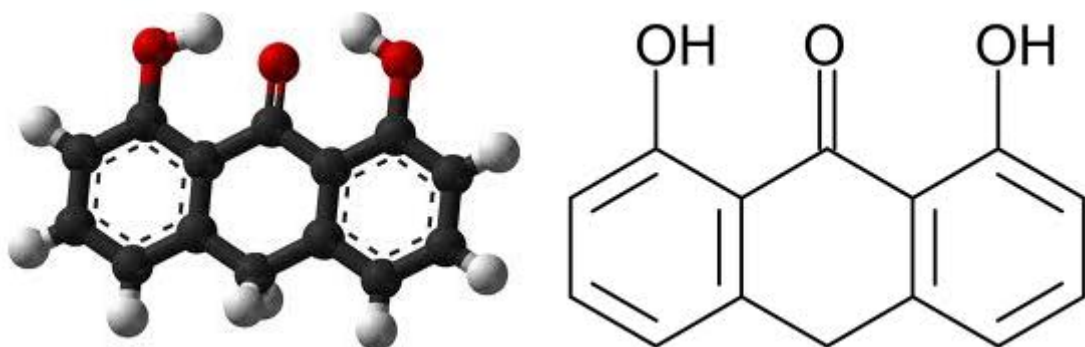
Kulcsszavak: dithranol, trigeminális ganglion, mikroglia, Iba1, kaszpáz-3, western blot, immuncitokémia

2.Bevezetés

2.1. A Dithranol szerepe

A dithranol (Anthralin) (1. ábra) a bőrgyógyászatban a pikkelysömör kezelésében használt gyűrűs szénhidrogén származék, mely a DNS-hez kötődik és gátolja az idegszálak UCH-L1 (ubiquitin carboxylterminal hidrolas L1 gén) immunreaktivitását (I. Orojan és mtsi, 2006), valamint reaktív szabadgyökök felszabadításával apoptózist indukál a humán keratinocitákban. A dithranol a keratinociták citoplazmájában lokalizálódik, kezelés hatására a mitokondriumok megduzzadnak, gömbölyűvé válnak és a sejtmag köré lokalizálódnak, majd csökken a mitokondriumok membránpotenciálja és citokróm c kiáramlást okoz. A dithranol interakcióba lép az endogén ubiquitin-poolal és modulálja az ubisemiquitin anion redox állapotát, minek következményeként reaktív oxigén gyökök keletkeznek (ROS), melyek aktiválják a pro- apoptotikus Bax fehérjét, amely gátolja a Bcl-2 és Bcl-xL fehérjéket, melyek a mitokondrium külső membránjában találhatók és feladatuk, hogy egészséges sejtekben meggátolják a citokróm c kiáramlását a citoplazmába (A. McGill és mtsai, 2005). Ám ha ezek gátoltak a citokróm c kiáramlik és az Apaf-1 (apoptotikus proteáz aktiváló faktor-1) fehérjével apoptoszómát képez, mely aktiválja a kaszpáz 9-et s ezzel beindítja a kaszpáz kaszkádot. A kaszkád végén a sejt magjának kromatin állománya kondenzálódik, a DNS- e fragmentálódik, végül a sejt apoptotizál.

A dithranol ezen hatása nemcsak a humán keratinocitákban figyelhető meg, ugyanis az idegszövetben illetve az idegsejtekben is ezt a folyamatot indukálja. Munkánk során ezt igyekeztünk igazolni.



1.ábra. A dithranol szerkezeti képlete

2.2. Az apoptózis és a kaszpáz 3

Az apoptózis a programozott sejthalál egyik formája, mely a szervezetben fiziológiai körülmények között megy végbe. Az apoptózisnak két útvonala ismert: az intrinsic útvonal, mely a sejt károsodása során megy végbe; az extrinsic útvonal valamely külső tényező, például ultraibolya sugárzás, oxidatív stressz vagy sejthalált indukáló ligand hatására játszódik le (D. Viatier és mtsai., 1996).

Az apoptózis elsődleges célja, hogy az elpusztult sejt alkotóit minél előbb apoptoszómákba illetve agregátumokba csomagolja és a mikroglia/makrofágok számára fagocitálhatóvá alakítsa. Az agregátumokba csomagolódnak a citoplazma alkotóelemei, fehérjék, vezikulák, a fragmentált DNS, membrán részletek, sejtservecskék és felszínükön olyan jelmolekulák találhatók melyeket a mikroglia/makrofágok felismernek. Ezzel megakadályozzák a sejt elpusztulásakor felszabaduló proteolitikus enzimek és reaktív oxigén metabolitok szivárgását, melyek helyi gyulladásos folyamatokat indukálnak. Így a környező sejtekben nem aktiválódik az apoptózis folyamata (D. Viatier és mtsai., 1996).

Az extrinsic útvonal (2. ábra) során a mikroglia/makrofágok által termelt TNF (Tumor Nekrózis Faktor) és a Fas ligand kötődik a célsejt membránján lévő receptorhoz. Mindkét receptor a TNFR receptor családba tartozik, a TNF-nek humán sejtekben két formája létezik, a TNF-R1 és a TNF-R2, a Fas receptort CD95-nek nevezzük.

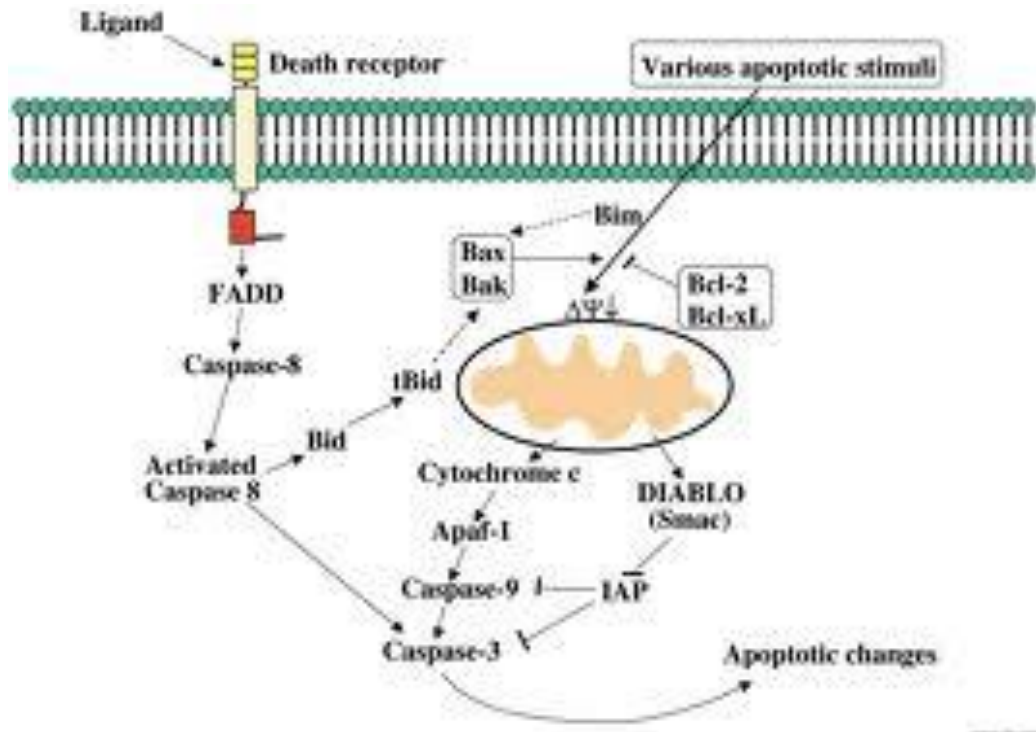
Miután a ligandok hozzákötődnek a receptoraikhoz, aktiválják a kaszpáz 8 molekulát, amely aktiválja a kaszpáz 3-at és az intrinsic útvonalat is. A kaszpáz 3 a kaszpáz kaszkád egyik utolsó, úgynevezett végrehajtó molekulája, amely különböző endonukleázokat aktivál, melyek fragmentálják a sejt DNS-ét. Tehát, ha egy sejtben kimutatható a kaszpáz 3 expressziója azzal igazolhatjuk, hogy az adott sejt éppen apoptotizál. Kísérleteinkben ezt a jelenséget használtuk fel az apoptotizáló sejtek kimutatására kevert tenyészetekben.

Az intrinsic útvonal (2. ábra) során a sejt egy belső jel hatására apoptotizál. Ebben az esetben a pro-apoptotikus Bax heterodimer fehérje gátolja a mitokondrium külső membránján lévő Bcl-2 és Bcl-xL antiapoptotikus fehérjéket (A sejt működése során Bcl-2 és Bcl-xL gátolják a citokróm c kiáramlását a citoplazmába.), így a citokróm c

kiáramlik a mitokondriumból és az Apaf-1-gyel (apoptotikus proteáz aktiváló faktor-1) apoptoszómát képez. A komplex aktiválja a kaspáz 9-et ez által a kaspáz kaszkádot, mely aktiválja a zimogén pro-kaspáz 3-at, amely konformáció változást szenved, aktív kaspáz 3-má alakul és beindítja azt a folyamatot mely során olyan molekulák (különböző endonukleázok) aktiválódnak, amelyek a sejtmag kromatin állományát kondenzálják, a sejt DNS-ét fragmentálják. A kaspáz kaszkád egy összetett folyamat, melyben számos kaspáz aktiválódása és együttműködése kell ahhoz, hogy kiválassza az apoptózist, a kaspáz 3 ezen kaszkád egyik utolsó, végrehajtó molekulája.

Az apoptózis egyik feladata tehát, hogy eltávolítsa a szövetek közül a nem kívánatos és potenciálisan veszélyes sejteket, mint az önreaktív-limfociták, a vírussal fertőzött sejteket, valamint a tumor sejteket.

A másik feladata az ún. morfogenetikus halál, melynek során részt vesz a szervek kialakulásának folyamatában. A szív, nyombél, hasnyálmirigy, az urogenitális traktus kialakulásában és a végtagképződésben, spermatogenezisben.

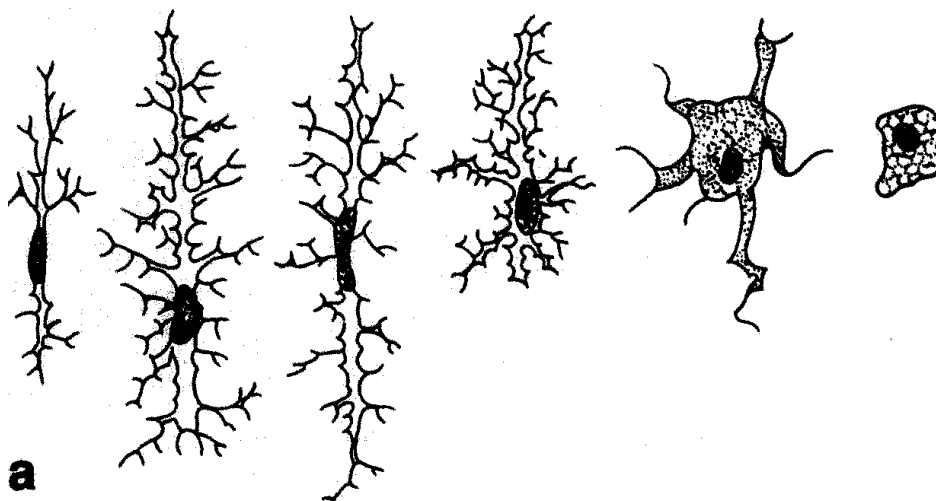


2. ábra. Az apoptózis intrinsic és extrinsic útvonala

2.3. A mikroglia és az Iba 1

A mikroglia az idegrendszer teljes glia populációjának körülbelül 20%-át alkotó sejtípus, amely a központi idegrendszer immunsejtjének tekinthető. A neuronoktól és a többi gliasejttől eltérően, amelyek neuroektodermális eredetűek, a mikroglia sejtek a monocita/makrofág eredetű sejtvonalból származnak. Feladatuk többek között a homeosztázis fenntartása, az elpusztult szöveti elemek eltüntetése, antigén prezentálás, sérüléseket követően a szöveti regeneráció kialakítása (Gehrmann és mtsai, 1995). A mikroglia sejtek egyik tulajdonsága a gyors aktiválódás, melynek segítségével az idegrendszerben lezajló legkisebb változásra is azonnal reagálnak. Számos megfigyelés igazolja, hogy a mikroglia aktivációja a többi sejt reakciója előtt bekövetkezik (Kreutzberg, 1996). Ez arra utal, hogy ezek a sejtek nemcsak az agy integritásának változására reagálnak, hanem a receptorkészletüknek köszönhetően már az agyi mikrokörnyezet finom változásait is érzékelik, így például az ionikus homeosztázis felborulását. Ennek köszönhetően az idegszövet védelmének egyik fő elemeivé válnak és meghatározó szerephez jutnak olyan folyamatokkal szemben, mint a fertőzések, gyulladások, trauma, ischaemia és neurodegeneratív folyamatok (Kreutzberg, 1996).

A mikrogliaknak a központi idegrendszerben különböző megjelenési formája ismert (3. ábra). A nyugalmi/ramifikált mikroglia sejtek nem fagocitálnak. A szürkeállomány területén kis, kerek sejttest és hosszú elágazó nyúlványok jellemzőek rájuk, míg a fehérállományban megnyúlt sejttestű mikroglia figyelhető meg, melyek nyúlványai az idegrostok lefutását követik. Az aktivált/amőboid mikroglia sejtek kerek, gyors fagocitálásra és proliferációra képesek, illetve citokineket, kemokineket (például az IL-1 α/β , amely gyulladáskeltő), citotoxikus anyagokat, fő hisztokompatibilitási komplex (MHC) molekulákat, TNF- α -at (amely az MHC molekulák expressziójára hat) vagy a TGF- β -at (ami immunszuppresszív hatású) termelnek.



3. ábra. A mikroglia morfológiai változása az aktiváció során. (Kreutzberg, 1996)

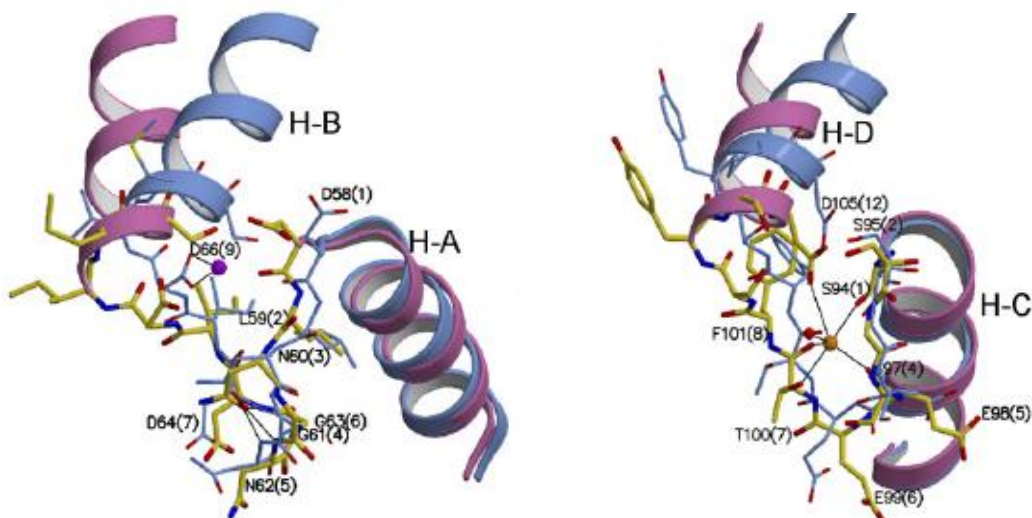
A mikroglia aktivációjának és proliferációjának indukálásában számos molekulának van fontos szerepe. Ezek közé tartoznak a kolóniastimuláló faktorok (M-CSF, GM-CSF). Vizsgálatokkal igazolták, hogy a központi idegrendszer sérülése során a premitotikus aktivált mikroglia sejtekben megnő az M-CSF és GM-CSF receptorok expressziója. Aktivációt serkentő hatással rendelkezhetnek a sejttermelékek, egyes neurotranszmitterek (például az acetilkolin) vagy az extracelluláris ATP (Kreutzberg, 1996; W. Walz és mtsai, 1993; J.M. Langosch és mtsai, 1994).

Tehát a mikroglia fontos szerepet játszanak az idegrendszer védelmében, hiszen fagocitálják a kórokozókat és az elpusztult sejteket, valamint különböző antigéneket és citokineket termelnek.

Az Iba1 147 aminosavból álló, 2,1 Angström, 14,5 KDa molekulásúlyú, ionizált kalcium kötő adapter molekula, mely két EF-hand motívumot tartalmaz, melyek közül a másodikban egy kalcium ion található, az első EF-hand motívum viszont nem tartalmaz kalcium iont (4. ábra).

Specifikusan a monocita/makrofág eredetű sejtvonalban expresszálódik, így a mikroglia és a makrofágokban is kifejeződik. Az Iba1 a mikroglia egyik legjobb marker fehérjeje. Jelentős szerepet játszik más molekulákkal együtt a mikroglia aktivációjában, mely sejtek aktivációjuk során morfológiai változáson mennek keresztül. Aktin-keresztalkötő képességének köszönhetően (képes az L-fimbrinnel kötődni) részt vesz a citoszkeleton reorganizációjában, mely a mikroglia aktivációját vonja maga után (Y. Mitsugu és mtsai, 2006).

Kísérleteink során kevert sejt kultúrában található mikroglia sejtek azonosítására használtuk az Iba1 marker fehérjét.



4. ábra. Az Iba1 EF-hand 1-es és 2-es motívuma. (Mitsugu Yamada és mtsai, 2006)

3. Célkitűzések

A Tanszéken végzett korábbi kísérletek során megállapítást nyert, hogy a patkányok orofaciális bőrének dithranolos kezelése, a trigeminális ganglionban idegsejt pusztulást és monocita/makrofág/mikroglia sejtszám növekedést eredményezett (A. Legradi és mtsai, 2012).

Munkánk elsődleges célja a különböző koncentrációkban in vitro körülmények között alkalmazott dithranolos kezelés idegsejtekre gyakorolt hatásának detektálása. Ennek érdekében E18 patkány embriókból készített kevert, primer kortikális tenyészetben lévő mikroglia sejtekben megjelenő Iba1 marker fehérjét, valamint az apoptózist indukáló kaszpáz 3 molekula idegsejtekben történő expresszióját igyekeztünk detektálni in vitro körülmények között.

Kísérleteink során 7 napig tenyésztett kevert primer kultúrákban fluoreszcens immuncitokémiai és Western analitikai módszerekkel határoztuk meg az Iba1 marker fehérjét és a kaszpáz 3 molekula expresszióját.

4. Anyagok és módszerek

Ezen fejezet célja a kísérleteink során végzett munka és a felhasznált anyagok pontos ismertetése.

4.1. Elsődleges kérgi sejt kultúra készítése 18 napos patkány embriók agykérgéből

Az előkészületek után étterrel elaltattuk a terhes patkányt. Kioperáltuk a 18 napos embriókat a felnőtt patkány méhéből és jégen hűtött, steril Petri csészébe tettük őket.

A steril fülke alatt kivettük az embriókat az embriózsákból és dekapitáltuk őket.

A fejet ezután steril szűrőpapír koronggal ellátott, Petri csésze tetőre helyeztük.

A bőrt és a koponyát óvatosan hátulról a kisagy felől előre felé a frontális lebeny felé haladva elvágtuk és széthúztuk. Kiemeltük a nagyagyat és 2-4 mm-es szekciókat csippentettünk mindkét féltekéből. A darabokat 9 ml DMEM-et (GIBCO, Scotland, UK) tartalmazó steril Petri csészébe helyeztük, 1 ml (2,5 %-os) tripszint adtunk hozzá és (37 °C-on, 5 % CO₂-ben) 10 percig inkubáltuk a sejteket. Ezt követően 1000 G-en centrifugáltuk a sejteket 10 percig 21 °C-on. A centrifugálás végén a felülúszót leöntöttük és a pellettel dolgoztunk tovább. Majd 10 ml (2x5 ml) friss 10 % FBS-t (fötális borjú szérum, GIBCO) tartalmazó DMEM-ben felfuszpendáltuk a sejteket. Újból centrifugáltunk 1000 G-en 10 percig 21 °C-on. Ismét a pelletet meghagyva, azt 2 ml friss 10% FBS-t tartalmazó DMEM-ben felfuszpendáltuk a sejteket. Sejtszámolás Bürker- kamrában (a sejtekből mintát véve 60 µl-t, azokat megfestettük 150 µl trypan kékekkel+ 90 µl 0,9 %-os fiziológiás sóoldattal), a kéken festődő sejtek az elhalt, a szintelenek (vízbuboréknak látszó) az élő sejtek. Ezután kitettük a sejteket 3 ml-es, 5 cm átmérőjű Petri csészébe. Inkubáltuk a sejteket 37 °C-on 5 %-os CO₂ mellett. A médiumot 3 naponta cseréltük a mintáinkon.

4.2. Sejtenyészet összeszedése Western blotra

Leöntöttük a médiumot a sejtenyészetet tartalmazó Petri csészéről. Óvatosan 3 ml fiziológiás sóoldattal kimostuk a médiumot a tenyészetből és leöntöttük. Majd 150 µl precipitáló puffert (50 Mm Tris-HCl, 150 Mm NaCl, 2 mM PMSF, 0,1 % nonidet P, 0,1 % Kolsav, 2 µg/ml leupeptin, 1 µg/ml pepstatin, 2 Mm EDTA) mértünk a csészébe. Összeszedtük a sejteket, majd a csésze tartalmát a pufferrel együtt bele pipettáztuk egy 1 ml-es eppendorf csőbe. Ezt a folyamatot még egyszer megismételtük. Homogenizáltuk, ezt követően 30 percig jégen hűtöttük a mintáinkat. Majd 4 °C-on, 10 percig, 10.000 G-en lecentrifugáltuk. Szétporcióztuk a mintákat 70 µl-enként 0,5 ml-es eppendorf csövekbe. Végül lefagyasztottuk a mintákat.

4.3. Lowry-féle fehérje mennyiség meghatározás

A Western blot analízishez az összegyűjtött minta fehérjetartalmának meghatározását Lowry és mtsai (1951) módszere alapján végeztük el.

4.4. Iba- 1 Western blot tenyészetből

Első lépésként 10 %-os szeparáló gél (4 ml dH₂O, 3,34 ml 30 % acrylamid, 2,5 ml 1,5 M pH 8.8 Tris-HCl, 100 µl 10 % SDS, 100 µl 10 % A.P.S., 10 µl TEMED) öntöttünk, a tetejére dH₂O-t rétegeztünk, majd 30 percet állni hagytuk. Leitattuk a vizet a 30 perc eltelte után. Második lépésben 4 %-os stacking gél (3,05 ml dH₂O, 0,65 ml 30 % acrylamid, 1,25 ml 0,5 M pH 6,8 Tris-HCl, 50 µl 10 % SDS, 50 µl 10 % A.P.S., 5 µl TEMED) öntöttünk, majd a "fésűt" behelyeztük a gélbe, amellyel a zsebeket alakítottuk ki, ezután 15 percet állni hagytuk. Kivettük a "fésűt" a gélből az idő lejáta után. 80V-on, 15 percig előfuttattuk a gél 1x elfo pufferben, melyet 10x elfo pufferből hígítottunk (30 g bázisos Tris, 144 g glicin és 10 g SDS dH₂O-val 1000 ml-re hígítva)

és közben kívülről jéggel hűtöttük az elfo tartályt. Mindeközben kiszámoltuk a felvivendő minták mennyiségét úgy, hogy a zsebekbe 25 µg fehérje kerüljön és a minta–mintapuffer (3,6 ml dH₂O, 1ml 0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 1,2 ml glicerol, 1,6 ml 10 % SDS, 0,4 ml 2-mercaptoetanol, 0,2 ml 0,05 % brómfenol kék) 2:1 arányban legyen hozzáadva, majd 100 °C-on, 5 percig inaktiváltuk a mintákat. Bemértük a zsebekbe a markert (Dual Color Marker, BioRad, Budapest) és a mintáinkat, majd 20 percig 80 V-on, ezt követően 1 órán át 100 V-on futtatuk a mintákat 1x elfo pufferben, kívülről jéggel hűtve az elfo tartályt. Ezt követően szétszedtük az elfo tartályt, összeállítottuk a transzfer "szendvicset" (a géltre membránt helyeztünk) és 1x transzfer pufferben (100 ml 10x-es transzfer puffer, 650 ml dH₂O, 250 ml metanol), melyet 10x-es transzfer pufferből hígítottunk (30,3 g bázisos Tris, 144.1 g glicin, 1000 ml dH₂O), majd 100 V-on, 1 órán át, hűtőszekrényben (4 °C-on) transzferáltunk nitrocellulóz membránra (Amersham). Majd szétszedtük a "szendvicset", a membránt méretre vágtuk, levágtuk a markert és 1 órán át 5 % tejes TBS-TW-ben (100 ml 10x TBS, 900 ml dH₂O, 1 ml Tween-20) blokkoltunk (Az 1x-es TBS-t 10x-es TBS-ből hígítottuk: 60,5 g bázikus Tris, 87,6 g NaCl, 1000 ml dH₂O). Hozzámértük a primer antitestet (poliklonális anti-nyúl Iba1, Wako, Osaka, Japan), 1/1000 hígításban az 1% tejes TBS-TW-hez. Ezután 1 x 10 percig mostuk a membránt TBS-TW-ben. Rátettük a primer antitestet tartalmazó 1% tejes TBS-TW-t a membránra, vizes kamrát készítettünk és egy éjszakán át állni hagytuk a membránt a kamrában.

Másnap 4 x 5 percig mostuk a membránt TBS-TW-ben. Közben belemértük a peroxidáz konjugált anti-nyúl IgG, azaz a szekunder antitestet (HRPO-GAR, Sigma Aldrich), 1/2000 hígításban az előző napról megmaradt 1 % tejes TBS-TW- be. Rátettük a szekunder antitestet a membránra, mellyel megjelöltük a bekötődött primer antitesteket és 1 órán át sötétben állni hagytuk. Ezután 4 x 5 percig mostuk a membránt TBS-TW-ben. Rátettük a membránra a chemiluminescent (Supersignal West Pico Chemiluminescent substrat, Pierce, Rockford) és 5 percig állni hagytuk. Ezek után sötétben filmet (ECL autoradiográfiás film, Amersham, Buckinghamshire, UK) vágunk a membránra és 20 percig exponáltunk sötétben. Előhívtuk (Kodak GBX hívó, Sigma Aldrich) a filmet, ezután fixáltuk (Kodak fixir, Sigma Aldrich). Majd 1 x 10 percig mostuk a membránt TBS-TW-ben. Végül Ponceau festékbe tettük a membránt és 15 percig állni hagytuk, az idő elteltével dH₂O-val kimostuk a felesleges festéket a membránból és hagytuk megszáradni.

4.5. Sejtek fixálása fluoreszcens immuncitokémiai vizsgálatokhoz

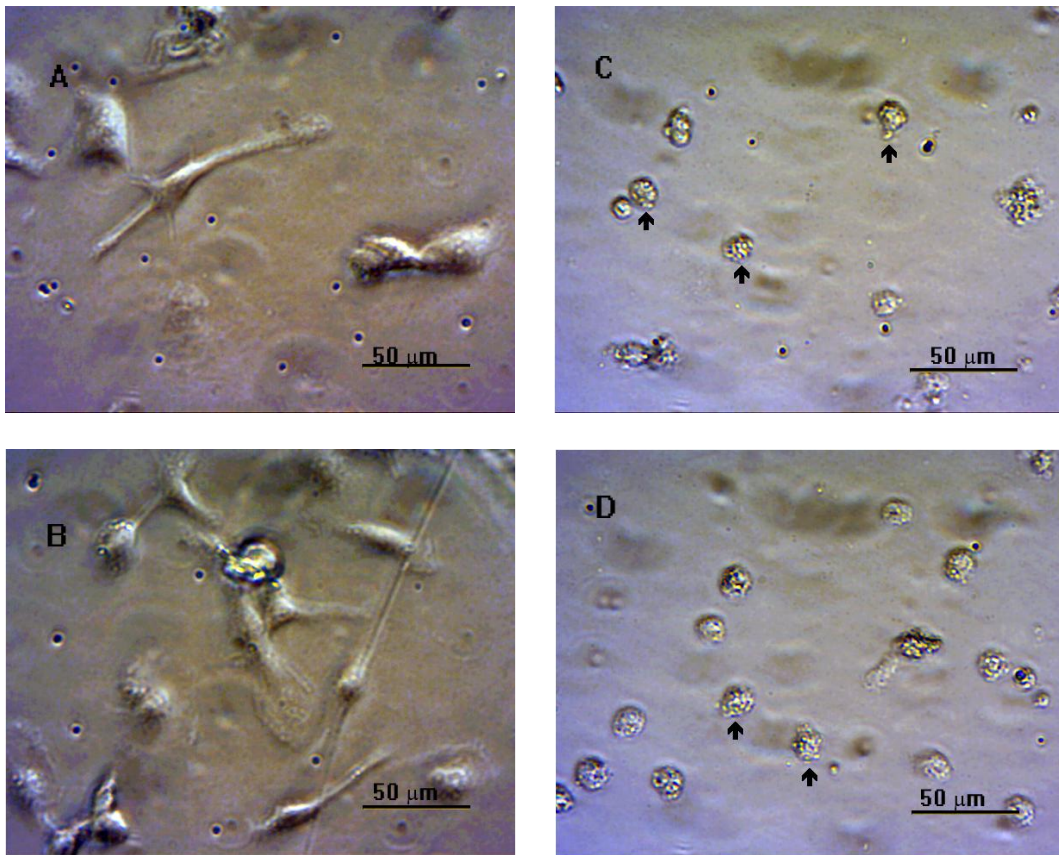
A fedőlemezeken tenyésztett sejtekről leöntöttük a tápfolyadékot, majd 2 ml 0,05 M-os PBS-sel (50 ml 10x-es PBS puffer, 450 ml dH₂O) leöblítettük őket, ügyelve arra, hogy ne mossuk le a sejteket a fedőlemezekről. Ezt követően fixáltuk a sejteket 4%-os formaldehid oldatban 20 percig, majd a fedőlemezeket 0,05 M-os PBS oldattal 3x5 percig mostuk. Ezután 10-15 percig szárítottuk a fedőlemezeket steril fülkében, majd felhasználásig Petri csészékben, mélyhűtőben tároltuk.

4.6. Immuncitokémia sejtenyészetből

A mintákat 5 percig 2 ml 0,05 M-os PBS- ben mostuk. Permeabilizálás: elkészítettük a permeabilizáló oldatot (0,05 % Triton-X 100, 1 % BSA (borjú szérum albumin, Sigma Aldrich), 5 % NGS (normál kecske szérum, Sigma Aldrich), 50 µl 0,05 M PBS), majd kettéosztottuk. Az egyik feléhez hozzáadtunk Triton-X 100-at és ebből a kiszámolt mennyiséget kivéve hozzáadtuk a primer antitest(ke)t (anti-nyúl IgG Iba1 vagy anti-nyúl IgG kaszpáz 3, mindkettőt 1/200 hígításban). Rápipettáztuk a mintákra a permeabilizáló oldatot és 30 percre betettük a 37 °C-os inkubátor szekrénybe. Rápipettáztuk a mintákra a primer antitestet. Nedves kamrát készítettünk, majd behelyeztük a mintáinkat és lezártuk. Egy éjszakán át 4°C- os hűtőszekrényben állni hagytuk. Másnap 4 x 10 percig 0,05 M-os PBS- ben mostuk a mintáinkat. Közben hozzáadtuk a Triton-X mentes permeabilizáló oldathoz a fluoreszcensen jelölt szekunder antitest(ke)t (Alexa 488 anti-egér IgG (zöld), Alexa 568 anti-nyúl IgG (piros)) 1/1000 hígításban és mikor letelt a mosási idő rátettük a mintáinkra és 3 órán át sötétben, szobahőn állni hagytuk. Ezt követően 4 x 10 percig PBS- ben mostuk a mintáinkat. Mindezt követően Hoechst- festéssel (biszbenzamid: Hoechst festék ,EEC Nr. 245-690-6, Sigma Aldrich) megfestettük a sejtmagokat (0,5 µl/ ml- is oldatot készítettünk a festékből és PBS –ből). 10 percig állni hagytuk. Majd 2 x 10 percen át kimostuk a mintáinkból a felesleges festéket (polivinil pirrolidin, Sigma Aldrich) PVP/ PBS 1 mg/ml- es oldatával. Az utolsó 10 perc letelte előtt felállítottuk a fedőlemezeket és megszárítottuk őket. Tárgylemezre Vectashieldet (Vectashield, Vectar Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) cseppentettünk és ráhelyeztük a mintát tartalmazó fedőlemezt, amit körömlakkal rögzítettünk. Epifluoreszcens (Nikon Microphot FXA) mikroszkópon megvizsgáltuk a metszeteket és fotót készítettünk SPOT RT digitális kamera segítségével róluk.

5. Eredmények és értékelésük

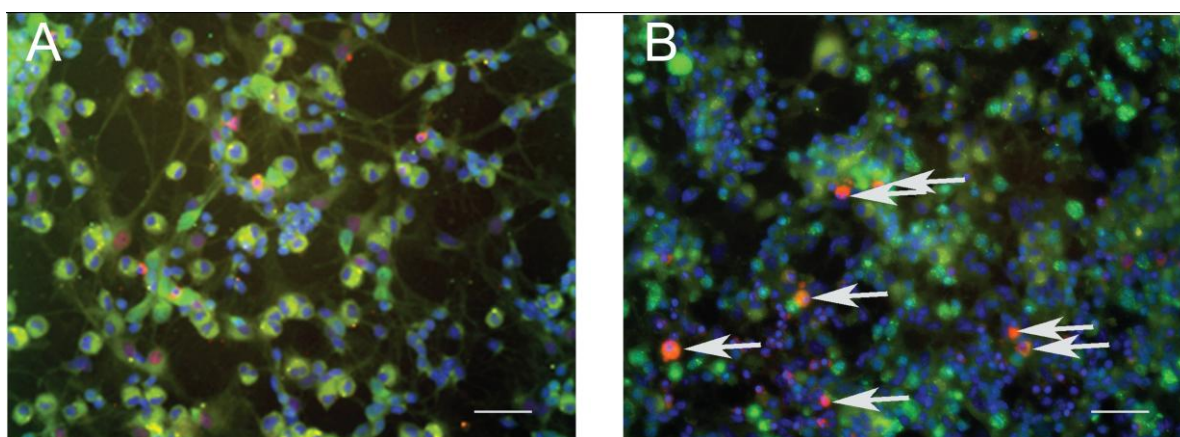
A mikroszkópos vizsgálataink során kiderült, hogy az E18 patkány primer kortikális kevert, 7 napon át tenyésztett, majd 6 órán át 0,5 μM koncentrációjú dithranollal kezelt tenyészetekben nagyszámú elpusztult sejt volt megfigyelhető (1. ábra. A-B: nem kezelt, kontrol tenyészet; C-D: 0,5 μM dithranollal kezelt tenyészet). Mint az az 1. ábrán is jól látható, a sejtek lekerekedtek, sejtmagjuk kondenzálódott és kis aggregátumok jelentek meg bennük.



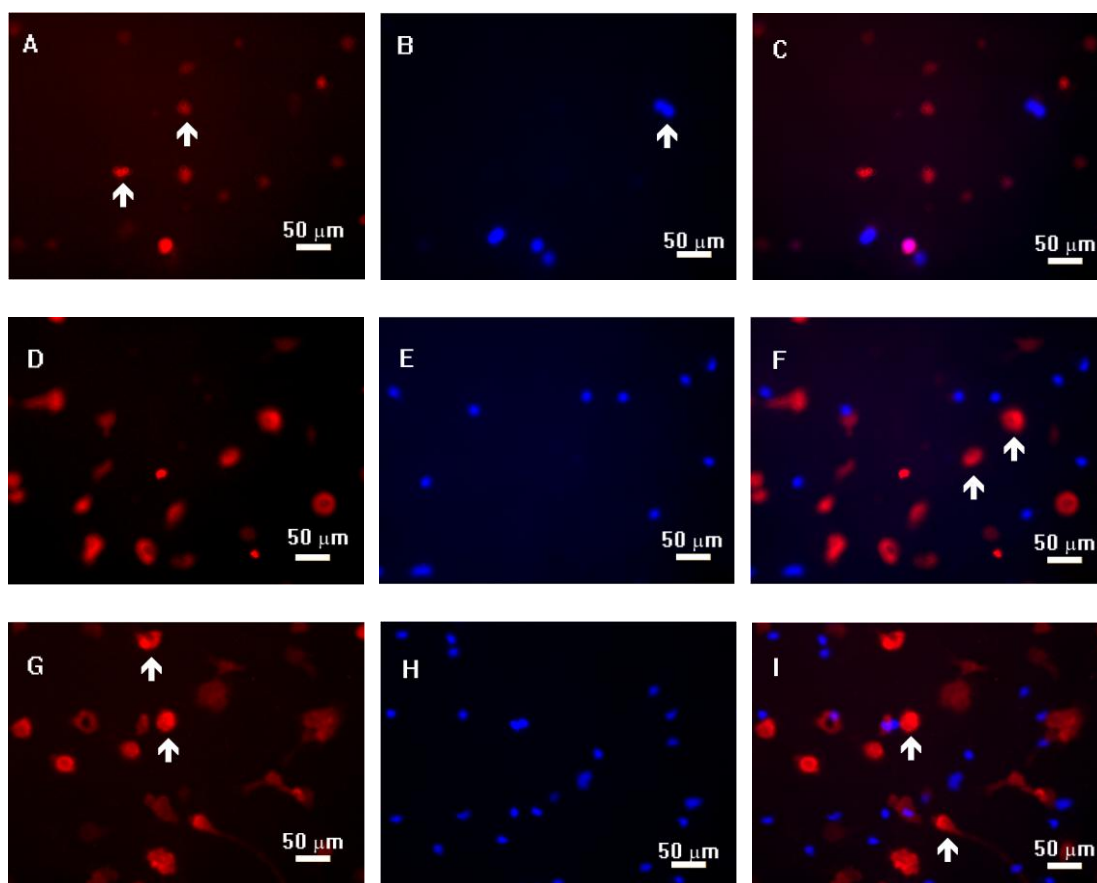
1. ábra. 7 napos E18 patkány embrió primer kortikális sejttenyészet. A-B: kontrol, ép neuronokat tartalmazó sejttenyészet. C-D: 6 órán keresztül 0,5 μM -os Dithranollal kezelt sejttenyészet. A felvételeken apoptotizáló sejtek (fekete nyíl) láthatók, melyekben kis aggregátumok jelentek meg.

A fluoreszcens immuncitokémiai vizsgálatok során megfigyeltük, hogy a kultúrában lévő idegsejtekben expresszáldott a kaszpáz 3 molekula, amely arra engedett következtetni, hogy ezekben a sejtekben elindult az apoptózis (2. ábra). A munka folyamán 0,5 μ M koncentrációjú DMSO-val (dimetil-szulfoxid) és ugyan ilyen koncentrációban 3 órán át dithranollal kezeltük a kevert kultúrákat. A DMSO-val kezelt kultúrákban a sejtek épek maradtak és csak kevés sejtben jelent meg a kaszpáz 3, melyekről feltételezhetjük, hogy nem a DMSO miatt következett be az apoptózisuk. Ám a dithranollal kezelt sejtenyészetekben jelentősen megnőtt a kaszpáz 3 pozitív sejtek száma, a sejtek szétestek, sejtalkotóik kis aggregátumokba csomagolódtak.

Munkánk során megfigyeltük, hogy a különböző kezelések hatására (dithranol, DMSO, LPS) a kevert kultúrákban lévő mikroglia sejtek aktiválódtak, amőboid morfológiát mutattak és expresszálták az Iba1 marker fehérjét a citoplazmájukban (3. ábra). Azonos 0,5 μ M-os koncentrációban alkalmaztuk a dithranolt, a DMSO-t és az LPS-t (lipopoliszaharid, bakteriális sejtalkotó, melynek hatására a kultúrákban aktiválódnak a mikroglia) is. Megfigyeltük, hogy a dithranolos tenyészetben sokkal kevesebb mikroglia sejt maradt, mint a DMSO-sban vagy a dithranol+LPS-esben. Ez azért lehet így, mert a dithranol olyan erős gyulladást keltő illetve szövetkárosító molekula, hogy nemcsak a neuronokat, hanem a mikroglia sejteket is elpusztítja.

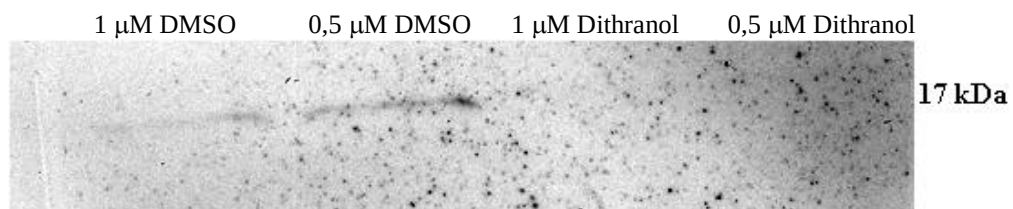


2. ábra. A kaszpáz 3 expressziója neuronokban 0,5 μ M koncentrációjú, 3 órás dithranol kezelés hatására 7 napos E18 patkány primer kortikális kultúrában (Dr. Légrádi Ádám, Dr. Gulya Károly, 2012). A: (kontrol) 0,5 μ M DMSO-val kezelt, ép neuronokat tartalmazó tenyészet, B: 0,5 μ M dithranollal kezelt apoptotizáló sejteket tartalmazó tenyészet, a kaszpáz 3 (nyíl) pirosan fluoreszkál a képen, kék színnel a sejtmagokat, zölddel a sejtek β -tubulinjait látjuk. Scale bar: 50 μ m



3. ábra. Aktivált/amőboid Iba1 marker fehérjét expresszáló mikrogliaák megjelenése E18 patkány primer kortikális kevert kultúrában. A-B-C: 0,5 μ M koncentrációjú dithranollal 6 órán át kezelt sejtek, A: Iba1 expresszió (nyíl) a mikrogliaák citoplazmájában, B: Hoechst festéssel megfestett kék sejtmagok (nyíl), C: Kompozit; D-E-F: 0,5 μ M koncentrációjú DMSO-val 6 órán át kezelt sejtek (kontrol), D: Iba1, E: Mag, F: Kompozit; G-H-I: 0,5 μ M koncentrációjú dithranollal+ 100 ng LPS-sel 6 órán át kezelt sejtek, G: Iba1, H: Mag, I: Kompozit. A dithranollal kezelt kultúrákban jelentősen csökkent az Iba1-et expresszáló mikroglia sejtek száma.

Az Iba1 Western analitikai vizsgálatok során a vártak megfelelően 17 kDa-os csíkokat detektáltunk (4. ábra). Ám a dithranollal kezelt mintákban olyan gyenge volt az Iba1 immunreaktivitása, hogy ott nem sikerült detektálni a csíkokat. Ennek oka, hogy dithranol hatására a kultúrákban az Iba1-et expresszáló mikroglia sejtek is apoptotizáltak.



4. ábra. Iba1 immunreaktivitás kevert primer kérgi tenyészetben. Az Iba1 immunreaktivitást a várt 17 kDa molukulatömegnél detektáltuk, azonban a dithranollal kezelt sejtenyészetekben nem jelent meg. Ez arra utal, hogy a dithranol az aktív, Iba1-et expresszáló mikroglia sejteket is elpusztította.

6. Megbeszélés

A dithranol a pikkelysömör kezelésében használt gyűrűs szénhidrogén származék, melyet gyulladáskeltő illetve apoptózis indukáló tulajdonsága miatt választottunk vizsgálataink célpontjául. A bőrgyógyászatban a keratinocita plakkok megszüntetésében, azaz tüneti kezelésként alkalmazzák, ugyanis a DNS- hez kötődik és gátolja az idegszálak UCH-L1 (ubiquitin carboxylterminal hidrolas L1 gén) immunreaktivitását, valamint a proliferatív hámsejtek osztódását és szabadgyökök felszabadulását idézi elő, mellyel szövetkárosodást és gyulladásos folyamatok elindulását váltja ki.

Korábbi kísérleteinkben in vivo patkánymodellel kimutattuk, hogy az orofaciális bőrfelszín dithranolos kezelése a trigeminus ganglionban lévő neuronok pusztulását, majd a mikroglia eredetű sejtek felszaporodását okozza és Iba1 expressziót vált ki a mikroglia sejtekben.

Munkánk során arra voltunk kíváncsiak, hogy az idegrendszerben in vitro is ezt a hatást váltja-e ki a dithranol. Kísérleteink során (immuncitokémiai vizsgálatok) igazolódni látszott a feltételezésünk, miszerint a dithranol szabadgyökök képzésével apoptózist indukál (károsítja a sejtek membránját) a neuronokban és az elhalt sejtek hatására aktiválódnak az Iba1 kalcium kötő marker fehérjét expresszáló mikroglia sejtek, melyek fagocitálják az elpusztult neuronokból keletkező aggregátumokat, hogy ne alakuljon ki helyi gyulladásos folyamat. Ám a Western blot analízis és immuncitokémiai vizsgálatok során az is kiderült, hogy a dithranol olyan erős gyulladáskeltő szer, amely a legkisebb általunk alkalmazott koncentrációban (0,5 μ M) is elpusztította a mikroglia sejteket, így nehezen vagy egyáltalán nem tudtuk az Iba1-et detektálni a mintáinkban.

7. Irodalomjegyzék

- I. Orojan, Cs. Szigeti, Sz. Varszegi, E. Dobo, K. Gulya: Dithranol abolishes UCH-L1 immunoreactivity in the nerve fibers of the rat orofacial skin. *Brain Research* 1121 (2006) 216-220
- A. McGill, A. Frank, N. Emmett, D. M. Turnbull, M. A. Birch-Machin, N. J. Reynolds: The anti-psoriatic drug anthralin accumulates in keratinocyte mitochondria, dissipates mitochondrial membrane potential, and induces apoptosis through a pathway dependent on respiratory competent mitochondria. *The FASEB Journal* 2005.
- D. Vinatier, Ph. Dufour, D. Subtil: Apoptosis: A programmed cell death involved in ovarian and uterine physiology, *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology* 67 (1996) 85-102
- J. Gehrmann, Y. Matsumoto, G. W. Kreutzberg: Microglia: intrinsic immunoeffector cell of the brain. *Brain Research Reviews* , 269-287, 1995
- W. Walz et al. (1993) *J. Neuroscience* 13, 4403-4411
- J.M. Langosch et al. (1994) *Br. J. Pharmacol.* 113, 29-34
- G. W. Kreutzberg: Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neuroscienc*, 19 (1996), 312-318
- Y. Mitsugu, O. Keiko, I. Yoshinori, K. Shinichi, K. Shigehiro: X-ray Structures of the Microglia/Macrophage-specific Protein Iba1 from Human and Mouse demonstrate novel molecular conformation change induced by calcium binding. *ScienceDirect* (2006) 364, 449-457
- A. Legradi, K. Gulya: Dithranol and corticosteroid treatments of the orofacial skin oppositely affect monocyte/macrophag/microglia in the rat trigeminal ganglion

8. Köszönetnyilvánítás

A Tudományos Diákköri munkám elkészítéséhez köszönetet mondok Dr. Gulya Károly Professzor Úrnak SZTE ÁOK- TTIK Sejtbiológia és Molekuláris Medicina Tanszék vezetőjének, hogy lehetővé tette azt, hogy a Tudományos Diákköri munkám a Tanszéken végezhessem el. Dr. Légrádi Ádám egyetemi adjunktusnak (SZTE ÁOK- TTIK Sejtbiológia és Molekuláris Medicina Tanszék), aki a munkám során segítséget nyújtott és jó tanácsokkal látott el. Emellett köszönöm Ambrus Józsefné és Darányi Istvánné laborasszisztenseknek a kísérleteim során nyújtott segítséget.

2012. október 22.

.....Martos Diána.....

Aláírás

9. Nyilatkozat

Alulírott Martos Diána Biológus MSc szakos hallgató kijelentem, hogy a TDK dolgozatban foglaltak saját munkám eredményei és csak a hivatkozott forrásokat (szakirodalom, eszközök) használtam fel.

2012. október 22.

.....Martos Diána.....

Aláírás