A transzformáló növekedési faktor béta fehérjék a központi idegrendszerben

Doktori tézisek

dr. Vincze Csilla

Semmelweis Egyetem
Szentágothai János Idegtudományi Doktori Iskola

Témavezető: Dr. Dobolyi Árpád tudományos főmunkatárs, az MTA doktora

Hivatalos bírálók: Dr. Kittel Ágnes tudományos tanácsadó, az MTA doktora
Dr. Vastagh Ildikó egyetemi adjunktus, PhD

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Molnár Mária Judit egyetemi tanár, az MTA doktora
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Fejér Zsolt egyetemi adjunktus, PhD
Dr. Pánczél Gyula, osztályvezető főorvos, PhD

Budapest
2014

I. BEVEZETÉS

Az 1980-as években olyan kis molekulasúlyú, hő- és saválló polipeptideket izoláltak, melyek normál patkány vese fibroblasztok onkogenikus transzformációját indukálni képesek. Ezeket a polipeptideket a transzformáló tulajdonság alapján transzformáló növekedési faktoroknak (TGF) nevezték el. Szerkezetük alapján a transzformáló növekedési faktorokat alfa és béta csoportra osztották. Előbbiek az epidermális növekedési faktorok családjába tartoznak, míg utóbbiak egy önálló növekedési faktor szupercsaládnak lettek tagjai, melyet az elsőként izolált transzformáló növekedési faktor β1 után transzformáló növekedési faktor béta szupercsaládnak neveztek el. Aminosav szekvencia homológia alapján a TGF béta szupercsaládon belül több főbb csoportot különböztetünk meg: a transzformáló növekedési faktor β családot, a csont morfogenikus proteineket (bone morphogenic protein, BMP), az aktivinek és inhibinek családját, az anti-Müller hormont, a növekedési-differenciálódási faktorokat (growth differentiation factor, GDF) a Drosophilában jelen levő decapentaplegikus proteineket, valamint a Xenopusban a vegetal-1 proteineket. A három emlős TGF-β fehérjét (TGF-β1,-β2,-β3) különböző kromoszómákon elhelyezkedő három elkülönülő gén kódolja. A TGF-β fehérjék a sejtek proliferációját, differenciálódását és túlélését szabályozzák, valamint a sejtek migrációját is befolyásolják. Immunológiai hatásaik miatt citokineknek is tekinthetők. A TGF-β-k különböző gének termékeként, 390-412 aminosav nagyságú prekurzor proteinekként

szintetizálódnak, és intracelluláris módosítások után inaktív, ún. látens formában szekretálódnak. A prekurzor proteint a Golgi apparátusban egy furin típusú proteáz hasítja, az "érett" TGF-β-t tartalmazó C-terminális vég azonban nem kovalens kötéssel továbbra is kapcsolatban marad az N-terminális propeptiddel, melyet LAP-nek (latency associated protein) neveznek. Ezek a monomerek diszulfid kötésekkel dimerizálódnak és létrehozzák így az ún. kis látens komplexet. A kis látens komplexhez továbbá kovalensen kapcsolódnak a látens TGF-β kötő proteinek (latent TGF-β binding protein, LTBP), létrehozva az ún. TGF-β nagy látens komplexet. A 4 különböző emlős LTBP-t (LTPB1, 2, 3, 4 valamint ezek különböző splice variánsait) eltérő gének kódolják. Az egyes LTBP-k feltételezett szelektív kötődése az egyes TGF-β fehérjékhez még nem teljesen feltérképezett. In vitro kísérletek arra utalnak, hogy az LTBP1 és LTBP4 mindhárom TGF-β-hoz, az LTBP3 csak a TGF-β1-hez képes kötődni, azonban az LTBP2 egyáltalán nem köt TGF-β-t. A TGF-β fehérjék a nagy látens komplexben, inaktív állapotban vannak jelen az extracelluláris térben vagy tárolódnak a szinaptikus vezikulákban. A TGF-β aktiválása a TGF-β nagy látens komplexből való kilépésével szabályozódik. Az extracelluláris TGF-β-nak több aktivátora ismert: pl. különböző proteázok, a thrombospondin-1, integrinek, reaktív oxigéngyökök és a pH csökkenése. A TGF-β-k receptorai szerin/treonin kináz doménnel rendelkeznek. A legtöbb sejtben a TGF-β szignáltranszdukció a TGF-β I-es típusú/Alk5 (activin-like kinase receptor 5) receptoron valósul meg, de ezen kívül

endotheliális sejtekben és neuronokban egy másik I-es típusú TGF-β receptoron, az Alk1-n keresztül is megvalósulhat a jelátvitel. A szabad TGF-β hetero- vagy homodimer bekötése indukálja a receptorok komplexekké történő összeszerelését. A receptor komplex valószínűleg egy 2 db I-es és 2 db II-es típusú receptort tartalmazó heterotetramer. Az aktivációt követően a II-es típusú receptorok foszforilálják a I-es típusú receptorokat. Ez a foszforilációs lépés a legfontosabb a TGF-β mediált szignál megindításához. Az aktivált I-es típusú receptor kináz továbbítja a szignált a sejten belülre a receptor- szabályozott Smad fehérjék foszforilációjával. A TGF-β szignáltranszdukció az újabb eredmények szerint nemcsak a kanonikus Smad szignál útvonalon keresztül valósulhat meg, hanem a p38, a Jun N-terminális kináz (JNK) és a mitogén aktivált protein kináz (MAPK) által mediált útvonalon is. A TGF-β-k a központi idegrendszer fejlődése során antiproliferatív, de a neuronális differenciációt elősegítő hatásúak. A fejlődés bizonyos stádiumaiban hatással vannak pl. a spinális motoneuronok és a középagyi dopaminerg neuronok fejlődésére és túlélésére. Továbbá, a TGF-β fehérjék jelenlegi ismereteink szerint antiapoptotikus hatásúak. A TGF-β2 a központi idegrendszeri szinapszisokban a szinaptikus transzmisszót jobban befolyásolja, mint a szinaptogenesist, valamint szerepe lehet a hosszú távú szinaptikus facilitáláshoz vezető sorozatos eseményekben. A TGF-β-k szerepét különböző neuroendokrin funkciókban is feltételezik. A preoptikus area GnRH-t (gonadotropin releasing hormon) ternelő sejtei TGF-β receptort is

kifejeznek. A TGF-β1 és -β3 a nucleus supraopticus és nucleus paraventricularis magnocelluláris sejtjeiben az antidiuretikus hormonnal kolokalizál. Fokális agyi iszkémia esetén a TGF-β-k neuroprotektív hatását több vizsgálat is igazolta: nyúl thromboembóliás stroke modellben autológ vérrög intrakraniális injektálása előtt az artéria carotis internába adott TGF-β1 bólus az infarktus nagyságát csökkentette. Ehhez hasonlóan patkányban az artéria cerebri media okklúziójával (MCAO) kiváltott stroke modellben beadott TGF-β1 is neuroprotektiv hatású volt, valamint adenovírus géntranszferrel kiváltott TGF-β1 túlexpresszió csökkentette az infarktus nagyságát 30 perces MCAO utáni 1. és 7. napon. Közvetlenebb bizonyítéka a TGF-β-k endogén neuroprotektív hatásának bizonyítására a TGF-β hatás antagonizálásával készült tanulmányok. A TGF-β-t antagonizáló szolubilis TGF-β II-es receptor agyba történő injektálása megnöveli az infarktus területének nagyságát 30 perces reverzibilis fokális agyi iszkémia során. Bár a legtöbb kísérletben nem differenciáltak a TGF-β altípusok között, a TGF-β2 és -β3 neuroprotektív hatása is valószínű. A lehetséges mechanizmusok között az anti-inflammatorikus hatás, a heg képződés, az angiogenezis elősegítése, az antiapoptotikus hatás, az excitotoxicitással szembeni védelem valamint a neuroregeneráció elősegítése mind szerepet játszhat. Továbbá, bár a bizonyítékok még hiányosak, a TGF-β-k mint endogén neuroprotektiv proteinek az iszkémiás prekondicionálásban is részt vesznek. A TGF-β-k hatásait több patológiás folyamatban is vizsgálják. Az agytumorok nagy

része "megmenekül" a TGF-β sejtproliferációt gátló hatása alól, továbbá a tumorok olyan mechanizmusokat fejlesztenek ki, amely a TGF-β anti-proliferatív hatását onkogenikus hatássá változtatják. Valószínű, hogy a TGF-β fehérjék több neurodegeneratív betegség, pl. az Alzheimer-kór, a Huntington chorea, a Lewy testes demencia, az amyotrófiás lateral sclerosis és a Pick demencia patológiájában is szerepet játszanak.

II. CÉLKITŰZÉSEK

- A mRNS expresszió térbeli eloszlása még nem került vizsgálatra annak ellenére sem, hogy a TGF-β fehérjék agyi funkciókban játszott jelentőségére egyre több bizonyíték áll rendelkezésre. A TGF-β1, -β2 és -β3 eloszlását eddig csak fehérje szinten, immunhisztokémiával vizsgálták, ezért elsődleges célom ép patkány agyban az eloszlás mRNS szintű vizsgálata radioaktív in situ hibridizációs hisztokémiával. Továbbá,
    - a fehérjék mRNS eloszlásának összehasonlítása az irodalomból ismert, immunhisztokémiai módszerekkel leírt TGF-β eloszlásokkal.
    - a TGF-β-k és kötőfehérjéik, az LTBP-k munkacsoportunk által korábban leírt mRNS eloszlásának összehasonlítása..
- A neuroprotektív hatás megértése céljából ezután kísérleti agyi iszkémiát követően vizsgáljuk a TGF-β-k mRNS expressziójának

változásait. Kísérleti agyi iszkémiát MCAO-modellel hozunk létre. Kérdéseink:

- fokális agyi iszkémia során változik-e a túlélési idő hosszával a TGF-β1,-β2 és-β3 mRNS indukciója? Ezt a kérdést megválaszolandó 1 órás MCAO-t követően 3, 24, 72 órás és 1 hónapos túlélés után vizsgáltuk a TGF-β1,-β2 és-β3 mRNS expressziójának változását.
- az indukciót az iszkémia vagy a reperfúzió váltja ki? Ehhez 1 órás és permanens (24 órás) MCAO-t követően 24 órás túlélési idő után vizsgáltuk meg a TGF-β1,-β2 és-β3 mRNS eloszlását.

III. MÓDSZEREK

Az állatkísérleteket a Semmelweis Egyetem Állatkísérleti Bizottságának engedélyével, valamint "Az állatok védelméről és kíméletéről" szóló 1998. évi XXVIII. törvény rendelkezései szerint, a Földművelésügyi és Vidékfejlesztési Minisztérium Állat és Élelmiszerhigiénés Osztályának ajánlása alapján végeztük. Fokális agyi iszkémiát az artéria cerebri media okklúziós modellel (MCAO), a Longa által leírt intraluminális fonaltechnika módszer módosításával hoztunk létre. Ennek során szilikon monofilamentumot vezettünk az artéria carotis communison ejtett metszésből az artéria carotis internába, a bifurcatio fölé 18-20 mm-re, egészen az artéria cerebri media eredéséig. Kísérleteink egy részében az átmeneti iszkémia vizsgálatakor a monofilamentumot 1

óra múlva eltávolítottuk, a permanens artéria cerebri média okklúzió vizsgálatánál bent hagytuk. Ezután a szükséges túlélési idő (1 órás MCAO után 3, 24, 72 órával valamint 1 hónappal, permanens elzárás esetén 24 órával) után az állatok agyát in situ hibridizációs hisztokémiához disszekáltuk. Az agyakat a bregmától 1 mm-rel rostrális irányba két részre metszettük. Az iszkémia létrejöttének bizonyításához az agy elülső részét 2,3,5-triphenyltetrazolium kloriddal (TTC) megfestettük, a hátsó felét pedig lefagyasztottuk és a felhasználásig -80 □C-on tároltuk. A TGF-β1, -β2 és -β3 mRNS eloszlásának vizsgálatához radioaktív in situ hibridizációt (ISH) végeztünk. Az ISH próbák elkészítéséhez mRNS-t izoláltunk, majd reverz transzkripcióval cDNS-t szintetizáltunk. Ezután a TGF-β altípusokra specifikus DNS próbákat PCR-rel állítottunk elő. A DNS próbákat klónozó vektorokkal szaporítottuk fel, a próbákból in vitro transzkripcióval [35S]UTP-tal jelölt ribopróbákat készítettünk. Ezekkel végeztük el patkány agy fagyasztott metszeteken a radioaktív in situ hibridizációt, majd a metszeteket autoradiográfiás oldatba merítettük, előhívtuk, végül Giemsával háttérfestettük.

IV. EREDMÉNYEK

1. Az in situ hibridizációs próbák előállítása

A próbagyártás első lépésében minden egyes TGF-β altípusra 2-2 primer párral elvégzett RT-PCR mindhárom TGF-β altípus expresszióját kimutatta a patkány agyban. Ezekben az RT-

PCR kísérletekben a kontamináció lehetőségét kizártuk. A genomiális DNS-t az RNS DNáz kezelésével iktattuk ki. Ennek eredményességét azzal ellenőriztük, hogy a tervezett primerek 2 különböző exonon helyezkedtek el, így genomikus szennyezés esetén az intron beékelődése miatt az abból keletkezett PCR termék hosszabb lett volna, mint az, amelynek a templátja a cDNS volt. Az RT-PCR során keletkezett termékeket agaróz gélen megfuttattuk, így ellenőriztük, hogy a készített próbák mérete megfelelt az előzőleg számított értéknek. A próbákat ezután szekvenálással is ellenőriztük.

2. A TGF-β1, -β2 és -β3 mRNS expressziójának leírása ép patkány agyban

Az in situ hibridizáció mindhárom TGF-β mRNS expresszióját kimutatta patkány agyban. A cortexben mindhárom TGF-β mRNS-e megtalálható volt, az egyes cortikális rétegekre specifikus eloszlásban. Az I-es réteg nem tartalmazott egyáltalán TGF-β mRNS-t. A TGF-β1 legkifejezettebben az V-ös rétegben volt jelen, ezenkívül a II-es és VI-os réteg is tartalmazta. A TGF-β2 igen kifejezetten expresszálódik az V-ös réteg belső részében, a VI-os rétegben, kevésbé erősen a többi cortikális rétegben. Ezzel szemben a TGF-β3 expressziója az V-ös réteg külső részén volt jelentős, valamint az expresszió megfigyelhető a VI-os rétegben, közvetlenül a commisura felett. A hippocampusban is megjelent mindhárom TGF-β mRNS-e, de expressziójuk intenzitása és eloszlása jelentős különbségeket mutatott. A TGF-β1 az összes rétegben megtalálható

volt. A TGF-β2 a gyrus dentatusban mutatott jelentős expressziót ill. szétszórtan az egyes hippocampalis sejtekben. A TGF-β3 a CA2 régióban fejeződött ki a legintenzívebben, de megtalálható volt a piramissejtek rétegében is. A TGF-β-k az előagy többi részén is megtalálhatóak, de az egyes altípusok kifejezetten eltérő eloszlást mutattak. Például a TGF-β1 a corpus amygdaloideumban főleg a centrális és medialis részben jelent meg, a TGF-β2 expressziója az amygdala elülső részén volt jelentős, a basalis és laterális részben főleg a TGF-β3 jelent meg. A nucleus caudatus, a putamen, a globus pallidus nagy része és a claustrum egyik TGF-β mRNS-ét sem tartalmazta. A thalamus gazdagon tartalmazta mindhárom TGF-β-t, de az egyes altípusok eloszlása igen jelentős eltérést mutatott. A TGF-β1 mindenütt kifejeződött, kivéve a corpus geniculatum lateralét. A nucleus parafascicularis és a mediális talamikus magok gazdagon tartalmaztak TGF-β2 mRNS-t, viszont a ventralis magban és a többi thalamusmagban a TGF-β2 nem volt jelen. A thalamus összes magja tartalmazott TGF-β3-at, azonban az expresszió főleg a mediális thalamikus magokban és a nucleus reticularisban, valamint a nuclei anterioresban és ventralesben volt a leggazdagabb. Általánosságban kijelenthető, hogy a thalamusban a TGF-β3 expresszálódott a legerősebben. A hypothalamusban jelentős TGF-β1 expressziót mutatott a nucleus paraventricularis, főleg a kissejtes része, míg a többi hypothalamicus magban kevésbé vagy egyáltalán nem expresszálódott TGF-β1. A TGF-β2 mRNS-ének kifejeződése az area hypothalamica posteriorban és a nucleus mamillaris medialis

medialis subdivíziójában volt a legerősebb. Ezeken a területeken kívül az area preoptica medialis és a nucleus supraopticus tartalmazott számottevő mennyiségű TGF-β2-t, míg a nucleus arcuatus, az area hypothalamica lateralis, a nuclei ventromedialis und dorsomedialis egyáltalán nem tartalmazott TGF-β2-mRNS-t. A TGF-β3 expressziós mintázata jelentősen eltért a másik két altípustól ezen a területen. Igen jelentős TGF-β3 expressziót mutatott a nucleus supramamillarius, a nucleus arcuatus, az area hypothalamica, a preoptikus area valamint a nucleus paraventricularis. A TGF-β3 viszont nem jelent meg sem a nucleus supraopticusban, a nucleus dorsomedialisban és ventromedialisban sem. A középagyban mind a három TGF-β mRNS-e megjelent. A TGF-β1 a legdominánsabban a substantia nigraban, a nucleus ruberben, az area tegmentalis ventralisban, a nucleus interpeduncularisban expresszálódott, míg ezekben a magvakban a TGF-β2 és -β3 mRNS mennyisége elhanyagolható volt. A zona incerta, az area pretectalis, a substantia grisea centralis, a raphe magvak, a colliculus inferior és a nucleus cuneiforme gyengébb TGF-β1 mRNS kifejeződést mutatott. Ezzel szemben a TGF-β2 expressziója igen jelentős volt a nucleus dorsalisban, a raphe magvakban, kissé kevésbé jelentkezett a substantia grisea centralisban, a nucleus nervi oculomotoriiban, a colliculus inferiorban és a nucleus cuneiformeban. A zona incertaban, az area pretectalisban és a colliculus superiorban viszont elenyésző mennyiségben volt jelen. Az utóbbi középagyi terület azonban jelentős TGF-β3 mRNS-t tartalmazott a felszíni rétegeiben.

A hídban és a nyúltvelőben a TGF-β-k eloszlása hasonló volt. Különbség a locus coeruleus, a nucleus tractus solitariiban és a nucleus reticularis nagysejtes részében volt: ezek a magvak jelentős TGF-β2 expressziót mutattak, míg a TGF-β1 és TGF-β3 mRNS alig volt jelen. Ezzel szemben a nuclei pontis alig tartalmazott TGF-β2-t, de megjelent benne a TGF-β1 és TGF-β3. Feltűnő volt, hogy az oliva inferior igen gazdagon tartalmazott TGF-β3 mRNS-t, viszont alig volt TGF-β1 jelölődés valamint a TGF-β2-től teljesen mentes volt. A cerebellumban a legerősebb expressziót a TGF-β2 mutatta, főleg a Purkinje sejtek és kevésbé erősen a granuláris sejtréteg. Minden réteg egynéhány sejtje tartalmazott TGF-β1-et, míg TGF-β3 egyáltalán nem jelent meg a cerebellumban. A plexus choroideusban igen erős jelet adott a TGF-β2, kevésbé intenzíven jelölt a TGF-β1 és-β3.

3. A TGF-β1, -β2 és -β3 mRNS expresszió eloszlásának összehasonlítása az irodalomban közölt immunhisztokémiai vizsgálatok eredményeivel

A TGF-β-k mRNS-ének eloszlási mintázata számos területen hasonlított a TGF-β immunreaktivitáshoz. A TGF-β2 és -β3 immunreaktivitás a II, III és V cortikális rétegben volt jelen, valamint jelenlétüket a cortikális réteg határozta meg, nem pedig az, hogy az agy melyik területét vizsgálták. Ez a TGF-β-k mRNS eloszlására is jellemző volt. Továbbá, a hippocampus különböző területein, a hypothalamicus- és amygdalamagokban TGF-β2 és -β3 immunreaktivitás volt jelen, amely korrelál a TGF-β-k mRNS

eloszlásával ezen a területeken. Erős TGF-β2 immunjelet irtak le a kisagy Purkinje sejtjeiben, az agytörzsi monoaminerg és motoneuronokban. Ezzel megegyezően ezek a területek különösen magas TGF-β2 mRNS szintet tartalmaztak. Azonban a striatum, a legtöbb talamicus mag és a colliculus superior szinte mentes volt a TGF-β2 mRNS-től, mely megegyezik azzal, hogy ezeken a területeken nem volt TGF-β2 immunpozitivitás sem. Ezektől a hasonlóságoktól eltekintve, jelentős eltéréseket is találtunk a TGF-β-k mRNS expressziója és immunreaktivitása között. A TGF-β1 mRNS eloszlása igen markánsan különbözött az irodalomban eddig közölt immunhisztokémiai vizsgálatok alapján leírt eloszlástól (immunpozitivitást csak a meningeális sejtekben és a plexus choroideus epithel sejtjeiben írtak le): a cortex, a hippocampus, a centrális amygdala mag, a mediális preoptikus area, a substantia nigra, az agytörzsi retikuláris formáció és motoneuronok valamint az area postrema is tartalmazott TGF-β1 mRNS-t. A TGF-β2 és -β3 mRNS eloszlása bizonyos agyterületeken, mint pl. a II, III és V-ös cortikális rétegben, a hippocampusban, hypothalamusban és az amygdalában megegyezett az immunreaktivitás eloszlásával, azonban jelentős eltéréseket is találtunk az agy több más területén. A TGF-β2 és -β3 mRNS eloszlása egymástól különbözött, ellentétben a korábbi immunhisztokémiai adatokkal, melyek igen hasonló lokalizációt írtak le. Az ISH és az immunhisztokémia alapján tapasztalt eloszlásbeli különbségek valószínűleg a két módszer eltérő szenzitivitásából és specificitásából adódik.

4. A TGF-β1, -β2 és -β3 mRNS expresszió eloszlásának összehasonlítása az LTBP-k eloszlásával

A patkány agyban munkacsoportunk már korábban leírta mind a 4 fajta LTBP mRNS-ének lokalizációját. Az LTBP1, 2, 3 és 4 eltérő eloszlási mintázatot mutatnak, amely lehetővé teszi a TGF-β és az LTBP mRNS eloszlásának összehasonlítását. Azok az agyterületek, melyek túlnyomóan egy bizonyos TGF-β fehérjét expresszálnak, alkalmasak a legjobban arra, hogy altípus-specifikus koexpressziót feltételezhessünk. Az eloszlások összehasonlítása alapján mindegyik TGF-β kötődhet az LTBP3-hoz. Továbbá, bizonyos agyterületeken a TGF-β-k a többi LTBP-hez is kötődhetnek. Az LTBP2 valószínűleg nem köt TGF-β-t.

5. Az egyes TGF-β fehérjék mRNS expressziójának idő- és térbeli változása fokális agyi iszkémiát követően

Az artéria cerebri média 1 órás okklúziója 3 órával az iszkémiát követően szövettanilag látható léziót okozott, főleg a striatum területén. Ebben az időpontban az infarktus széli részén már kimutatható volt a TGF-β1 indukciója, de a TGF-β2 és -β3 indukciója még nem mutatható ki. Az MCAO után 24 órával a striatumot és az ipszilaterális cortex nagy részét érintő lézió keletkezett. A TGF-β1 mRNS a lézió széli területén a cortex mindegyik rétegében és a striatumban jelent meg. A TGF-β2 a

lézióval szomszédos agykéreg specifikus rétegeiben indukálódott, a striatumban viszont nem. Az indukció intenzitása a II-es és V-ös cortikális rétegben volt a legkifejezettebb, amelyek az intakt patkányagyban is tartalmaznak TGF-β2-t, valamint a III-as rétegben is megjelent egy-egy jelölt sejt. A TGF-β3 indukciója a lézió körül csak a II. rétegben volt látható. A permanens 24 órás MCAO után a TGF-β-k indukciója még kifejezettebbé vált, továbbá, a TGF-β2 és -β3 indukciója a specifikus cortikális rétegekben egészen a középvonalig felerősödött. Tranziens MCAO után 72 órával a TGF-β1 expressziójában jelentős változás figyelhető meg: az infarktus területén belül valamint a corpus callosumban számos TGF-β1-et termelő sejt jelenik meg valamint az indukció a lézió széli részén sokkal kifejezettebbé vált. A TGF-β2 és-β3 mRNS expressziója viszont az alapállapothoz hasonló szintre csökkent. Tranziens MCAO után 1 hónappal az infarktuson belül a TGF-β1 indukciója igen emelkedett maradt, míg az infarktuson kívüli területen csökkent. Az agykéregben a TGF-β2 és -β3 expressziója továbbra is a léziót megelőző szinten maradt.

V. KÖVETKEZTETÉSEK

1. Kimutattuk, hogy mindhárom TGF-β expresszálódik intakt patkány agyban.
2. A különböző TGF-β1, -β2 és -β3 mRNS expressziója az ép patkány agyban egyéni térbeli eloszlást mutat, mely az expresszió térbeli szabályozottságára utal.

3. A TGF-β fehérjék mRNS-ének eloszlási mintázata egyes területeken megegyezett, bizonyos területeken eltért az immunhisztológiai festések során leírt immunreaktivitással. Ez a különbség, mivel az immunreaktivitást a sejttestekben írták le és nem a sejtek nyúlványaiban, nem a TGF-β-k sejtestből való transzportjából ered, hanem az immunhisztokémia és az in situ hibridizáció eltérő szenzitivitásából és szelektivitásából adódik.

4. A TGF-β-k és a kötőfehérjéik, az LTBP-k expressziós mintázatának összehasonlítása alapján valószínű, hogy mindhárom TGF-β kötődhet LTBP3-hoz, valamint bizonyos agyterületeken a többi LTPB-hez is.

5. Az agyi iszkémia során az időben és térben eltérő TGF-β1, -β2 és -β3 mRNS expressziós mintázat az iszkémia során bekövetkező TGF-β indukció eltérő mechanizmusára, valamint a neuroprotekcióban betöltött eltérő szerepre utal.

6. A permanens okklúzió során mindhárom TGF-β altípus mRNS expressziója kifejezettebbé vált. Ez arra utal, hogy iszkémia során a TGF-β-k indukcióját nem a reperfúzió, hanem a maga az iszkémia váltja ki.

VI. AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ SAJÁT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

1. **Vincze C**., Pál G., Wappler E., Szabó E. R., Nagy Z., Lovas G., Dobolyi A. (2010). "Distribution of mRNAs encoding transforming growth factors-β1,-2, and-3 in the intact rat brain and after

experimentally induced focal ischemia." *J. Comp. Neurol.* 518(18): 3752-3770. IF: **3,774**

2. Dobolyi A., **Vincze C.**, Pál G, Lovas G. (2012). "The neuroprotective functions of transforming growth factor Beta proteins." *Int. J. Mol. Sci.* 13(7): 8219-8258. IF: **2,464**

3. Pál G., **Vincze C.**, Renner É., Wappler E., Nagy Z., Lovas G., Dobolyi A. (2012). "Time course, distribution and cell types of induction of transforming growth factor betas following middle cerebral artery occlusion in the rat brain." *PLoS One* 7(10): e46731. IF: **3,730**

VII. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Hálás köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Dobolyi Árpádnak állandó és fáradhatatlan útmutatásáért, a tudomány iránti lankadatlan lelkesedéséért, mely mindig magával ragadott. Továbbá szívből köszönöm Dr. Lovas Gábornak, hogy a neurológia és az idegtudomány útvesztőjében mindig a helyes útra terelt. Szeretném megköszönni Bereczki Dániel Professzor Úrnak és Böhm József Főorvos Úrnak mindenkori szívélyes támogatását, mely lehetővé tette PhD munkám elkészítését. Szeretném megköszönni Vígh Béla Professzor Úrnak, hogy orvostanhallgató koromban fantasztikus személyiségével és szemléletmódjával megszerettette velem a neuroanatómiát és az alapkutatást, melynek hatására a neurológia és

az idegtudományok felé fordultam. Ezen kívül hálával tartozom Dr. Pál Gabriellának mindenkori, kísérletekben és az eredmények feldolgozásában nyújtott segítségért. Továbbá köszönettel tartozom Hanák Nikolettnek és Dellaszéga-Lábas Viktóriának a technikai segítségért, továbbá Dr. Dobolyiné Renner Évának, Dr. Vitéz-Cservenák Melindának és Szabó Éva Rebekának, hogy mindig minden kérdésemre türelemmel válaszoltak és mindenkor a segítségemre voltak.

Köszönöm szüleimnek, hogy mind egyetemi éveim alatt mind diplomám és szakvizsgám megszerzése után mindenben messzemenőkig támogattak.