



SZENT ISTVÁN EGYETEM
ÁLLATORVOS-TUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA

A disztrofin fehérjecsald: lokalizáció és fiziológias szerep

Doktori értekezés tézisei

Készítette:
Hazai Diána

Témavezető:
Dr. Jancsik Veronika

2007

Szent István Egyetem
Állatorvos-tudományi Doktori Iskola

Témavezető:

Dr. Jancsik Veronika,
Biológia-tudomány kandidátusa
Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Kar
Anatómiai és Szövettani Tanszék

Témabizottsági tagok:

Dr. Halasy Katalin,
MTA doktora
Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Kar
Anatómiai és Szövettani Tanszék

Dr. Baska Ferenc,
Állatorvos-tudományok kandidátusa
Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Kar
Kórbonctani és Igazságügyi Állatorvostani Tanszék

Bevezetés

Az izomrendszer sorvadásával járó, örökletes betegségek egyik leggyakrabban előforduló tagja a gyerekkorban lezajló, X kromoszómához kötött, ma még gyógyíthatatlan Duchenne-féle izomdisztrófia (DMD). A Duchenne-féle izomdisztrófia kialakulásáért a disztrofin génben történt mutáció a felelős, aminek következtében zavart szenved a disztrofin fehérje termelődése a szervezetben.

A disztrofin fehérje a harántcsíkolt izomrostot határoló membránban, a szarkolemmában elhelyezkedő fehérje komplex, az úgynevezett disztrofin-asszociált fehérje komplex (**D**ystrophin-**A**ssociated **P**rotein **C**omplex, rövidítve: DAPC) egyik kulcsfontosságú tagja. A DAPC szerepe, hogy összeköttetést biztosítson az extracelluláris mátrix komponensek és az aktin alapú sejtvázas között, illetve számos jelátviteli fehérjét képes a membránhoz kihorgonyozni. Ismert, hogy az utrofin a disztrofin fehérje autoszomális homológja, szerkezetük nagyon hasonló és részben helyettesíthetik is egymást a DAPC-ben.

A DMD betegek egy részében az izomsorvadás mellett, enyhe, szelektív kognitív károsodások is fellépnek. A verbális IQ, az olvasási képesség, a szövegértés és a tanulási képesség érintett, emellett memóriazavarok is előfordulhatnak. Ezek a tünetek arra utalnak, hogy a DAPC-nek az idegi működésben is fontos szerep jut, bár ez a szerep ma még nem tisztázott.

Számos kutatás bizonyítja, hogy a központi idegrendszer ideg- és gliasejtjeiben a disztrofin mellett egyéb DAPC fehérjék is jelen vannak, melyek kölcsönhatásba lépnek egymással, kialakítva ezzel a különböző disztrofin-asszociált fehérje komplexeket. Az agyban leggyakrabban előforduló disztrofin fehérje a Dp71.

A disztrofin-rokon és disztrofin-kötő disztrobrevinek fontos tagjai a DAPC-nek, mert a jelátviteli utakban részt vevő

adapter molekulákat, a szintrofinokat képesek a komplexhez kapcsolni. A disztrobrevinek csak a disztrofinon, vagy az utrofinon keresztül tudnak a DAPC-hez kötődni.

Ismereteink az agyban előforduló DAPC-k fehérje összetételéről, a komplexet alkotó fehérjék lokalizációjáról és kolokalizációjáról elég hiányosak, ami további kutatásokat indokol. Érdekes kérdés ugyanezen fehérjék előfordulásának vizsgálata a disztrofin fehérjét nem termelő mutáns, $mdx^{\beta geo}$ egerekben. Mivel az agyon belül a vér-agy gát kialakításában szerepet játszó kapillárisok körül is számos DAPC fehérje megtalálható, felmerül a kérdés, hogy az egyéb szöveti gátakat létrehozó szervekben (mint a herében, tüdőben) vajon előfordulnak-e DAPC fehérjék.

A munka célja

I. Az agyban leggyakrabban előforduló disztrofin, a Dp71 egyik splice-variánsának, a Dp71f fehérjének ultrastrukturális lokalizálása patkány agyban.

II. Az α -disztrobrevin fehérje kimutatása gliasejtekben vad típusú és disztrofin hiányos $mdx^{\beta geo}$ egér agyában, az agyi erekben. Egyes DAPC fehérjék, mint a β -DB és az utrofin kolokalizációjának vizsgálata α -DB-el gliasejtekben vad típusú egér agyi ereiben.

III. Miután az α -DB fehérjét idegsejtekben is sikerült kimutatnunk a laterális hypothalamus területén, célul tűztük ki annak kiderítését, hogy az α -DB fehérjék közül mely izoformák lokalizálódnak az idegsejtekben a vad típusú és disztrofin hiányos $mdx^{\beta geo}$ egér agyában.

IV. A hypothalamus idegsejtjeiben kimutatott α -DB2/ α -DB4 kolokalizációjának vizsgálata β -DB és utrofin fehérjével, illetve a hypothalamusban termelődő egyes neuropeptidekkel, mint a galaninnal, neuropeptid Y-al, melanin koncentráló hormonnal és a neuronális nitrogén-oxid szintetázal, vad típusú és disztrofin hiányos $mdx^{\beta geo}$ egér agyában.

V. Az α -DB fehérje lokalizációja egyes szöveti gátaakat képező szervekben, a vad típusú egér heréjében és a tüdejében.

Anyag és módszer

A felhasznált állatok

Felnőtt, hím Wistar patkányokat, felnőtt, hím C57BL/6 vad típusú és mdx ^{β_{geo}} transzgenikus egereket használtunk.

Alkalmazott módszerek

A vizsgálatok során immunhisztokémiai és immuncitokémiai módszerek segítségével végeztünk fénymikroszkópos, immunfluoreszcens mikroszkópos (egyszeres és többszörös jelöléses) illetve transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálatokat.

Eredmények

- Morfológiai bizonyítékot szolgáltatunk a Dp71f disztrofin izoforma ultrastrukturális lokalizációjára patkány agyban a hippocampus CA3 régiójának stratum lucidum rétegben.

A Dp71f-et axo-dendritikus és tükesszinapszisok posztszinaptikus denzitásában találtuk meg. A jelölt és az ezekkel morfológiailag azonos immunnegatív szinapszisok heterogén eloszlást mutattak. A moharostok terminálisai által adott szinapszisokban a Dp71f nem volt kimutatható.

A szinaptikus helyeződésen kívül a Dp71f fehérjét egyes mielinhüvely nélküli és mielinhüvelyes axonokban is kimutattuk. A kötegeket képző mielinhüvely nélküli moharostokban az immunreakció az axonális membránt jelölte körbe. A mielinhüvelyes axonokban a jelölés az axoplazmában, a sejtvezék alkotó elemekhez kapcsolódott. Más, szerkezetileg hasonló mielinhüvelyes axonokban jelölés nem volt.

Új eredményünk, hogy a Dp71f fehérjét sikerült az irodalomban eddig nem említett sejtkompartimentben (axonokban) kimutatni és elektronmikroszkópos bizonyítékot szolgáltatunk a Dp71f szinapszisok posztszinaptikus denzitásában való megjelenésére.

- Néhány DAPC fehérje (α -DB, β -DB, utrofin) lokalizációját és kolokalizációját vizsgáltuk meg az agyi erekben normál és $mdx^{\beta geo}$ egerekben.

Az α -DB az agyi erek falában az asztrocita végtalpokban volt jelen. Az α -DB és az utrofin fehérjék, illetve az α -DB és β -DB fehérjék minden vizsgált agyterületen a kapillárisok falában kolokalizálódtak.

A disztrofin fehérjét nem termelő mdx^{bgeo} állatok és a vad típusú egerek összehasonlítása alapján az összes vizsgált agyterületre vonatkozóan a mutáns állatban sokkal kevesebb ér volt immunpozitív. Az ultrastrukturális vizsgálatokból kiderült, hogy az immunjelölés a perikapilláris asztrocita végtalpakban jól észrevehetően lecsökkent. Hipotézisünk szerint a α -DB fehérje szintjének lecsökkenése a disztrofin hiányával magyarázható, mivel a disztrofin nélkül a DB nem tud a DAPC-hez kapcsolódni. Az, hogy a fehérje nem tűnik el teljesen az erek falából, feltehetően az utrofin disztrofin helyettesítő hatásával magyarázható. A normál és disztrofin hiányos egerek agyi ereivel kapcsolatos eredményeink tovább bővítik az erekben felépülő DAPC szerkezetére vonatkozó ismereteket.

- Új eredményünk, hogy az α -DB fehérjét az agyi erekben kívül az idegsejtek egy speciális csoportjában is megtaláltuk, a laterális hypothalamusban a Bregma -1,22 mm és -1,94 mm közötti területen, normál és mdx^{bgeo} egerekben. A fehérje az idegsejtek sejttestében, nyúlványaiban és szinapszisainak posztszinaptikus denzitásában expresszálódik. A sejttesten belül az erősen kitágult endoplazmatikus retikulum ciszternáinak membránjához kapcsolódik a luminális oldalon. A jelölt sejttestek közelében lévő immunpozitív nyúlványok és posztszinaptikus denzitások valószínűleg az immunpozitív sejttestekhez tartoznak. Tisztáztuk, hogy a vizsgált α -DB fehérjék közül az idegsejtekben csak az α -DB2 és/vagy az α -DB4 izoformák fejeződnek ki, az α -DB1 neuronokban nem expresszálódik. Az α -DB2/ α -DB4 a neuronok citoplazmájában a β -DB fehérjével kolokalizálódott a laterális hypothalamus körülhatárolható neuron csoportjában. A β -DB a

citoplazmán kívül a neuronok sejtmagjában is megjelent. A β -DB olyan neuronokban is kimutatható volt, amelyek α -DB2-t nem tartalmaztak.

Kimutattuk továbbá, hogy az α -DB2/ α -DB4 az utrofinnal, az nNOS-sal, NPY-al és a galaninnal nem kolokalizálódott ezekben az idegsejtekben, de az α -DB2/ α -DB4 tartalmú neuronok MCH neuropeptidet is expresszálnak vad típusú és *mdx^{bgeo}* egerekben,.

A lateralis hypothalamusban lokalizált α -DB2/ α -DB4 fehérje neuronális megjelenése az irodalomban eddig még nem leírt, teljesen új eredmény.

- Az idegrendszeren kívül a herében és a tüdőben is vizsgáltuk az α -DB fehérje eloszlását vad típusú egérben, elektronmikroszkópos szinten. Az α -DB a herében a vér-here, a tüdőben a vér-levegő gát egyes elemeiben volt kimutatható. A herében az α -DB fehérjét a Sertoli sejtek plazmamembránjának alaphártyával érintkező és a csírasejtek felé néző részén, tüdőben az alveolusok falát felépítő 1-es típusú alveolaris epitelsejtek citoplazmájában detektáltuk. A herében és a tüdőben általunk leírtak hozzájárulnak a vér-here, vér-levegő gát és a DAPC kapcsolatának tisztázásához.

Az egyes DAPC fehérjék lokalizációja és kolokalizációja hozzájárul a központi idegrendszerben, a herében és a tüdőben felépülő disztrofin-asszociált fehérje komplexek szerepéről meglévő ismeretek bővüléséhez és hosszú távon közelebb visz a DMD fiziológiai és patológiai mechanizmusainak megértéséhez.

Saját közlemények jegyzéke

Folyóirat cikkek

Diana Hazai, Katalin Halasy, D. Mornet, F. Hajós, Veronika Jancsik: **Dystrophin splice variants are distinctly localized in the hippocampus**

Acta Biologica Hungarica Volume 57, Number 2/2006 pp. 141-146

Hazai Diána: **A Duchenne-féle disztrófia, örökletes izomsorvadás**

Élet és Tudomány, 2006/3, 86-87

Chung Fu Lien, Diana Hazai, Davy Yeung, Tan Juraini, Ernst-Martin Füchtbauer, Veronika Jancsik, Dariusz C. Górecki: **Expression of alpha-dystrobrevin in blood-tissue barriers: sub-cellular localisation and molecular characterisation in normal and dystrophic mice**

Cell and Tissue Research, 2007 327(1):67-822006.

Diana Hazai, Chung Fu Lien, Katalin Halasy, Ferenc Hajos, Dariusz C. Górecki, Veronika Jancsik: **Synaptic expression of alpha-dystrobrevin: localisation of a short α -dystrobrevin isoform in melanin-concentrating hormone neurons of the hypothalamus.**

közlésre beküldve

Előadás és poszter absztraktok

Jancsik Veronika, Halasy Katalin, Hazai Diána, Hajós Ferenc: **Differential distribution of dystrophin splice variants in the brain.**

16th European Cytoskeletal Forum Meeting, Maastricht, Hollandia, 2001.

Hazai Diána, Halasy Katalin, Mornet Dominique, Jancsik Veronika: **Distribution of Dp71f, a dystrophin family protein, in hippocampal neurons.**

Magyar Ideg tudományi Társaság IX. Kongresszusa Balatonfüred, 2003.

Hazai Diána, Jancsik Veronika: **Members of the dystrophin glycoprotein complex in the hippocampus.**

International IBRO Workshop, Budapest, 2004. Clinical Neuroscience/Ideggyógyászati Szemle 57. évfolyam, 1. különszám, p. 24

Hazai Diána, Jancsik Veronika, Kis Zsuzsanna, Kacs Kovics Imre: **Preparation and characterization of a new anti-DP71 antibody**

Magyar Tudományos Akadémia, Akadémiai Beszámoló, Budapest, 2004.

Hazai Diána, Jancsik Veronika, Górecki Darius C: **Alpha-dystrobrevin immunoreactivity in the adult mouse brain; occurrence in glial endfeet and in a subpopulation of hypothalamic neurons.**

Magyar Ideg tudományi Társaság XI. Kongresszusa, Pécs, 2005. Clinical Neuroscience/Ideggyógyászati Szemle 58. évfolyam, 1. különszám, p. 40

Hazai Diána, Górecki Darius C, Halasy Katalin, Hajós Ferenc, Jancsik Veronika: **Characterization of the alpha-dystrobrevin immunoreactive neurons in the lateral hypothalamus.**

International IBRO Workshop Budapest, 2006. Clinical Neuroscience/ Ideggyógyászati Szemle 59. évfolyam, 1. különszám, p. 26

Köszönetnyilvánítás

Elsőként hálával tartozom témavezetőmnek, Dr. Jancsik Veronikának a támogatásáért, szakmai tanácsaiért, értékes észrevételeiért és kritikáiért. Köszönettel tartozom Prof. Sótonyi Péternek, a Szent István Egyetem Állatorvos-Tudományi Kar Anatómiai és Szövetani Tanszékének tanszékvezetőjének, hogy lehetővé tette számomra a disszertáció elkészítését. Ezúton szeretnék köszönetet mondani Dr. Halasy Katalinnak, aki hasznos tanácsai mellett a laboratóriumi munka során is rengeteg segítséget nyújtott. Köszönöm Dr. Német Lászlónak a támogatást, Dr. Baranyai Tibornak és Dr. Fekete Csabának a dolgozatban szereplő fénymikroszkópos felvételek elkészítésében nyújtott segítségüket, az Állatorvos-tudományi kar Kórbonctani és Igazságügyi Állatorvostani Tanszékének pedig az elektronmikroszkóp használatának lehetőségét. Ezúton köszönöm meg Pető Klára és Szász Olga asszisztensnőknek a munka egésze alatt nyújtott segítségét. Végül, de nem utolsósorban hálával tartozom családomnak és barátaimnak a türelmükért és a támogatásukért.