A HSPB1 neuroinflammációban betöltött moduláló szerepének vizsgálata transzgenikus egérmodellben

Doktori (Ph.D.) értekezés

Dukay Brigitta Dóra

Témavezetők: Dr. Sántha Miklós, DSc
Dr. Tóth E. Melinda, PhD

ELKH Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Biokémiai Intézet

Biológia Doktori Iskola
Szegedi Tudományegyetem
Természettudományi és Informatikai Kar

2021
Szeged

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke 1
1. Bevezetés 2
1.1. A neuroinflammáció kialakulásának folyamata 2
1.2. A HSPB1 szerepe a központi idegrendszerben 4
1.3. A hősokkfehérjék szerepe a gyulladásos folyamatok szabályozásában 6
1.4. A HSPB1 szerepe az idegrendszeri gyulladásban 8
1.5. Az akut idegrendszeri gyulladás modellezése etanol kezeléssel 10
2. Célkitűzések 11
3. Anyagok és módszerek 12
3.1. *In vivo* kísérletek 12
3.1.1. Állatok 12
3.1.2. Akut etanol kezelés 12
3.1.3. DNS tisztítás transzgenikus egerek farokmintáiból 12
3.1.4. A hHSPB1 transzgén jelenlétének kimutatása PCR analízissel 13
3.1.5. hHSPB1 Western-blot analízis 13
3.1.6. Totál RNS izolálás és reverz transzkripció 14
3.1.7. Valós idejű (RT) PCR-elemzés 14
3.1.8. TUNEL-próba 15
3.1.9. Fluoreszcens immunhisztokémia 15
3.1.10. Peroxidázos immunhisztokémia 16
3.2. *In vitro* kísérletek 17
3.2.1. Primer sejtkultúrák készítése 17
3.2.2. Az izolált primer sejttenyészetek tisztaságának meghatározása immunfestéssel 18
3.2.3. Sejtek életképességének vizsgálata 19
3.2.3.1. Valósidejű sejtanalízis 19
3.2.3.2. Resazurin-próba 19
3.2.3.3. Mikroglia életképesség 20
3.2.4. A primer sejtkultúrák kezelése és a felülúszók gyűjtése 20
3.2.5. Fluoreszcens immunfestés 20
3.2.6. Enzim kapcsolt immunszorbens vizsgálatok (ELISA) 21

3.2.7. Statisztikai analízis 21
4. Eredmények 22
4.1. A hHSPB1 transzgenikus egerek genotipizálása 22
4.2. A hHSPB1 kifejeződési mintázata transzgenikus egerek agyszövetében 22
4.3. A hHSPB1 túltermelés hatása az etanol kezelés által kiváltott citokin termelésre 24
4.4. A hHSPB1 túltermelés hatása az etanol kezelés által kiváltott mikroglia aktivációra 25
4.5. A hHSPB1 túltermelés hatása az etanol kezelés által kiváltott asztrocita aktivációra 31
4.6. A hHSPB1 túltermelés hatása az etanol kezelés által kiváltott apoptózisra 33
4.7. A primer sejtkultúrák tisztaságának és a hHSPB1 transzgén *in vitro* kifejeződésének vizsgálata 35
4.8. A primer sejtkultúrák életképességének vizsgálata citokin és etanol kezelést követően 37
4.9. A primer sejtkultúrák TNFα termelése citokin és etanol kezelést követően 40
4.10. A citokin és az etanol kezelés hatása az extracelluláris és az intracelluláris hHSPB1 szintekre 41
5. Diszkusszió 45
Köszönetnyilvánítás 56
Irodalomjegyzék 57
Összefoglaló 69
Summary 72
Publikációs lista 75
Függelék 76

Rövidítések jegyzéke

Aif1	allograft gyulladásos faktor 1
Arg1	arginász 1
CD68	differenciációs klaszter-68
CMV	citomegalovírus
DAB	3,3’-diaminobenzidin
DAMP	veszély-asszociált molekuláris mintázat
DAPI	4′,6-diamidino-2-fenilindol
GAPDH	glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz
GFAP	gliális fibrilláris savas fehérje
HSF1	hősokk faktor 1
HSP	hősokkfehérje
sHSP	kismólsúlyú hősokkfehérje
HSPA1	hősokkfehérje A1/70
HSPB1	hősokkfehérje B1/27
IBA1	ionizált kálcium-kötő adaptor molekula-1
IKK	inhibítor-κB kináz
IL	interleukin
iNOS	indukálható nitrogén-monoxid szintáz
MAP2	mikrotubulus asszociált fehérje-2
Mrc1	C-típusú mannóz receptor 1
NEUN	neuronális nukleáris antigén
NF-κB	nukleáris faktor-κB
PFA	paraformaldehid
PRR	mintázatfelismerő receptor
TGF-β1	transzformáló növekedési faktor β1
TLR	toll-szerű receptor
TNFα	tumor nekrózis faktor-α
TUNEL	terminális deoxinukleotidil transzferáz-közvetített dUTP végjelölés
Vim	vimentin

1. Bevezetés

1.1. A neuroinflammáció kialakulásának folyamata

A neuroinflammáció, azaz a központi idegrendszer gyulladásos folyamata kulcsfontosságú szerepet játszik a legtöbb agyat érintő akut és krónikus betegség patofiziológiájában. A gyulladás egy nagyon sokrétű folyamat, amelynek alapjául a fokozottan termelődő citokinek, kemokinek és egyéb gyulladásos mediátorok szolgálnak, de emellett magába foglalja a mikroglia sejtek aktivációját, a reaktív asztrogliózist és a perifériás immunsejtek infiltrációját is (Kim és Yenari, 2013). A központi idegrendszeri gyulladást általában neurodegenerációs folyamatokkal társítjuk, holott az agyszövet első védelmi vonalaként funkcionál. Az aktivált immunsejtek harcolnak a kórokozók ellen és eltávolítják a károsodott agyszövetet, ezáltal megakadályozva a fertőzés és a nekrózis terjedését. Fontos azonban hangsúlyozni, hogy a védelmi funkciók mellett a túlzott, krónikussá vagy szabályozatlanná vált gyulladás további idegsejtkárosodáshoz vezethet. Tehát a gyulladásnak és az immunmediátoroknak kettős hatásuk van, és kiemelkedő jelentőséggel bírnak mind az idegsejtek károsításában, mind a központi idegrendszeri sérülést követő regenerációban. Ezért az idegrendszerben kialakuló gyulladásos válaszok megfelelő, szigorú szabályozása elengedhetetlen a folyamat negatív hatásainak megelőzéséhez vagy legalább csökkentéséhez (Swaroop és mtsai., 2016; Le és mtsai., 2016; Sochocka és mtsai., 2017; Banjara és Gosh, 2017).

A sérült szövet veszély-asszociált molekuláris mintázattal (danger-associated molecular pattern, DAMP) rendelkező molekulákat bocsát ki. Ilyen mintázatot jelenthetnek többek között az extracelluláris ATP-k, a hibás szerkezetű fehérjék, mint a β-amiloid, de akár az erősen konzervált hősokkfehérjék (heat-shock protein, HSP) is, amelyek expressziója tovább fokozódik szöveti sérülések esetén (Patel, 2018). A felszabadult DAMP-ok a központi idegrendszer sejtjein lévő mintázatfelismerő receptorokhoz (pattern recognison receptor, PRR) kötődnek (Tang és mtsai., 2012; Kigerl és mtsai., 2014). Ez az interakció inflammaszómák összeszerelődését indukálja a neuronokban, az asztrocitákban, a mikroglia sejtekben, valamint az endotél sejtekben (Minkiewicz és mtsai., 2013; Burm és mtsai., 2015; Nagyőszi és mtsai., 2015; Fann és mtsai., 2018). Az inflammaszómák kialakulása a kaszpáz-1 aktivációja révén emelkedett interleukin-1β (IL-1β) és IL-18 expresszióhoz vezet, illetve apoptótikus sejthalált indukál (Martinon és mtsai., 2002; de Rivero Vaccari és mtsai., 2009; Adamczak és mtsai., 2014). A DAMP-ok receptorokhoz való kötődése másrészt különböző gyulladáskeltő

transzkripciós faktorok aktiválásával, például a nukleáris faktor-κB (NF-κB) sejtmagba juttatásával, szintén a gyulladásos kaszkádok stimulálásához vezethet (Kim és Yenari, 2013; Banjara és Ghosh, 2017). Mivel a PRR-eken kívül számos citokin receptor is megtalálható a sejtek felszínén, így a felszabadult gyulladáskeltő citokinek a receptorukhoz kötve további citokin termelődést képesek indukálni, ezáltal egy öngerjesztő gyulladásos folyamat veszi kezdetét (Tada és mtsai., 1994; Rothwell és mtsai., 1996; Lee és mtsai., 2002).

Az agyszövet állapotát az agy rezidens immunsejtjei, a mikroglia, valamint az asztrocita sejtek folyamatosan monitorozzák (Banjara és Ghosh, 2017). A központi idegrendszert ért károsító hatásokra a mikroglia sejtek reagálnak először, és egy dinamikus mikroglia aktiváció veszi kezdetét. A folyamat során a mikroglia sejtek gyorsan a sérült területre vándorolnak, és megkezdik az axonális regenerációt gátló mielin törmelék fagocitikus eltávolítását, valamint rész vesznek a gliális hegképzésében és a vér-agy gát integritásának támogatásában is. A mikroglia sejteknek ez az aktivációs állapota csökkenti a gyulladást, korlátozza a másodlagos károsodásokat és elősegíti a szöveti homeosztázis helyreállítását (Mosley és Cuzner, 1996; Schwab, 2004; Davalos és mtsai, 2005; Lou és mtsai, 2016). A felszabaduló DAMP-ok azonban a korai fagocitikus mikroglia fenotípuson kívül egy gyulladáskeltő fenotípust is aktiválnak, amely ártalmas az agyszövetre: gyulladáskeltő citokineket, kemokineket, komplement rendszer-komponenseket, szabad gyököket és mátrix metalloproteázokat termel, valamint fokozza a vér-agy gát permeabilitását és az apoptózis mértékét (Walker és mtsai, 1995; Jack és mtsai, 2005; Yenari és mtsai, 2006; del Zoppo és mtsai, 2012; Kawabori és Yenari, 2015). Az agy gyulladásos reakciójának következő lépése az asztrociták aktiválódása és proliferációja. Fiziológiás körülmények között az asztrociták azáltal, hogy részt vesznek az idegsejtek tápanyagellátásában, valamint eltávolítják a felesleges vizet, neurotranszmittereket és ionokat az extracelluláris térből, központi szerepet töltenek be az agyszövet homeosztázisának fenntartásában és az idegi jelátvitelben. Emellett végtalpaikkal a vér-agy gát egyik fő alkotóeleméül is szolgának (Raivich és mtsai., 1999; Sofroniew és Vinters, 2010). Sérülést követően azonban az aktivált asztrociták egyik fő feladata, hogy nyúlványaikkal egy heget képezzenek a sérült és az egészséges agyszövet között, megakadályozva ezzel a károsodás további terjedését (Raivich és mtsai., 1999). Másrészt viszont a reaktív asztrogliózis a gyulladásos folyamatok egyik fő szabályozója, és nagymértékben hozzájárul a gyulladáskeltő szignálmolekulák erőteljes szekréciójához (Banjara és Ghosh, 2017). Míg egy gyors, akut

gyulladásnak számos pozitív hatása van, addig az elhúzódó, krónikus gyulladás az agyszövet pusztulásához vezet. A tartós gyulladás miatt az agy rezidens immunsejtjei nem tudják ellátni fiziológiás feladataikat, valamint az aktivált gliasejtek károsító hatásai következtében a vér-agy gát integritása is csökken, és az agy elveszíti immunprivilegizált tulajdonságát. Ezzel párhuzamosan a mikroglia és az asztrocita sejtek által felszabadított kemokinek hatására a perifériás immunsejtek a sérült agyszövetbe vándorolnak, lehetővé téve a szisztémás folyamatok kihatását az agyra (Glabinski és mtsai 1995; Yenari és mtsai., 2006; Man és mtsai 2007; Elahy és mtsai., 2015).

1.2. A HSPB1 szerepe a központi idegrendszerben

Az evolúciósan konzervált hősokkfehérjék a sejteken belül elsősorban molekuláris chaperonként funkcionálnak: hozzájárulnak az újonnan termelődő fehérjék natív térszerkezetének kialakításához, a hibás fehérjék javításához, illetve az irreverzibilisen károdosott fehérjék proteaszómális lebontásához, ezáltal elősegítve a fehérje homeosztázis fenntartását (Ellis, 1988; Hendrick and Hartl, 1993). A sejtet ért károsító hatásokra a hősokkfehérjék gyorsan indukálódnak, szintézisük fokozódik, és védik a sejtet a stresszfolyamatokkal szemben, valamint részt vesznek az antigén prezentációban, a membránok stabilizálásban, illetve az apoptótikus folyamatokban is (Takayama és mtsai., 2003; Nishikawa és mtsai., 2008; Balogi és mtsai., 2019).

A kismólsúlyú hősokkfehérjék (sHSP) családjának egyik legjobban tanulmányozott tagja a HSPB1 (HSP27/25). A család tagjai olyan 12-42 kDa közötti fehérjék, amelyek egy erősen konzervált, a C-terminálison elhelyezkedő α-crystallint domént tartalmaznak. Az sHSP-k ATP-független chaperonok, amelyek képesek felismerni a rendellenes szerkezetű vagy aggregációra-hajlamos fehérjéket és stabil átmeneti komplexeket képezni velük, ezáltal megakadályozva irreverzibilis aggregációjukat. A fehérjéket a helyreállításukat elősegítő állapotban tarják fent, de az sHSP/szubsztrát komplexek felbontására, illetve a hibás szerkezet kijavítására önmagukban nem képesek, ezen folyamatok ATP-függő chaperonok jelenlétét igénylik (Haslbeck és Vierling, 2015).

Az agyban a HSPB1 konstitutívan expresszálódik, de az egyes sejttípusok között eltérések lehetnek. A HSPB1-et normál körülmények között az asztrociták termelik a legnagyobb mennyiségben, azonban különböző stresszhelyzetek esetén, például hőkezelésre

vagy oxidatív stresszre adott válaszként az expresszió mértéke tovább fokozódik (Schwarz és mtsai., 2010; Rioux és mtsai., 2015). Átmeneti fokális iszkémiát követően a sérülés köré csoportosuló, HSPB1-et nagymértékben expresszáló sejtek túlnyomó többsége asztrocita volt. Emellett toxikus fehérje lerakódásokkal járó neurodegeneratív betegségekben, például tauopátiák vagy az Alzheimer-kór esetében is megfigyelték az asztrociták általi fokozott HSPB1 termelést. Ezen adatok arra utalnak, hogy a HSPB1 szerepet játszhat a reaktív asztrogliózisban (Renkawek és mtsai., 1994; Imura és mtsai., 1999; Wilhelmus és mtsai., 2006; Schwarz és mtsai., 2010). Az asztrocitákhoz képest a neuronokban kisebb mértékben expresszálódik a HSPB1, míg a mikroglia sejtekben csak elhanyagolható mennyiségben van jelen. Megnövekedett HSPB1 termelődést azonban a neuronokban és a mikroglia sejtekben is megfigyeltek különböző károsító behatásokat követően (Bechtold és Brown, 2003; Schwarz és mtsai., 2010; Sharp és mtsai., 2013; Bartelt-Kirbach és mtsai., 2017).

Számos szakirodalmi adat bizonyítja a HSPB1 védő hatását a neurodegeneratív betegségekben központi szerepet játszó károsító folyamatokkal szemben, mint a kóros fehérjelerakódások kialakulása, az oxidatív károsodás vagy az apoptótikus sejtpusztulás (Radi és mtsai., 2014). Csoportunk korábban bizonyította a HSPB1 túltermelés neuroprotektív szerepét *in vivo*, akut és krónikus etanol kezelést követően, valamint az Alzheimer-kór egérmodelljében. A HSPB1 jelenléte javította az etanol kezelt állatok mozgáskoordinációját, és csökkentette a neuronpusztulás mértékét, míg az Alzheimer-modell állatokban védett a memóriaromlás ellen, javította a szinaptikus plaszticitást, illetve mérsékelte az amiloid-plakkok mennyiségét (Tóth és mtsai., 2010; Tóth és mtsai., 2013). A HSPB1 neurodegeneratív betegségek során leírt védő hatása részben abból adódik, hogy chaperon aktivitása révén képes az amiloid-β, az α-szinuklein és a tau fehérjékhez kötődve meggátolni azok aggregátum képzését, ezáltal mérsékelve károsító hatásukat (Wilhelmus és mtsai., 2006; Cox és mtsai., 2016; Baughman és mtsai., 2018). A HSPB1 antioxidáns tulajdonságát bizonyítja, hogy hatékony védelmet nyújtott a neuronok számára H_2O_2 által kiváltott oxidatív stresszel szemben, valamint csökkentette a reaktív oxigén gyökök mennyiségét a Huntington-kór sejtes modelljében (Wyttenbach és mtsai., 2002; Dávila és mtsai., 2014). Irodalmi adatok alapján a HSPB1 az apoptótikus jelátviteli utakat is sokféle módon képes befolyásolni azáltal, hogy kölcsönhatásba lép valamelyik komponensükkel (Venugopal és mtsai., 2019). Kainsav által kiváltott epilepszia modellben például a kaszpáz-3 aktiváció csökkentése révén fejtette ki

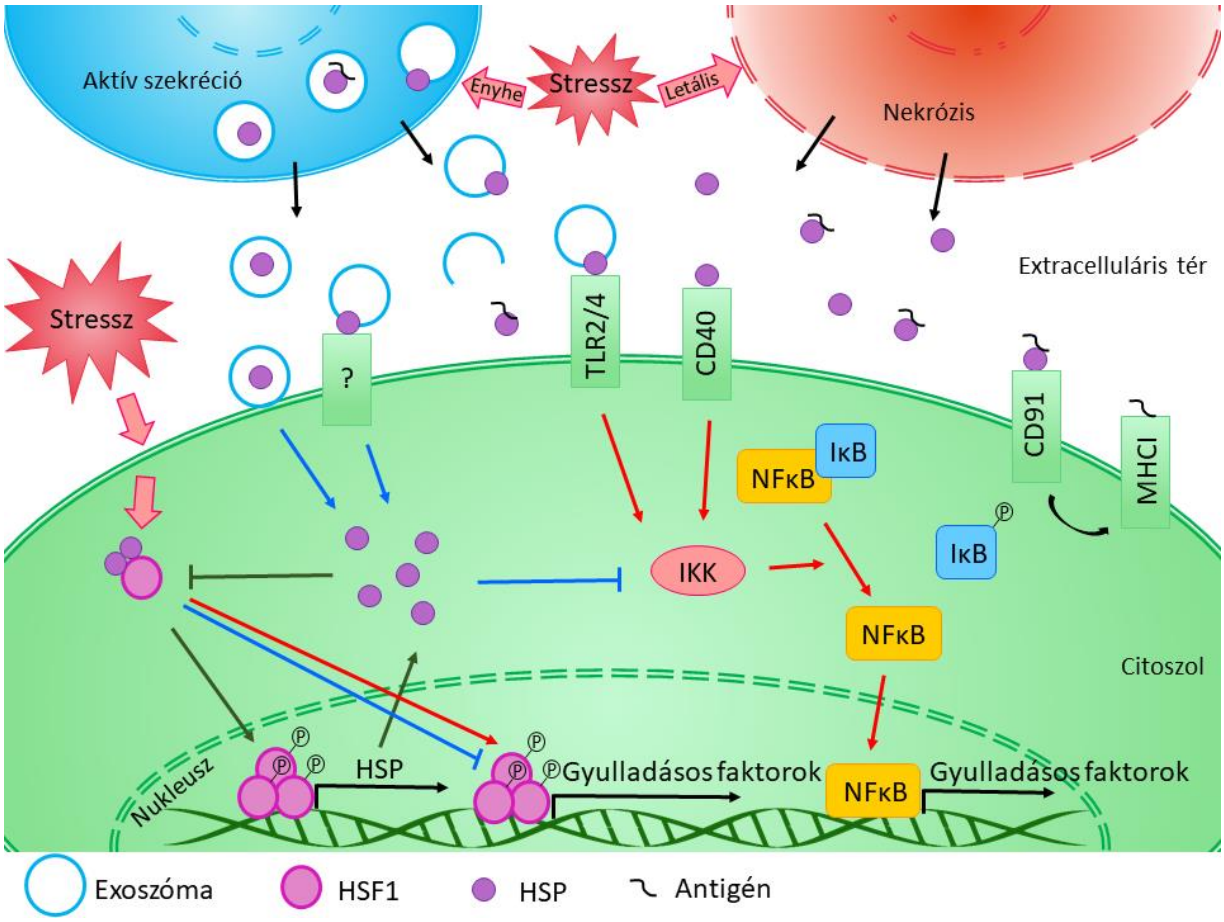
apoptózist gátló hatását, és mérsékelte a hippokampális neuron pusztulás mértékét (Akbar és mtsai., 2003).

1.3. A hősokkfehérjék szerepe a gyulladásos folyamatok szabályozásában

A hősokkfehérjék számos ponton képesek beavatkozni a gyulladáskeltő és a gyulladáscsökkentő folyamatok szabályozásába, amelynek összefoglalása az 1. ábrán látható. A hősokkfehérje gének transzkripcióját a hősokk faktor 1 (HSF1) szabályozza, amely általában a citoszolban inaktív formában, a HSPA és HSPC fehérjékhez kötődve van jelen. Stressz hatására azonban leválik a HSPA/HSPC komplexről, trimerizálódik, majd a sejtmagba vándorol, ahol indukálja a hősokkfehérje gének átíródását. A HSF1 azonban a gyulladásos faktorok génjeinek promóter régiójához is képes kötődni, ezáltal szabályozva expressziójukat. Szerepe azonban kettősnek bizonyult, ugyanis kimutatták, hogy a HSF1 önmagában gátolta a tumor nekrózis faktor-α (TNFα) génjének kifejeződését, viszont egy multiprotein komplex részeként képes volt aktiválni a TNFα transzkripcióját (Singh és mtsai., 2002; Ali és mtsai., 2019). Hasonlóképpen kiderült, hogy a HSF1 az IL-6 promóter régiójának interakcióit is képes befolyásolni, azonban ez a szabályozás is kétirányú lehet, ami arra utal, hogy a HSF1 citokin expresszióra gyakorolt hatását valószínűleg más faktorok is befolyásolják (Inouye és mtsai., 2007; Takii és mtsai., 2010). Szakirodalmi adatok alapján az újonnan szintetizált intracelluláris hősokkfehérjék, elsősorban védő hatásúak. A HSPB1 és a HSPA1 (HSP70) fehérjékről kimutatták, hogy többek között az inhibítor-κB kináz (IKK) legátlásával képesek megakadályozni az NF-κB útvonal aktivációját, ezáltal hozzájárulva a gyulladás csökkentéséhez (Kammanadiminti and Chadee, 2006; Zheng és mtsai., 2008).

Bár a hősokkfehérjéket sokáig intracelluláris molekuláknak tekintették, számos eredmény támasztja alá az extracelluláris térbe történő szekréciójukat, akár normál körülmények között, akár a sejtet ért stressz hatására. A hősokkfehérjék extracelluláris térbe történő kijutásának egyik lehetséges mechanizmusa, hogy nagymértékű károsodást követően a nekrotizáló sejtekből passzívan szabadulnak fel, és DAMP-ként funkcionálva egy erős gyulladáskeltő hatást indukálhatnak (Basu és mtsai., 2000; Saito és mtsai., 2005). Enyhe stressz esetén a hősokkfehérjék aktív szekrécióval is kijuthatnak a sejtekből. Az aktív export folyamata azonban egyelőre még nem tisztázott, ugyanis a hősokkfehérjék nem hordoznak szekréciós szignálszekvenciát, illetve a klasszikus szekréciós útvonalak legátlása nem akadályozta meg a

sejtből való kijutásukat (Dukay és mtsai., 2019). Egy potenciális alternatív útvonal lehet a lizoszomális szekréció, amelyet korábbi megfigyelések is alátámasztanak. Kimutatták például a HSPB1 lizoszomális markerrel való kolokalizációját, valamint hőstresszt követően a HSPA1 mennyiségének megemelkedését a lizoszomális frakcióban. Emellett a HSPA1 exportja gátolható volt a lizoszómán belüli pH megemelésével, valamint a lizoszomális membrán károsítása révén (Hunter-Lavin és mtsai., 2004; Mambula és Calderwood, 2006; Rayner és mtsai., 2008). Ezen kívül egy másik lehetséges útvonal az exoszómális felszabadulás. Ebben az esetben a hősokkfehérjék szállítódhatnak kizárólag az exoszómák lumenében, de megfigyelték már őket membrán-kötött állapotban, illetve az exoszómák felszínén is, amely módosíthatja a célsejten kifejtett hatásukat (Clayton és mtsai., 2005; Gastpar és mtsai., 2005; Vega és mtsai., 2008; Nafar és mtsai., 2015). Az exoszómák lumenében felszabadult hősokkfehérjék csak akkor tudják kifejteni hatásukat, ha a vezikulák a sejten kívül felrepednek vagy összeolvadnak a sejtmembránnal, és így tartalmukat az extracelluláris térbe vagy a citoszolba juttatják (De Maio és Vazquez, 2013). A membránfúziót követően a sejtbe került hősokkfehérjék a fentebb említett intracelluláris útvonalon hatnak. Az extracelluláris vezikulák membránjában megjelenő hősokkfehérjék funkciója viszont nagymértékben függ attól, hogy mely felületi receptorhoz kötődnek. Például toll-szerű (toll-like receptor, TLR) vagy CD (differenciációs klaszter) receptorokon keresztül indukálhatják az NF-κB jelátviteli utat és fokozhatják a gyulladás mértékét (van Noort, 2008; Kim és Yenari, 2013). Valószínű, hogy léteznek más, eddig még nem jellemzett receptorok, amelyeken keresztül a hősokkfehérjék képesek szabályozni az immunfolyamatokat, és amelyeken keresztül akár gyulladáscsökkentő hatást is kifejthetnek. Ezen kívül a kialakult gyulladáskeltő vagy gyulladáscsökkentő hatást a különböző sejtfelszíni receptorok egyidőben történő aktiválása is nagymértékben befolyásolhatja (Calderwood és mtsai., 2016). Az extracelluláris hősokkfehérjék a gyulladásos folyamatokon kívül részt vesznek az adaptív immunválasz kialakításában is azáltal, hogy hozzájárulnak az antigén prezentáció folyamatához (Zininga és mtsai., 2018).



1. ábra A hősokkfehérjék szerepe a gyulladásos folyamatok szabályozásában
(Dukay és mtsai., 2019)

1.4. A HSPB1 szerepe az idegrendszeri gyulladásban

A HSPB1 jól ismert chaperon funkciója mellett számos olyan folyamatban vesz részt, amelyek szoros összefüggésben állnak a neuroinflammációval. A HSPB1 például elősegíti a sejtváz stabilizációját azáltal, hogy hozzákötődik különböző sejtvázalkotó filamentumokhoz, mint a gliális fibrilláris savas fehérje (GFAP), a vimentin vagy a neurofilamentum (Der Perng és mtsai., 1999; Nefedova és mtsai., 2017). Ez nem csak a sejtek stressz elleni védekezésében lehet meghatározó, de a gliasejtek aktivációjában is, ahol kulcsfontosságú az intermedier filamentumok szintjének megemelkedése és ezen hálózatok átrendeződése. A gyulladást gyakran kíséri neurodegeneráció is, azonban a HSPB1 apoptózist gátló szerepét már többféle károsító hatást követően bizonyították (Stetler és mtsai., 2009).

Ezenfelül számos irodalmi adat igazolja, hogy a HSPB1 befolyásolhatja a citokinek expresszióját is, de az, hogy gyulladáskeltő vagy gyulladáscsökkentő tulajdonságokkal rendelkezik-e, még nem teljesen világos. Egy korábbi összefoglaló tanulmány a HSPB1-et gyulladáscsökkentő fehérjeként írta le, amely indukálja többek között a gyulladásgátló IL-10 expresszióját, azonban a tanulmányban felsorolt adatok elsősorban perifériás gyulladásos kísérletekből származnak (Giuliano és mtsai., 2011). Ezzel szemben Bruinsma és munkatársai kimutatták, hogy humán asztrocita sejtekben extracelluláris HSPB1 kezelés hatására nagymértékben megnövekedett a gyulladáskeltő IL-8 termelés, míg a gyulladásgátló transzformáló növekedési faktor- β1 (TGF-β1), valamint a CD40 ligand expressziója jelentősen lecsökkent (Bruinsma és mtsai., 2011). A gyulladásos faktorok termelődésében fontos szerepet játszó NF-κB útvonal aktiválódását is képes szabályozni a HSPB1. Primer mikroglia sejtekben a HSPB1 az IKKβ-hez kötve elősegítette annak chaperon-mediált autofágia általi lebontását, így az NF-κB inaktív állapotban maradt és a TNFα expresszió lecsökkent (Liu és mtsai., 2018). Ugyanakkor humán makrofág sejtkultúrában a rekombináns HSPB1 kezelés fokozta az NF-κB transzkripciós aktivitását az IκBα (nukleáris faktor-κBα inhibítor) lebontása révén, ami gyulladáskeltő és gyulladásgátló citokinek, például az *IL1b*, a *TNF*, az IL-10 és a granulocita-makrofág kolóniastimuláló faktor fokozott termelődését és szekrécióját eredményezte (Salari és mtsai., 2013).

A HSPB1 a vér-agy gáton kifejtett hatása által közvetett védelmet nyújthat a neuroinflammációval szemben. Endotél sejtek által túltermelt HSPB1 csökkentette a vér-agy gát permeabilitását iszkémia/reperfúziót követően, amely hatást elsősorban az aktin filamentumok és a kapcsolófehérjék stabilizálása révén érte el. Mi több, hosszútávon is enyhítette a károsodás mértékét, mert a gát funkció javításával megakadályozta a perifériás immunsejtek agyszövetbe való bejutását (Shi és mtsai., 2017). Egy másik tanulmányban leírták, hogy a HSPB1 transzgenikus túltermeltetése középső agyi artéria elzáródást követően csökkentette a mikroerek falát alkotó sejtek pusztulásának mértékét és bizonyos gyulladásos citokinek termelődését, valamint gátolta a neutrofil granulociták infiltrációját (Leak és mtsai., 2013). Hasonló akut sérülés után az intravénásan bejuttatott foszforilált rekombináns HSPB1 szintén védő hatásúnak bizonyult a vér-agy gát tekintetében, de emellett alkalmazása csökkentette még az ionizált kálcium-kötő adaptor molekula-1 (IBA1) pozitív mikroglia sejtek számát és a mátrix metalloproteázok aktivitását is (Shimada és mtsai., 2018). Összességében

egyre több adat támasztja alá, hogy a HSPB1 sokféleképpen befolyásolhatja a gyulladással kapcsolatos folyamatokat, azonban a sejttípustól vagy az adott sejt állapotától függően eltérő hatásokat válthat ki.

1.5. Az akut idegrendszeri gyulladás modellezése etanol kezeléssel

A nem fertőzések útján kialakuló idegrendszeri elváltozások egyik központi mechanizmusa a steril gyulladás kialakulása, amelyet jelen kísérletben akut etanol kezeléssel modelleztünk. A kísérleti dózist (5g/kg etanol) Ikonomidou és munkatársai által 2000-ben publikált tanulmány alapján választottuk meg, amelyben leírták, hogy 7 napos patkányok véralkohol koncentrációját legalább 4 órán keresztül a toxikus határérték (200 mg/dl) felett tartva egy gyorsan kialakuló, nagyfokú neurodegenáráció veszi kezdetét az agyban. Ennek oka, hogy a magzati agy rendkívül érzékeny az etanol citotoxikus hatására a szinaptogenezis időszaka során, amely emberekben prenatálisan az utolsó trimeszterben, rágcsálókban pedig posztnatálisan játszódik le (Ikonomidou és mtsai., 2000). Ezzel egyidőben az akut etanol túladagolás előidézi a mikroglia sejtek átmeneti aktiválódását és a GFAP-pozitív asztrociták számának tartós növekedését is, valamint fokozza számos gyulladáskeltő faktor termelődését, így ez a modell alkalmas a neuroinflammáció vizsgálatára (Saito és mtsai., 2016). A fejlődő agyban a mikroglia sejtek aktiválódásának foka és időbeni kiterjedése szoros összefüggésben áll a sejtpusztulás mértékével. Annak ellenére, hogy a mikrogliális válasz elsődlegesen az apoptotizáló idegsejtek eltávolítására irányul, a mikroglia aktivációt kísérő fokozott gyulladáskeltő citokin expresszió a mikroglia sejteknek a gyulladás kialakításában betöltött szerepét támasztja alá (Ahlers és mtsai., 2015). A szöveti sérülés során felszabadított DAMP-ok által indukált gyulladásos folyamatok mellett az etanol képes az immunreceptorokra, elsősorban a TLR4-re közvetlenül hatva is részt venni a neuroinflammációt kiváltó szignalizációs utak aktiválásában. Az alkohol hatására a magzati agyban bekövetkező szerkezeti és funkcionális elváltozások, valamint a velejáró gyulladás hosszútávú agykárosodást idézhetnek elő (Saito és mtsai., 2016; Guerri és Pascual, 2019).

2. Célkitűzések

Az utóbbi években egyre több tanulmány támasztja alá a HSPB1 neuroprotektív szerepét akut és krónikus idegrendszeri megbetegedésekben egyaránt. Csoportunk korábban igazolta a humán HSPB1 túltermelő transzgenikus egerekben a hHSPB1 védő hatását neurodegeneratív folyamatokban. Mivel ezen betegségekben központi szerepet játszanak a gyulladásos folyamatok, ezért jelen munkánk során a hHSPB1 neuroinflammációban betöltött szerepének vizsgálatát tűztük ki célul.

Munkánk során a következő kérdésekre kerestük a választ:

1. A hHSPB1 túltermelés hogyan hat a neuroinflammációs folyamatokra *in vivo*?
   Befolyásolja-e és hogyan
   a) a citokinek génexpresszióját?
   b) a mikroglia sejtek aktiválódását?
   c) a reaktív asztrogliózis kialakulását?
   d) a sejtpusztulás mértékét?

2. A hHSPB1 túltermelő transzgenikus állatokban megfigyelt hatásokért az agy mely sejttípusai felelősek?
   a) Mely sejttípus a fő citokin forrás?
   b) Az extracelluláris vagy az intracelluláris hHSPB1 játszik-e szerepet a gyulladásos folyamatok szabályozásában?
   c) Hogyan változik az egyes sejttípusokban a hHSPB1 expressziós mintázata etanol, illetve citokin kezelést követően?

A 2. kérdés megválaszolásában Prof. Deli Mária és a Biológiai Barrierek Kutatócsoport (SZBK Biofizikai Intézet) nyújtott segítséget, akik nagy tapasztalattal rendelkeznek a primer mikroglia és asztrocita sejtkultúrákkal való munkában, míg csoportunk a primer neuron kultúrákon végezte el a kísérleteket.

3. Anyagok és módszerek

3.1. *In vivo* kísérletek

3.1.1. Állatok

A kísérletet az 2010/63/EU irányelvnek megfelelően végeztük el, a regionális Élelmiszerlánc-biztonsági és Állategészségügyi Igazgatóság (Csongrád-megye, Magyarország) által jóváhagyott XVI/4136/2014 projektengedély alapján. Az egereket két-háromfős csoportokban, kontrollált körülmények között (24 °C, 12 órás világos-sötét ciklus) helyeztük el, igény szerint hozzáférhető táplálékkal és vízzel. Vizsgálatainkhoz 7 napos hHSPB1 túltermelő transzgenikus egereket és vad típusú alomtársaikat használtuk. A transzgént hemizigóta formában hordozó hHSPB1 túltermelő transzgenikus egértörzset csoportunk állította elő korábban C57BL/6 genetikai háttéren (Tóth és mtsai., 2013).

3.1.2. Akut etanol kezelés

Ikonomidou és munkatársai tanulmánya alapján 20%-os etanol-oldat szubkután injekciójával neurodegenerációt indukáltunk 7 napos vad típusú és hHSPB1 túltermelő transzgenikus egerekben (Ikonomidou és mtsai., 2000). Az összesen 5 g/ttkg etanol kezelést az állatok két egyenlő 2,5 g/ttkg-os dózisban kapták meg 2 óra különbséggel. A kontroll állatokat azonos térfogatmennyiségű fiziológiás sóoldattal kezeltük. A második injekció beadása után 7 órával/24 órával/1 héttel az állatok agyát eltávolítottuk, és a következőképpen dolgoztuk fel: a TUNEL-.próbához szükséges mintákat kriosztátos metszéshez OCT médiumba ágyaztuk be (Tissue-Tek, Sakura Finetek, CA, USA); az immunhisztokémiai festésekhez az agyakat 3% paraformaldehid (PFA) - 0,1 M foszfátpuffer oldatban posztfixáltuk, majd cukoroldatban tároltuk; valamint RNS izoláláshoz AccuZol Reagensben, illetve fehérje izoláláshoz RIPA pufferben homogenizáltuk az agymintákat. Emellett farok biopsziákat vettünk genomi DNS izoláláshoz és genotípus meghatározáshoz.

3.1.3. DNS tisztítás transzgenikus egerek farokmintáiból

Az állatok terminálása után a 7 napos utódok farokvégének levágásával szövetmintát vettünk. A szövetmintákat egy éjszakán át (overnight – O/N) 55°C-on emésztettük 15 µl proteináz K (10 µg/ml) és 200 µl TNES (10 mM Tris, 400 mM NaCl, 100 mM EDTA, 0,6% SDS) puffer hozzáadásával. Másnap 55 µl telített NaCl segítségével a mintákból a fehérjéket

kisóztuk, majd szobahőmérsékleten történő 10 perces centrifugálás (16060 *g*) után a felülúszóból 500 µl-t átmértünk egy tiszta Eppendorf-csőbe. A mintákat 200 µl kloroform hozzáadása után újabb 10 percig centrifugáltuk (16060 *g*), majd egy térfogatnyi 90%-os jéghideg etanol hozzáadásával kicsaptuk a DNS-t a felülúszóból. Ezután 30 perces 4 °C-on történő centrifugálással (15710 *g*) ülepítettük a pelletet, amit 70%-os etanollal mostunk. A mintát végül szobahőmérsékleten 2 percig centrifugáltuk (16060 *g*). A DNS-t ezután 50-100 µl 10mM TRIS-HCl (pH=7,4) pufferben visszaoldottuk 1 órán keresztül 65°C-on inkubálva. Végül spektrofotométer segítségével OD 260 nm-en (Nanodrop, DE, USA) meghatároztuk a DNS oldatok koncentrációját, és -20°C-on tároltuk őket felhasználásig.

3.1.4. A hHSPB1 transzgén jelenlétének kimutatása PCR analízissel

A PCR reakcióelegy tartalma: 10 µl templát DNS (400 ng); 8,65 µl steril H_2O; 2,5 µl 10 x Dream Taq Buffer; 0,5-0,5 µl forward és reverz primer; 2,5 µl 2mM dNTP; 0,35 µl Taq polimeráz enzim (Thermo Scientific Dream Taq kit). A reakcióhoz a humán gén promóter régiójára tervezett primer párt használtunk (hHSPB1 forward primer: 5'-GTC CCT GGA TGT CAA CCA CT -3'; hHSPB1 reverz primer: 5'-GAC TGG GAT GGT GAT CTC GT -3').
A 25 µl össztérfogatú PCR reakció programjának paraméterei (BIO-RAD MiniOpticon): denaturáció: 95°C - 3 perc, denaturáció: 95°C – 30 másodperc, annaeling: 58°C - 30 másodperc, elongáció: 72°C – 1 perc, 35 ciklusban, végül 72°C - 5 perc. A reakciót követően a termékeket 100V-on 1,5%-os agaróz gélben szeparáltuk és 1,2 µl etídium-bromid hozzáadásával tettük láthatóvá.

3.1.5. hHSPB1 Western-blot analízis

A transzgenikus humán HSPB1 fehérje szintjét 7 napos egerek teljes agy homogenizátumából határoztuk meg. Az agyakat 2 ml fenil-metil-szulfonil-fluoridot és 2 mM N-etil-maleimidet tartalmazó 1 ml RIPA pufferben homogenizáltuk. Centrifugálás után (13000 *g*, 25 perc, 4 °C) a felülúszók fehérjekoncentrációját NanoDropND-1000 spektrofotométerrel mértük meg 280 nm-en. Ezután 5 mg/ml mintát összekevertünk SDS-t, glicerint, β-merkaptoetanolt, bróm-fenol-kéket tartalmazó mintapufferrel, és 5 percig 95 °C-on inkubáltuk. A fehérjemintákat (50 µg) 15% -os SDS-poliakrilamid gélbe töltöttük, és a mintákat 80 V-on 2 órán át futtattuk. Ezután a fehérjéket PVDF membránokra (Pall Corporation, NY, USA)

transzferáltuk, 1x transzfer pufferbe merítettük, és 200 mA áramerősségen 1 órán át blottoltuk. A membránokat ezután 5% zsírmentes tejport tartalmazó PBST-ben (1,5% Tween-20-PBS) blokkoltuk 1 órán át szobahőmérsékleten. A vizsgálat során a következő primer antitesteket használtuk: anti-hHSPB1 (O/N, 4 °C, Stressgen-Enzo Life Sciences, NY, USA, nem keresztreagál az egér HSPB1-gyel) és anti-aktin (2 óra, szobahőmérséklet, Sigma-Aldrich Ltd., Budapest, Magyarország). Az elsődleges ellenanyagokat 3 x 10 perces PBST mosás követte, majd torma-peroxidázzal konjugált anti-nyúl másodlagos ellenanyaggal kezeltük a membránt (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Cambridgeshire, Egyesült Királyság) (az antitestek részletes leírása - lásd F1. táblázat). Végül a membránokat kemilumineszcens detektáló reagenssel (Luminata Forte Western HRP Substrate, Merck Millipore, MA, USA) inkubáltuk 2 percig, és a fehérjéket röntgenfilmen detektáltuk. Az eredmények számszerűsítését a nyílt hozzáférésű ImageJ szoftver segítségével végeztük.

3.1.6. Totál RNS izolálás és reverz transzkripció

A teljes agy mintákat 1 ml AccuZol reagenssel (Bioneer, Dél-Korea) homogenizáltuk, majd 200 µl kloroform hozzáadása után a mintákat 5 percig jégen inkubáltuk. A fázisokat centrifugálással választottuk el (13 000 *g*, 15 perc, 4 °C), majd a vizes fázisból 100% izopropil-alkohollal kicsaptuk az RNS-t 10 percig -20 °C-on inkubálva. Újabb centrifugálás után (13 000 *g*, 10 perc, 4 °C) az RNS pelleteket 80%-os etanollal mostuk, majd centrifugálással ülepítettük (13 000 *g*, 5 perc, 4 °C). Az RNS pelleteket RNáz-mentes vízben oldottuk vissza és Nucleo Spin RNA Clean-Up oszlopokkal (Macherey-Nagel, Düren, Németország) tisztítottuk. A mintákat DNázzal kezeltük, és végül a membránról RNáz-mentes vízzel eluáltuk. A minták koncentrációit 230 nm-en spektrofotométerrel mértük meg (NanoDrop ND-1000, Nanodrop, DE, USA). Az mRNS mintákat reverz transzkripcióval (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems, CA, USA) írtuk át cDNS-sé a gyártó utasításainak megfelelően. A reakció során kapott cDNS termékeket a 20-szorosára hígítottuk.

3.1.7. Valós idejű (RT) PCR-elemzés

RT-PCR segítségével a hHSPB1, a citokinek és a gliasejt markerek expressziós szintjének változásait vizsgáltuk. A génspecifikus primereket az F2 táblázat tartalmazza. Mindegyik reakciót 20 µl össztérfogatban mértük össze, amely 10 µl Power SYBR Green PCR

Master Mix-et (Applied Biosystems, CA, USA), 1 µl 5 pmol/µl primer keveréket (forward+reverz) és 9 µl cDNS mintát tartalmazott. Az amplifikációt RotorGene 3000 eszközön (Corbett Research, Ausztrália) hajtottuk végre, a következő ciklusparaméterekkel: hőaktiválás 95 °C-on 10 percig; ezt követi 45 cikluson keresztül ismétlődve: denaturáció 95 °C-on 15 másodpercig, annealing 56 °C-on 15 másodpercig, és elongáció 60 °C-on 40 másodpercig. Végül pedig az olvadási görbe rögzítése történt 50-95 °C között. A vizsgált gének expressziós szintjét egy endogén kontroll génre, a *Gapdh*-ra (glicerinaldehid-3-foszfát-dehidrogenáz) normalizáltuk. A vizsgált gének relatív expresszióját a kontroll vad típusú állatokhoz viszonyítva ΔΔCt módszerrel számoltuk ki.

3.1.8. TUNEL-próba

Az apoptótikus sejtpusztulás szintjének kvantitatív meghatározásához TUNEL-próbát (terminális deoxinukleotidil transzferáz-közvetített dUTP végjelölés) alkalmaztunk, amely a fragmentált DNS-t jelöli. Az agyakat OCT médiumba ágyaztuk, majd 10 µm-es sagittális fagyasztott metszeteket készítettünk. A metszeteket 4% PFA-ban (pH=7,4) posztfixáltuk szobahőmérsékleten 20 percig. Egy 30 perces PBS mosást követően a metszeteket 3% H_2O_2-t tartalmazó metanolban inkubáltuk 10 percig, majd 2 percig permeabilizáltuk 0,1% Triton X–100-at és 0,1% nátrium-citrátot tartalmazó oldatban. PBS-sel való mosás után 50 µl TUNEL reakcióelegyet adtunk minden mintához (In situ Cell Death Detection Kit, POD, Roche Applied Science, IN, USA), és a metszeteket 1 órán át 37 °C-on, párás közegben inkubáltuk. Ugyanezen körülmények között a metszeteket Converter-POD oldattal 30 percig inkubáltuk, majd egy PBS mosást követően peroxidáz reagenssel 10 perc alatt előhívtuk a jeleket. A vörös apoptótikus sejteket fénymikroszkóppal detektáltuk. A kvantitatív összehasonlítás érdekében a metszeteket Mirax Midi szkenner (3DHistech Ltd., Budapest, Magyarország) segítségével beszkenneltük, és a TUNEL-pozitív sejteket minden agymetszeten tizenöt látómezőben megszámoltuk.

3.1.9. Fluoreszcens immunhisztokémia

A hHSPB1 expressziós mintázatát kettős immunfestéssel tanulmányoztuk. A 30 µm vastagságú, fagyasztott sagittális agyi metszeteket PBS-es mosás után először 0,2% Triton X-100-zal permeabilizáltuk, majd 3% BSA-val blokkoltuk szobahőmérsékleten 1 órán keresztül. Ezután a metszeteket egy éjszakán át 4 °C-on inkubáltuk a következő elsődleges antitestekkel:

anti-IBA1 (Abcam, Cambridge, Egyesült Királyság), anti-GFAP (Sigma-Aldrich Ltd., Budapest, Magyarország), anti-NEUN (neuronális nukleáris antigén, Merck Millipore, MA, USA) és anti-hHSPB1. Másnap szekunder antitestekkel kezeltük a metszeteket 2 órán át: Alexa Fluor-488-jelölt anti-kecske (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Cambridgeshire, Egyesült Királyság); FITC-jelölt anti-egér (Sigma-Aldrich Ltd., Budapest, Magyarország); Alexa Fluor-647-jelölt anti-nyúl (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) (F1. táblázat). A sejtmagokat 5 percig 0,5 μg/ml 4',6-diamidino-2-fenilindollal (DAPI) (Sigma-Aldrich Ltd., Budapest, Magyarország) festettük. Az immunfestéseket konfokális lézer-pásztázó mikroszkóppal vizsgáltuk (Olympus Fluoview FV1000, Olympus Life Science Europa GmbH, Hamburg, Németország).

3.1.10. Peroxidázos immunhisztokémia

A gliasejtek aktivációjának elemzéséhez az agymetszeteket mikroglia és asztrocita markerekkel jelöltük. A hHSPB1 agyi expressziós mintázatát szintén megvizsgáltuk ezzel a módszerrel. A 30 μm-es metszeteket 20% metanollal és 3% H_2O_2-dal kezeltük 15 percig az endogén peroxidázok deaktiválása érdekében. Ezt követően a metszeteket PBS-ben mostuk, majd 2 órán át szobahőmérsékleten blokkoltuk 2% normál nyúl- vagy lószérummal és 0,3% BSA-val. Ezután a metszeteket anti-hHSPB1, anti-GFAP vagy anti-IBA1 primer antitestekkel inkubáltuk egy éjszakán át 4 °C-on. Ezt követően a metszeteket a megfelelő másodlagos antitestekkel inkubáltuk 2 órán át: peroxidázzal konjugált anti-nyúl, peroxidázzal konjugált anti-egér (Chemicon-Merck Millipore, MA, USA) vagy biotinilált anti-kecske (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Cambridgeshire, Egyesült Királyság) (F1. táblázat). A metszeteket ezután a kromogén szubsztráttal, az 1% nikkel-kloriddal kiegészített 10 mg/ml 3,3'-diaminobenzidinnel (DAB) (Sigma-Aldrich Ltd., Budapest, Magyarország) inkubáltuk 15 percig. Az IBA1 festéshez a DAB-os szignálkonverzió előtt egy avidin-biotin (VECTASTAIN Elite ABC Peroxidase Kit, Vector Laboratories, CA, USA) kezelést is alkalmaztunk 2 órán át szobahőmérsékleten, hogy erősítsük az immunhisztokémiai jelet. Az immunfestett mintákat egy metszet szkenner segítségével digitálisan beszkenneltük (Mirax Midi, 3DHistech Ltd., Budapest, Magyarország). Csoportonként három állatot és minden állat agyából három metszetet vizsgáltunk párhuzamosan. A képeket a Pannoramic Viewer 1.15.4, a CaseViewer 2.1 és a QuantCenter, HistoQuant modul szoftverekkel (3DHistech Ltd., Budapest, Magyarország) elemeztük. A vizsgált agyterületeket manuálisan annotáltuk, majd a program segítségével

kiértékeltük az immunpozitív területek méretét. Az immunpozitív területek arányát a teljes annotált területhez viszonyítva adtuk meg, és százalékban ábrázoltuk (relatív terület %). A különböző morfológiájú mikroglia sejtek felderítésére és osztályozására a Dr. Horváth Péter csoportja által kifejlesztett, mély tanuláson (deep learning) alapuló, FindMyCells szoftver kiterjesztett verzióját használtuk.

3.2. *In vitro* kísérletek

3.2.1. Primer sejtkultúrák készítése

A primer neuronok izolálását Pacifici és Peruzzi leírása szerint végeztük, némi módosítással (Pacifici és Peruzzi, 2012). Az elsődleges kérgi neuronokat 17 napos hHSPB1 transzgenikus egerekből és vad típusú alomtársaikból izoláltuk. Röviden, az embriókat hideg disszekciós médiumban mostuk, majd az egész agyat eltávolítottuk, és jéghideg Hibernate E médiumba helyeztük (BrainBits, IL, USA). Az agykérgeket elkülönítettük, az agyhártyákat eltávolítottuk a felszínükről. Hibernate E médiummal történő mosást követően a kérgi szövetet TryplE-vel 10 percig 37 °C-on enzimatikusan emésztettük (Gibco, Life Technologies, CA, USA). Ezután az emésztett agykérgeket háromszor Hibernate E-vel mostuk, majd 18G és 20G tűkkel (B. Braun, Németország) 200 mM Glutamax-ot (Gibco, Life Technologies, CA, USA) tartalmazó Neurobasal/B27 médiumban (Gibco, Life Technologies, CA, USA) homogenizáltuk. Végül a szuszpenziót Neurobasal/B27 médiummal hígítottuk, és a sejteket Countess Automated Cell Counter (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) segítségével megszámoltuk. A sejteket poli-D-lizinnel bevont 96 lyukú lemezekre szélesztettük 2×10^4 sejt/lyuk sűrűséggel. A primer neuronokat 5% CO_2 mellett 37 °C hőmérsékletű inkubátorban tenyésztettük 5 napig.

A primer asztrocita és mikroglia sejtkultúrákat Lénárt és munkatársai által leírtak alapján Prof. Deli Mária csoportja hozta létre (Lénárt és mtsai., 2015). Röviden: 4 napos vad típusú és hHSPB1 transzgenikus egerekből kisagy és bulbus olfactorius nélküli előagyakat izoláltak, amiket jéghideg PBS-be helyeztek. Az agyhártyákat finom csipesszel és steril szűrőpapírral eltávolították az agy felszínéről. Kis kéregdarabokat tettek 50 ml-es csövekbe, majd a szövetet mechanikusan homogenizálták egy hosszú, vékony tűvel (21G 4 ¾, B. Braun, Németország). Az izolált sejteket bevonat nélküli T25 flaskákba szélesztették (Corning Costar Co., MA, USA), és alacsony glükóztartalmú Dulbecco's Modified Eagle médiumban tenyésztették (Gibco, Life Technologies, CA, USA), amely 10% FBS-t (Sera Plus, Pan Biotech, Aidenbach, Németország)

és 50 μg/ml gentamicint (Sigma-Aldrich Ltd., Budapest, Magyarország) tartalmazott. A sejteket konfluens állapotig tenyésztették és 2 naponta cserélték a médiumot.

A mikroglia sejteket a primer asztrolgia kultúrák felületéről izolálták (Lian és mtsai., 2016). Az asztrocita sejteket nem passzálták a konfluens állapot elérése után, hanem hosszabb ideig engedték nőni őket a flaskában. Tíz nap elteltével a kerek morfológiájú mikroglia sejtek az asztroglia réteg tetejére vándoroltak. A flaskák óvatos ütögetése után a leváló mikroglia sejteket összegyűjtötték, és asztroglia médiumban poli-L-lizinnel bevont 96 lyukú lemezekre helyezték 2×10^4 sejt/lyuk sűrűségben. Ezzel a módszerrel egy héten keresztül minden második napon további mikroglia sejteket gyűjtöttek az asztroglia réteg felszínéről. A médium felét naponta cserélték, és kezelés előtt a sejteket 7 napig tenyésztették.

3.2.2. Az izolált primer sejttenyészetek tisztaságának meghatározása immunfestéssel

A primer neuron, asztrocita és mikroglia sejtkultúrák tisztaságának meghatározása céljából a tenyészeteket a különböző sejttípusokra specifikus markerekkel jelöltük. A korábban leírt permeabilizációs és blokkolási lépéseket követően (lásd a „3.2.5. Fluoreszcens immunfestés” című fejezetet) a tenyészeteket kétféle markerrel festettük meg. A neuronkultúrák tisztaságának ellenőrzéséhez a mikrotubulus-asszociált fehérje-2 neuronális markert (anti-MAP2, Abcam, Cambridge, Egyesült Királyság) és a GFAP asztrocita markert (anti-GFAP) alkalmaztuk. A primer asztrocita tenyészeteket mikroglia sejtek szennyezhetik, és fordítva, ezért az asztrocita és a mikroglia tenyészetek tisztaságának értékeléséhez a GFAP és az IBA1 markereket használtuk (F1. táblázat). A másodlagos antitestek az alábbiak voltak: Alexa Fluor-594-jelölt anti-csirke (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Cambridgeshire, Egyesült Királyság); Alexa Fluor-488-jelölt anti-egér (Life Technologies, Invitrogen, USA), Alexa Fluor-488-jelölt anti-kecske (Life Technologies, Invitrogen, USA), Dylight 549-jelölt anti-egér (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Cambridgeshire, Egyesült Királyság), (F1. táblázat). A mintákról fedést követően (Fluoromount-G; Southern Biotech, AL, USA) konfokális lézer-pásztázó mikroszkópokkal (Olympus Fluoview FV1000, Olympus Life Science Europa GmbH, Németország; Leica SP8 Confocal mikroszkóp, Leica Microsystems, Németország) a tenyésztőfelület random pontjain képeket készítettünk (legalább 3 kép/minta). A sejtmagokat mindkét marker esetén megszámoltuk, és az adott markerre pozitív sejtek számát az össz sejtszámhoz viszonyítva százalékban ábrázoltuk.

3.2.3. Sejtek életképességének vizsgálata

3.2.3.1. Valósidejű sejtanalízis

Prof. Deli Mária és munkatársai segítségével citokin és etanol kezelés után a primer neuronok és asztrociták életképességét valós idejű sejtanalízissel vizsgáltuk, amely során a sejtek életképességének kimutatása jelölő ágens hozzáadása nélkül történik. Az ACEA arany elektródákat tartalmazó 96 lyukú lemezt alkalmazó (RTCA-SP, E-plate, ACEA Biosciences, CA, USA) módszere egy impedancia mérésen alapuló érzékeny vizsgálat (Harazin és mtsai., 2018; Barna és mtsai., 2020). A mért impedancia alapján következtetni lehet a sejt alakjának változására, a sejtpusztulásra, valamint a sejtek felületre történő letapadására is. Az RTCA-SP rendszer 10 percenként automatikusan méri a sejtek letapadásának mértékét és növekedését, ezáltal meghatározva a sejtindexet, amely az elektródák felületére tapadt sejtek impedanciájának a háttérimpedanciával korrigált értéke. A méréshez a neuronokat és az asztrocita sejteket egy poli-L- és poli-D-lizinnel bevont 96 lyukú E-platere szélesztettük. A háttérimpedancia méréséhez mindegyik lyukba először 50 µl tenyésztő médiumot adtunk, majd a háttér regisztrálása után 50 µl sejtszuszpenziót adtunk a lyukakhoz, amely asztrociták esetén 6×10^3 sejt/lyuk, neuronok esetében pedig $1{,}8 \times 10^4$ sejt/lyuk sűrűségű volt. Amikor a sejtnövekedés elérte a plató fázist, 10 ng/ml rekombináns humán TNFα és IL-1β keverékével, valamint 10-800 mM etanollal kezeltük a sejteket, és az impedancia változásokat 24 órán keresztül regisztráltuk. A maximális sejtpusztulás meghatározásához 1%-os Triton X-100 detergenst alkalmaztunk.

3.2.3.2. Resazurin-próba

A neuronok esetében az etanol kezelés hatékony koncentrációjának meghatározásához Resazurin-próbát alkalmaztunk. A primer neuronokat poli-D-lizinnel bevont fekete falú 96 lyukú lemezre (Greiner Bio-One, Németország) szélesztettük 2×10^4 sejt/lyuk sűrűségben. A sejteket fenol-vörös mentes Neurobsasal/B27 médiumban tenyésztettük. A neuronokat 5 nappal az izolálás után 24 órán át a következő etanolkoncentrációkkal kezeltük: 0; 100; 200; 400; 800 mM. Az összes etanolkoncentrációt 8 párhuzamosban teszteltük. Egy nap elteltével a kezelő médiumot 10% resazurint tartalmazó médiumra cseréltük, és 4 órán át 37 °C-on inkubáltuk. A reagens előállításához resazurin-nátrium-sót (Sigma-Aldrich Ltd., Budapest, Magyarország) használtunk. Az élő sejtek mitokondriumaiban a kék színű, nem fluoreszcens resazurin piros színű, fluoreszcens resorufinná redukálódik. A sejtek metabolikus aktivitása tehát arányos a

minták fluoreszcencia intenzitásával, amit fluoreszcens mikroplate-olvasóval 565/580 nm-en mértünk meg.

3.2.3.3. Mikroglia életképesség

Ahhoz, hogy megvizsgáljuk az etanol és citokin kezeléseknek a mikroglia sejtek életképességére gyakorolt hatását az immunfestett mintákon manuálisan megszámoltuk az IBA1-pozitív sejtek DAPI-jelölt sejtmagjait csoportonként 10–23 képen, hogy ezek alapján megállapítsuk a sejtsűrűséget. (A festési eljárás részletes leírását lásd a „3.2.5. Fluoreszcens immunfestés” című fejezetben.)

3.2.4. A primer sejtkultúrák kezelése és a felülúszók gyűjtése

A primer neuronokat izolálás után 5 nappal humán TNFα és IL-1β kombinációjával (mindegyikből 10 ng/ml), illetve 200 mM etanollal kezeltük. A primer neuronokon végzett kezeléseket 96 lyukú lemezeken végeztük 50 µl/lyuk Neurobasal/B27 médiumban (Gibco, Life Technologies, CA, USA). A 24 órás kezelés után 3-3 lyukból a felülúszókat összegyűjtöttük, és a törmelék eltávolítása érdekében 510 *g*-n centrifugáltuk, majd felhasználásig -80 °C-on tároltuk. Eközben a sejteket 4% PFA-val fixáltuk 20 percig, majd immunfluoreszcens festések céljából 1x PBS-ben 4 °C-on tároltuk. A primer asztrocita és mikroglia sejtek kezelését és a felülúszó gyűjtését Prof. Deli Mária csoportja hasonlóan hajtotta végre, azzal az eltéréssel, hogy a glisejtek esetében egy alacsonyabb etanol koncentrációt (50 mM) alkalmaztak. A kezelés után a sejtkultúrák felülúszóit összegyűjtötték és -80 °C-on tárolták. A sejteket 3% PFA-val fixálták szobahőmérsékleten 15 percig, majd 0,1% nátrium-azidot tartalmazó PBS-ben 4 °C-on tárolták.

3.2.5. Fluoreszcens immunfestés

A hHSPB1 expressziós mintázatának elemzéséhez a PFA-fixált primer neuronokat 10 percig 0,1% Triton X-100-zal permeabilizáltuk. A sejteket ezután 3% BSA-val blokkoltuk 1 órán át, majd egy éjszakán át inkubáltuk anti-MAP2 és anti-hHSPB1 primer antitestekkel. Ezt követően a sejteket szekunder antitestekkel jelöltük 45 percig: Alexa Fluor-594-jelölt anti-csirke, Alexa Fluor-488-jelölt anti-nyúl (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) (F1. táblázat). A sejtmagokat 0,5 µg/ml koncentrációjú DAPI-val jelöltük 5 percig. A festéseket Leica SP8 Confocal mikroszkóppal vizsgáltuk. A hHSPB1 expresszió további értékeléséhez Prof. Deli

Mária és munkatársai a mikroglia és asztroglia sejteken is kettős festést végeztek. PFA fixálás után a permeabilizálást 0,2% Triton X-100-zal végezték (10 perc), majd 2% normál lószérummal vagy 5% normál kecskeszérummal blokkolták a mintákat. Az elsődleges antitestekkel egy éjszakán át inkubálták a sejteket: anti-IBA1, anti-GFAP, anti-hHSPB1. A másodlagos antitestekkel való inkubálás 1 órán át tartott: Alexa Fluor-488-jelölt anti-kecske, Cy3-jelölt anti-nyúl (Sigma-Aldrich Ltd., Budapest, Magyarország), Dylight 488-jelölt anti-nyúl (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Cambridgeshire, Egyesült Királyság), és Dylight 549-jelölt anti-egér. A sejtmag festésére a gliasejteknél Hoechst 33342 festéket használtak (F1. táblázat). A mintákat Olympus Fluoview FV1000 konfokális lézer-pásztázó mikroszkóppal vizsgálták.

A képeket Matlab szoftver segítségével elemeztük (MathWorks, Natick, MA, USA). Az asztrocitákból nyert intenzitásértékeket azokhoz a pixelszámokhoz normalizáltuk, ahonnan az intenzitási adatokat gyűjtöttük. A primer neuron tenyészet esetén azonban a tenyészetben maradó asztrocita sejtek is nagymértékben expresszálhatják a hHSPB1-et, ezért a neuronokból nyert hHSPB1 intenzitás értékeket a MAP2 neuronális marker pixelszámára normalizáltuk.

3.2.6. Enzim kapcsolt immunszorbens vizsgálatok (ELISA)

A felszabadított hHSPB1 és TNFα fehérjék koncentrációit mindhárom primer sejttenyészet felülúszójában humán HSPB1 ELISA kit (Enzo Life Sciences, NY, USA) és egér TNFα ELISA kit (Life Technologies, Invitrogen, USA) segítségével számszerűsítettük. Minden sejttípus esetében több kísérletből származó mintákat teszteltünk, hogy biológiai és technikai párhuzamosokat hozzunk létre. Az egér TNFα vizsgálatához 47 µl/lyuk, a hHSPB1 vizsgálathoz 95 µl/lyuk mennyiségű mintapufferrel hígított felülúszót használtunk. Mindkét ELISA kit esetén a kísérletet a gyártók utasításainak megfelelően végeztük el.

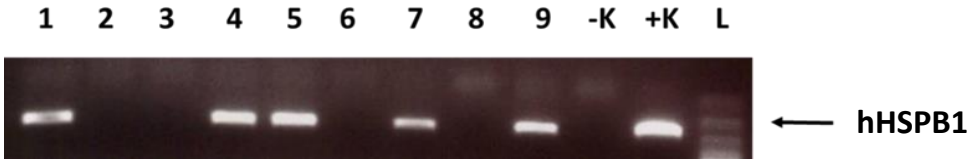
3.2.7. Statisztikai analízis

A kísérletek során kapott adatokat minden esetben átlag ± SEM formában ábrázoltuk. A statisztikai elemzés során kétutas ANOVA-t végeztünk Tukey post-hoc teszttel az OriginPro8 szoftver használatával (OriginLab, MA, USA) vagy kétmintás t-próbát a GraphPad Prism szoftver segítségével (GraphPad Software Inc., San Diego, Kalifornia, USA). Az adatokat $p < 0,05$-nél tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

4. Eredmények

4.1. A hHSPB1 transzgenikus egerek genotipizálása

Csoportunk korábban pronukleusz mikroinjekció segítségével előállított egy hHSPB1 túltermelő transzgenikus egértörzset, amelyben a humán HSPB1 gén egy citomegalovírus (CMV) promóter mögé van klónozva, ezáltal biztosítva a transzgén konstitutív expresszióját (Tóth és mtsai., 2010). A hHSPB1 transzgenikus állatok és a C57BL/6 vad típusú egerek keresztezése révén egy stabil hemizigóta transzgenikus vonal került előállításra. Kísérleteinkhez ezen törzsből származó utódokat használtuk, amelyek genotípusát, a megfelelő csoportok kialakítása végett, PCR segítségével határoztuk meg (2. ábra).



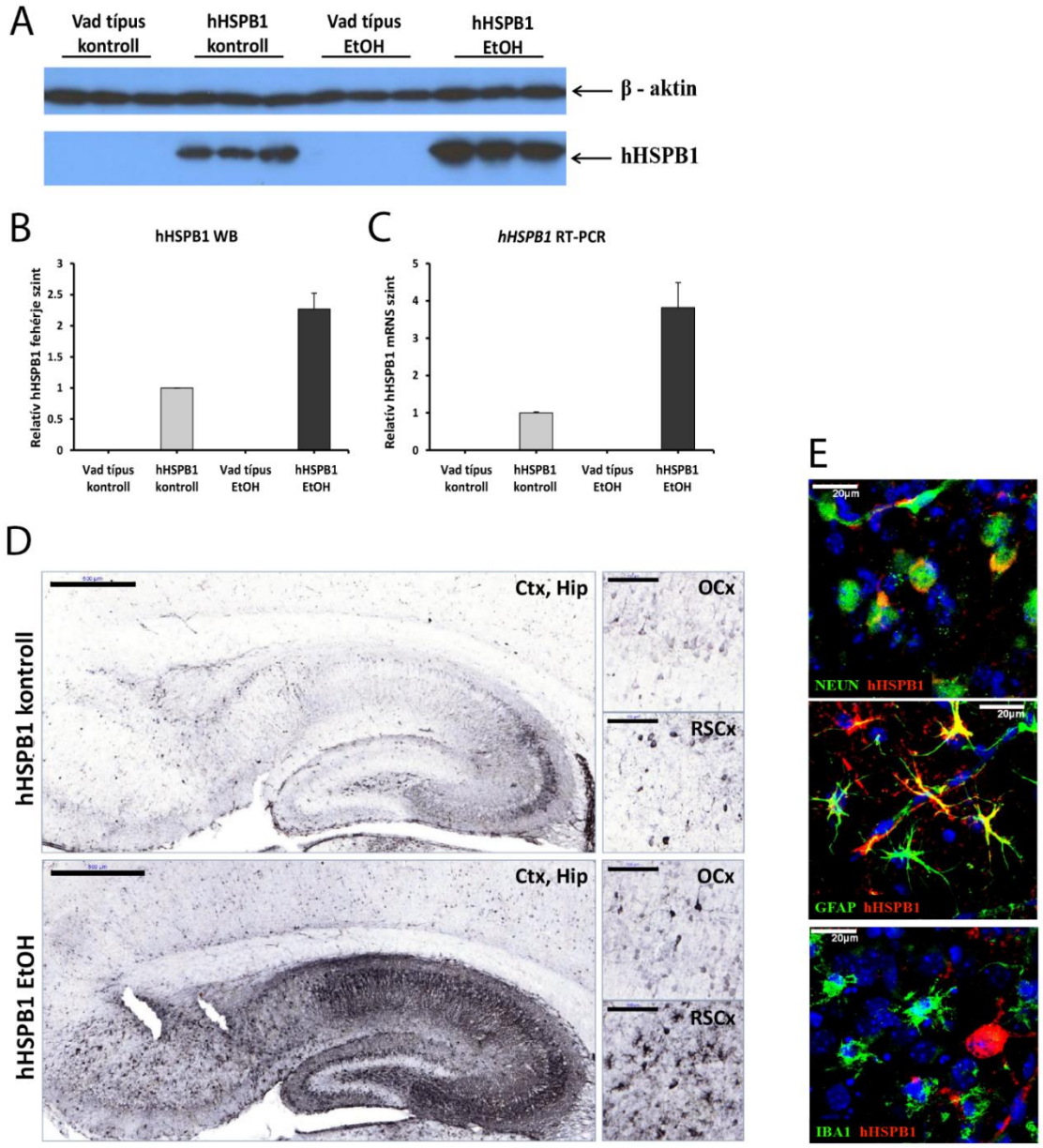
2. ábra A transzgén jelenlétének kimutatása PCR analízissel
-K: vad típusú állat, +K: tisztított plazmid, L: 100bp DNS marker

4.2. A hHSPB1 kifejeződési mintázata transzgenikus egerek agyszövetében

A transzgén korai posztnatális korra jellemző agyi expressziós mintázatát több módszer segítségével is tanulmányoztuk. Hét napos állatok teljes agy homogenizátumát RT-PCR-ral és Western-blottal elemezve megvizsgáltuk az alap expressziós szintet, valamint azt, hogy etanol kezelés hatására változik-e a hHSPB1 expresszió mértéke. Fontos, hogy az általunk használt RT-PCR primerek és a HSPB1 ellenanyag csak a transzgenikus humán fehérjét ismerik fel, az egér homológot nem. A kontroll állatokban a hHSPB1 magas szintű expresszióját mutattuk ki fehérje és mRNS szinten egyaránt. Érdekes módon a hHSPB1 expressziója 24 órával etanol kezelés után tovább növekedett (3.A-C ábra). Ezt immunhisztokémiai festésekkel is igazoltuk, amely során azt is megállapítottuk, hogy kezelés hatására elsősorban a hippokampális régióban és a retrospleniális kéregben nőtt meg a transzgenikus fehérje szintje (3.D ábra).

A hHSPB1 túltermelő állatok agyából származó metszeteken a transzgén sejtspecifikus kifejeződési mintázatát is megvizsgáltuk, amelyhez NEUN-hHSPB1, GFAP-hHSPB1 és IBA1-hHSPB1 kettős fluoreszcens immunfestéseket alkalmaztunk. A NEUN-hHSPB1 kettős immunfestés kimutatta a hHSPB1 fehérje jelenlétét a neuronokban, míg a hHSPB1 GFAP-val való kolokalizációja azt jelzi, hogy az asztrociták is expresszálják a transzgént. A többi

sejttípussal ellentétben az IBA1-pozitív mikroglia sejtek esetében csak kismértékű hHSPB1 jelölődést figyeltünk meg (3.E ábra).



3. ábra A hHSPB1 kifejeződési mintázata transzgenikus egér agyszövetében. A) A hHSPB1 transzgenikus fehérje szintjének tanulmányozása Western-blot analízissel, 24 órával etanol kezelést követően. Belső kontroll: egér β-aktin. **B)** A hHSPB1 Western-blot kiértékelése. hHSPB1 kontroll=1. Átlag±SEM; n=3. **C)** A *hHSPB1* relatív mRNS szintjének tanulmányozása RT-PCR segítségével 24 órával etanol kezelést követően. hHSPB1 kontroll=1. Átlag±SEM; n=8. **D)** hHSPB1 immunfestés sagittális agymetszeten 24 órával etanol kezelést követően. Mérce: 500 μm (Ctx, Hip); 100 μm (OCx, RSCx). Rövidítések: Ctx: kéreg, Hip: hippokampusz, RSCx: retrospleniális kéreg, OCx: occipitalis kéreg. **E)** A sejttípus specifikus hHSPB1 kifejeződést kettős immunfluoreszcens festéssel vizsgáltuk. Mérce: 20 μm. Piros: hHSPB1; zöld: IBA1/NEUN/GFAP; kék: sejtmag.

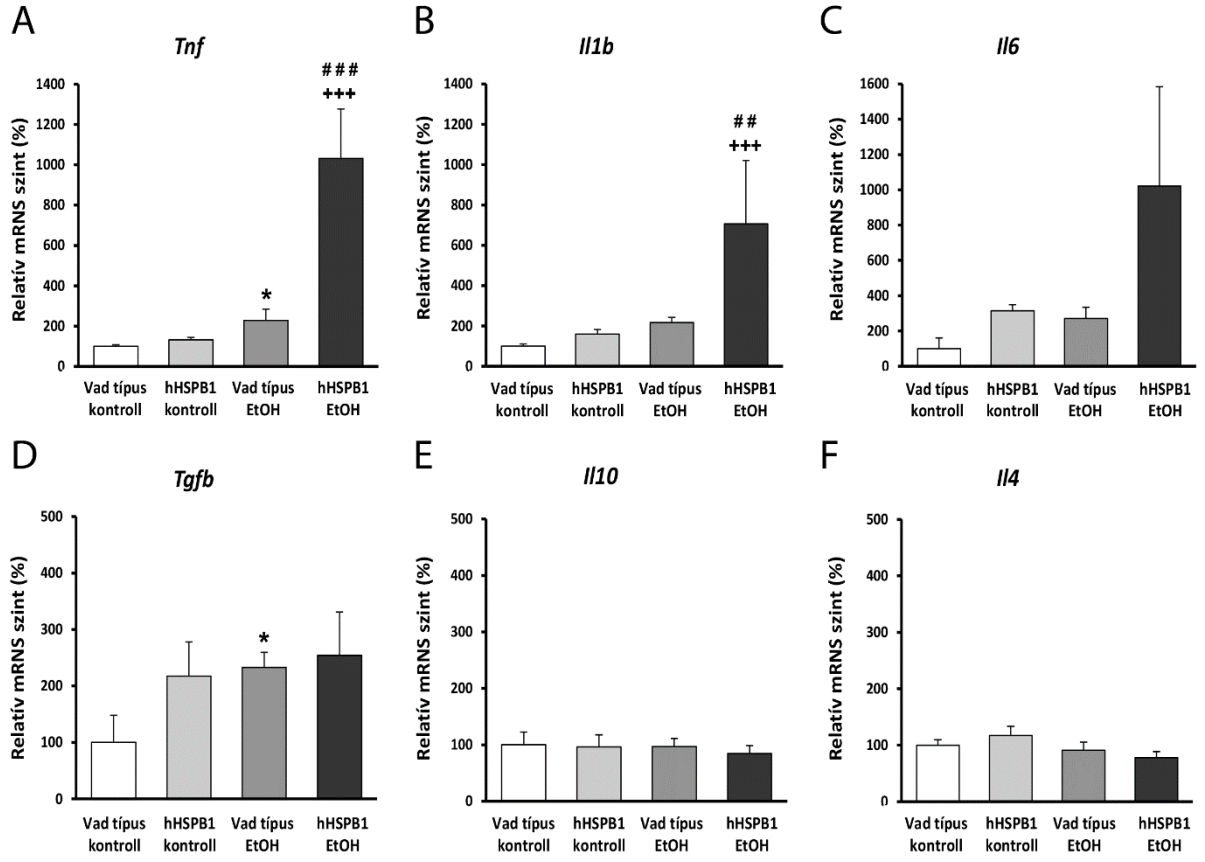
4.3. A hHSPB1 túltermelés hatása az etanol kezelés által kiváltott citokin termelésre

A gyulladás molekuláris markereinek, a citokinek génexpressziós szintjét RT-PCR segítségével tanulmányoztuk különböző időpontokban etanol kezelést követően. Kísérleteink során azt figyeltük meg, hogy a hHSPB1 túltermelés önmagában nem befolyásolta szignifikánsan a gyulladáskeltő citokinek expressziós szintjét, míg etanol kezelést követően egy erőteljesebb génexpresszióhoz vezetett a transzgenikus állatok agyszövetében. A *Tnf* esetén egy nagyon gyors választ figyeltünk meg, ugyanis mRNS szintje már 7 órával etanol kezelés után háromszorosára (297%) nőtt a vad típusú állatokban, és négyszeresére (413%) a hHSPB1 transzgenikus egerekben a vad típusú kontroll állatokhoz képest (100%, F1.A ábra). Az etanol kezelt vad típusú állatokban azonban ez a fokozott *Tnf* expresszió egy nappal később csökkeni kezdett, de még így is egy kétszer magasabb (229%) *Tnf* mRNS szintet mutattak, mint a kontroll vad típusú társaik (4.A ábra). Ezzel szemben a transzgenikus állatokban a *Tnf* expresszió mértéke tovább emelkedett 24 órával etanol kezelést követően, és esetükben egy kifejezetten magas, tízszeres (1031%) expressziós szint növekedés volt megfigyelhető (4.A ábra).

Hasonló változásokat tapasztaltunk az *Il1b* expressziós szintjében is, azonban ez a *Tnf*-hez képest etanol kezelés után egy későbbi időpontban kezdett el emelkedni. Egy nappal a kezelés után kétszeres növekedést mutatott a vad típusú állatokban, míg a transzgenikus állatokban egy szignifikánsan nagyobb, több mint hétszeres mRNS szint növekedést észleltünk (706%, 4.B ábra). A harmadik vizsgált gyulladáskeltő citokin, az *Il6* szintén hasonló, de nem szignifikáns génexpresszió növekedést mutatott az etanollal kezelt transzgenikus egerek agyszövetében (4.C ábra).

A gyulladáskeltő citokinekkel szemben a gyulladásgátló citokinek esetében a *Tgfb* expressziós szintjének változása eltérő képet mutatott, mivel már a kontroll csoportokban különbségek voltak megfigyelhetők az egyes genotípusok között. A fiziológiás sóoldat beadását követően 24 órával a transzgenikus állatokban közel kétszer magasabb volt a génexpresszió mértéke (218%), mint vad típusú alomtársaikban (100%, 4.D ábra). Etanol kezelést követően ez a fokozott expresszió a transzgenikus állatokban nem mutatott további szignifikáns emelkedést, míg vad típusú állatokban a kezelés hatására megduplázódott a *Tgfb* expressziójának mértéke (233%) a kontroll csoporthoz képest. A másik két gyulladásgátló citokin, az *Il10* és az *Il4*, expressziója azonban nem változott sem a hHSPB1 túltermelés, sem pedig etanol kezelés hatására (4.E-F ábra).

A citokinek közül a *Tnfa, Il1b, és a Tgfb* mRNS szintjét egy harmadik időpontban, etanol kezelést követően egy héttel is megvizsgáltuk. A kapott eredmények mindhárom citokin esetében egybevágnak, miszerint egy hét elteltével a génexpressziós szint a kontroll csoporthoz hasonló értéket mutatott vad típusú és transzgenikus egerek agyszövetében egyaránt (F1.A-C ábra).



4. ábra A hHSPB1 túltermelés hatása a citokinek expressziós szintjére. RT-PCR segítségével megvizsgáltuk a **A)** *Tnf*, **B)** *Il1b*, **C)** *Il6*, **D)** *Tgfb*, **E)** *Il10*, és az **F)** *Il4* relatív mRNS szintjét az agyszövetben 24 órával etanol kezelést követően. Vad típus kontroll=100%. Átlag±SEM; n=8. Jelölések: * vad típus EtOH vs vad típus kontroll; + hHSPB1 EtOH vs hHSPB1 kontroll; # hHSPB1 EtOH vs vad típus EtOH. Statisztikai próba: kétutas ANOVA Tukey post-hoc teszttel.* $p<0,05$; ## $p<0,01$; ###/+++ $p<0,001$.

4.4. A hHSPB1 túltermelés hatása az etanol kezelés által kiváltott mikroglia aktivációra

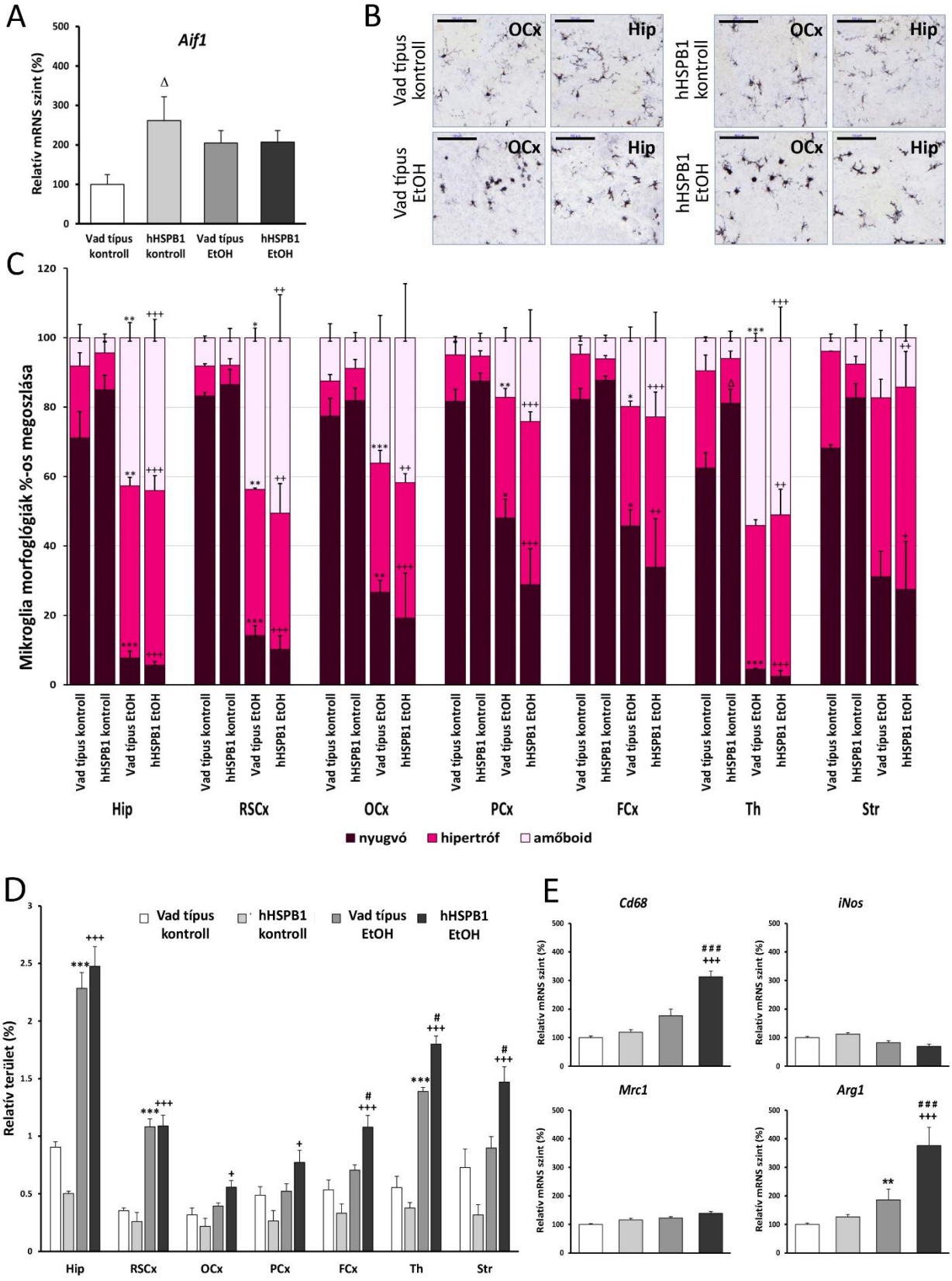
A mikroglia-specifikus IBA1 fehérjét kódoló *Aif1* gén (allograft gyulladásos faktor 1) expressziós szintjét is megvizsgáltuk az agyszövetekben RT-PCR segítségével. Kísérleteink során megfigyeltük, hogy 7 órával a fiziológiás sóoldat és az etanol beadását követően a

hHSPB1 túltermelő transzgenikus állatokban mindkét esetben majdnem kétszeresére nőtt a génexpresszió mértéke (kontroll: 189%, EtOH: 187%), míg a vad típusú állatokban még etanol kezelés után is változatlan maradt (F1.D ábra). A következő vizsgált időpontban, 24 órával a sóoldatos kezelést követően azt tapasztaltuk, hogy a kontroll transzgenikus állatok *Aif1* expressziója még mindig kétszer magasabb volt (261%) a vad típusú egerekhez viszonyítva (100%, 5.A ábra). Az etanol kezelt csoportban viszont 24 órával a kezelést követően az *Aif1* expressziós szintje a vad típusú állatokban is megemelkedett (205%), míg az etanollal kezelt transzgenikus csoportban további növekedést nem figyeltünk meg (5.A ábra).

A vizsgált gének expressziójában megfigyelt változások a mikroglia sejtek aktivációjára utalnak, ezért IBA1 peroxidázos immunfestéssel megvizsgáltuk az aktiválódás során megfigyelhető jellegzetes morfológiai változásokat is. Az egyes morfológiák (nyugvó, hipertróf, amőboid) százalékos megoszlásait Dr. Horváth Péter csoportja által kifejlesztett, mély tanuláson (deep learning) alapuló, FindMyCells szoftver kiterjesztett verziója segítségével elemeztük. Mivel a fehérjeszintű változásokhoz több idő kell, ezért az első időpont amit immunhisztokémiával megvizsgáltunk az egy nappal a kezelések után volt. A kontroll állatok agyában a legnagyobb mértékben dúsan elágazó, finom nyúlványokkal rendelkező nyugvó mikroglia sejteket detektáltunk (5.B ábra), azonban megfigyelhető volt néhány eltérés a vad típusú és a transzgenikus minták között (5.C ábra). Bár a transzgenikus kontroll állatokban talált nagyobb mértékű génexpresszió alapján azt feltételeztük, hogy nagyobb mértékben lesznek jelen aktivált gliasejtek ebben a csoportban, az immunhisztokémiai vizsgálat során azt tapasztaltuk, hogy a hHSPB1 túltermelő állatok talamikus régiójában a vad típusú állatokhoz viszonyítva szignifikánsan magasabb arányban voltak jelen nyugvó mikroglia sejtek, míg ezzel párhuzamosan az aktivált (hipertróf és amőboid) sejtek mennyisége szignifikánsan alacsonyabb volt. A többi agyrégióban is hasonló különbségek voltak megfigyelhetőek a két genotípus között 24 órával a fizológiás sóoldat beinjektálása után, de ezek nem bizonyultak szignifikánsnak (5.C ábra; az aktivált mikroglia sejtek arányának statisztikai elemzése - lásd F3. táblázat). Etanol kezelés után nagy arányban észleltünk aktivált, hipertróf mikroglia sejteket megnövekedett sejttesttel és rövidebb, vastagabb nyúlványokkal a striátumban, valamint a kéreg parietális és frontális részén, míg ezeken a területeken a kerek morfológiájú amőboid mikroglia sejtek csak kisebb százalékban voltak jelen (5.C ábra). Ezzel szemben a retrospleniális és az occipitális kérgi régiókban, valamint a talamuszban és a hippokampuszban jelentősen megnőtt az amőboid

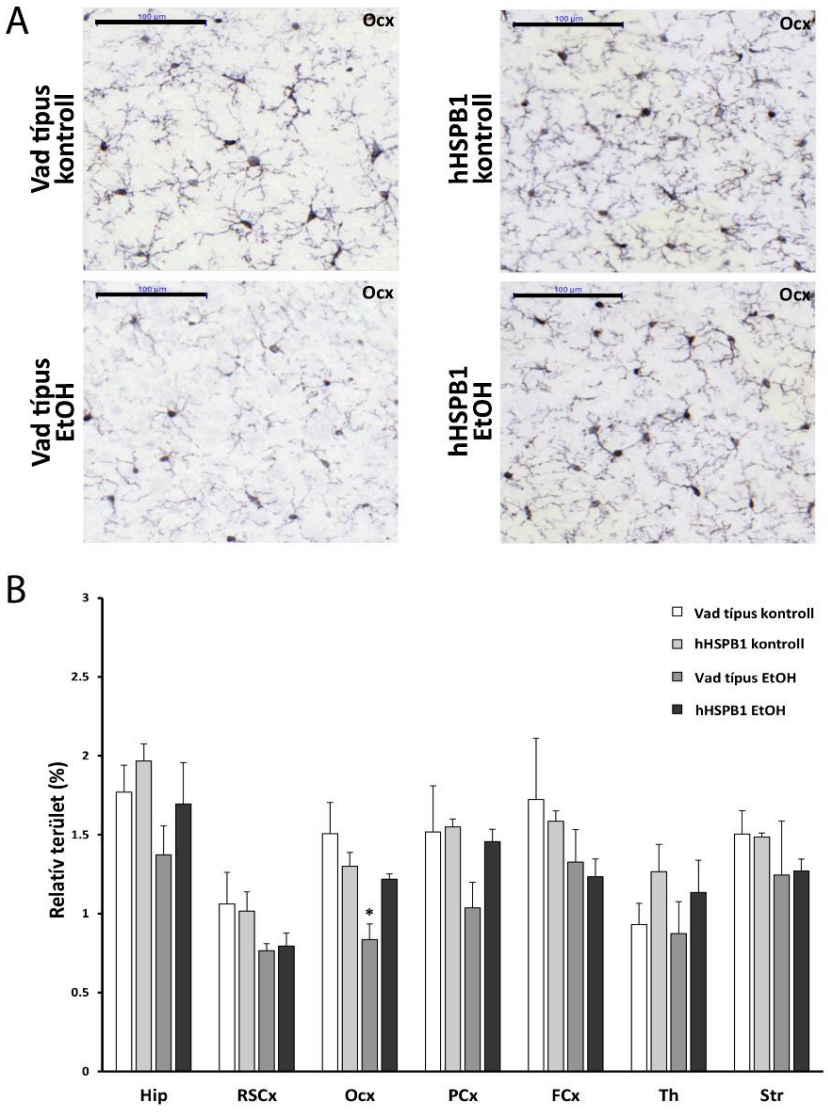
mikroglia sejtek aránya (5.C ábra). A hipertróf és az amőboid mikroglia sejtek aránya az etanol kezelt állatok összes agyterületén szignifikánsan magasabb volt, mint a kontroll csoportokban, viszont a vad típusú és a transzgenikus állatok között az aktivált sejtek arányát tekintve nem találtunk szignifikáns különbségeket etanol kezelést követően (5.C ábra). Az IBA1 immunhisztokémiát nem csak az eltérő morfológiájú sejtek arányát tekintve értékeltük ki, hanem megvizsgáltuk az immunpozitív területek méretét is. Az IBA1 lefedettség kontroll körülmények között szignifikánsan nem különbözött a vad típusú és a transzgenikus állatok agyában (5.D ábra). Ezzel szemben etanol kezelést követően a transzgenikus állatokban az összes vizsgált agyterületen szignifikáns mértékben megnőtt az IBA1-pozitív területek nagysága, míg a vad típusú állatokban csak a hippokampális, a talamikus és retrospleniális kérgi régiókban figyeltük meg az IBA1 festődés szignifikáns kiterjedését a kontroll csoporthoz képest (5.D ábra). Érdekes, hogy míg az aktivált sejtek relatív számát tekintve etanol kezelést követően nem volt jelentős különbség a két genotípus között, addig az etanol kezelt hHSPB1 túltermelő állatok agyában szignifikánsan nagyobb volt az immunreaktív területek mérete a frontális kérgi, a talamikus és a striatális régiókban az etanollal kezelt vad típusú állatokhoz képest, amely egy fokozottabb mikroglia aktivációt feltételez (5.D ábra).

Az aktivált mikroglia sejtek jellemzése érdekében elemeztük a gyulladáskeltő (M1) és a gyulladásgátló (M2) mikroglia fenotípus markerek expresszióját (Hu és mtsai., 2015; Koizumi és mtsai., 2019). Az M1 markerek esetében csak a *Cd68* mutatott figyelemre méltó változásokat, mivel etanol kezelés hatására egy szignifikáns háromszoros növekedés (312%) volt detektálható a hHSPB1 transzgenikus állatokban, míg a vad típusú állatoknál csak enyhe növekedést figyeltünk meg. Érdekes módon a másik marker, az indukálható nitrogén-monoxid szintáz (*iNos*) szintje még az etanol kezelt csoportokban is változatlan maradt (5.E ábra). Hasonló választ figyeltünk meg az M2 markerek esetében is, ugyanis az egyik marker, a C-típusú mannóz-receptor 1 (*Mrc1*) mRNS mennyisége szintén változatlan maradt etanol kezelést követően. A másik gén expressziója, az argináz 1 (*Arg1*) az etanol kezelt vad típusú állatokban majdnem megduplázódott (186%), míg a hHSPB1 transzgenikus állatokban még egy ennél is szignifikánsan magasabb, majdnem négyszeres növekedést mutatott (375%) (5.E ábra).


A
Aif1
Relatív mRNS szint (%)
Vad típus kontroll
hHSPB1 kontroll
Vad típus EtOH
hHSPB1 EtOH
B
OCx
Hip
Vad típus kontroll
hHSPB1 kontroll
Vad típus EtOH
hHSPB1 EtOH
C
Mikroglia morfológiák %-os megoszlása
Hip
RSCx
OCx
PCx
FCx
Th
Str
nyugvó
hipertróf
amőboid
D
Vad típus kontroll
hHSPB1 kontroll
Vad típus EtOH
hHSPB1 EtOH
Relatív terület (%)
E
Cd68
iNos
Mrc1
Arg1
Relatív mRNS szint (%)

5. ábra A hHSPB1 túltermelés hatása a mikroglia sejtek aktivációjára 24 órával etanol kezelés után. A) Az *Aif1* relatív génexpressziós szintjének változása az agyszövetben 24 órával etanol kezelést követően. Vad típus kontroll=100%; n=8. **B)** A mikroglia sejtek morfológiai változásának tanulmányozása sagittális agymetszeteken IBA1 peroxidázos immunhisztokémia segítségével, 24 órával etanol kezelést követően. Mérce: 100 µm (OCx, Hip). **C)** A különböző morfológiával rendelkező IBA1+ sejtek megoszlásának %-os aránya a különböző agyterületeken. **D)** Az IBA1 immunpozitív területek relatív változása etanol kezelést követően. Az immunpozitív területek arányát a teljes annotált területhez viszonyítva százalékban ábrázoltuk. n=3 állat/csoport és 3 metszet/állat. **E)** A gyulladáskeltő: *Cd68, iNos*, és a gyulladásgátló: *Mrc1, Arg1* mikroglia markerek relatív génexpressziójának változása 24 órával etanol kezelést követően. Vad típus kontroll= 100%, n=8. Átlag±SEM. Jelölések: * vad típus EtOH vs vad típus kontroll; + hHSPB1 EtOH vs hHSPB1 kontroll; # hHSPB1 EtOH vs vad típus EtOH; Δ hHSPB1 kontroll vs vad típus kontroll. Statisztikai próba: kétutas ANOVA Tukey post-hoc teszttel. */#/+/Δ $p<0,05$; **/##/++ $p<0,01$; ***/###/+++ $p<0,001$. Rövidítések: Ctx: kéreg, Hip: hippokampusz, RSCx: retrospleniális kéreg, OCx: occipitális kéreg, PCx: parietális kéreg, FCx: frontális kéreg, Th: talamusz, Str: striátum.

A mikroglia sejtek aktivációját a kezelést követően egy héttel is megvizsgáltuk. Kísérleteink során kimutattuk, hogy a mikroglia sejtek deaktiválódtak, ugyanis az immunfestések során újra a nyugvó sejtekre jellemző morfológiával rendelkező mikroglia sejteket figyeltünk meg (6.A ábra). Ezzel párhuzamosan az *Aif1* mRNS szintje is lecsökkent, és megközelítőleg azonos volt minden csoportban (F1.D ábra), illetve az IBA1-pozitív terület kiterjedése is hasonló mértékű volt a kezelt és kontroll állatok agyában. Kivételt képez ez alól az etanol kezelt vad típusú csoport, ahol a kontroll vad típusú állatokhoz képest szignifikánsan kisebb mértékű IBA1 lefedettséget találtunk az occipitális kéregben (6.B ábra).

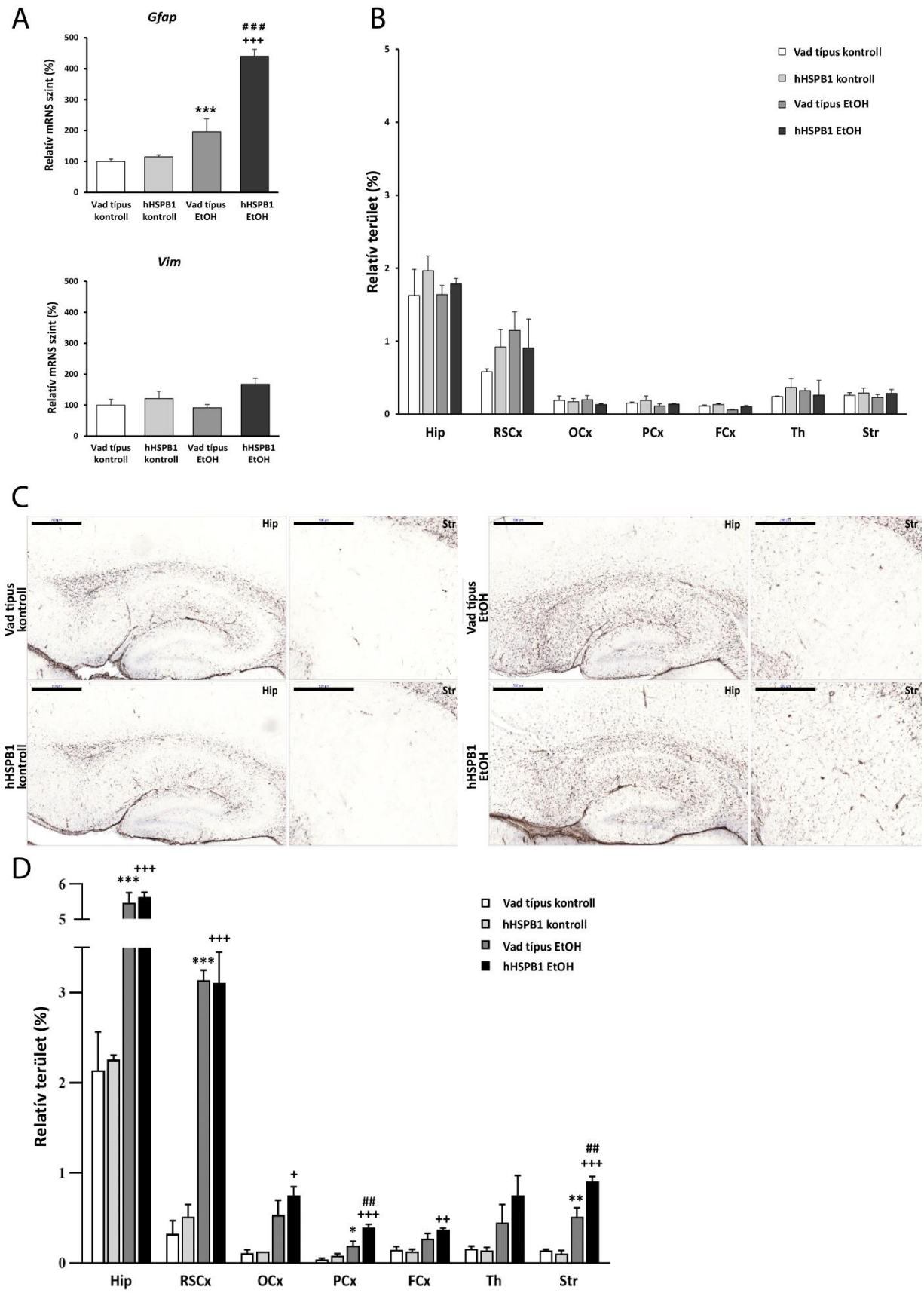


6. ábra A hHSPB1 túltermelés hatása a mikroglia sejtek aktivációjára 1 héttel etanol kezelés után. A) A mikroglia sejtek morfológiai változásainak vizsgálata sagittális agymetszeteken 1 héttel etanol kezelést követően IBA1 peroxidázos immunhisztokémia segítségével. Mérce: 100 µm (OCx). **B)** Az IBA1 immunpozitív területek relatív változása etanol kezelést követően. Az immunpozitív területek arányát a teljes annotált területhez viszonyítva százalékban ábrázoltuk. n=3 állat/csoport és 3 metszet/állat. Átlag±SEM. Jelölések: * vad típus EtOH vs vad típus kontroll. Statisztikai próba: kétutas ANOVA Tukey post-hoc teszttel.* $p<0,05$. Rövidítések: Ctx: kéreg, Hip: hippokampusz, RSCx: retrospleniális kéreg, OCx: occipitális kéreg, PCx: parietális kéreg, FCx: frontális kéreg, Th: talamusz, Str: striátum.

4.5. A hHSPB1 túltermelés hatása az etanol kezelés által kiváltott asztrocita aktivációra

A következő lépésben a reaktív asztrogliózis markereként használt két intermedier filamentum fehérjét kódoló génnek, a *Gfap*-nak és a vimentinnek (*Vim*) az expressziós szintjét vizsgáltuk. A hHSPB1 túltermelés önmagában egyik marker expresszióját sem befolyásolta (7.A ábra). A *Gfap* mRNS szintje 24 órával etanol kezelés után azonban mindkét genotípus esetén nagymértékben megemelkedett, egy nagyjából kétszeres növekedést (196%) mutatva a vad típusú csoportban, míg egy ennél is szignifikánsan magasabb, négyszeres növekedést (440%) mutatva a hHSPB1 transzgenikus állatokban (7.A ábra). Ezzel szemben a másik asztrocita marker, a *Vim* mRNS szintje etanol hatására a vad típusú csoportban nem változott, és a transzgenikus csoportban is csak egy kismértékű génexpresszió fokozódás volt megfigyelhető (7.A ábra). Mindkét marker mRNS szintje a kezelés után egy héttel visszaállt az eredeti szintre vad típusú és transzgenikus állatban egyaránt (F1.E-F ábra).

Az asztrociták morfológiáját és a GFAP fehérjeszintű változásait immunhisztokémiai módszerekkel tanulmányoztuk. Mivel az asztrociták aktiválódásuk során nem vesznek fel olyan sokféle jellegzetes morfológiát, mint a mikroglia sejtek, ezért ebben az esetben az immunfestést csak a GFAP-pozitív területek kiterjedésének szempontjából értékeltük ki. Az asztrociták esetében egy nappal etanol kezelést követően nem tapasztaltuk a GFAP immunpozitív struktúrák területének kiterjedését, illetve a kontroll csoportban sem mutatkozott különbség (7.B ábra). Egy héttel később azonban az etanol kezelésre adott válaszként a vad típusú és a transzgenikus egerek számos agyterületén hipertróf asztrocitákat detektáltunk, és ezzel párhuzamosan megnövekedett a GFAP immunreaktív területek mérete is (7.C-D ábra). Az etanol kezelt hHSPB1 transzgenikus csoportban a talamusz kivételével az összes vizsgált agyrégióban szignifikánsan magasabb volt a GFAP lefedettség a kontroll csoporthoz képest, míg a vad típusú állatok esetén a vizsgált agyterületeknek csak a felén mutatkozott szignifikáns különbség. Emellett szignifikánsan nagyobb mértékű asztrocita aktiválódást találtunk az etanol kezelt hHSPB1 transzgenikus állatok striátumában és parietális kérgi régiójában az etanol kezelt vad típusú állatok azonos agyterületeihez képest (7.D ábra).

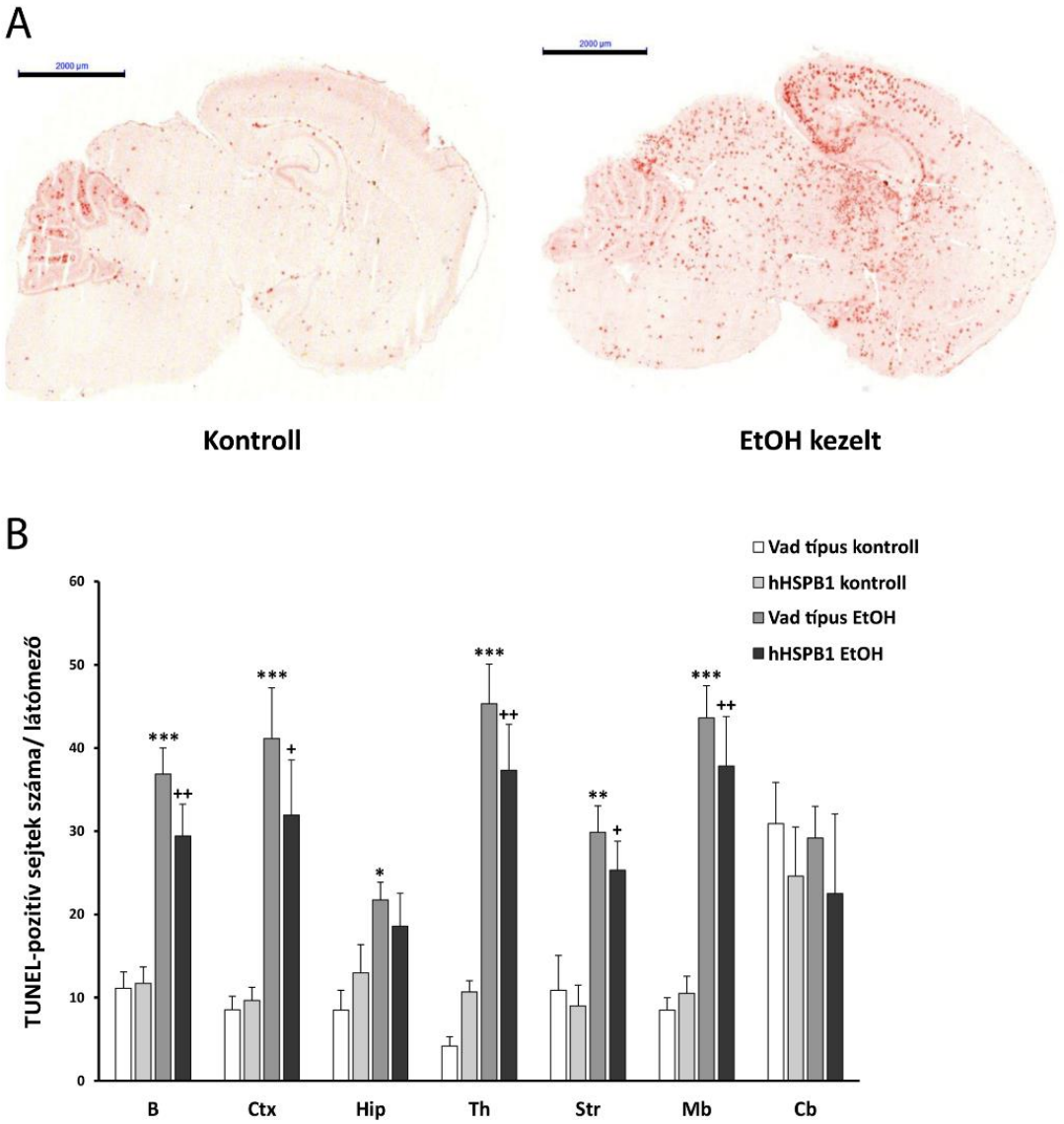

A
Gfap
Relatív mRNS szint (%)
Vad típus kontroll
hHSPB1 kontroll
Vad típus EtOH
hHSPB1 EtOH
***
###
+++
Vim
B
Relatív terület (%)
Vad típus kontroll
hHSPB1 kontroll
Vad típus EtOH
hHSPB1 EtOH
Hip
RSCx
OCx
PCx
FCx
Th
Str
C
Hip
Str
Vad típus kontroll
hHSPB1 kontroll
Vad típus EtOH
hHSPB1 EtOH
D
Relatív terület (%)
Vad típus kontroll
hHSPB1 kontroll
Vad típus EtOH
hHSPB1 EtOH
Hip
RSCx
OCx
PCx
FCx
Th
Str

7. ábra A hHSPB1 túltermelés hatása az asztrocita sejtek aktivációjára etanol kezelés után. A) Az asztrocita markerek, a *Gfap* és a *Vim* relatív mRNS szintjének változása 24 órával etanol kezelést követően. Vad típus kontroll=100%; n=8. **B)** A GFAP immunpozitív területek változásainak vizsgálata 24 órával etanol kezelést követően. **C)** Egy héttel etanol kezelést követően az asztrociták morfológiai változásait sagittális agymetszeteken végzett GFAP peroxidázos immunhisztokémia segítségével tettük láthatóvá. Mérce: 500 μm. **D)** A GFAP immunpozitív területek méretének meghatározása 1 héttel etanol kezelést követően. Relatív terület: Az immunpozitív területek arányát a teljes annotált területhez viszonyítva százalékban ábrázoltuk. n=3 állat/csoport és 3 metszet/állat. Átlag±SEM. Jelölések: vad típus EtOH vs vad típus kontroll; + hHSPB1 EtOH vs hHSPB1 kontroll; # hHSPB1 EtOH vs vad típus EtOH. Statisztikai próba: kétutas ANOVA Tukey post-hoc teszttel. */+ $p<0,05$; **/##/++ $p<0,01$; ***/###/+++ $p<0,001$. Rövidítések: Ctx: kéreg, Hip: hippokampusz, RSCx: retrospleniális kéreg, OCx: occipitális kéreg, PCx: parietális kéreg, FCx: frontális kéreg, Th: talamusz, Str: striátum.

4.6. A hHSPB1 túltermelés hatása az etanol kezelés által kiváltott apoptózisra

A programozott sejthalál kimutatása érdekében az egerek agyszövetében a fragmentált DNS mennyiségét TUNEL-próba segítségével elemeztük. A kontroll, sóoldattal kezelt állatok agyában mindkét genotípus esetén megfigyelhető volt egy alacsony szintű apoptózis, amely a kisagyi régióban volt a legkifejezettebb (8.A ábra). Etanol kezelés hatására azonban 24 órán belül egy nagymértékű apoptózis vette kezdetét a vad típusú és a hHSPB1 transzgenikus állatok agyában egyaránt, amit jól mutat, hogy a TUNEL-pozitív sejtek száma az etanol kezelt csoportokban szignifikánsan megnőtt a kontroll csoportokhoz képest (8.A ábra). A kvantitatív összehasonlítás érdekében az agymetszeteken kijelöltünk 15 azonos méretű kisebb régiót és ezekben megszámoltuk a TUNEL-pozitív sejteket. Bár a statisztikai elemzés az apoptótikus sejtek számának szignifikáns növekedését mutatta ki etanol kezelést követően a vizsgált agyi régiók többségében, az etanol által kiváltott sejtpusztulás mértéke jelentős eltéréseket mutatott az egyes agyterületeken (8.B ábra). A legtöbb apoptótikus sejtet a kérgi régióban, a talamuszban, valamint a középagyban detektáltuk; míg ezzel szemben a hippokampuszban egy jóval kisebb mértékű sejtpusztulás volt megfigyelhető (8.B ábra). Egyedül a kisagyi régióban nem mutatkozott szignifikáns növekedés az apoptótikus sejtek számában etanol kezelést követően, ami a kontroll állatok agyában is jelenlévő magas szintű fiziológiás sejpusztulásra vezethető vissza (8.B ábra). A vad típusú és a hHSPB1 túltermelő állatokat összehasonlítva etanol kezelést követően valamelyest kevesebb apoptótikus sejtet találtunk a transzgenikus állatok agyában a

vad típusú állatokhoz képest, a különbség azonban nem volt statisztikailag szignifikáns (8.B ábra).



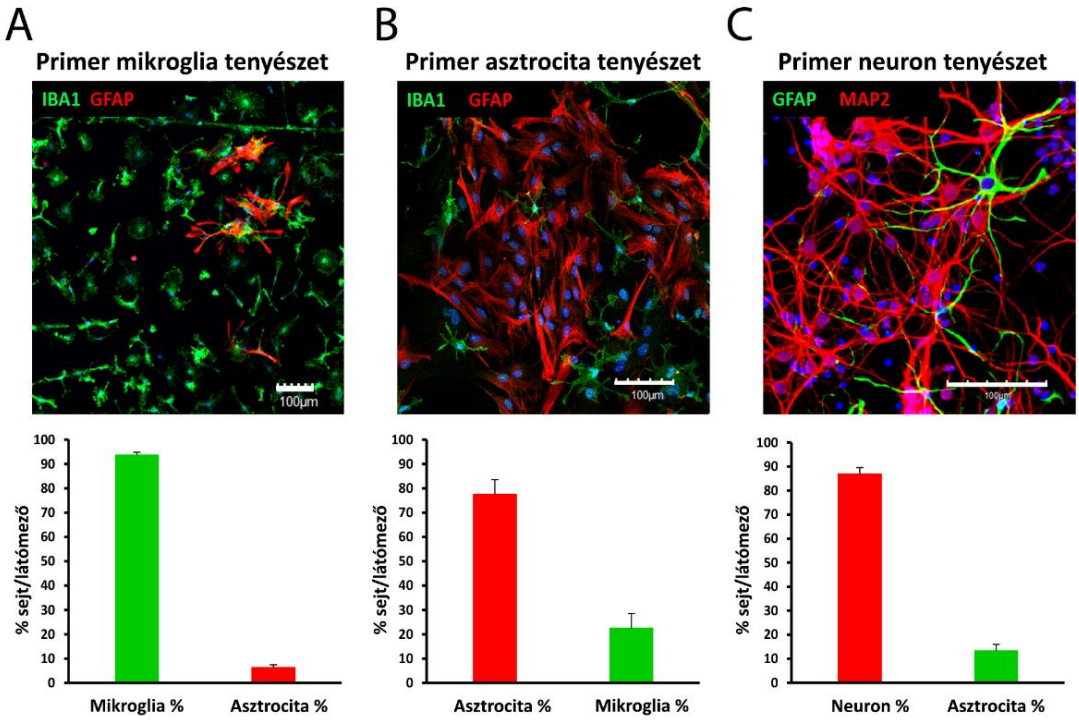
8. ábra A hHSPB1 túltermelés hatása a sejtpusztulásra 24 órával etanol kezelés után. A) A programozott sejthalált sagittális agymetszeteken vizsgáltuk TUNEL-próba segítségével. Mérce: 2000 µm. **B)** Az apoptótikus sejtek számának meghatározása 24 órával etanol kezelést követően. Átlag±SEM; n=6. * vad típus EtOH vs vad típus kontroll; hHSPB1 EtOH vs hHSPB1 kontroll. Statisztikai próba: kétutas ANOVA Tukey post-hoc teszttel. */+ $p<0,05$;**/++ $p<0,01$; *** $p<0,001$. Rövidítések: B: teljes agy, Ctx: kéreg, Hip: hippokampusz, Th: talamusz, Str: striátum, Mb: középagy, Cb: kisagy.

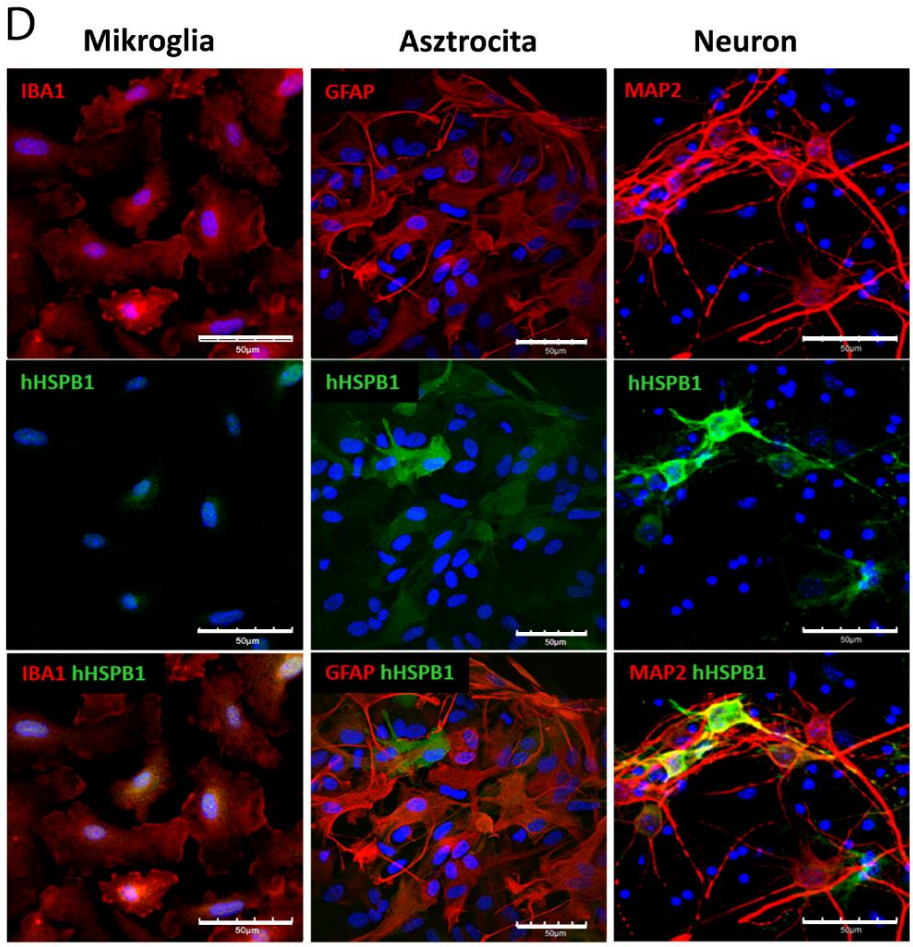
In vivo eredményeink értelmezéséhez *in vitro* kísérleteink vittek közelebb, amelyek során arra kerestük a választ, hogy mely sejttípusok lehetnek felelősek a hHSPB1 túltermelés által kiváltott immunregulációs folyamatokért. Ezen kísérleteinket Prof. Deli Máriával és munkatársaival együttműködésben valósítottuk meg, akik nagy tapasztalattal rendelkeznek a primer mikroglia és asztrocita sejtkultúrákkal végzett kísérletekben.

4.7. A primer sejtkultúrák tisztaságának és a hHSPB1 transzgén *in vitro* kifejeződésének vizsgálata

Az *in vitro* vizsgálatokhoz primer neuron, asztrocita és mikroglia tenyészeteket készítettünk a hHSPB1 túltermelő transzgenikus állatok és vad típusú alomtársaik agyából. A primer sejtkultúrák tisztaságát fluoreszcens immunhisztokémiával ellenőriztük, mely során megvizsgáltuk a mikroglia (IBA1), az asztrocita (GFAP) és a neuronális (MAP2) markerek jelenlétét. A primer mikroglia tenyészet tisztasága az IBA1-GFAP kettős festés alapján meghaladta a 93%-ot (9.A ábra). Ugyanezt a kettős festést alkalmazva kimutattuk, hogy a primer asztrocita tenyészetben 22%-ban voltak jelen mikroglia sejtek (9.B ábra). A primer neuron tenyészetet MAP2 és GFAP antitestekkel jelöltük, amely kimutatta, hogy a sejtek több mint 85%-a neuron volt a tenyészetben (9.C ábra).

A következő lépésben a transzgén expressziós mintázatát is megvizsgáltuk a primer sejtkultúrákban hHSPB1-IBA1, hHSPB1-GFAP és hHSPB1-MAP2 fluoreszcens immunfestések alkalmazásával. A sejtspecifikus markerek hHSPB1 jelölődéssel való kolokalizációja a tenyészetekben megegyezett azzal, amit korábban az agyi metszeteknél figyeltünk meg. Megállapítottuk, hogy a hHSPB1 kifejeződik a primer asztrocitákban és neuronokban, valamint hogy ezek a sejttípusok egy erős hHSPB1 expressziót mutatnak. Ezzel szemben a mikroglia tenyészetekben alig lehetett kettősen festődő sejteket detektálni, és a hHSPB1-pozitív mikroglia sejtekben is csak egy rendkívül alacsony szintű, mag körüli expresszió volt megfigyelhető. Ezek alapján arra következtethetünk, hogy modellünkben a transzgenikus hHSPB1 fehérjét elsősorban a primer neuronok és asztrociták expresszálták (9.D ábra).


A
Primer mikroglia tenyészet
IBA1 GFAP
100µm
% sejt/látómező
Mikroglia %
Asztrocita %
B
Primer asztrocita tenyészet
IBA1 GFAP
100µm
% sejt/látómező
Asztrocita %
Mikroglia %
C
Primer neuron tenyészet
GFAP MAP2
100µm
% sejt/látómező
Neuron %
Asztrocita %


D
Mikroglia
Asztrocita
Neuron
IBA1
GFAP
MAP2
hHSPB1
hHSPB1
hHSPB1
IBA1 hHSPB1
GFAP hHSPB1
MAP2 hHSPB1
50µm

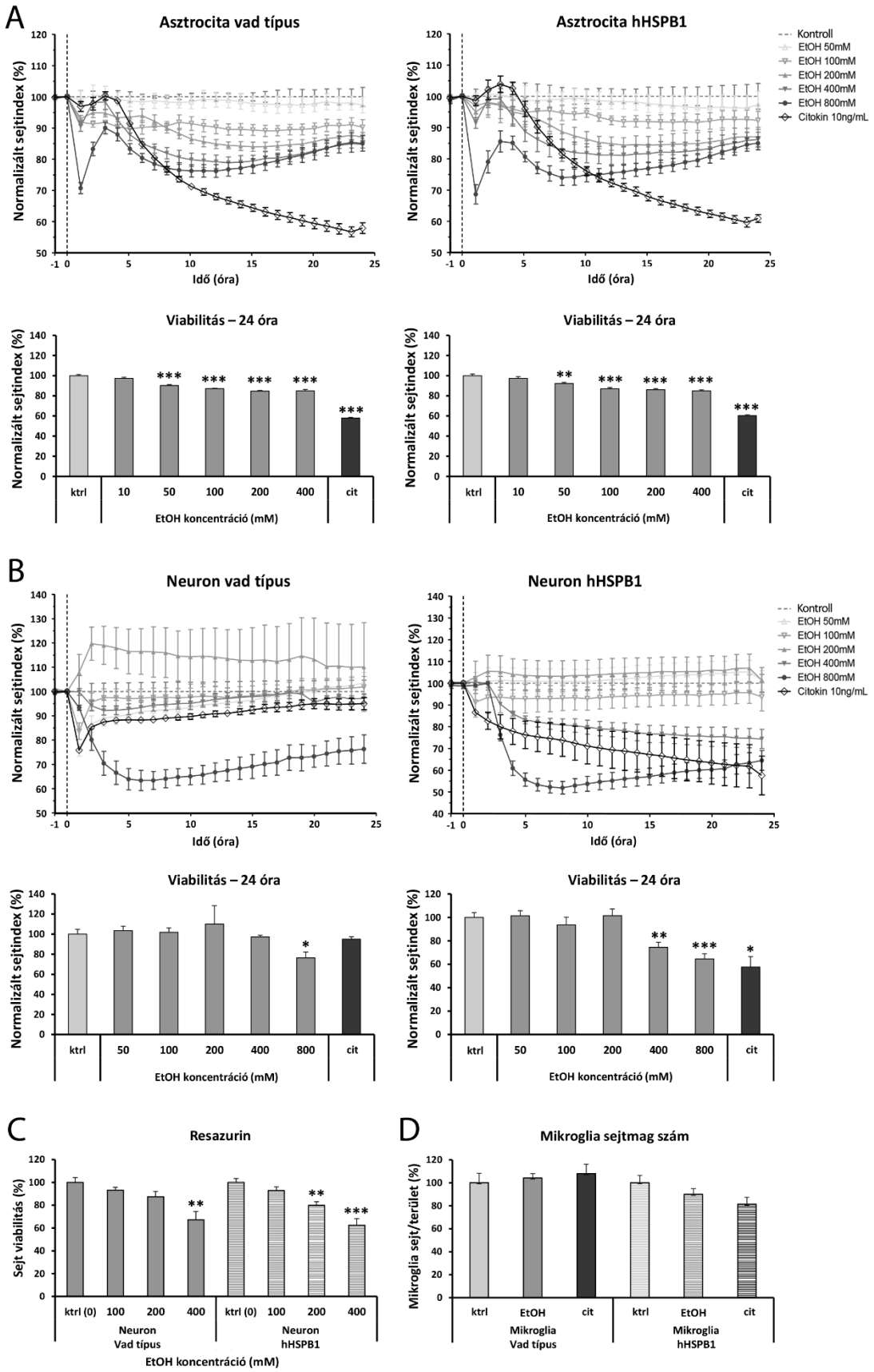
9. ábra A primer sejtkultúrák tisztaságának és a hHSPB1 kifejeződési mintázatának vizsgálata. A primer **A)** mikroglia, **B)** asztrocita, és **C)** neuron sejtkultúrák tisztaságát kettős immunfluorenszcens festésekkel ellenőriztük. Zöld: IBA1/GFAP; piros: GFAP/MAP2. A sejtspecifikus markerekkel jelölt sejtek magjait megszámoltuk, és az összes sejtszámhoz viszonyítva százalékban ábrázoltuk. Mérce: 100 µm. Átlag±SEM; n=3-11. **D)** A transzgenikus hHSPB1 kifejeződésének vizsgálata a különböző primer agyi sejtkultúrákban. Mérce: 50 µm. Zöld: hHSPB1; piros: IBA1/MAP2/GFAP; kék: sejtmag.

4.8. A primer sejtkultúrák életképességének vizsgálata citokin és etanol kezelést követően

Annak érdekében, hogy az alkohol agyra gyakorolt hatását sejttípusonként is megvizsgáljuk, a primer sejtkultúrákat etanol kezelésnek vetettük alá. Az etanol önmagában és metabolitjai által is képes direkt módon gyulladásos folyamatokat indukálni az agyban (Haorah és mtsai., 2008; Chapp és mtsai., 2019). Emellett a vér-agy gát integritásának csökkentésével, valamint a perifériás immunsejtek agyba való behatolásának elősegítésével közvetett módon szintén hozzájárulhat a neuroinflammációs folyamatok kialakulásához (Haorah és mtsai., 2007). Figyelembe véve tehát, hogy az etanol nem csak közvetlenül, hanem más módokon is hozzájárulhat a gyulladásos folyamatok kiváltásához, elképzelhető, hogy a sejtek etanol kezelése önmagában nem elég az etanol által kiváltott neuroinflammáció modellezésére. Ezek alapján a kontroll és az etanol-kezelt sejtkultúrák mellett a gyulladásos környezet modellezése érdekében létrehoztunk gyulladáskeltő citokinekkel kezelt sejttenyészeteket is.

Az etanol és a citokinek hatékony kezelési koncentrációjának meghatározásához a szakirodalomban rendelkezésre álló adatokat (Ikonomidou és mtsai., 2000; Harazin és mtsai., 2018), és az általunk végzett életképességi méréseket használtuk. Prof. Deli Mária és munkatársai segítségével a primer sejtek életképességi kinetikájának meghatározásához az E-plate-re kiszélesztett sejteken valós idejű impedancia mérést végeztünk, amiből a sejtek életképességére lehet következtetni, amit a sejtindex jelöl. Ezzel a technikával azonban csak az asztrocitákat és a neuronokat elemeztük, mivel a primer mikroglia izolálások során kevesebb sejtet lehetett kinyerni, ami nem alkotott konfluens tenyészetet. Etanol kezelés esetén a korábbi *in vivo* adatok azt mutatták, hogy 50 mM volt az alsó koncentrációs határ, amely felett hatásos volt a kezelés (Ikonomidou és mtsai., 2000). Az E-plate felhasználásával végzett 24 órás valós idejű életképességi teszt azt mutatta, hogy az 50 mM etanol koncentráció hatékonyan csökkenti az asztrociták impedanciáját (10.A ábra). Azonban a neuronok ellenállóbbnak bizonyultak, és

esetükben csak a 400 mM etanol koncentráció vezetett az impedancia jelentős mértékű csökkenéséhez (10.B ábra). A neuronok életképességét egy másik módszerrel, Resazurin-próbával is megvizsgáltuk, amely a metabolikus aktivitás szignifikáns csökkenését már a 200 mM-os etanol kezelés után is kimutatta (10.C ábra). Ez arra utalhat, hogy a metabolikus változások már a 200 mM-os etanol kezelés után kialakulnak, de a morfológiai változások, ami a sejtek csökkent kitapadásához és impedanciájához vezetnek, csak a 400 mM-os etanol kezelés után következnek be. Ezek alapján etanolos kísérleteink során a gliasejtek esetén az 50 mM kezelési koncentrációt, míg neuronok esetében a 200 mM kezelési koncentrációt használtuk. A gyulladásos környezet modellezésére alkalmazott citokin kezelés során pedig a Prof. Deli Mária és csoportja által korábban már tesztelt 10 ng/ml humán TNFα és 10 ng/ml humán IL-1β citokinek kombinációját használtuk (Harazin és mtsai., 2018). Citokin kezelés hatására az impedancia mérések során mind a primer asztrocita, mind a primer neuron tenyészetek sejtindexe szignifikáns mértékben lecsökkent, amely azt mutatta, hogy ez a citokin koncentráció elegendő a sejtek viabilitásának nagymértékű csökkenéséhez (10.A-B ábra). A mikroglia sejtek azonban az előzőektől eltérő képet mutattak. A neuronokkal és az asztrocitákkal ellentétben a primer mikroglia tenyészetekben a sejtmagszám meghatározás során nem detektáltunk szignifikáns sejtpusztulást egyik kezelést követően sem (10.D ábra).

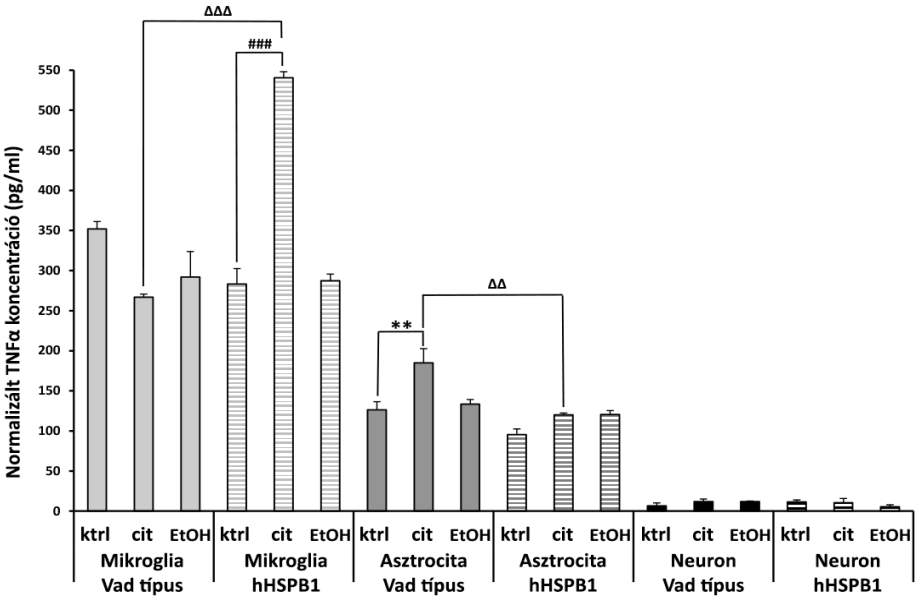

A
Asztrocita vad típus
Asztrocita hHSPB1
Normalizált sejtindex (%)
Idő (óra)
Kontroll
EtOH 50mM
EtOH 100mM
EtOH 200mM
EtOH 400mM
EtOH 800mM
Citokin 10ng/mL
Viabilitás – 24 óra
ktrl
10
50
100
200
400
cit
EtOH koncentráció (mM)
B
Neuron vad típus
Neuron hHSPB1
800
C
Resazurin
Sejt viabilitás (%)
ktrl (0)
Neuron
Vad típus
Neuron
hHSPB1
D
Mikroglia sejtmag szám
Mikroglia sejt/terület (%)
EtOH
Mikroglia
Vad típus
Mikroglia
hHSPB1

10. ábra A primer sejtek életképességének vizsgálata. A primer **A)** asztrocita sejtek és **B)** neuronok életképességének változását etanol és citokin kezelést követően valós idejű impedanicia méréssel határoztuk meg. n=2-13. **C)** A primer neuronok viabilitását Resazurin-próbával is kiértékeltük 24 órával etanol kezelést követően. n=8. **D)** A primer mikroglia sejtek életképességének meghatározásához 24 órával a kezeléseket követően megszámoltuk a sejtmagokat. n=10-23. Kontroll sejtek=100%. Átlag±SEM. Statisztikai próba: kétmintás t-próba. * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$. Rövidítések: ktrl: kezeletlen kontroll, EtOH: etanol kezelés, cit: citokin kezelés.

4.9. A primer sejtkultúrák TNFα termelése citokin és etanol kezelést követően

Annak érdekében, hogy megtudjuk melyik sejttípus a TNFα fő forrása, és annak igazolására, hogy a hHSPB1 szabályozza az agy sejtjeinek citokin termelését, a primer tenyészetek felülúszóinak felhasználásával TNFα ELISA vizsgálatot végeztünk. A mért TNFα koncentrációkat a mikroglia sejtek esetében a sejtmagszámra, az asztrociták és a neuronok esetében pedig a valós idejű impedancia mérés során kapott sejtindex értékekre normalizáltuk. Kontroll körülmények között a TNFα a legnagyobb mennyiségben a gliasejtek felülúszójában volt kimutatható. Azonban a mikroglia sejtek alap TNFα expressziója csaknem háromszor magasabb volt (hHSPB1: 283 pg/ml; Vad típus: 351 pg/ml), mint az asztrocita sejteké (hHSPB1: 95 pg/ml; Vad típus: 126 pg/ml; 11. ábra), amely arra utal, hogy modellünkben a mikroglia sejtek a TNFα elsődleges forrásai. Citokin kezelést követően a hHSPB1 transzgenikus egerekből származó mikroglia sejtek TNFα termelése szignifikáns mértékben megnőtt a kontroll transzgenikus mikroglia sejtekhez képest (hHSPB1 cit: 540 pg/ml, hHSPB1 ktrl: 283 pg/ml). A vad típusú mikroglia sejtek esetében ilyen hatást nem figyeltünk meg. Ez arra enged következtetni, hogy a hHSPB1 túltermelés modulálhatja a TNFα szekréciót, mivel citokin kezelés után a hHSPB1 transzgenikus állatokból származó mikroglia tenyészetből szignifikánsan nagyobb mennyiségű TNFα szabadult fel, mint a citokinnel kezelt vad típusú sejtekből (hHSPB1: 540 pg/ml, Vad típus: 266 pg/ml; 11. ábra). Ezzel szemben a citokin-kezelt vad típusú asztrocitákban a TNFα termelés szignifikánsan magasabb volt a kontroll sejtekhez képest, míg a hHSPB1 transzgenikus asztrociták TNFα felszabadítását a gyulladásos közeg nem fokozta, ami jelentős különbséget eredményezett a két genotípus között (Vad típus: 184 pg/ml; hHSPB1: 120 pg/ml; 11. ábra). Meglepő módon az etanolos kezelés egyik gliasejt típus esetén sem fokozta a TNFα termelést (11. ábra). A primer neuronok felülúszóiban csak nagyon

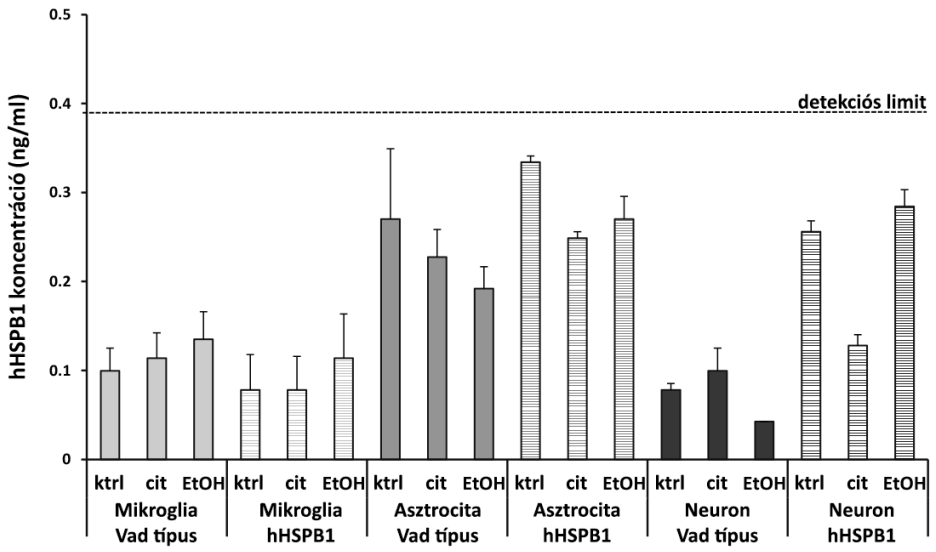
alacsony TNFα szint volt megfigyelhető kontroll körülmények között, és a kezeléseket követően is (11. ábra).



11. ábra A primer sejtek TNFα termelése. A primer sejttenyészetek által felszabadított TNFα mennyiségét ELISA segítségével határoztuk meg 24 órával a kezeléseket követően. A TNFα koncentrációkat a mikroglia sejtek esetén a sejtszámra, míg az asztrociták és a neuronok esetében az impedancia mérésre normalizáltuk. Átlag±SEM; n=2-3. Jelölések:* vad típus citokin vs vad típus kontroll, # hHSPB1 citokin vs hHSPB1 kontroll, Δ hHSPB1 citokin vs vad típus citokin. Statisztikai próba : kétutas ANOVA Tukey post-hoc teszttel. **/ΔΔ $p<0,01$; ###/ΔΔΔ $p<0,001$. Rövidítések: ktrl: kezeletlen kontroll, EtOH: etanol kezelés, cit: citokin kezelés.

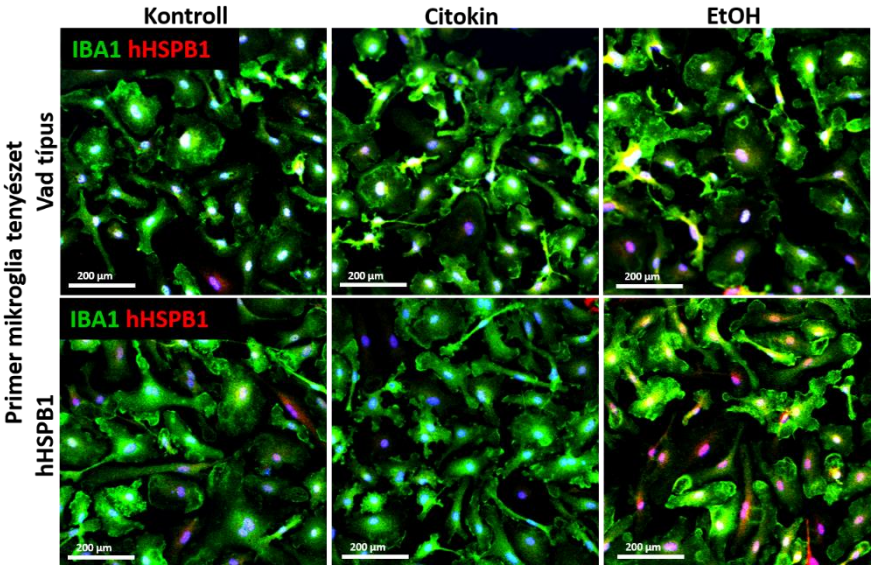
4.10. A citokin és az etanol kezelés hatása az extracelluláris és az intracelluláris hHSPB1 szintekre

Kísérleteink során azt is megvizsgáltuk, hogy az extracelluláris vagy az intracelluláris hHSPB1 felelős-e a leírt gyulladásszabályozó folyamatokért. Ehhez egyrészt a tenyészetek felülúszójából ELISA segítségével visszamértük a sejtek által felszabadított hHSPB1 mennyiségét, másrészt immunhisztokémiai módszerrel meghatároztuk a hHSPB1 fehérje mennyiségének változásait a sejteken belül. A humán HSPB1 ELISA eredményei azt mutatták, hogy sem kontroll körülmények között, sem kezelés hatására nem szabadított fel egyik sejttípus sem detektálható mennyiségű hHSPB1 fehérjét a felülúszóba (12. ábra).



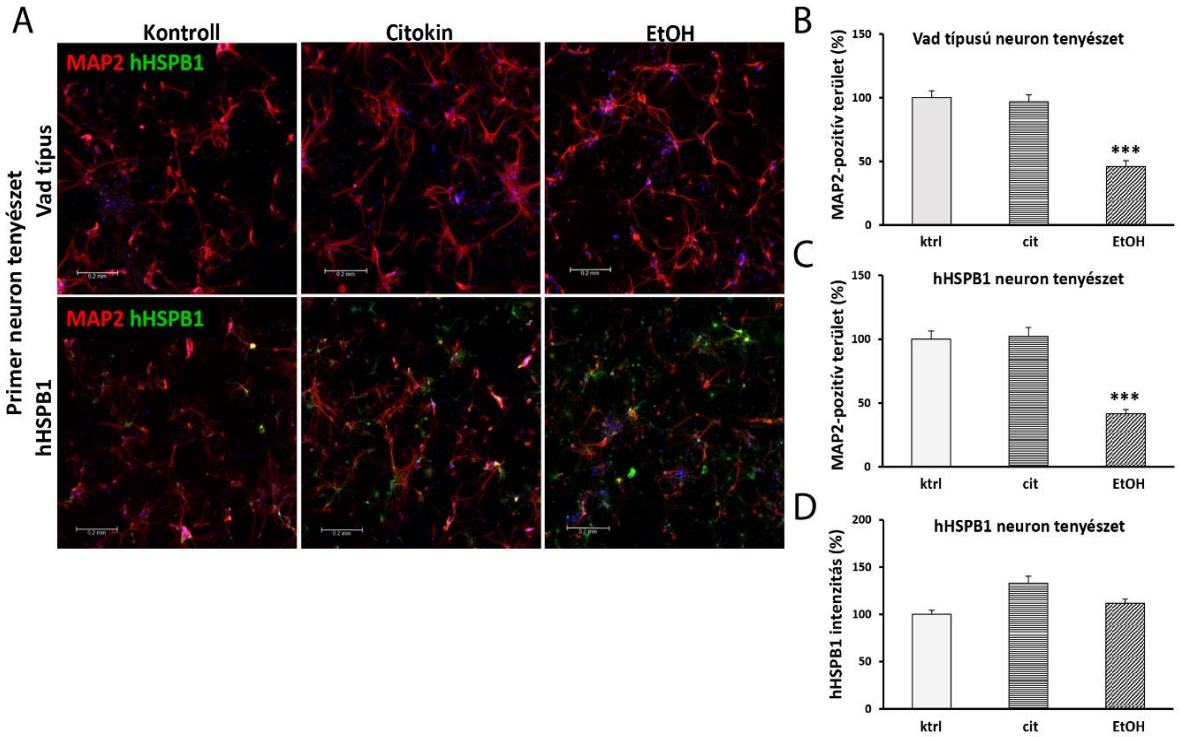
12. ábra A primer sejtek hHSPB1 termelése. A primer sejttenyészetek által felszabadított hHSPB1 mennyiségét ELISA segítségével határoztuk meg 24 órával a kezeléseket követően. Átlag±SEM; n=2-3. Rövidítések: ktrl: kezeletlen kontroll, EtOH: etanol kezelés, cit: citokin kezelés. A szaggatott vonal az ELISA kit alsó detekciós határát jelzi.

Az immunfestések során a transzgenikus fehérje intracelluláris szintjének változásait csak a primer neuron és asztrocita tenyészetekben elemeztük, mivel a mikroglia sejtek még kezelés után is csak elenyésző mennyiségű intracelluláris hHSPB1-et expresszáltak (13. ábra). A mikroglia sejtek esetében nem figyeltünk meg változást az IBA1 festés intenzitásában sem.



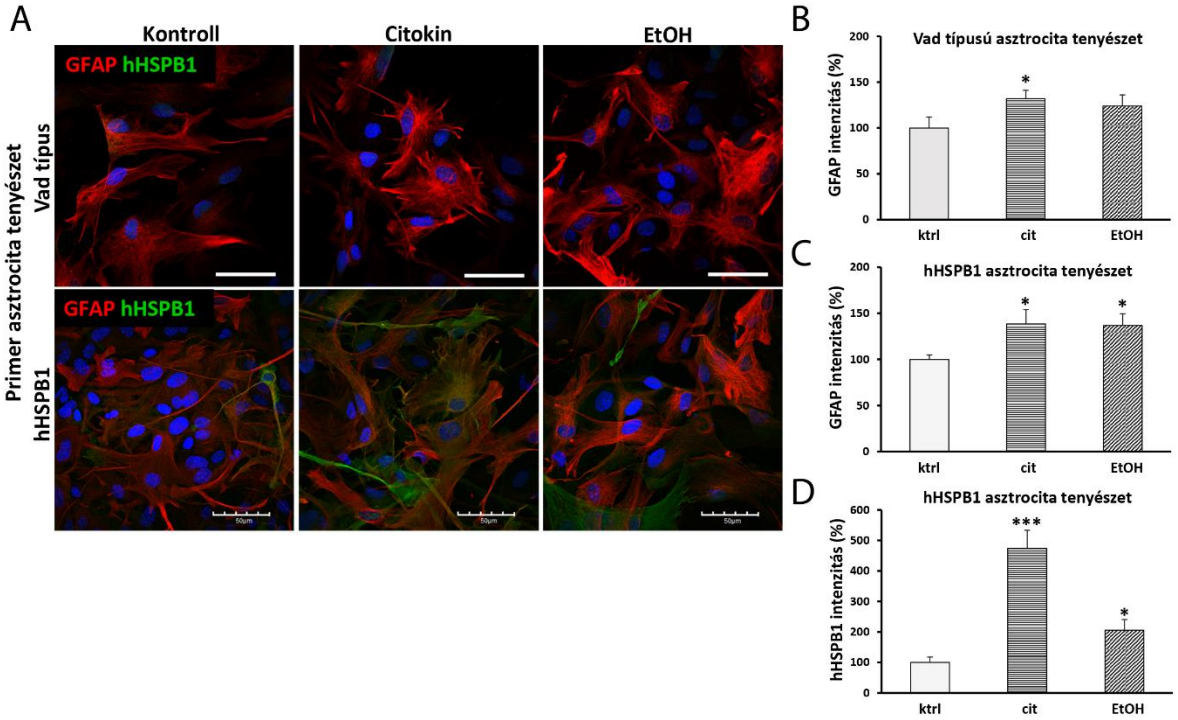
13. ábra A primer mikroglia sejtek intracelluláris hHSPB1 termelése. hHSPB1 és IBA1 kettős immunfluoreszcens festések vad típusú és hHSPB1 primer mikroglia tenyészeteken 24 órával a kezeléseket követően. Mérce: 200 µm. Piros: hHSPB1; zöld: IBA1; kék: sejtmag.

Neuronok esetében a tenyészetben maradó asztrocita sejtek miatt csak a neuronális marker MAP2-vel kolokalizáló hHSPB1 fluoreszcencia intenzitását értékeltük ki. Ezt a MAP2 pixel számára normalizáltuk, ezért először ennek változásait vizsgáltuk. Érdekes, hogy a MAP2-pozitív terület nagysága nem változott citokin kezelést követően, míg etanol kezelés hatására szignifikáns mértékben lecsökkent a transzgenikus (41%) és a vad típusú (46%) tenyészetekben egyaránt (14.A-C ábra). Ez utóbbi a sejtek morfológiájában is megfigyelhető volt, ugyanis kisebb nyúlványrendszerrel rendelkező neuronokat detektáltunk (14.A ábra). Ezzel szemben, a hHSPB1 intenzitás a transzgenikus neuronokban etanol kezelés után változatlan maradt, míg citokin kezelés következtében mérsékelt, de nem szignifikáns növekedést mutatott (14.D ábra).



14. ábra A primer neuronok intracelluláris hHSPB1 termelése. **A)** hHSPB1 és MAP2 kettős immunfluorenszcens festés vad típusú és hHSPB1 primer neuron tenyészetben 24 órával a kezeléseket követően. Mérce: 200 µm. Piros: MAP2; zöld: hHSPB1; kék: sejtmag. A MAP2 pozitív területek méretének meghatározása **B)** vad típusú és **C)** hHSPB1 neuron tenyészetekben. **D)** A hHSPB1 fluoreszcencia intezitásának kiértékelése hHSPB1 neuron tenyészetben. n=12. Kontroll sejtek=100%. Átlag±SEM. Statisztikai próba: kétmintás t-próba. *** p<0,001. Rövidítések: ktrl: kezeletlen kontroll, EtOH: etanol kezelés, cit: citokin kezelés.

Az asztrocita sejtekben a citokinekkel, illetve az etanollal végzett kezelés hatással volt a GFAP expressziójára. A citokin kezelés a GFAP intenzitás szignifikáns növekedését eredményezte a transzgenikus (138%), és a vad típusú sejtekben egyaránt (131%), míg etanol kezelés hatására csak a transzgenikus asztrocitákban detektáltunk szignifikáns változást (136%), a vad típusúaknál nem (15.A-C ábra). A transzgenikus asztrociták emellett nagymértékű hHSPB1 expresszió emelkedést mutattak a károsító hatásokat követően, ugyanis a hHSPB1 fluoreszcencia intenzitása citokin kezelést követően a kontroll sejtekhez képest majdnem ötszörösére, 475%-ra emelkedett, míg etanol kezelés után 205% -ra nőtt (15.D ábra).



15. ábra A primer asztrocita sejtek intracelluláris hHSPB1 termelése. A) hHSPB1 és GFAP kettős immunfluorenszcens festés vad típusú és hHSPB1 primer asztrocita tenyészetben 24 órával a kezeléseket követően. Mérce: 50 µm. Piros: GFAP; zöld: hHSPB1; kék: sejtmag. A GFAP fluoreszcencia intenzitásának meghatározása **B)** vad típusú és **C)** hHSPB1 asztrocita tenyészetekben. n=14-15 a vad típusú tenyészetben ; n=9-12 a hHSPB1 tenyészetben **D)** A hHSPB1 fluoreszcencia intezitásának kiértékelése hHSPB1 asztrocita tenyészetben. n=10-11. Kontroll sejtek=100%. Átlag±SEM. Statisztikai próba: kétmintás t-próba. *p<0,05 ; *** p<0,001. Rövidítések: ktrl: kezeletlen kontroll, EtOH: etanol kezelés, cit: citokin kezelés.

5. Diszkusszió

Csoportunk korábbi eredményei és számos szakirodalmi adat bizonyítja a HSPB1 neuroprotektív szerepét akut és krónikus idegrendszeri károsodásokban egyaránt. Az utóbbi évek kutatásai rávilágítottak arra, hogy a HSPB1 szerepet játszhat a gyulladásos folyamatok szabályozásban is. Ezen adatok nagy része azonban vagy perifériás gyulladásos modellekből származik, vagy neuroinflammáció esetén a legtöbb kísérletet sejttenyészeteken hajtották végre. Ezen túlmenően a HSPB1 gyulladáskeltő és gyulladásgátló hatását is leírták, így pontos szerepe még nem teljesen tisztázott. (Dukay és mtsai., 2019). Ezért a jelen dolgozat célja, hogy a hHSPB1 neuroinflammációban betöltött szerepét *in vivo* vizsgálva bővítsük meglévő ismereteinket, ezáltal hozzájárulva, hogy a hHSPB1 potenciális terápiás célponttá válhasson a neurodegeneratív betegségek kezelésében, nem csak neuroprotektív, de immunregulációs funkciója révén is.

Kísérleteink során a csoportunkban korábban előállított hHSPB1 túltermelő transzgenikus egértörzsben akut neuroinflammációt indukáltunk. A hHSPB1 túltermelő transzgenikus egerek használata lehetővé teszi számunkra, hogy a hHSPB1 szerepét steril gyulladásos környezetben vizsgáljuk, amely központi folyamat minden olyan idegrendszeri rendellenességben, amely nem fertőzéses eredetű (Banjara és Gosh, 2017). A hősokkfehérjék által kiváltott immunreakciók vizsgálatának módszere egy régóta vitatott kérdés. Ezen fehérjék egyik fontos tulajdonsága, hogy képesek megkötni más molekulákat, például a bakteriális LPS-t, és egyfajta hordozó funkciót betöltve növelni immunreaktivitásukat, ezáltal elősegítve az immunrendszer általi felismerésüket. Azonban emiatt a bakteriális eredetű rekombináns hősokkfehérje preparátumok gyakran szennyezettek, amely elfedheti tényleges immunregulációs hatásukat, mivel a hősokkfehérjék más molekulákkal képzett komplexe erősebb immunreakciót vált ki, mintha önmagukban vizsgálnánk őket (Quintana és Cohen, 2005). Bár Gao és Tsan kísérleteik során kimutatták, hogy az LPS eltávolítása után megszűnt a rekombináns hősokkfehérje preparátum makrofágokban kifejtett citokin termelést fokozó hatása, azóta több olyan tanulmány is született, amelyben bizonyították a kontamináció-mentes hősokkfehérjék immunsejt aktiváló szerepét (Basu és mtsai., 2000; Panjwani és mtsai., 2002; Gao és Tsan, 2003; 2004; Quintana és Cohen, 2005). Ezek alapján azonban a hősokkfehérjék transzgenikus expresszáltatása egy megbízhatóbb módja annak, hogy ténylegesen az általuk kiváltott hatást tudjuk vizsgálni a steril gyulladás egyes folyamataiban. Transzgenikus

állatainkban a hHSPB1 génexpresszióját egy CMV promóter vezérli, amely magas szintű transzgén kifejeződést biztosít számos emlős sejttípusban. A CMV promótert alapvetően egy konstitutívan aktív promóterként tartják számon, azonban *in vitro* kísérletekben kimutatták, hogy különböző stresszhatásokat, például hősokkot követően, vagy nátrium-arzenittel, kemoterápiás szerekkel, illetve gyulladásos citokinnel történő kezelés következtében a promóter aktivitása fokozódott (Prösch és mtsai., 1995; Bruening és mtsai., 1998; Svensson és mtsai., 2007). A CMV promóter indukálhatóságát eredményeink is megerősítették, ugyanis etanol kezelés hatására a transzgén expressziója megemelkedett az agy különböző régióiban, illetve a primer asztrocita sejttenyészetben is. Ily módon azonban az általunk használt transzgenikus egértörzs jobban modellezheti a hHSPB1 szerepét, mivel számos korábbi tanulmány kimutatta, hogy a HSPB1 expressziója fokozódik különböző neurológiai rendellenességek során. Sőt, a transzgenikus állatok agyában a hHSPB1 fehérje expressziós mintázata nagyon hasonlít a korábban az emberi agyban leírt endogén hHSPB1 expressziós mintázathoz, mivel mindkét esetben az asztrociták és a neuronok bizonyultak az elsődleges hHSPB1 termelő sejteknek, míg a mikrogliális hHSPB1 expresszió mértéke elenyésző volt (Satoh és Kim, 1995).

A gyulladásos folyamatok fő közvetítőit vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy az akut etanol kezelés fokozta a gyulladáskeltő citokinek expresszióját, míg a gyulladásgátló citokinekre nem volt hatással. A transzgenikus állatokban a hHSPB1 túltermelés önmagában nem befolyásolta szignifikáns mértékben a vizsgált gének expresszióját. Azonban a hHSPB1 túltermelés etanol kezeléssel kombinálva többszörösére emelte az összes vizsgált gyulladáskeltő citokin szintjét, tehát egy sokkal intenzívebb reakciót váltott ki, mint amit az etanollal kezelt vad típusú egereknél megfigyeltünk. Eredményeinkből ezért arra következtethetünk, hogy a hHSPB1 túltermelés felerősíti az akut etanol kezeléssel előidézett gyulladáskeltő citokin választ. Ez részben abból adódhat, hogy a HSPB1 és az etanol gyulladásos folyamatokban betöltött szerepében lehetnek közös pontok, például képesek ugyanazon az immunreceptoron, a TLR4-en keresztül hatva jelátviteli útvonalakat aktiválni, ezért párhuzamos jelenlétükkel felerősíthetik egymás hatását (Fernandez-Lizarbe és mtsai., 2013; Jin és mtsai., 2014; Lawrimore és Crews, 2017). Bár a HSPB1-et sokáig gyulladáscsökkentő faktornak tekintették, az általunk leírt eredmények egybevágnak korábbi szakirodalmi adatokkal és rámutatnak, hogy szerepe nem ilyen egyértelmű (van Noort és mtsai., 2012). HeLa-sejteken kimutatták, hogy a HSPB1 fontos szerepet játszik az IL-1 és a TNF-mediált jelátviteli utak aktiválásában, valamint a

gyulladáskeltő faktorok, mint az IL-6, IL-8 és a ciklooxigenáz-2 expressziójának indukálásában (Alford és mtsai., 2007). C6 glióma sejtekben azt is megfigyelték, hogy a HSPB1 foszforilációs állapotának meghatározó szerepe van az IL-1β által kiváltott IL-6 szintézisben, ugyanis az IL-6 termelődése és felszabadulása csak abban az esetben fokozódott, ha a sejteket foszforilálatlan HSPB1-el transzfektálták (Tanabe és mtsai., 2010). Egy nemrég publikált tanulmányban pedig *in vivo* is alátámasztották a HSPB1 gyulladásos folyamatokban betöltött szerepét, ugyanis HSPB1-/- egerekben szepszist követően szignifikánsan alacsonyabb volt a szérum IL-6 szint, mint vad típusú társaikban, illetve ezen egerekből származó T-sejtek csökkent TNF és IL-2 szekréciót mutattak (Breed és mtsai., 2018). Emellett több *in vitro* kísérletben kimutatták, hogy a rekombináns HSPB1 kezelés fokozott gyuladáskeltő citokin expressziót eredményezett (Jin és mtsai., 2014; Salari és mtsai., 2013; Yusuf és mtsai., 2009). Fontos azonban kiemelni, hogy az etanol kezelt hHSPB1 transzgenikus egerekben ez a rendkívül magas gyulladáskeltő citokin expresszió csak időszakos volt, és a vad típusú állatokhoz hasonlóan egy héttel a kezelést követően az expresszió mértéke visszacsökkent a kontroll csoportokéhoz hasonló szintre.

A felszabaduló citokineknek nem csak a fő forrásai, de egyben célpontjai is az agyban található gliasejtek. A különböző ingerekre és neuronális sérülésekre a mikroglia sejtek válaszolnak először, amelyek aktiválódásuk során morfológiai és funkcionális változásokon mennek keresztül. Az aktivált mikroglia feladata egyrészt, hogy fagocitikus tevékenysége által megtisztítsa az agyszövetet a toxikus sejttörmeléktől (Yang és mtsai., 2014). Másrészt, az aktivált mikroglia közreműködik az etanol által kiváltott gyulladásos folyamatokban is. Ezt támasztják alá azon megfigyelések, miszerint a mikroglia-depléció gátolta az etanol hatására indukálódó gyulladáskeltő faktorok expresszióját (Coleman és mtsai., 2020; Walter és Crews, 2017). Jelen kísérletünkben kimutattuk, hogy a mikroglia aktiváció már etanol kezelést követően 24 órán belül megkezdődött, amit jól mutat, hogy az IBA1-pozitív területek nagysága és az aktivált morfológiával rendelkező sejtek aránya szignifikánsan megnőtt az összes agyrégióban. Azonban a hHSPB1 túltermelő állatok bizonyos agyterületein etanol kezelést követően még a vad típusú állatokhoz képest is szignifikánsan magasabb volt az IBA1 lefedettség, ami arra utal, hogy stressz hatására a hHSPB1 egy még erőteljesebb mikrogliális választ képes előidézni. A transzgén-hatás viszont már a kontroll csoportban is megfigyelhető, mivel a transzgenikus állatok talamuszában a vad típusú társaikhoz képest szignifikánsan nagyobb arányban voltak jelen nyugvó mikroglia sejtek, és szignifikánsan kisebb arányban

voltak jelen aktivált sejtek. Ezen immunhisztokémiai eredményeink látszólag ellentmondanak a RT-PCR eredményeinknek, ahol fokozott *Aif1* expressziót találtunk a kontroll transzgenikus csoportban a vad típusú állatokhoz viszonyítva, míg etanol kezelést követően az *Aif1* mRNS szintje nem mutatott további növekedést a transzgenikus állatokban. Ez az ellentmondás egyrészt adódhat abból, hogy a két kísérlethez nem azonos módon történt a mintavétel: míg az immunfestés során külön-külön elemeztünk bizonyos agyi régiókat, addig a RT-PCR-hoz teljes agy homogenizátumból izoláltunk mRNS-t. Mivel sérülést követően az aktivált mikroglia sejtek gyorsan a károsodott idegsejtek köré vándorolnak, azt eredményezheti, hogy az adott területen a mikroglia sűrűség átmenetileg nagymértékben megemelkedik (Raivich és mtsai., 1999). Ezért lehetséges, hogy az *Aif1* szint az egész agyat tekintve változatlan maradt, miközben bizonyos agyi régiókban különbségek alakultak ki. Egy másik lehetséges magyarázat az *Aif1* gén alternatív splice variánsai lehetnek (Deininger és mtsai., 2002; Berglund és mtsai., 2012). Számos splice variánst írtak le korábban, azonban sem az általunk használt RT-PCR primer, sem az antitest nem ismeri fel az összes formát. Immunhisztokémiai kísérleteinkben a kontroll vad típusú és a transzgenikus egerek között kimutatott eltérések abból adódhatnak, hogy a neuronális fejlődés során a végleges agyi struktúrák kialakulásához vezető folyamatokban, mint az angiogenezis, a neuronális differenciáció, vagy a fiziológiás sejtpusztulás, a mikroglia sejtek és a HSPB1 egyaránt fontos szerepet játszanak (Eyo és Dailey, 2013; Miller és Fort, 2018). Az etanol kezelést követően megfigyelt eltérések elemzése során nem szabad megfeledkeznünk arról, hogy az aktivált mikroglia sejtek szerepe a károsodást követően komplex és sok esetben kontextusfüggő, mivel hozzájárulhatnak a károsító és a regenerációs folyamatokhoz is. Ezek alapján a hHSPB1 állatokban megfigyelt fokozottabb mikroglia válasz egyrészt a gyulladásos folyamatok erősítése révén további idegsejtkárosodást eredményezhet (Yang és mtsai., 2014). Másrészt azonban a szövet helyreállításához is hozzájárulhat, mivel kimutatták, hogy akut agysérülés után a mikroglia sejtek szerepet játszanak a károsodás és a gyulladás mértékének csökkentésében (Szalay és mtsai., 2016; Jin és mtsai., 2017; Tsuji és mtsai., 2020). Kísérleteink során az etanollal kezelt transzgenikus állatokban magasabb IBA1 immunreaktivitást és magasabb gyulladáskeltő citokin expressziót találtunk a vad típusú egerekhez képest, azonban ezzel egyidőben nem tapasztaltunk fokozottabb idegsejt pusztulást, ami arra utal, hogy a hHSPB1 túltermelés sokrétű, akár egymással ellentétes mikroglia funkciókat indukálhat. Ezt támasztják alá az M1 és M2 mikroglia markerek expressziójában megfigyelt különbségek is,

ugyanis az etanolos kezelésre adott válaszként a hHSPB1 túltermelés mindkét mikroglia fenotípus jelenlétét fokozta, mivel a *Cd68* (M1) és az *Arg1* (M2) expressziója is szignifikánsan magasabb volt transzgenikus egerekben, mint a vad típusú állatokban. Azonban a gyulladáskeltő citokinek rendkívül magas expressziója mégis arra utal, hogy a gyulladást elősegítő mikroglia típus van túlsúlyban a hHSPB1 transzgenikus állatok agyában egy nappal az etanol kezelést követően. Vizsgálataink során azt is megfigyeltük, hogy a mikroglia aktiváció szintje mindkét genotípus esetén eltérést mutatott az egyes agyterületek között etanol kezelést követően. Ez a megfigyelés egybevág egy korábbi tanulmánnyal, amelyben kimutatták, hogy a fejlődő agyban az aktivált mikroglia sejtek megjelenése térben és időben szorosan összefügg az alkohol által kiváltott sejtpusztulással (Ahlers és mtsai., 2015). Fontos azonban kihangsúlyozni, hogy az általunk megfigyelt mikroglia aktiváció reverzibilisnek bizonyult. Akut gyulladásos modellünkben a kezelés után egy héttel a mikroglia sejtek visszatértek nyugvó állapotukba, illetve újra egyenletes volt az eloszlásuk az agy egész területén, ami arra enged következtetni, hogy a sérülés által kiváltott nagymértékű aktivációjukat egy gyors deaktiváció követte, és az aktivált állapot nem vált hosszan elnyúlóvá. Úgy tűnik azonban, hogy a hHSPB1 transzgenikus állatokkal ellentétben az etanollal kezelt vad típusú csoportban a mikroglia sejtek teljes regenerációjához nem volt elegendő egy hét. Ezt támasztja alá, hogy míg a hHSPB1 túltermelő állatokban egy héttel etanol kezelést követően az IBA1 lefedettség megközelítette a kontroll állatokban mért lefedettséget, addig az etanol kezelt vad típusú állatokban kisebb volt, ami egy hiányosabb nyúlványhálózatra utal. A mikroglia sejtek regenerációja elengedhetetlen lépés lehet az etanol által kiváltott károsodást követően a neurogenezis elősegítésében is (McClain és mtsai., 2011; Zhao és mtsai., 2013).

Az idegrendszeri gyulladásos folyamatok másik fontos sejtes résztvevői az asztrociták. Az asztrociták az egészséges agyban számos, a neuronális homeosztázis fenntartásához nélkülözhetetlen feladatot látnak el. Azonban a központi idegrendszert ért sérülések egy specifikus asztrocita választ idéznek elő, az úgynevezett reaktív asztrogliózist, amely az asztrociták komplex molekuláris, morfológiai és funkcionális átalakulását jelenti. A reaktív asztrogliózis, amely a molekuláris expressziós változásoktól kezdve egészen a gliális hegképződésig terjedhet, egy grádiensszerű folyamat, mértéke függ a sérülés súlyosságától, illetve az asztrocitáknak a sérült területtől való távolságától. A folyamat során az asztrociták alapvető funkciókat vesztenek el, de ezzel párhuzamosan új funkciókra tesznek szert, amelyek

jótékonyan és hátrányosan is befolyásolhatják a környező szövetet (Sofroniew és Vinters, 2010). Mivel az asztrociták aktiválásában a citokineknek kulcsfontosságú szerepe van, ezért nem meglepő, hogy kísérletünkben a fokozott citokin expresszió és mikroglia aktiváció mellett a *Gfap* mRNS szintje is nagymértékben megemelkedett egy nappal az etanol kezelést követően (Raivich és mtsai., 1999). Ráadásul az etanollal kezelt transzgenikus állatokban a *Gfap* expressziós szintje szignifikánsan magasabb volt, mint az etanollal kezelt vad típusú állatoké. Mivel a GFAP-pozitív fibrillumok kialakulásához több idő kell, ezért az asztrocita aktiválódással járó morfológiai változások csak egy héttel az etanol kezelés után voltak kimutathatóak. A génexpressziós változásoknak megfelelően az etanolra adott válaszként nagymértékben megemelkedett a GFAP-pozitív területek nagysága is, amely elsősorban az erek körül volt megfigyelhető. Ez a változás a hHSPB1 túltermelő transzgenikus egerek agyában még kifejezettebb volt, ami bizonyos agyterületeken szignifikáns különbségekhez vezetett a GFAP immunreaktív területek nagyságában a két genotípus között. Tehát a transzgenikus állatokban a hHSPB1 jelenléte fokozta a reaktív asztrogliózis mértékét. Ezt támasztja alá a primer asztrocita tenyészeteken tett megfigyelésünk is, amelyben a GFAP intracelluláris szintje a vad típusú sejtekben csak citokin kezelést követően nőtt meg szignifikáns mértékben, míg ez a hatás a transzgenikus sejtek esetében citokin és etanol kezelést követően is kimutatható volt. Károsodást követően a gliasejtek negatív hatása nemcsak abból adódhat, hogy hozzájárulnak a citotoxikus faktorok termeléséhez, hanem abból is, hogy képtelenek ellátni alapvető feladataikat. A hHSPB1 azonban hozzájárulhat az asztrociták normál működésének fenntartásához azáltal, hogy kölcsönhatásba lép a GFAP-val, és elősegíti a sejthálózatokat alkotó filamentumok közötti helyes kölcsönhatások kialakulását, valamint megvédi a filamentumokat az aggregációhoz vezető nem kovalens kötések létrejöttétől (Der Perng és mtsai., 1999). Ezen kívül reaktív asztrocitákban a HSPB1 erős kolokalizációt mutatott a kaszpáz-3-mal, amely arra utalhat, hogy a HSPB1 az apoptótikus kaszkádok gátlása révén elősegítheti az asztroglia túlélését (Villapol és mtsai., 2008). A HSPB1 azonban nemcsak az őt expresszáló asztrocita sejtekre gyakorolhat pozitív hatást, hanem védelmet nyújthat a környező szövetek számára is (Acarin és mtsai., 2002). Mivel az asztrociták fiziológiás körülmények között rendkívül fontos szerepet töltenek be az idegi jelátvitelben, ezért kiemelten fontos Bechtold és Brown (2000) speciális radiális asztrocitákon, az úgynevezett Bergmann gliasejteken tett megfigyelése, miszerint hipertermia okozta stressz hatásra a HSPB1

felhalmozódik a preszinaptikus gliális nyúlványokban. Mi több, felvetették a HSPB1 szinaptikus átvitelének lehetőségét a gliasejtekből az idegsejtekbe stressz körülmények között. Ez egyrészt megkönnyítheti a stressz okozta szinaptikus károsodások kijavítását és a szinaptikus aktivitás helyreállítását. Másrészt felgyorsítja a központi idegrendszer károsító tényezőkre adott hősokkfehérje válaszát, mert így a neuronális sejttesttől távol eső struktúrákban, például a szinapszisokban, is hamar megjelenhetnek a védelmet biztosító hősokkfehérjék (Bechtold és Brown, 2000).

A következő lépésben azt vizsgáltuk, hogy az intra-, vagy az extracelluláris hHSPB1 felelős-e a transzgenikus egerekben megfigyelt változásokért, és hogy mely sejttípus lehet a fő forrása az etanol kezelt hHSPB1 transzgenikus állatokban leírt nagymértékű gyulladáskeltő citokin expressziónak. Bár a szakirodalom nagy része az extracelluláris hősokkfehérjéket azonosítja gyulladásszabályozó faktorként, mi jelen kísérleteink során nem tudtuk kimutatni a hHSPB1-et a primer sejttenyészetek felülúszójából, amely azt támasztja alá, hogy az általunk használt modellben elsődlegesen a hHSPB1 intracelluláris formája felelős a gyulladásos folyamatok modulációjáért. Az aktív hHSPB1 szekréció hiánya azonban nem zárja ki annak a lehetőségét, hogy az *in vivo* megfigyelt nagyfokú neurodegeneráció során az elpusztult sejtekből passzívan felszabaduló transzgenikus fehérje nem befolyásolta a gyulladásos folyamatokat. Kísérleteink során mindkét genotípus esetében a mikroglia sejtek bizonyultak az elsődleges TNFα-termelő sejttípusnak, míg az asztrociták egy alacsonyabb szintű TNFα termelést mutattak, a neuronális citokin felszabadítás pedig a gliasejtekhez képest elenyésző mértékű volt, amely eredmények összhangban állnak korábbi irodalmi adatokkal (Lambertsen és mtsai., 2005; Welser-Alves és Milner, 2013). A vad típusú gliasejtekhez képest a hHSPB1 transzgenikus tenyészetekben szignifikáns eltéréseket detektáltunk a TNFα termelést illetően, amely tovább erősíti azon feltételezésünket, hogy a hHSPB1 szerepet játszik a gyulladásos folyamatok szabályozásában. A primer mikroglia sejtek esetében gyulladásos környezetben a transzgenikus állatokból származó sejtek szignifikánsan nagyobb mennyiségű TNFα-át szabadítottak fel a vad típusú sejtekhez képest. Ezzel szemben az asztrociták esetében a vad típusú kultúrában citokin kezelés hatására szignifikánsan megemelkedett a TNFα termelés szintje, míg a transzgenikus sejtekben változatlan maradt. Mivel a transzgenikus asztrocitákban a kezelések hatására többszörösére nőtt az intracelluláris hHSPB1 expreszió mértéke is, ráadásul a gyulladáskeltő citokinekre adott hHSPB1 válasz volt a legerősebb, ezért feltételezhető, hogy a megemelkedett

intracelluláris hHSPB1 szint közvetlenül befolyásolja a transzgenikus asztrociták TNFα termelését. Nemrég megjelent tanulmányokban kimutatták, hogy a gyulladásgátló tulajdonságú Annexin A1 fehérje, amely fokozott asztrogliális expressziót mutatott akut agysérülést követően, képes kölcsönhatásba lépni a HSPB1-el, és az IKKβ degradációját elősegítve csökkenteni a TNFα termelést (Liu és mtsai., 2018; Shijo és mtsai., 2019). Az asztrocitákkal szemben a mikroglia sejtek csekély hHSPB1 expressziója feltételezhetően nem indukálja hasonló direkt interakciók kialakulását, mégis a hHSPB1 transzgenikus állatokból származó mikroglia sejtek látszólag fokozottabb aktivitást mutattak, mivel nagyobb mennyiségű TNFα-t választottak ki, mint a vad típusú sejtek. Ez arra enged következtetni, hogy a hHSPB1 közvetett módon képes befolyásolni a mikroglia sejtek aktiválódását. Egy lehetséges útvonal, hogy a mikroglia tenyészetekben kis számban jelen levő, a hHSPB1-et magas szinten expresszáló asztrociták által fejti ki hatását. Korábbi irodalmi adatok alapján nemcsak a károsodás esetén gyorsan aktiválódó mikroglia sejtek befolyásolhatják a későbbi asztrocita választ, hanem a sejtek között egy bonyolult kölcsönhatás, egy kétirányú kommunikáció jön létre. Ezt támasztja alá egy nemrég megjelent tanulmány, amelyben leírták, hogy asztrocitákban az NF-κB aktiváció egy WNT-függõ mikroglia proliferációt indukál (Ouali Alami és mtsai., 2018). Továbbá az asztrocitákból akut sérülés vagy gyulladás hatására felszabaduló ATP kiválthatja a mikroglia sejtek purinerg receptorainak aktiválódását, amely többek között indukálja a kemotaktikus mozgásokat, stimulálja a mikrogliális Ca^{2+} szignalizációt és fokozza a citokin felszabadulást, például IL-1β-t tartalmazó vezikulák képzése révén (Verderio és Matteoli, 2001; Davalos és mtsai., 2005; Bianco és mtsai., 2005). Ezen kívül az asztrociták módosíthajták még a mikroglia sejtek funkcióját és eloszlását gyulladásos citokinek és kemokinek szekréciója által vagy közvetlen sejt-sejt kölcsönhatás révén is (Farina és mtsai., 2007; He és mtsai., 2016; Lana és mtsai., 2019). Mivel a HSPB1-ről korábban kimutatták, hogy több, gyulladással összefüggő jelátviteli útra hatással van, ezért számos faktor felszabadulását befolyásolhatja. Alford és munkatársai HeLa sejteken kimutatták, hogy az intracelluláris HSPB1 részt vesz három IL-1-aktivált protein-kináz kaszkád, nevezetesen a p38/MAPK (mitogén-aktivált protein-kináz), a JNK (c-Jun N-terminális kináz), és az NF-κB útvonal aktiválásának szabályozásában, valamint fokozza a gyulladásos mediátorok transzkripcióját azáltal, hogy hozzájárul mRNS-ük stabilizálásához (Alford és mtsai., 2007). A HSPB1 ilyen széleskörű hatása tovább erősíti azon hipotézisünket, hogy a hHSPB1 az asztrogliális funkciók módosítása révén hatással lehet a

mikroglia aktivációra. *In vitro* kísérleteink során tett másik érdekes megfigyelésünk, hogy az imént megvitatott változások csak citokin kezelést követően voltak megfigyelhetőek a sejttenyészetekben, az etanol kezelés önmagában nem befolyásolta a TNFα felszabadulását. Ez azzal magyarázható, hogy az etanol gyulladást kiváltó hatása részben az idegsejtek károsodásától függ. Ezt támasztja alá az a megfigyelés is, hogy fejlődő agyban a kevésbé toxikus, közepes dózisú (3g/kg) etanol kezelés, bár aktiválta a mikroglia sejteket, egy rövidebb és kisebb mértékű aktivációt váltott ki, amelyet nem kísért gyulladásos citokin felszabadulás sem, ellenben a magas dózisú etanol kezeléssel (5g/kg) (Ahlers és mtsai., 2015). Hasonlóképpen, felnőtt rágcsálók agyában, amelyek a magzati agyhoz képest kevésbé érzékenyek az etanol károsító hatásaival szemben, egyszeri 5g/kg etanol kezelést követően nem figyelték meg a neurogenezis csökkenését, és ezzel párhuzamosan a gyulladáskeltő citokinek szintje sem változott szignifikánsan (Qin és mtsai., 2008). Az etanol hatását ezen kívül a neurodegeneráció mellett metabolitjai is erősítik, amelyet jól bizonyít, hogy az acetaldehid toxikusabbnak bizonyult az asztrocita és oligodendrocita tenyészetek számára, mint az etanol (Signorini-Allibe és mtsai., 2005; Coutts and Harrison, 2015).

Annak érdekében, hogy megtudjuk, összességében milyen irányba befolyásolta a hHSPB1 túltermelés az akut agysérülés kimenetelét a gyulladásos folyamatok fokozása révén, megvizsgáltuk az etanol által kiváltott sejtpusztulást mértékét. A kontroll állatok agyában megfigyelhető kismértékű apoptózisért feltehetően a fejlődő agyban lejátszódó fiziológiás folyamatok felelősek, mivel az idegrendszer embrionális és posztnatális finomhangolása során sok idegsejt elpusztul (Ikonomidou és mtsai., 2000). Ezen túlmenően az etanol kezelt állatok agyában 24 órán belül egy nagyfokú apoptózis vette kezdetét, azonban az egyes agyterületek között különbségek mutatkoztak a károsodás mértékét tekintve. A kérgi régióban található sejtek voltak a legérzékenyebbek az etanolra, míg például a hippokampuszban mérsékeltebb károsodást figyeltünk meg. Ez azzal magyarázható, hogy a szinaptogenetikus periódus különböző időszakaiban az egyes neuron csoportok etanol szenzitivitása eltér. Tehát minden agyrégióban van egy meghatározott időablak, amikor az idegsejtek fokozottan érzékenyek az alkohol citotoxikus hatására, és ilyenkor ezeken a területeken a kezelés nagyobb mértékű sejtpusztulást vált ki (Ikonomidou és mtsai., 2000). A HSPB1 neuroprotektív szerepét számos *in vivo* és *in vitro* adat támasztja alá (Wagstaff és mtsai., 1999; Akbar és mtsai., 2003; Van Der Weerd és mtsai., 2010; Penke és mtsai., 2018). Mi több, csoportunk korábban akut és krónikus

etanol kezelést követően is kimutatta a hHSPB1 idegsejtekre gyakorolt védő hatását felnőtt egerekben, azonban a jelen kísérletben a hHSPB1 túltermelés nem csökkentette szignifikáns mértékben az apoptótikus sejtek számát (Tóth és mtsai., 2010). Az irodalmi adatoktól való eltérés részben adódhat abból, hogy ebben a korai posztnatális korban az agy olyan nagyfokú érzékenységet mutat az alkohol károsító hatásával szemben, amit a hHSPB1 túltermelés nem tud ellensúlyozni. Másrészt viszont, eredményeink főként azon ismeretek tükrében lehetnek fontosak, miszerint a gyulladáskeltő citokinek, mint a TNFα, apoptótikus sejtpusztulást indukálnak (Rath és Aggarwal, 1999). Ezt támasztják alá azon tanulmányok is, amelyekben leírták, hogy a TNFα csökkentette humán idegsejtek és patkány neuronális őssejtek életképességét, ráadásul az utóbbi esetében a TNFα hatása dózis-függő volt (Talley és mtsai., 1995; Chen és mtsai., 2016). Ezen eredmények alapján nagyon fontos azon megfigyelésünk, hogy az etanollal kezelt hHSPB1 transzgenikus állatok agyában, ahol tízszeres *Tnf* expresszió növekedést detektáltunk, az apoptózis szintje többnyire változatlan maradt vagy csökkenő trendet mutatott az etanol kezelt vad típusú állatokhoz képest. Az intracelluláris hHSPB1 szint neuroprotektív hatása részben azon alapulhat, hogy a neurofilamentumokkal és az aktinhálózattal kölcsönhatásba lépve képes támogatni a neuronok szerkezeti integritásának fenntartását (Williams és mtsai., 2005; Zhai és mtsai., 2007). Ezenfelül korábbi vizsgálatok szerint a HSPB1 a TNFα által kiváltott sejthalál több pontjára is hatással lehet. A HSPB1 túltermelés *in vitro* képes volt megakadályozni a TNFα által közvetített apoptózist, amely összefüggésben állt a sejt megemelkedett glutation-szintjével (Mehlen és mtsai 1996). A TNFα kezelésre adott válaszként a HSPB1 fokozta az NF-κB inhibítor proteaszómális lebontását, ezáltal növelve az NF-κB transzkripciós aktivitását és a sejtek túlélését (Parcellier és mtsai., 2003, Zhou és mtsai., 2019). TNFα stimulációt követően a foszforilált HSPB1 elősegítette a p38/ERK (extracelluláris szignál-regulált kináz) szignalizációs útvonal aktiválódását is, amely szintén apoptózis gátlónak bizonyult (Qi és mtsai., 2014). Továbbá kimutatták a TNFα kaszpáz-8 és kaszpáz-3 által szabályozott sejtpusztulást indukáló hatását, míg a HSPB1-ről leírták, hogy gátolja a kaszpáz-mediált apoptótikus folyamatokat (Bruey és mtsai., 2000; Gordon és mtsai., 2012). Ezen megfigyelések alapján feltételezzük, hogy a hHSPB1 túltermelés képes ellensúlyozni a transzgenikus egerekben nagymértékben expresszálódó *Tnf* apoptózis-indukáló hatását. Azonban fontos azt is megemlíteni, hogy a gyulladáskeltő citokin termelődés pozitív hatásokat is kiválthat a központi idegrendszerben. Bonthius és munkatársai neuronális

tenyészeteken végzett kísérletekkel igazolták a TNFα neuroprotektív szerepét alkohol kezelést követően (Bonthius és mtsai., 2008; 2009). Továbbá attól függően, hogy melyik receptorán hat, a TNFα egyaránt részt vehet a demielinizációban, valamint az idegsejtek regenerációjában is, míg akut Il-1β kezelést követően neurotróf faktorok fokozott termelődését írták le (Arnett és mtsai., 2001; Song és mtsai., 2013). Nemrégiben Hyvarinen és munkatársai pedig kimutatták, hogy krónikus IL-1β és TNFα kezelés képes egy olyan asztrocita fenotípust aktiválni, amely elősegíti a neuronok túlélését (Hyvärinen és mtsai., 2019).

Eredményeink új *in vivo* adatokat szolgáltatnak arra vonatkozóan, hogy a hHSPB1 túltermelés szerepet játszik az akut neuroinflammáció szabályozásában. Nevezetesen, a hHSPB1 túltermelés modulálta az etanol által kiváltott gyulladásos folyamatokat, ami a gyulladáskeltő citokinek magasabb expressziójában és a gliasejtek fokozott aktivációjában nyilvánult meg. A jelen dolgozatban bemutatott eredmények arra utalnak, hogy a hHSPB1 komplex szerepet játszhat a neuroinflammáció szabályozásában, mert a hHSPB1 túltermelő egerekben az intenzívebb gyulladás nem járt fokozott idegsejtkárosodással. Továbbá a hHSPB1 transzgenikus egerekben a vad típusúakhoz hasonlóan a gyulladáskeltő citokinek szintje, valamint a mikroglia aktiváció mértéke is normalizálódott egy héttel a kezelést követően, ami arra utal, hogy a hHSPB1 túltermelés a gyulladás akut fázisát erősíti fel, és nem fordítja át krónikus jellegűvé. A dolgozat által bemutatott adatok segíthetnek megérteni a hHSPB1 potenciális szabályozó szerepét a központi idegrendszeri gyulladásban.

Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek Prof. Dr. Sántha Miklósnak a tanulmányaim során nyújtott szakmai támogatásáért és iránymutatásáért. Köszönöm neki, hogy lehetőséget biztosított számomra, hogy a csoportjában dolgozhassak.

Hálás köszöntettel tartozom társtémavezetőmnek Dr. Tóth E. Melindának az elméleti és gyakorlati munkám során nyújtott segítségéért, támogatásáért, valamint kedvességéért, és türelméért, amelyet irányomba tanúsított.

Köszönettel tartozom a csoport összes jelenlegi és korábbi tagjának segítségükért, valamint, hogy az általuk megteremtett jóhangulatú, baráti légkörben dolgozhattam. Külön köszönöm laboránsunknak, Kis-Sebestyén Lászlóné Hegyvári Ibolyának, és hallgatónknak, Hajdu Petrának a munkáját, amivel hozzájárultak dolgozatomhoz.

Hálásan köszönöm a Biológiai Barrierek Kutatócsoport valamennyi tagjának a vizsgálatokban való együttműködést. Külön köszönöm Prof. Dr. Deli Máriának és Dr. Walter Fruzsinának az *in vitro* kísérletek tervezésében és kivitelezésében nyújtott segítségét, valamint hasznos tanácsaikat. Köszönöm továbbá Vigh Juditnak és Barabási Beátának az *in vitro* kísérletek során végzett munkájukat, valamint Dr. Hoyk Zsófiának hasznos szakmai tanácsait.

Köszönettel tartozom együttműködő partnereinknek: a Molekuláris Stresszbiológia Csoportból Prof. Dr. Vígh Lászlónak; a Mikroszkópos Képfeldolgozó és Gépi Tanulási Csoportból Dr. Horváth Péternek, Dr. Migh Edének, Balassa Tamásnak; a Funkcionális Genomikai Laboratóriumból Prof. Dr. Puskás Lászlónak, Dr. Zvara Ágnesnek; a Biomolekuláris Elektronika Kutatócsoportból Kincses Andrásnak; az SZTE ÁOK Orvosi Vegytani Intézetből Prof. Dr. Penke Botondnak, Dr. Fülöp Líviának, Borbély Emőkének és Szögi Titanillának, hogy hozzájárulásukkal lehetővé tették a dolgozat létrejöttét, valamint köszönöm a munkám során nyújtott technikai és elméleti segítségüket. Külön köszönöm Dr. Csoboz Bálintnak, a Molekuláris Stresszbiológia Csoport egykori tagjának a cikk lektorálását és baráti támogatását.

Végül pedig kimondhatatlanul hálás vagyok szüleimnek, testvéremnek és páromnak töretlen odaadásukért, szeretetükért, türelmükért és támogatásukért, amellyel mindvégig mellettem álltak.

Munkánk a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal (GINOP-2.3.2-15-2016-00060, GINOP-2.3.2-15-2016-00040) szakmai támogatásával készült.

Irodalomjegyzék

Acarin L, Paris J, González B, Castellano B. Glial expression of small heat shock proteins following an excitotoxic lesion in the immature rat brain. *Glia* 2002; 38: 1–14.

Adamczak SE, De Rivero Vaccari JP, Dale G, Brand FJ, Nonner D, Bullock M *et al.* Pyroptotic neuronal cell death mediated by the AIM2 inflammasome. *J Cereb Blood Flow Metab* 2014; 34: 621–629.

Ahlers KE, Karaçay B, Fuller L, Bonthius DJ, Dailey ME. Transient activation of microglia following acute alcohol exposure in developing mouse neocortex is primarily driven by BAX-dependent neurodegeneration. *Glia* 2015; 63: 1694–1713.

Akbar MT, Lundberg AMC, Liu K, Vidyadaran S, Wells KE, Dolatshad H *et al.* The neuroprotective effects of heat shock protein 27 overexpression in transgenic animals against kainate-induced seizures and hippocampal cell death. *J Biol Chem* 2003; 278: 19956–19965.

Alford KA, Glennie S, Turrell BR, Rawlinson L, Saklatvala J, Dean JLE. Heat shock protein 27 functions in inflammatory gene expression and transforming growth factor-β-activated kinase-1 (TAK1)-mediated signaling. *J Biol Chem* 2007; 282: 6232–6241.

Ali A, Biswas A, Pal M. HSF1 mediated TNF-α production during proteotoxic stress response pioneers proinflammatory signal in human cells. *FASEB J* 2019; 33: 2621–2635.

Arnett HA, Mason J, Marino M, Suzuki K, Matsushima GK, Ting JPY. TNFα promotes proliferation of oligodendrocyte progenitors and remyelination. *Nat Neurosci* 2001; 4: 1116–1122.

Balogi Z, Multhoff G, Jensen TK, Lloyd-Evans E, Yamashima T, Jäättelä M *et al.* Hsp70 interactions with membrane lipids regulate cellular functions in health and disease. *Prog Lipid Res* 2019; 74: 18–30.

Banjara M, Ghosh C. Sterile Neuroinflammation and Strategies for Therapeutic Intervention. *Int J Inflam* 2017; 2017: 8385961.

Barna L, Walter FR, Harazin A, Bocsik A, Kincses A, Tubak V *et al.* Simvastatin, edaravone and dexamethasone protect against kainate-induced brain endothelial cell damage. *Fluids Barriers CNS* 2020; 17. doi:10.1186/s12987-019-0166-1.

Bartelt-Kirbach B, Slowik A, Beyer C, Golenhofen N. Upregulation and phosphorylation of HspB1/Hsp25 and HspB5/αB-crystallin after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Cell Stress Chaperones* 2017; 22: 653–663.

Basu S, Binder RJ, Suto R, Anderson KM, Srivastava PK. Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-κB pathway. *Int Immunol* 2000; 12: 1539–1546.

Baughman HER, Clouser AF, Klevit RE, Nath A. HspB1 and Hsc70 chaperones engage distinct tau species and have different inhibitory effects on amyloid formation. *J Biol Chem* 2018; 293: 2687–2700.

Bechtold DA, Brown IR. Heat shock proteins Hsp27 and Hsp32 localize to synaptic sites in the rat cerebellum following hyperthermia. *Brain Res Mol Brain Res* 2000; 75: 309–20.

Bechtold DA, Brown IR. Induction of Hsp27 and Hsp32 stress proteins and vimentin in glial cells of the rat hippocampus following hyperthermia. *Neurochem Res* 2003; 28: 1163–73.

Berglund LM, Kotova O, Osmark P, Grufman H, Xing C, Lydrup ML *et al*. NFAT regulates the expression of AIF-1 and IRT-1: yin and yang splice variants of neointima formation and atherosclerosis. *Cardiovasc Res* 2012; 93: 414–423.

Bianco F, Pravettoni E, Colombo A, Schenk U, Möller T, Matteoli M *et al.* Astrocyte-Derived ATP Induces Vesicle Shedding and IL-1β Release from Microglia. *J Immunol* 2005; 174: 7268–7277.

Bonthius DJ, Bonthius NE, Li S, Karacay B. The protective effect of neuronal nitric oxide synthase (nNOS) against alcohol toxicity depends upon the NO-cGMP-PKG pathway and NF-κB. *Neurotoxicology* 2008; 29: 1080–1091.

Bonthius DJ, Luong T, Bonthius NE, Hostager BS, Karacay B. Nitric oxide utilizes NF-κB to signal its neuroprotective effect against alcohol toxicity. *Neuropharmacology* 2009; 56: 716–731.

Breed ER, Hilliard CA, Yoseph B, Mittal R, Liang Z, Chen CW *et al.* The small heat shock protein HSPB1 protects mice from sepsis. *Sci Rep* 2018; 8: 1–10.

Bruening W, Giasson B, Mushynski W, Durham H. Activation of stress-activated MAP protein kinases up-regulates expression of transgenes driven by the cytomegalovirus immediate/early promoter. *Nucleic Acids Res* 1998; 26: 486–489.

Bruey JM, Ducasse C, Bonniaud P, Ravagnan L, Susin SA, Diaz-Latoud C *et al.* Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c. *Nat Cell Biol* 2000; 2: 645–652.

Bruinsma IB, de Jager M, Carrano A, Versleijen AAM, Veerhuis R, Boelens W *et al.* Small heat shock proteins induce a cerebral inflammatory reaction. *J Neurosci* 2011; 31: 11992–12000.

Burm SM, Zuiderwijk-Sick EA, T Jong AEJ, Van Der Putten C, Veth J, Kondova I *et al.* Inflammasome-induced IL-1β secretion in microglia is characterized by delayed kinetics and is only partially dependent on inflammatory caspases. *J Neurosci* 2015; 35: 678–687.

Calderwood SK, Gong J, Murshid A. Extracellular HSPs: The Complicated Roles of Extracellular HSPs in Immunity. *Front Immunol* 2016; 7: 159.

Chapp AD, Behnke JE, Driscoll KM, Fan Y, Hoban E, Shan Z *et al.* Acetate Mediates Alcohol Excitotoxicity in Dopaminergic-like PC12 Cells. *ACS Chem Neurosci* 2019; 10: 235–245.

Chen N, Wei F, Wang L, Cui S, Wan Y, Liu S. Tumor Necrosis Factor Alpha Induces Neural Stem Cell Apoptosis Through Activating p38 MAPK Pathway. *Neurochem Res* 2016; 41: 3052–3062.

Clayton A, Turkes A, Navabi H, Mason MD, Tabi Z. Induction of heat shock proteins in B-cell exosomes. *J Cell Sci* 2005; 118: 3631–3638.

Coleman LG, Zou J, Crews FT. Microglial depletion and repopulation in brain slice culture normalizes sensitized proinflammatory signaling. *J Neuroinflammation* 2020; 17: 27.

Coutts DJC, Harrison NL. Acetaldehyde, not ethanol, impairs myelin formation and viability in primary mouse oligodendrocytes. *Alcohol Clin Exp Res* 2015; 39: 455–462.

Cox D, Selig E, Griffin MDW, Carver JA, Ecroyd H. Small Heat-shock Proteins Prevent α-Synuclein Aggregation via Transient Interactions and Their Efficacy Is Affected by the Rate of Aggregation. *J Biol Chem* 2016; 291: 22618–22629.

Davalos D, Grutzendler J, Yang G, Kim J V, Zuo Y, Jung S *et al.* ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat Neurosci* 2005; 8: 752–758.

Dávila D, Jiménez-Mateos EM, Mooney CM, Velasco G, Henshall DC, Prehn JHM. Hsp27 binding to the 3′UTR of bim mRNA prevents neuronal death during oxidative stress-induced injury: A novel cytoprotective. *Mol Biol Cell* 2014; 25: 3413–3423.

De Maio A, Vazquez D. Extracellular Heat Shock Proteins. *Shock* 2013; 40: 239–246.

De Rivero Vaccari JP, Lotocki G, Alonso OF, Bramlett HM, Dietrich WD, Keane RW. Therapeutic neutralization of the NLRP1 inflammasome reduces the innate immune response and improves histopathology after traumatic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 2009; 29: 1251–1261.

Deininger MH, Meyermann R, Schluesener HJ. The allograft inflammatory factor-1 family of proteins. *FEBS Lett* 2002; 514: 115–121.

Del Zoppo GJ, Frankowski H, Gu Y-H, Osada T, Kanazawa M, Milner R *et al.* Microglial cell activation is a source of metalloproteinase generation during hemorrhagic transformation. *J Cereb Blood Flow Metab* 2012; 32: 919–32.

Der Perng M, Cairns L, Van Den IJssel P, Prescott A, Hutcheson AM, Quinlan RA. Intermediate filament interactions can be altered by HSP27 and αB-crystallin. *J Cell Sci* 1999; 112: 2099–2112.

Dukay B, Csoboz B, Tóth ME. Heat-shock proteins in neuroinflammation. *Front Pharmacol* 2019; 10: 920.

Elahy M, Jackaman C, Mamo JCL, Lam V, Dhaliwal SS, Giles C *et al.* Blood-brain barrier dysfunction developed during normal aging is associated with inflammation and loss of tight junctions but not with leukocyte recruitment. *Immun Ageing* 2015; 12. doi:10.1186/s12979-015-0029-9.

Ellis J. Proteins as molecular chaperones. *Nature* 1988; 328: 378–379.

Eyo UB, Dailey ME. Microglia: Key elements in neural development, plasticity, and pathology. *J Neuroimmune Pharmacol* 2013; 8: 494–509.

Fann DYW, Lim YA, Cheng YL, Lok KZ, Chunduri P, Baik SH *et al*. Evidence that NF-κB and MAPK Signaling Promotes NLRP Inflammasome Activation in Neurons Following Ischemic Stroke. *Mol Neurobiol* 2018; 55: 1082–1096.

Farina C, Aloisi F, Meinl E. Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends Immunol* 2007; 28: 138–145.

Fernandez-Lizarbe S, Montesinos J, Guerri C. Ethanol induces TLR4/TLR2 association, triggering an inflammatory response in microglial cells. *J Neurochem* 2013; 126: 261–273.

Gao B, Tsan MF. Endotoxin contamination in recombinant human heat shock protein 70 (Hsp70) preparation is responsible for the induction of tumor necrosis factor α release by murine macrophages. *J Biol Chem* 2003; 278: 174–179.

Gao B, Tsan MF. Induction of cytokines by heat shock proteins and endotoxin in murine macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 317: 1149–1154.

Gastpar R, Gehrmann M, Bausero MA, Asea A, Gross C, Schroeder JA *et al.* Heat Shock Protein 70 Surface-Positive Tumor Exosomes Stimulate Migratory and Cytolytic Activity of Natural Killer Cells. *Cancer Res* 2005; 65: 5238–5247.

Giuliano, JS; Lahni, PM; Wong, HR; Wheeler D. Pediatric Sepsis - Part V: Extracellular Heat Shock Proteins: Alarmins for the Host Immune System. *Open Inflamm J* 2011; 4: 49–60.

Glabinski AR, Tani M, Aras S, Stoler MH, Tuohy VK, Ransohoff RM. Regulation and function of central nervous system chemokines. *Int J Dev Neurosci* 1995; 13: 153–165.

Gordon R, Anantharam V, Kanthasamy AG, Kanthasamy A. Proteolytic activation of proapoptotic kinase protein kinase Cδ by tumor necrosis factor α death receptor signaling in dopaminergic neurons during neuroinflammation. *J Neuroinflammation* 2012; 9: 82.

Guerri C, Pascual M. Role of neuroinflammation in ethanol neurotoxicity. *Academic Press*, 2019, pp 259–294.

Haorah J, Knipe B, Gorantla S, Zheng J, Persidsky Y. Alcohol-induced blood-brain barrier dysfunction is mediated via inositol 1,4,5-triphosphate receptor (IP3R)-gated intracellular calcium release. *J Neurochem* 2007; 100: 324–336.

Haorah J, Ramirez SH, Floreani N, Gorantla S, Morsey B, Persidsky Y. Mechanism of alcohol-induced oxidative stress and neuronal injury. *Free Radic Biol Med* 2008; 45: 1542–1550.

Harazin A, Bocsik A, Barna L, Kincses A, Váradi J, Fenyvesi F *et al.* Protection of cultured brain endothelial cells from cytokine-induced damage by α-melanocyte stimulating hormone. *PeerJ* 2018; 2018: e4774.

Haslbeck M, Vierling E. A first line of stress defense: Small heat shock proteins and their function in protein homeostasis. *J Mol Biol* 2015; 427: 1537–1548.

He M, Dong H, Huang Y, Lu S, Zhang S, Qian Y *et al.* Astrocyte-Derived CCL2 is Associated with M1 Activation and Recruitment of Cultured Microglial Cells. *Cell Physiol Biochem* 2016; 38: 859–870.

Hendrick JP, Hartl FU. Molecular chaperone functions of heat-shock proteins. *Annu Rev Biochem* 1993; 62: 349–384.

Hu X, Leak RK, Shi Y, Suenaga J, Gao Y, Zheng P *et al.* Microglial and macrophage polarization - New prospects for brain repair. *Nat Rev Neurol* 2015; 11: 56–64.

Hunter-Lavin C, Davies EL, Bacelar MMFVG, Marshall MJ, Andrew SM, Williams JHH. Hsp70 release from peripheral blood mononuclear cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 324: 511–517.

Hyvärinen T, Hagman S, Ristola M, Sukki L, Veijula K, Kreutzer J *et al.* Co-stimulation with IL-1β and TNF-α induces an inflammatory reactive astrocyte phenotype with neurosupportive characteristics in a human pluripotent stem cell model system. *Sci Rep* 2019; 9: 16944.

Ikonomidou C, Bittigau P, Koch C, Genz K, Stefovska V, Hörster F. Ethanol-induced apoptotic neurodegeneration and fetal alcohol syndrome. *Science (80-)* 2000; 287: 1056–1060.

Imura T, Shimohama S, Sato M, Nishikawa H, Madono K, Akaike A *et al.* Differential expression of small heat shock proteins in reactive astrocytes after focal ischemia: possible role of beta-adrenergic receptor. *J Neurosci* 1999; 19: 9768–79.

Inouye S, Fujimoto M, Nakamura T, Takaki E, Hayashida N, Hai T *et al.* Heat Shock Transcription Factor 1 Opens Chromatin Structure of Interleukin-6 Promoter to Facilitate Binding of an Activator or a Repressor. *J Biol Chem* 2007; 282: 33210–33217.

Jack CS, Arbour N, Manusow J, Montgrain V, Blain M, McCrea E *et al.* TLR Signaling Tailors Innate Immune Responses in Human Microglia and Astrocytes. *J Immunol* 2005; 175: 4320–4330.

Jin C, Cleveland JC, Ao L, Li J, Zeng Q, Fullerton DA *et al.* Human myocardium releases heat shock protein 27 (HSP27) after global ischemia: The proinflammatory effect of extracellular HSP27 through toll-like receptor (TLR)-2 and TLR4. *Mol Med* 2014; 20: 280–289.

Jin WN, Shi SXY, Li Z, Li M, Wood K, Gonzales RJ *et al.* Depletion of microglia exacerbates postischemic inflammation and brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 2017; 37: 2224–2236.

Kammanadiminti SJ, Chadee K. Suppression of NF-κB Activation by *Entamoeba histolytica* in Intestinal Epithelial Cells Is Mediated by Heat Shock Protein 27. *J Biol Chem* 2006; 281: 26112–26120.

Kawabori M, Yenari MA. The role of the microglia in acute CNS injury. *Metab Brain Dis* 2015; 30: 381–392.

Kigerl KA, de Rivero Vaccari JP, Dietrich WD, Popovich PG, Keane RW. Pattern recognition receptors and central nervous system repair. *Exp Neurol* 2014; 258: 5–16.

Kim JY, Yenari MA. The immune modulating properties of the heat shock proteins after brain injury. *Anat Cell Biol* 2013; 46: 1.

Koizumi T, Taguchi K, Mizuta I, Toba H, Ohigashi M, Onishi O *et al.* Transiently proliferating perivascular microglia harbor M1 type and precede cerebrovascular changes in a chronic hypertension model. *J Neuroinflammation* 2019; 16: 79.

Lambertsen KL, Meldgaard M, Ladeby R, Finsen B. A quantitative study of microglial-macrophage synthesis of tumor necrosis factor during acute and late focal cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 2005; 25: 119–135.

Lana D, Ugolini F, Wenk GL, Giovannini MG, Zecchi-Orlandini S, Nosi D. Microglial distribution, branching, and clearance activity in aged rat hippocampus are affected by astrocyte meshwork integrity: evidence of a novel cell-cell interglial interaction. *FASEB J* 2019; 33: 4007–4020.

Lawrimore CJ, Crews FT. Ethanol, TLR3, and TLR4 Agonists Have Unique Innate Immune Responses in Neuron-Like SH-SY5Y and Microglia-Like BV2. *Alcohol Clin Exp Res* 2017; 41: 939–954.

Le W, Wu J, Tang Y. Protective microglia and their regulation in Parkinson's disease. *Front Mol Neurosci* 2016; 9. doi:10.3389/fnmol.2016.00089.

Leak RK, Zhang L, Stetler RA, Weng Z, Li P, Atkins GB *et al.* HSP27 Protects the Blood-Brain Barrier Against Ischemia-Induced Loss of Integrity. *CNS Neurol Disord - Drug Targets* 2013; 12: 325–337.

Lee YB, Nagai A, Kim SU. Cytokines, chemokines, and cytokine receptors in human microglia. *J Neurosci Res* 2002; 69: 94–103.

Lénárt N, Walter FR, Bocsik A, Sántha P, Tóth ME, Harazin A *et al.* Cultured cells of the blood-brain barrier from apolipoprotein B-100 transgenic mice: Effects of oxidized low-density lipoprotein treatment. *Fluids Barriers CNS* 2015; 12: 17.

Lian H, Roy E, Zheng H. Protocol for Primary Microglial Culture Preparation. *BIO-PROTOCOL* 2016; 6. doi:10.21769/bioprotoc.1989.

Liu L, An D, Xu J, Shao B, Li X, Shi J. Ac2-26 induces IKKβ degradation through chaperone-mediated autophagy via HSPB1 in NCM-treated microglia. *Front Mol Neurosci* 2018; 11. doi:10.3389/fnmol.2018.00076.

Lou N, Takano T, Pei Y, Xavier AL, Goldman SA, Nedergaard M. Purinergic receptor P2RY12-dependent microglial closure of the injured blood-brain barrier. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016; 113: 1074–1079.

Mambula SS, Calderwood SK. Heat induced release of Hsp70 from prostate carcinoma cells involves both active secretion and passive release from necrotic cells. *Int J Hyperth* 2006; 22: 575–585.

Man S, Ubogu EE, Ransohoff RM. Inflammatory cell migration into the central nervous system: A few new twists on an old tale. *Brain Pathol* 2007, pp 243–250.

Martinon F, Burns K, Tschopp J. The Inflammasome: A molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-β. *Mol Cell* 2002; 10: 417–426.

McClain JA, Morris SA, Deeny MA, Marshall SA, Hayes DM, Kiser ZM, Nixon K. Adolescent binge alcohol exposure induces long-lasting partial activation of microglia. *Brain Behav Immun* 2011; 25: S120-8.

Mehlen P, Kretz-Remy C, Préville X, Arrigo AP. Human hsp27, Drosophila hsp27 and human alphaB-crystallin expression-mediated increase in glutathione is essential for the protective activity of these proteins against TNFalpha-induced cell death. *EMBO J* 1996; 15: 2695–2706.

Miller DJ, Fort PE. Heat shock proteins regulatory role in neurodevelopment. *Front. Neurosci*. 2018; 12. doi:10.3389/fnins.2018.00821.

Minkiewicz J, de Rivero Vaccari JP, Keane RW. Human astrocytes express a novel NLRP2 inflammasome. *Glia* 2013; 61: 1113–1121.

Mosley K, Cuzner ML. Receptor-mediated phagocytosis of myelin by macrophages and microglia: Effect of opsonization and receptor blocking agents. *Neurochem Res* 1996; 21: 481–487.

Nafar F, Williams JB, Mearow KM. Astrocytes Release HspB1 in Response to Amyloid-β Exposure in vitro. *J Alzheimer's Dis* 2015; 49: 251–263.

Nagyőszi P, Nyúl-Tóth Á, Fazakas C, Wilhelm I, Kozma M, Molnár J *et al.* Regulation of NOD-like receptors and inflammasome activation in cerebral endothelial cells. *J Neurochem* 2015; 135: 551–564.

Nefedova V V., Sudnitsyna M V., Gusev NB. Interaction of small heat shock proteins with light component of neurofilaments (NFL). *Cell Stress Chaperones* 2017; 22: 467–479.

Nishikawa M, Takemoto S, Takakura Y. Heat shock protein derivatives for delivery of antigens to antigen presenting cells. *Int J Pharm* 2008; 354: 23–27.

Ouali Alami N, Schurr C, Olde Heuvel F, Tang L, Li Q, Tasdogan A *et al.* NF-κB activation in astrocytes drives a stage-specific beneficial neuroimmunological response in ALS. *EMBO J* 2018; 37. doi:10.15252/embj.201798697.

Pacifici M, Peruzzi F. Isolation and culture of rat embryonic neural cells: A quick protocol. *J Vis Exp* 2012: e3965.

Panjwani NN, Popova L, Srivastava PK. Heat Shock Proteins gp96 and hsp70 Activate the Release of Nitric Oxide by APCs. *J Immunol* 2002; 168: 2997–3003.

Parcellier A, Schmitt E, Gurbuxani S, Seigneurin-Berny D, Pance A, Chantôme A *et al.* HSP27 Is a Ubiquitin-Binding Protein Involved in I-κBα Proteasomal Degradation. *Mol Cell Biol* 2003; 23: 5790–5802.

Patel S. Danger-Associated Molecular Patterns (DAMPs): the Derivatives and Triggers of Inflammation. *Curr Allergy Asthma Rep* 2018; 18. doi:10.1007/s11882-018-0817-3.

Penke B, Bogár F, Crul T, Sántha M, Tóth ME, Vígh L. Heat shock proteins and autophagy pathways in neuroprotection: From molecular bases to pharmacological interventions. *Int J Mol Sci* 2018; 19. doi:10.3390/ijms19010325.

Prösch S, Staak K, Stein J, Liebenthal C, Stamminger T, Volk HD *et al.* Stimulation of the human cytomegalovirus IE enhancer/promoter in HL-60 cells by TNFα is mediated via induction of NF-κB. *Virology* 1995; 208: 197–206.

Qi Z, Shen L, Zhou H, Jiang Y, Lan L, Luo L *et al.* Phosphorylation of heat shock protein 27 antagonizes TNF-α induced HeLa cell apoptosis via regulating TAK1 ubiquitination and activation of p38 and ERK signaling. *Cell Signal* 2014; 26: 1616–1625.

Qin L, He J, Hanes RN, Pluzarev O, Hong JS, Crews FT. Increased systemic and brain cytokine production and neuroinflammation by endotoxin following ethanol treatment. *J Neuroinflammation* 2008; 5: 10.

Quintana FJ, Cohen IR. Heat Shock Proteins as Endogenous Adjuvants in Sterile and Septic Inflammation. *J Immunol* 2005; 175: 2777–2782.

Radi E, Formichi P, Battisti C, Federico A. Apoptosis and oxidative stress in neurodegenerative diseases. In: *Journal of Alzheimer's Disease* IOS Press, 2014, pp S125–S152.

Raivich G, Bohatschek M, Kloss CUA, Werner A, Jones LL, Kreutzberg GW. Neuroglial activation repertoire in the injured brain: Graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function. *Brain Res Rev* 1999; 30: 77–105.

Rath PC, Aggarwal BB. TNF-induced signaling in apoptosis. *J. Clin. Immunol* 1999; 19: 350–364.

Rayner K, Chen Y-X, McNulty M, Simard T, Zhao X, Wells DJ *et al.* Extracellular Release of the Atheroprotective Heat Shock Protein 27 Is Mediated by Estrogen and Competitively Inhibits acLDL Binding to Scavenger Receptor-A. *Circ Res* 2008; 103: 133–141.

Renkawek K, Bosman GICGM, de Jong WW. Expression of small heat-shock protein hsp 27 in reactive gliosis in Alzheimer disease and other types of dementia. *Acta Neuropathol* 1994; 87: 511–519.

Rioux DA, Murphy K, Esser MJ, Currie RW. Neurodegenerative Diseases, Sex Differences and the 27 kDa Heat Shock Protein in the Nervous System. In: *The Big Book on Small Heat Shock Proteins*. Springer, Cham, 2015, pp 335–363.

Rothwell NJ, Luheshi G, Toulmond S. Cytokines and their receptors in the central nervous system: Physiology, pharmacology, and pathology. *Pharmacol Ther* 1996; 69: 85–95.

Saito K, Dai Y, Ohtsuka K. Enhanced expression of heat shock proteins in gradually dying cells and their release from necrotically dead cells. *Exp Cell Res* 2005; 310: 229–236.

Saito M, Chakraborty G, Hui M, Masiello K, Saito M. Ethanol-induced neurodegeneration and Glial activation in the developing Brain. *Brain Sci* 2016; 6. doi:10.3390/brainsci6030031.

Salari S, Seibert T, Chen YX, Hu T, Shi C, Zhao X *et al.* Extracellular HSP27 acts as a signaling molecule to activate NF-κB in macrophages. *Cell Stress Chaperones* 2013; 18: 53–63.

Satoh JI, Kim SU. Differential expression of heat shock protein HSP27 in human neurons and glial cells in culture. *J Neurosci Res* 1995; 41: 805–818.

Schwab ME. Nogo and axon regeneration. *Curr Opin Neurobiol* 2004; 14: 118–124.

Schwarz L, Vollmer G, Richter-Landsberg C. The Small Heat Shock Protein HSP25/27 (HspB1) Is Abundant in Cultured Astrocytes and Associated with Astrocytic Pathology in Progressive Supranuclear Palsy and Corticobasal Degeneration. *Int J Cell Biol* 2010; 717520: 10.

Sharp FR, Zhan X, Liu DZ. Heat Shock Proteins in the Brain: Role of Hsp70, Hsp 27, and HO-1 (Hsp32) and Their Therapeutic Potential. *Transl Stroke Res* 2013; 4: 685–692.

Shi Y, Jiang X, Zhang L, Pu H, Hu X, Zhang W *et al.* Endothelium-targeted overexpression of heat shock protein 27 ameliorates blood-brain barrier disruption after ischemic brain injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2017; 114: E1243–E1252.

Shijo M, Hamasaki H, Honda H, Suzuki S, Tachibana M, Ago T *et al.* Upregulation of Annexin A1 in Reactive Astrocytes and Its Subtle Induction in Microglia at the Boundaries of Human Brain Infarcts. *J Neuropathol Exp Neurol* 2019; 78. doi:10.1093/JNEN/NLZ079.

Shimada Y, Shimura H, Tanaka R, Yamashiro K, Koike M, Uchiyama Y *et al.* Phosphorylated recombinant HSP27 protects the brain and attenuates blood-brain barrier disruption following stroke in mice receiving intravenous tissue-plasminogen activator. *PLoS One* 2018; 13: e0198039.

Signorini-Allibe N, Gonthier B, Lamarche F, Eysseric H, Barret L. Chronic Consumption of Ethanol Leads to Substantial Cell Damage in Cultured Rat Astrocytes in Conditions Promoting Acetaldehyde Accumulation. *Alcohol Alcohol* 2005; 40: 163–171.

Singh IS, He J-R, Calderwood S, Hasday JD. A High Affinity HSF-1 Binding Site in the 5′-Untranslated Region of the Murine Tumor Necrosis Factor-α Gene Is a Transcriptional Repressor. *J Biol Chem* 2002; 277: 4981–4988.

Sochocka M, Diniz BS, Leszek J. Inflammatory Response in the CNS: Friend or Foe? *Mol Neurobiol* 2017; 54: 8071–8089.

Sofroniew MV, Vinters H V. Astrocytes: Biology and pathology. *Acta Neuropathol* 2010; 119: 7–35.

Song C, Zhang Y, Dong Y. Acute and subacute IL-1β administrations differentially modulate neuroimmune and neurotrophic systems: Possible implications for neuroprotection and neurodegeneration. *J Neuroinflammation* 2013; 10: 59.

Stetler RA, Gao Y, Signore AP, Cao G, Chen J. HSP27: mechanisms of cellular protection against neuronal injury. *Curr Mol Med* 2009; 9: 863–72.

Svensson RU, Barnes JM, Rokhlin OW, Cohen MB, Henry MD. Chemotherapeutic agents up-regulate the cytomegalovirus promoter: Implications for bioluminescence imaging of tumor response to therapy. *Cancer Res* 2007; 67: 10445–10454.

Swaroop S, Sengupta N, Suryawanshi AR, Adlakha YK, Basu A. HSP60 plays a regulatory role in IL-1β-induced microglial inflammation via TLR4-p38 MAPK axis. *J Neuroinflammation* 2016; 13: 27.

Szalay G, Martinecz B, Lénárt N, Környei Z, Orsolits B, Judák L *et al.* Microglia protect against brain injury and their selective elimination dysregulates neuronal network activity after stroke. *Nat Commun* 2016; 7: 1–13.

Tada M, Diserens AC, Desbaillets I, De Tribolet N. Analysis of cytokine receptor messenger RNA expression in human glioblastoma cells and normal astrocytes by reverse-transcription polymerase chain reaction. *J Neurosurg* 1994; 80: 1063–1073.

Takayama S, Reed JC, Homma S. Heat-shock proteins as regulators of apoptosis. *Oncogene* 2003; 22: 9041–9047.

Takii R, Inouye S, Fujimoto M, Nakamura T, Shinkawa T, Prakasam R *et al.* Heat Shock Transcription Factor 1 Inhibits Expression of IL-6 through Activating Transcription Factor 3. *J Immunol* 2010; 184: 1041–1048.

Talley AK, Dewhurst S, Perry SW, Dollard SC, Gummuluru S, Fine SM *et al.* Tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis in human neuronal cells: protection by the antioxidant N-acetylcysteine and the genes bcl-2 and crmA. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 2359–2366.

Tanabe K, Matsushima-Nishiwaki R, Dohi S, Kozawa O. Phosphorylation status of heat shock protein 27 regulates the interleukin-1β-induced interleukin-6 synthesis in C6 glioma cells. *Neuroscience* 2010; 170: 1028–1034.

Tang D, Kang R, Coyne CB, Zeh HJ, Lotze MT. PAMPs and DAMPs: Signal 0s that spur autophagy and immunity. *Immunol Rev* 2012; 249: 158–175.

Tóth ME, Gonda S, Vigh L, Sántha M. Neuroprotective effect of small heat shock protein, Hsp27, after acute and chronic alcohol administration. *Cell Stress Chaperones* 2010; 15: 807–817.

Tóth ME, Szegedi V, Varga E, Juhász G, Horváth J, Borbély E *et al.* Overexpression of Hsp27 ameliorates symptoms of Alzheimer's disease in APP/PS1 mice. *Cell Stress Chaperones* 2013; 18: 759–771.

Tsuji S, Di Martino E, Mukai T, Tsuji S, Murakami T, Harris RA *et al.* Aggravated brain injury after neonatal hypoxic ischemia in microglia-depleted mice. *J Neuroinflammation* 2020; 17: 111.

Van Der Weerd L, Tariq Akbar M, Aron Badin R, Valentim LM, Thomas DL, Wells DJ *et al.* Overexpression of heat shock protein 27 reduces cortical damage after cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 2010; 30: 849–856.

Van Noort JM. Stress proteins in CNS inflammation. *J Pathol* 2008; 214 (2): 267–275.

Van Noort JM, Bsibsi M, Nacken P, Gerritsen WH, Amor S. The link between small heat shock proteins and the immune system. *Int J Biochem Cell Biol* 2012; 44: 1670–1679.

Vega VL, Rodriguez-Silva M, Frey T, Gehrmann M, Diaz JC, Steinem C *et al.* Hsp70 Translocates into the Plasma Membrane after Stress and Is Released into the Extracellular Environment in a Membrane-Associated Form that Activates Macrophages. *J Immunol* 2008; 180: 4299–4307.

Venugopal A, Sundaramoorthy K, Vellingiri B. Therapeutic potential of Hsp27 in neurological diseases. *Egypt J Med Hum Genet* 2019; 20: 1–8.

Verderio C, Matteoli M. ATP Mediates Calcium Signaling Between Astrocytes and Microglial Cells: Modulation by IFN-γ. *J Immunol* 2001; 166: 6383–6391.

Villapol S, Acarin L, Faiz M, Castellano B, Gonzalez B. Survivin and heat shock protein 25/27 colocalize with cleaved caspase-3 in surviving reactive astrocytes following excitotoxicity to the immature brain. *Neuroscience* 2008; 153: 108–119.

Wagstaff MJD, Collaço-Moraes Y, Smith J, De Belleroche JS, Coffin RS, Latchman DS. Protection of neuronal cells from apoptosis by Hsp27 delivered with a herpes simplex virus-based vector. *J Biol Chem* 1999; 274: 5061–5069.

Walker DG, Kim SU, McGeer PL. Complement and cytokine gene expression in cultured microglia derived from postmortem human brains. *J Neurosci Res* 1995; 40: 478–493.

Walter TJ, Crews FT. Microglial depletion alters the brain neuroimmune response to acute binge ethanol withdrawal. *J Neuroinflammation* 2017; 14. doi:10.1186/s12974-017-0856-z.

Welser-Alves JV, Milner R. Microglia are the major source of TNF-α and TGF-β1 in postnatal glial cultures; Regulation by cytokines, lipopolysaccharide, and vitronectin. *Neurochem Int* 2013; 63: 47–53.

Wilhelmus M, Otte-Höller I, Wesseling P, de Waal RMW, Boelens WC, Verbeek MM. Specific association of small heat shock proteins with the pathological hallmarks of Alzheimer's disease brains. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2006; 32: 119–130.

Williams KL, Rahimtula M, Mearow KM. Hsp27 and axonal growth in adult sensory neurons in vitro. *BMC Neurosci* 2005; 6: 24.

Wyttenbach A, Sauvageot O, Carmichael J, Diaz-Latoud C, Arrigo A-P, Rubinsztein DC. Heat shock protein 27 prevents cellular polyglutamine toxicity and suppresses the increase of reactive oxygen species caused by huntingtin. *Hum Mol Genet* 2002; 11: 1137–1151.

Yang JY, Xue X, Tian H, Wang XX, Dong YX, Wang F *et al.* Role of microglia in ethanol-induced neurodegenerative disease: Pathological and behavioral dysfunction at different developmental stages. *Pharmacol. Ther* 2014; 144: 321–337.

Yenari MA, Xu L, Tang XN, Qiao Y, Giffard RG. Microglia potentiate damage to blood-brain barrier constituents: improvement by minocycline in vivo and in vitro. *Stroke* 2006; 37: 1087–93.

Yusuf N, Nasti TH, Huang C-M, Huber BS, Jaleel T, Lin H-Y *et al.* Heat Shock Proteins HSP27 and HSP70 Are Present in the Skin and Are Important Mediators of Allergic Contact Hypersensitivity. *J Immunol* 2009; 182: 675–683.

Zhai J, Lin H, Julien J-P, Schlaepfer WW. Disruption of neurofilament network with aggregation of light neurofilament protein: a common pathway leading to motor neuron degeneration due to Charcot-Marie-Tooth disease-linked mutations in NFL and HSPB1. *Hum Mol Genet* 2007; 16: 3103–16.

Zhao YN, Wang F, Fan YX, Ping GF, Yang JY, Wu CF. Activated microglia are implicated in cognitive deficits, neuronal death, and successful recovery following intermittent ethanol exposure. *Behav Brain Res* 2013; 236: 270–282.

Zheng Z, Kim JY, Ma H, Lee JE, Yenari MA. Anti-Inflammatory Effects of the 70 kDa Heat Shock Protein in Experimental Stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 2008; 28: 53–63.

Zhou Z bin, Huang G xiang, Lu J jia, Ma J, Yuan Q jun, Cao Y *et al.* Up-regulation of heat shock protein 27 inhibits apoptosis in lumbosacral nerve root avulsion-induced neurons. *Sci Rep* 2019; 9: 1–10.

Zininga T, Ramatsui L, Shonhai A. Heat Shock Proteins as Immunomodulants. *Molecules* 2018; 23. doi:10.3390/molecules23112846.

Összefoglaló

A hősokkfehérje B1 (HSPB1) az evolúciósan konzervált kismólsúlyú hősokkfehérjék családjának egyik legismertebb és legsokoldalúbb tagja, amely fontos szerepet tölt be a normál fehérje homeosztázis fenntartásában. Az agyban a HSPB1 konstitutívan expresszálódik és számos szakirodalmi adat támasztja alá neuroprotektív szerepét a különböző központi idegrendszert ért károsító folyamatokkal szemben. A neuroinflammáció, azaz a központi idegrendszer gyulladásos folyamata kulcsfontosságú szerepet játszik a legtöbb agyat érintő akut és krónikus megbetegedés patofiziológiájában. A HSPB1 jól ismert chaperon funkciója mellett számos olyan folyamatban vesz részt, amelyek szoros összefüggésben állnak a gyulladással. Korábbi eredmények szerint a HSPB1 a gyulladásos folyamatok több komponensével is képes kölcsönhatásba lépni, és például a gyulladáskeltő vagy gyulladáscsökkentő citokinek felszabadulásának modulálása révén szabályozni azt. Bár számos tanulmány igazolja a HSPB1 immunregulációs szerepét, arról, hogy milyen szerepet tölt be a központi idegrendszeri gyulladásban azonban kevés adat áll rendelkezésünkre.

Jelen dolgozatban ezért célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk a HSPB1 neuroinflammatórikus folyamatokra gyakorolt hatását akut agykárosodást követően a humán HSPB1 túltermelő transzgenikus egértörzsünkben, valamint a transzgenikus egérmodell agyából izolált primer sejttenyészeteken is.

Korai posztnatális etanol-expozíciós modellünkben a gyulladásos folyamatok már 7 órával etanol kezelést követően megkezdődtek, mivel a *Tnf* expressziója szignifikáns növekedést mutatott, amelynek szintje magasabb volt a hHSPB1 túltermelő egerekben, mint vad típusú alomtársaikban. A legerősebb gyulladásos választ azonban 24 órával etanol kezelés után észleltük, amikor intenzív gyulladás és sejtpusztulás volt megfigyelhető az állatok agyában. A gyulladáskeltő citokinek (*Tnf, Il1b*), valamint bizonyos mikroglia (*Cd68, Arg1*) és asztrocita (*Gfap*) markerek expressziós szintje szintén nagymértékben megemelkedett és szignifikánsan magasabb volt a transzgenikus csoportban, mint a vad típusú állatokban. Ezen kívül a hHSPB1 túltermelő állatok agyában szignifikánsan nagyobb volt a mikroglia lefedettség a frontális kéregben, a talamuszban és a striátumban, amely egy fokozottabb mikroglia választ feltételez. Ezt támasztják alá az M1 (*Cd68*) és M2 (*Arg1*) mikroglia markerek expressziós változásai is, ugyanis etanol kezelésre adott válaszként a hHSPB1 túltermelés mindkét mikroglia fenotípus jelenlétét fokozta. Azonban a gyulladáskeltő citokinek rendkívül magas expressziója mégis arra

utal, hogy a gyulladást elősegítő mikroglia van túlsúlyban a hHSPB1 transzgenikus állatok agyában egy nappal etanol kezelést követően. Fontos azonban kiemelni, hogy a hHSPB1 transzgenikus egerek agyában megfigyelt fokozottabb gyulladásos válasz nem okozott nagyobb mértékű sejtpusztulást. Az etanol kezelés után egy héttel megkezdődött a gyulladásos folyamatok csillapodása, mivel a gyulladáskeltő citokinek szintje, valamint a mikroglia és az asztrocita markerek expressziója mindkét genotípusban a kontroll csoporthoz hasonló szintre csökkent vissza. A mikroglia sejtek szintén a nyugalmi állapotukra jellemző morfológiát mutattak. Ezzel szemben az asztrociták etanol által kiváltott morfológiai változásai ebben az időpontban voltak kimutathatóak, mivel a GFAP-pozitív fibrillumok kialakulásához több idő kell. Az asztrocita aktiváció a mikrogliához hasonlóan nagyobb mértékű volt a hHSPB1 túltermelő állatok agyában, ugyanis a parietális kéregben és a striátumban szignifikánsan magasabb asztrocita-lefedettséget figyeltünk meg vad típusú alomtársaikhoz képest.

In vitro kísérleteink azt mutatták, hogy a hHSPB1 felszabadulása a primer sejtkultúrákból még kezelés után is elenyésző mértékű volt. Ez alapján azt feltételezzük, hogy az általunk használt modellben elsősorban a hHSPB1 intracelluláris formája felelős a megfigyelt gyulladásszabályozó hatásokért. Az agy sejtjei közül az asztrociták és a neuronok bizonyultak az elsődleges hHSPB1 expresszáló sejteknek, míg a TNFα fő forrásai a mikroglia sejtek voltak. Citokin kezelést követően a mikroglia tenyészetek közül csak a hHSPB1 transzgenikus egerekből származó sejtek TNFα termelése nőtt meg szignifikáns mértékben, míg asztrociták esetén éppen ellenkezőleg, a vad típusú sejtek TNFα termelését indukálta a gyulladásos környezet, és a transzgenikus sejtekre nem volt hatással. Ez arra enged következtetni, hogy a hHSPB1 túltermelés modulálhatja a TNFα felszabadulást, mivel primer mikroglia és asztrocita sejtek esetében is szignifikáns különbség alakult ki citokin kezelés után a két genotípus között. Szakirodalmi adatok alapján arra lehet következtetni, hogy a primer asztrocitákban a magas intracelluláris hHSPB1 szint közvetlenül befolyásolja a TNFα felszabadítást, míg a primer mikroglia sejtek esetén egy közvetett hatásról lehet szó. A hHSPB1-ről korábban kimutatták, hogy több, a gyulladásos folyamatokban szerepet játszó jelátviteli útra hatással van, ezért feltételezhető, hogy a transzgenikus primer mikroglia kultúrákban maradt asztrocita sejtek erőteljes hHSPB1 expressziója befolyásolja az asztrocita és a mikroglia sejtek közötti kommunikációt, amely eredményezhet egy fokozottabb mikroglia aktivációt.

Eredményeink alapján elmondható, hogy a korai posztnatális korban lévő egerek agyában az egyszeri akut etanol kezelés intenzív gyulladásos folyamatokat indukált, és a hHSPB1 túltermelés gyulladásszabályozó hatást mutatott etanol kezelést követően. Korábbi szakirodalmi adatok és saját tanulmányaink alapján azt feltételeztük, hogy a hHSPB1 túltermelő egerekben egy védő hatás lesz kimutatható, amely mérsékeli az etanol károsító hatását, azonban a gyulladáskeltő citokinek erőteljesebb expressziója és a gliasejtek fokozottabb aktivációja egy intezívebb gyulladásra utal a transzgenikus egerek agyában. A jelen dolgozatban bemutatott eredmények alapján a hHSPB1 túltermelés egy összetett moduláló hatást fejt ki, ugyanis a transzgenikus egerekben leírt szignifikánsan nagyobb mértékű gyulladás nem járt fokozott idegsejtkárosodással, amely azt feltételezi, hogy a gyulladáskeltő citokinek káros hatását a hHSPB1 képes ellensúlyozni. Emellett korábbi tanulmányok alapján a gyulladáskeltő citokinek expressziója nemcsak káros hatásokat indukálhat az agyban, hanem hozzájárul a regenerációs folyamatokhoz is. Az M2 mikroglia marker fokozottabb expressziója a transzgenikus állatokban szintén arra utal, hogy a hHSPB1 kedvező gyulladásgátló folyamatokat is indukál. Mindezek mellett kifejezetten fontos, hogy egy héttel etanol kezelést követően a vad típusú, valamint a hHSPB1 túltermelő állatokban egyaránt lecsökkent a gyulladás mértéke, ami arra utal, hogy a hHSPB1 túltermelés a gyulladás akut fázisát erősíti fel és nem fordítja át krónikus jellegűvé. A dolgozatban bemutatott eredményeknek segíthetnek megérteni a hHSPB1 potenciális szabályozó szerepét a központi idegrendszeri gyulladásban.

Summary

Heat-shock protein B1 (HSPB1) is one of the most studied and most versatile members of the evolutionarily conserved small heat-shock protein family that play an important role in maintaining normal protein homeostasis. HSPB1 is constitutively expressed in the brain, and numerous studies support its neuroprotective role against various diseases in the central nervous system. Neuroinflammation, the inflammatory process of the central nervous system, plays a key role in the pathophysiology of most acute and chronic neurological disorders. In addition to its well-known chaperone function, HSPB1 is involved in several processes that are closely related to inflammation. Previous results have shown that HSPB1 can interact with several components of inflammatory pathways and, for example, by modulating the release of pro-inflammatory or anti-inflammatory cytokines it has an inflammation regulating role. Although several studies confirm the immunomodulatory effect of HSPB1, its role in neuroinflammation is poorly understood.

Therefore, we aimed to investigate the effect of HSPB1 on neuroinflammatory processes following acute brain injury in the human HSPB1-overexpressing transgenic mouse strain, as well as in primary cell cultures isolated from the brain of the transgenic mouse model.

In our model of early postnatal ethanol exposure, inflammatory processes began as early as 7 hours after ethanol treatment since the expression of *Tnf* showed a significant increase, the level of which was higher in hHSPB1-overexpressing mice than in their wild-type littermates. However, the greatest inflammatory response was observed 24 hours after ethanol treatment, at which point an intense inflammation and cell death could be detected in the brains of the wild-type and transgenic animals. Expression levels of pro-inflammatory cytokines (*Tnf*, *Il1b*) as well as certain microglia (*Cd68*, *Arg1*) and astrocyte (*Gfap*) markers were greatly elevated and were significantly higher in the transgenic group compared to the wild-type animals. In addition, in the brains of hHSPB1-overexpressing animals, there was a significantly greater microglial coverage in the frontal cortex, thalamus, and striatum, suggesting an enhanced microglial response. This is also supported by the expression changes of the M1 (*Cd68*) and M2 (*Arg1*) microglial markers, since in response to ethanol treatment the overexpression of hHSPB1 increased the presence of both microglial phenotypes. However, the remarkably high expression of pro-inflammatory cytokines suggests that pro-inflammatory microglia predominated in hHSPB1-overexpressing animals one day after ethanol treatment. It is important to note that the

enhanced inflammatory response observed in the brains of hHSPB1-overexpressing mice did not result in greater cell death. One week after ethanol treatment, the resolution of the inflammatory processes began as the levels of pro-inflammatory cytokines and the expression of microglia and astrocyte markers returned to a level similar to controls in both genotypes. Microglia cells also showed resting state-like morphology. In contrast, ethanol-induced morphological changes in astrocytes were detectable at this time point because more time is necessary for the formation of GFAP-positive filaments. Astrocyte activation, like microglia, was enhanced in the brains of hHSPB1-overexpressing animals, as significantly greater astrocyte coverage was observed in the parietal cortex and striatum compared to their wild-type littermates.

Our *in vitro* experiments showed that the release of hHSPB1 from primary cell cultures was negligible even after treatment. Based on this, we hypothesize that in our model, the intracellular form of hHSPB1 was responsible for the observed inflammation-regulating effects. Of the brain cells, astrocytes and neurons proved to be the primary hHSPB1-expressing cell types, while the microglia cells were the main sources of TNFα. Following cytokine treatment, TNFα production was significantly increased only in microglia cultures derived from hHSPB1 transgenic mice, whereas in astrocytes, TNFα production was induced in wild-type cells and remained unaffected in transgenic ones. This suggests that hHSPB1 overexpression may modulate the release of TNFα, as there was a significant difference between the two genotypes after cytokine treatment in both primary microglia and astrocyte cultures. Based on literature data, we assume that high intracellular hHSPB1 levels in primary astrocytes can influence their TNFα release directly, whereas the differences between the wild-type and transgenic microglia cultures could be the result of a potential indirect effect of hHSPB1. hHSPB1 has previously been shown to affect several signaling pathways involved in inflammatory processes, so it is hypothesized that the elevated intracellular level of hHSPB1 in astrocytes remaining in the transgenic primary microglia cultures may affect the astrocyte-microglia communication, resulting in enhanced microglial activation.

These results indicate that a single ethanol treatment induces intense inflammation in the brains of early postnatal mice and provide evidence that hHSPB1 overexpression has an inflammation-regulating effect after ethanol treatment. Based on our previous studies, we hypothesized that a protective effect will be seen in hHSPB1-overexpressing mice mitigating

the damaging effects of ethanol. In contrast, we detected a stronger expression of pro-inflammatory cytokines and increased activation of glial cells, which indicates a more intense inflammation in the brain of the transgenic animals. However, based on the results presented here, hHSPB1 overexpression exerts a complex modulating effect, as the significantly higher level of inflammation described in the transgenic mice was not associated with increased neuronal damage, suggesting that hHSPB1 can counteract the deleterious effects of inflammatory cytokines. In addition, previous studies show that the expression of inflammatory cytokines may not only induce adverse effects in the brain but also contribute to regenerative processes. Increased expression of the M2 microglial marker in transgenic animals also assumes that hHSPB1 induces beneficial anti-inflammatory processes as well. In addition, it is particularly important that one week after ethanol treatment, both wild-type and hHSPB1-overexpressing animals showed the resolution of inflammation, indicating that hHSPB1 overexpression amplifies the acute phase of inflammation and does not turn it into one of a chronic nature. The data presented in this study could help to understand the potential regulatory role of hHSPB1 in neuroinflammation.

Publikációs lista

MTMT azonosító: 10055841

A disszertáció alapjául szolgáló közlemények:

1. **Brigitta Dukay**, Fruzsina R. Walter, Judit P. Vigh, Beáta Barabási, Petra Hajdu, Tamás Balassa, Ede Migh, András Kincses, Zsófia Hoyk, Titanilla Szögi, Emőke Borbély, Bálint Csoboz, Péter Horváth, Lívia Fülöp, Botond Penke, László Vígh, Mária A. Deli, Miklós Sántha* and Melinda E. Tóth*. (2021) Neuroinflammatory processes are augmented in mice overexpressing human heat-shock protein B1 following ethanol-induced brain injury. *Journal of Neuroinflammation* 18, 22. https://doi.org/10.1186/s12974-020-02070-2
   $IF_{2019/20}$: 5.793

2. **Brigitta Dukay***, Bálint Csoboz*, Melinda E Tóth. (2019) Heat Shock Proteins in Neuroinflammation. *Frontiers in Pharmacology* 10:920. DOI: 10.3389/fphar.2019.00920.
   IF_{2019}: 4.225

* a szerzők azonos mértékben járultak hozzá a publikációhoz

Egyéb közlemények:

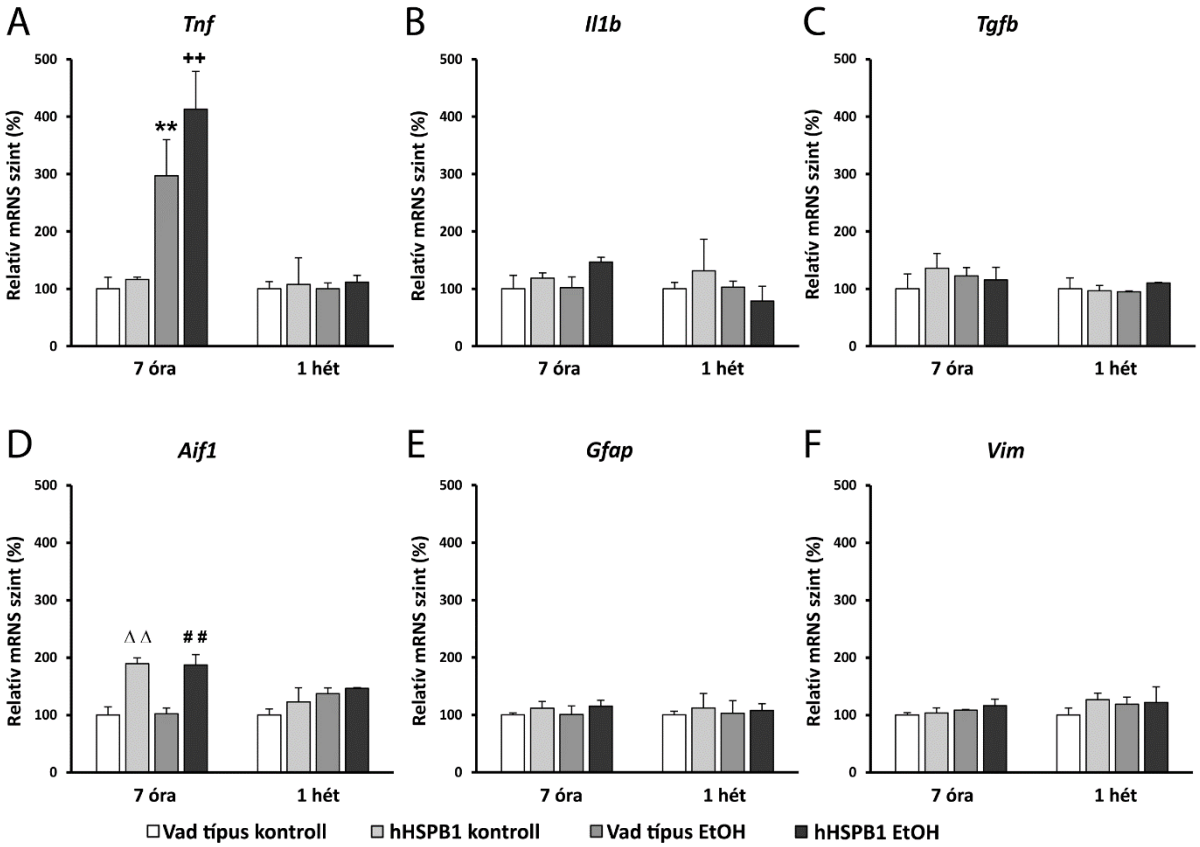
1. Melinda E Tóth, **Brigitta Dukay**, Zsófia Hoyk, Miklós Sántha. (2020) Cerebrovascular Changes and Neurodegeneration Related to Hyperlipidemia: Characteristics of the Human ApoB-100 Transgenic Mice. *Current Pharmaceutical Design* 26(13):1486-1494. DOI: 10.2174/1381612826666200218101818.
   $IF_{2019/20}$: 2.208

2. Zsófia Hoyk, Melinda E Tóth, Nikolett Lénárt, Dóra Nagy, **Brigitta Dukay**, Alexandra Csefova, Ágnes Zvara, György Seprényi, András Kincses, Fruzsina R Walter, Szilvia Veszelka, Judit Vígh, Beáta Barabási, András Harazin, Agnes Kittel, László G Puskás, Botond Penke, László Vígh, Maria A Deli, Miklos Santha. (2018) Cerebrovascular pathology in hypertriglyceridemic APOB-100 transgenic mice. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2018; 12: 380. DOI: [10.3389/fncel.2018.00380]
   IF_{2018}: 3.900

3. Melinda E. Tóth*, **Brigitta Dukay***, Mária Péter, Gábor Balogh, Gergő Szűcs, Ágnes Zvara, Gábor J. Szebeni, Petra Hajdu, Márta Sárközy, László G. Puskás, Zsolt Török, Tamás Csont, László Vígh and Miklós Sántha. Male and female animals respond differently to high-fat diet and regular exercise training in a mouse model of hyperlipidemia. *Közlésre benyújtva.*

* a szerzők azonos mértékben járultak hozzá a publikációhoz

Függelék



F1. ábra A hHSPB1 túltermelés hatása a citokinek és gliasejt markerek expressziós szintjére. RT-PCR segítségével megvizsgáltuk a **A)** *Tnf*, **B)** *Il1b*, **C)** *Tgfb*, **D)** *Aif1*, **E)** *Gfap*, és az **F)** *Vim* relatív mRNS szintjét az agyszövetben 7 órával/1 héttel etanol kezelést követően. Vad típus kontroll=100%. Átlag±SEM; n=3. Jelölések: * vad típus EtOH vs vad típus kontroll; + hHSPB1 EtOH vs hHSPB1 kontroll; # hHSPB1 EtOH vs vad típus EtOH; Δ hHSPB1 kontroll vs vad típus kontroll. Statisztikai próba: kétutas ANOVA Tukey post-hoc teszttel. **/++/##/ ΔΔ $p<0,01$.

F1. táblázat: A Western-blot analízis és az immunhisztokémiai vizsgálatok során használt ellenanyagok listája. Rövidítés: A: Alexa Fluor

Ellenanyag neve	Gyártó	Katalógusszám	Gazda	Koncentráció	Regisztrációs ID
Western Blot analíziss					
anti-hHSPB1	Stressgen	SPA-803	nyúl	2 µg/ml	AB_2120611
anti-aktin	Sigma	A2103	nyúl	0.25 µg/ml	AB_476694
torma-peroxidáz-konjugált anti-nyúl	Jackson ImmunoResearch	111-035-003	kecske	0.02 µg/ml	AB_2313567
Fluoreszcens immunohisztokémia - Agymetszeteken					
anti-IBA1	Abcam	ab5076	kecske	0.5 µg/ml	AB_2224402
anti-GFAP	Sigma	G3893	egér	36.5 µg/ml	AB_477010
anti-NEUN	Millipore	MAB377	egér	20 µg/ml	AB_2298772
anti-hHSPB1	Enzo Life Sciences	ADI-SPA-803	nyúl	20 µg/ml	AB_10615084
A488 anti-kecske	Jackson ImmunoResearch	305-545-003	nyúl	5 µg/ml	AB_2339532
FITC anti-egér	Sigma	F5387	kecske	3.7 µg/ml	AB_259647
A647 anti-nyúl	Thermo Fisher Scientific	A21244	kecske	6.7 µg/ml	AB_2535812
Peroxidázos immunohisztokémia					
anti-hHSPB1	Enzo Life Sciences	ADI-SPA-803	nyúl	1.6 µg/ml	AB_10615084
anti-GFAP	Sigma	G3893	egér	18.25 µg/ml	AB_477010
anti-IBA1	Abcam	ab5076	kecske	0.5 µg/ml	AB_2224402
torma-peroxidáz-konjugált anti-nyúl	Jackson ImmunoResearch	111-035-003	kecske	0.4 µg/ml	AB_2313567
peroxidázzal-konjugált anti-egér	Chemicon	AP160P	nyúl	1:2000	AB_92531
biotinilált anti-kecske	Jackson ImmunoResearch	705-065-147	szamár	1.3 µg/ml	AB_2340397
Fluoreszcens immunohisztokémia – Sejtkultúrák tisztasága					
anti-MAP2	Abcam	ab92434	csirke	0.25 µg/ml	AB_2138147
anti-GFAP	Sigma	G3893	egér	12.17 µg/ml	AB_477010
anti-IBA1	Abcam	ab5076	kecske	0.5 µg/ml	AB_2224402
A594 anti-csirke	Jackson ImmunoResearch	703-585-155	szamár	5 µg/ml	AB_2340377
A488 anti-egér	Invitrogen, Life Technologies	A21202	szamár	6.7 µg/ml	AB_141607
A488 anti-kecske	Invitrogen	A11055	szamár	2 µg/ml	AB_2534102
Dylight 549 anti-egér	Jackson ImmunoResearch	115-505-003	kecske	0.94 µg/ml	-
Fluoreszcens immunohisztokémia – Sejtkultúrák					
anti-MAP2	Abcam	ab92434	csirke	0.25 µg/ml	AB_2138147
anti-hHSPB1	Enzo Life Sciences	ADI-SPA-803	nyúl	2.5 µg/ml	AB_10615084
anti-IBA-1	Abcam	ab5076	kecske	0.5 µg/ml	AB_2224402
anti-GFAP	Sigma	G3893	egér	3.65 µg/ml	AB_477010
A594 anti-csirke	Jackson ImmunoResearch	703-585-155	szamár	5 µg/ml	AB_2340377
A488 anti-nyúl	Thermo Fisher Scientific	A11034	kecske	3.4 µg/ml	AB_2576217
A488 anti-kecske	Invitrogen	A11055	szamár	2 µg/ml	AB_2534102
Cy3 anti-nyúl	Sigma	C2306	birka	2.5 µg/ml	AB_258792
Dylight 488 anti-nyúl	Jackson ImmunoResearch	111-485-003	kecske	0.94 µg/ml	-
Dylight 549 anti-egér	Jackson ImmunoResearch	115-505-003	kecske	0.94 µg/ml	-

F2. táblázat: A RT-PCR kísérlethez használt primerek

	gén	forward primer	reverz primer
1	***Gapdh***	GGG TTC CTA TAA ATA CGG ACT GC	CCA TTT TGT CTA CGG GAC GA
2	***Tnfa***	CCCTCACACTCAGATCATCTTCT	GCTACGACGTGGGCTACAG
3	***Il1b***	GCAACTGTTCCTGAACTCAACT	ATCTTTTGGGGTCCGTCAACT
4	***Gfap***	CGGAGACGCATCACCTCTG	AGGGAGTGGAGGAGTCATTCG
5	***Aif1***	ATCAACAAGCAATTCCTCGATGA	CAGCATTCGCTTCAAGGACATA
6	***Vim***	CGTCCACACGCACCTACAG	GGGGGATGAGGAATAGAGGCT
7	***Tgfb***	CTCCCGTGGCTTCTAGTGC	GCCTTAGTTTGGACAGGATCTG
8	***hHSPB1***	GTCCCTGGATGTCAACCACT	GACTGGGATGGTGATCTCGT
9	***Il6***	GCTACCAAACTGGATATAATCAGGA	CCAGGTAGCTATGGTACTCCAGAA
10	***Il10***	CAGAGCCACATGCTCCTAGA	TGTCCAGCTGGTCCTTTGTT
11	***Il4***	CATCGGCATTTTGAACGAG	CGAGCTCACTCTCTGTGGTG
12	***Cd68***	GACCTACATCAGAGCCCGAGT	CGCCATGAATGTCCACTG
13	***iNos***	GTTCTCAGCCCAACAATACAAGA	GTGGACGGGTCGATGTCAC
14	***Mrc1***	CCACAGCATTGAGGAGTTTG	ACAGCTCATCATTTGGCTCA
15	***Arg1***	GAATCTGCATGGGCAACC	GAATCCTGGTACATCTGGGAAC

F3. táblázat. A mikroglia sejtek morfológiai eloszlásának statisztikai analízise 24 órával etanol kezelést követően. Statisztikai próba: kétutas ANOVA Tukey post-hoc teszttel. Rövidítések: Ctx: kéreg, Hip: hippokampusz, RSCx: retrospleniális kéreg, OCx: occipitális kéreg, PCx: parietális kéreg, FCx: frontális kéreg, Th: talamusz, Str: striátum. (*p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001

Agyterület	Mikroglia aktivációs állapota	Vad típus kontroll	hHSPB1 kontroll	Vad típus EtOH	hHSPB1 EtOH	TG ktrl - WT ktrl	WT EtOH - WT ktrl	TG EtOH - TG ktrl	TG EtOH - WT EtOH
Hip	nyugvó	71.1 ± 7.6	85.0 ± 4.2	7.7 ± 2.0	5.6 ± 1.1	-	***	***	-
	hipertróf	20.7 ± 3.8	10.6 ± 3.2	49.7 ± 2.4	50.4 ± 4.3	-	**	***	-
	amőboid	8.1 ± 3.8	4.4 ± 1.0	42.6 ± 4.4	44.0 ± 5.3	-	**	***	-
	aktivált (hipertróf + amőboid)	28.9 ± 7.6	15.0 ± 4.2	92.3 ± 2.0	94.4 ± 1.1	-	***	***	-
RSCx	nyugvó	83.3 ± 0.9	86.5 ± 4.4	14.2 ± 2.7	10.2 ± 3.9	-	***	***	-
	hipertróf	8.6 ± 0.6	5.7 ± 1.8	42.0 ± 0.5	39.2 ± 8.5	-	**	**	-
	amőboid	8.1 ± 0.5	7.9 ± 2.6	43.7 ± 2.7	50.6 ± 12.4	-	*	**	-
	aktivált (hipertróf + amőboid)	16.7 ± 0.9	13.5 ± 4.4	85.8 ± 2.7	89.8 ± 3.9	-	***	***	-
OCx	nyugvó	77.4 ± 5.1	81.9 ± 3.6	26.7 ± 3.4	19.2 ± 13.0	-	**	***	-
	hipertróf	10.1 ± 1.9	9.2 ± 2.5	37.1 ± 3.8	39.0 ± 2.6	-	***	**	-
	amőboid	12.4 ± 4.0	8.8 ± 1.6	36.2 ± 6.4	41.8 ± 15.6	-	-	-	-
	aktivált (hipertróf + amőboid)	22.6 ± 5.1	18.1 ± 3.6	73.3 ± 3.4	80.8 ± 13.0	-	**	***	-
PCx	nyugvó	81.7 ± 3.5	87.5 ± 2.3	48.0 ± 5.4	28.8 ± 10.3	-	*	***	-
	hipertróf	13.4 ± 3.6	7.2 ± 1.6	34.8 ± 2.6	47.0 ± 2.8	-	**	***	-
	amőboid	4.9 ± 0.3	5.3 ± 1.2	17.2 ± 2.9	24.2 ± 8.0	-	-	-	-
	aktivált (hipertróf + amőboid)	18.3 ± 3.5	12.5 ± 2.3	52.0 ± 5.4	71.2 ± 10.3	-	*	***	-
FCx	nyugvó	82.3 ± 3.1	87.7 ± 1.2	45.8 ± 4.6	33.8 ± 14.0	-	*	**	-
	hipertróf	13.0 ± 2.7	6.2 ± 0.9	34.4 ± 1.6	43.3 ± 7.1	-	*	***	-
	amőboid	4.7 ± 0.5	6.1 ± 0.8	19.8 ± 3.1	22.8 ± 7.3	-	-	-	-
	aktivált (hipertróf + amőboid)	17.7 ± 3.1	12.3 ± 1.2	54.2 ± 4.6	66.2 ± 14.0	-	*	**	-
Th	nyugvó	62.5 ± 4.4	81.1 ± 4.0	4.4 ± 0.3	2.4 ± 1.7	*	***	***	-
	hipertróf	28.0 ± 4.5	12.9 ± 2.2	41.5 ± 1.6	46.6 ± 7.3	-	-	**	-
	amőboid	9.5 ± 0.2	6.0 ± 1.9	54.1 ± 1.3	51.0 ± 8.8	-	***	***	-
	aktivált (hipertróf + amőboid)	37.5 ± 4.4	18.9 ± 4.0	95.6 ± 0.3	97.6 ± 1.7	*	***	***	-
Str	nyugvó	68.1 ± 1.0	82.7 ± 4.0	31.1 ± 7.3	27.5 ± 13.8	-	-	*	-
	hipertróf	27.9 ± 0.0	9.6 ± 2.3	51.6 ± 5.3	58.2 ± 10.3	-	-	**	-
	amőboid	3.9 ± 1.0	7.6 ± 3.8	17.3 ± 2.1	14.2 ± 3.7	-	-	-	-
	aktivált (hipertróf + amőboid)	31.9 ± 1.0	17.3 ± 4.0	68.9 ± 7.3	72.5 ± 13.8	-	-	*	-