

In utero rosvastatin kezelés epigenetikai
következményeként megváltozik az újszülött patkány agy
hiszton metilációs mintázata

Fábián-Dulka Karolina

Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola

PhD Tézisek összefoglalója

Sejtbiológia és Molekuláris Medicina Tanszék
Szent-Györgyi Albert Általános Orvostudományi Kar – Természettudományi és
Informatikai Kar, Szegedi Tudományegyetem



Témavezető: Prof. Dr. Gulya Károly egyetemi tanár

Szeged, 2021

TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA

(MTMT2 AZONOSÍTÓ: 10053250)

AZ ÉRTEKEZÉST MEGALAPOZÓ TUDOMÁNYOS PUBLIKÁCIÓ

- I) **Dulka K**, Szabo M, Lajkó N, Beleczi I, Hoyk Z, Gulya K (2021) Epigenetic consequences of *in utero* exposure to rosuvastatin: Alteration of histone methylation patterns in newborn rat brains. **Int J Mol Sci.** 22(7):3412. doi: 10.3390/ijms22073412. (IF: 5.923) (Q1)

AZ ÉRTEKEZÉST NEM KÖZVETLENÜL MEGALAPOZÓ TUDOMÁNYOS PUBLIKÁCIÓK

- I) **Dulka K**, Nacska K, Lajkó N, Gulya K (2021) Quantitative morphometric and cell-type-specific population analysis of microglia-enriched cultures subcloned to high purity from newborn rat brains. **IBRO Neurosci Rep.** 10:119-129. doi: 10.1016/j.ibneur.2021.01.007.
- II) Legradi A, **Dulka K**, Jancsó G, Gulya K (2020) Orofacial skin inflammation increases the number of macrophages in the maxillary subregion of the rat trigeminal ganglion in a corticosteroid-reversible manner. **Cell Tissue Res.** 382(3):551-561. doi: 10.1007/s00441-020-03244-3. (IF: 5.249) (Q1)
- III) Lajkó N, Kata D, Szabó M, Mátyás A, **Dulka K**, Földesi I, Fülöp F, Gulya K, Vécsei L, Mihály A (2020) Sensitivity of rodent microglia to kynurenines in models of epilepsy and inflammation *in vivo* and *in vitro*: Microglia activation is inhibited by kynurenic acid and the synthetic analogue SZR104. **Int J Mol Sci.** 21(23):9333. doi: 10.3390/ijms21239333. (IF: 5.923) (Q1)
- IV) Szabo M, **Dulka K**, Gulya K (2016) Calmodulin inhibition regulates morphological and functional changes related to the actin cytoskeleton in pure microglial cells. **Brain Res Bull.** 120:41-57. doi: 10.1016/j.brainresbull.2015.11.003. (IF: 3.37) (Q2)

Tudományos közlemények száma: 5 (2 elsőszerzős, 1 társ-elsőszerzős)

Kumulatív impakt faktor: 20.47 (3 Q1 és 1 Q2 publikáció)

AZ ÉRTEKEZÉSHEZ KÖZVETLENÜL KAPCSOLÓDÓ POSZTER ELŐADÁS

- I) **Dulka K**, Szabo M, Lajko N, Beleczi I, Hoyk Z, Gulya K (2020) Prenatal exposure to rosuvastatin changes histone methylation patterns in the newborn rat brain. **12th FENS 2020 Virtual Forum of Neuroscience**, 2020.07.11-15. (*e-poster*)

AZ ÉRTEKEZÉSHEZ NEM KÖZVETLENÜL KAPCSOLÓDÓ POSZTER ELŐADÁSOK

- I) Szabo M, Lajko N, **Dulka K**, Mihály A, Vécsei L, Gulya K (2020) Kynurenic acid and its analog SZR104 exhibit strong anti-inflammatory effects in microglia-enriched newborn rat cerebral cultures. **12th FENS 2020 Virtual Forum of Neuroscience**, 2020.07.11-15. (*e-poster*)
- II) Légrádi Á, Szebeni G J, Yaqub M, **Dulka K**, Lajko N, Szabó M, Monostori É, Gulya K (2020) Galectin-1 expression correlates with the microglial activation state in primary and secondary cultures of newborn rat cortical tissue. **12th FENS 2020 Virtual Forum of Neuroscience**, 2020.07.11-15. (*e-poster*)
- III) **Dulka K**, Nacsa K, Lajkó N, Gulya K (2018) Nagy tisztaságú mikroglia kultúra készítése primer és szekunder tenyészetekből. **Magyar Élettani Társaság Vándorgyűlése**, Szeged, Hungary, 2018.06.27-30. (*P1.56*)
- IV) **Dulka K**, Szabo M, Gulya K (2015) Calmodulin inhibition affects proliferation and cell viability in unchallenged and LPS-challenged pure microglial cultures. **XII European Meeting on Glial Cell Function in Health and Disease**, Bilbao, Spain, 2015.07.15-18. (*TO2-04B*) **GLIA**: 63 (1) pp. E95-E95

EGYÉB, AZ ÉRTEKEZÉSHEZ NEM KAPCSOLÓDÓ PUBLIKÁCIÓ

- I) Kata D, Nacsa K, Légrádi Á, **Dulka K**, Gulya K (2015) Állati sejtek és szövetek tenyésztése. Egyetemi jegyzet. SZTE, Szeged, pp. 1-233. <https://elearning.szte.hu/mod/szte/course.php?id=84> (in Hungarian)

1. BEVEZETÉS

Az eukariota sejtek kromatinállománya a DNS-nek fehérjékkel alkotott dinamikus makromolekuláris komplexe. A kromatin szerkezete olyan alapvető folyamatokat befolyásol, mint a transzkripció, a DNS replikáció vagy a DNS hibajavítás. A kromatin ismétlődő alapegysége a nukleoszóma, amelyet a négy „core” hiszton (H2A, H2B, H3, H4) által kialakított oktamer és a köré tekeredő 146 bázispár hosszúságú DNS szakasz alkot. A hiszton fehérjék a genom eu- és heterokromatin egységekre tagolásához is hozzájárulnak.

A hisztonoknak a kromatin szerkezetében és dinamikájában betöltött létfontosságú szerepét a sokféle poszttranszlációs módosítás (PTM) szabályozza. A hiszton fehérjék több olyan aminosavat tartalmaznak, amelyek a transzláció után módosíthatók. A hisztonok módosítása az epigenetikai szabályozás egyik fő mechanizmusa, amely a kromatin szerkezetének megváltoztatásával befolyásolja a DNS-hez való hozzáférést. Az epigenetika a genomot érintő olyan jelenségekkel foglalkozik, amelyek a génexpressziót szabályozzák és a DNS nukleotidsorrendjének megváltoztatása nélkül módosíthatják a sejtek fenotípusát. A génexpressziót befolyásoló epigenetikai szabályzó mechanizmusok közé tartozik a DNS-metilációja és a rövid (19-30 nukleotid hosszúságú), nem-kódoló RNS populáció szintézise mellett a hisztonok enzimatisz módosítása. A hiszton fehérjék PTM-ainak legnagyobb része a fehérjék erősen konzervált, másodlagos szerkezetet nem mutató N-terminális régiójában történik. A PTM-ok dinamikus rendszerében többféle módosítás ismert, így például a metiláció, az acetiláció, a foszforiláció, az ubikvitináció és a szumoiláció, amelyek hatással vannak a génexpresszióra és a genom működésére. Ez az epigenetikai mechanizmus több különböző PTM-t katalizáló enzimet igényel, például az „írókat”, amelyek módosításokat fűznek a hisztonhoz, az „olvasókat”, amelyek felismerik, illetve a „törlőket”, amelyek eltávolítják ezeket a módosításokat.

A hiszton fehérjék metilált lizinjeinek (Lys; K) peptidláncon belüli pozíciója és metilációs foka különböző génexpressziós állapotokhoz köthető. Ismert, hogy egyes Lys metilációs pozíciók, például a H3K4 és a H3K36 metilációk részt vesznek a transzkripció aktiválásában, és többnyire a kromatin nyitott állapotához társulnak. Más metilációs mintázatok, mint például a H3K9, H3K27 és H4K20 Lys metilációk, a transzkripció represszióhoz járulnak hozzá és a kondenzált kromatinra jellemzők. A hiszton fehérjék

különböző lizin aminosavjaihoz kapcsolódó mono- (me1), di- (me2), vagy trimetil (me3) csoportok a metilációs mintázatok összetettségét tovább fokozhatják.

A statinok (3-hidroxi-3-metil glutaril koenzim A reduktáz gátlók) a vér magas koleszterin szintjének kezelésére szolgáló, széles körben alkalmazott lipidcsökkentő készítmények. A kereskedelemben kapható statinok közül a rosuvastatin (RST) az egyik legkeresettebb vényköteles gyógyszer, és amelyik a napjainkban használt statinok közül a legerősebb gátló hatást fejt ki a koleszterin bioszintézisre. A statinok működésének alapja, hogy blokkolják az L-mevalonát előállításához szükséges enzimet. A koleszterin szintézis első, egyben sebességkorlátozó lépésének gátlásával csökkentik a szintézis útvonalon kialakuló intermedier metabolitok létrejöttét, amelyek a sejtfunkciók széles körét szabályozzák, beleértve a hormonális jelátvitelt, a fehérjeszintézist vagy egyes sejtmembrán funkciókat. Bár a statinok elsődleges szerepe a lipid anyagcseréhez kapcsolódik, ezek a vegyületek a koleszterin szint csökkentése mellett az alacsony sűrűségű lipoproteinek és trigliceridek keringő szintjének csökkentésén, illetve a nagy sűrűségű lipoproteinek expressziójának stimulálásán túl az ateroszklerotikus plakkok körüli sejtek gyulladási paramétereit is erősen modulálják és javítják az erek endothél funkcióját. A statinok emellett daganatellenes tulajdonságokkal is rendelkeznek, amelyek különböző rákos sejtvonalakban apoptózist indukálhatnak.

Annak ellenére, hogy a statinok számos jótékony hatással bírnak, ismert néhány mellékhatásuk is. Mivel káros hatással lehetnek az embrióra, ezért rendszeres szedésük a terhesség alatt ellenjavallt. Ennek fő oka az, hogy gátolják a koleszterin bioszintézisét. A megfelelő koleszterin szint és HMG-CoA reduktáz aktivitás fontos a sejtek szaporodásához és a korai embrionális fejlődéshez. A statinok általi enzimgátlás azonban megzavarhatja a membránszintézist, a fehérjék glikozilációját, illetve a sejtek szaporodását, növekedését és anyagcseréjét, amelyek elengedhetetlenek a méhlepény és az embrió normális fejlődéséhez. Az embrióra gyakorolt potenciálisan káros, de nem jól dokumentált hatásuk miatt a nők statinkezelését 3 hónappal a terhesség tervezése előtt fel kell függeszteni, és nem szabad terhesség vagy szoptatás alatt alkalmazni. Mivel a terhességek körülbelül fele nem tervezett, fennáll annak a lehetősége, hogy a nő terhessége korai szakaszában egy ideig statint szed.

Az emlősök embrionális/magzati fejlődése pontos molekuláris kölcsönhatásokat igényel a belső tényezők, például a genom és az epigenom, valamint a külső anyai/környezeti tényezők között. Napjainkban egyre több tanulmány hangsúlyozza az

anyai hatások fontosságát a kromatin szerkezetére, illetve emeli ki a genom, epigenom és környezet közötti kölcsönhatások jelentőségét. Mivel nagyon korlátozott ismereteink vannak a RST epigenetikai hatásairól, munkánk célja az volt, hogy megvizsgáljuk, vajon a RST (mint *in utero* környezeti faktor) kivált-e molekuláris epigenetikai eseményeket, például hisztonmetilációt a kezelt patkányok újszülött utódainak agyában.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Az epigenetikai mechanizmusok hozzájárulhatnak a sejt fenotípusának vagy transzkripció állapotának megváltoztatásához anélkül, hogy befolyásolnák annak genomját. Ez lehetővé teszi a sejtek számára az alkalmazkodást a különböző fejlődési és környezeti feltételekhez. A hiszton fehérjék PTM-a az epigenetikai szabályozások egyik fő mechanizmusa. A hiszton módosítások vizsgálata – egy adott genomi régióban vagy a teljes genomban – információt adhat a kromatin szerkezetéről, a DNS hozzáférhetőségéről, a génexpressziós állapotról vagy akár a génszabályozó elemek helyéről is. Az embrionális fejlődés során az agy sejtjeinek hiszton metilációs mintázata a környezeti zavarok széles spektrumára érzékeny.

A statinok alkalmazása a terhesség alatt jelenleg nem javasolt. Ennek legfőbb oka a statinok magzatra gyakorolt feltételezett teratogén hatása annak ellenére, hogy nincs egyértelmű és közvetlen bizonyíték arra, hogy a statinok terhességben történő alkalmazása növelné a magzati rendellenességek kialakulásának kockázatát, illetve az, hogy a RST epigenetikai hatásaira vonatkozóan csak korlátozott adatok állnak rendelkezésre. Kísérleteinkben célul tűztük ki, hogy számos, előkísérletek alapján kiválasztott hisztonmetiláció kvantitatív analízisét végezzük el újszülött patkány agyban. Munkánk során az alábbi célokat tűztük ki:

- 1) Megvizsgálni, hogy a vemhesség során RST-nal kezelt patkányok újszülött utódainak agyában a gyógyszer befolyásolja-e a molekuláris epigenetikai mechanizmusokat;
- 2) Meghatározni, hogy a RST kezelés összefüggésben van-e hisztopatológiai elváltozásokkal és/vagy befolyásolja-e a sejtproliferációt az újszülött patkányok agyában;
- 3) Kvantitatív technikával elemezni a méhen belüli RST expozíció következtében létrejött metilációs mintázat változásait, és azonosítani azokat az agyi sejt típusokat, amelyek mutatják ezeket az epigenetikai változásokat.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Vemhes Sprague-Dawley patkányokat osztottunk három csoportba. A hagyományos táppal etetett abszolút kontrollok mellett (akik nem kaptak semmilyen kiegészítőt) a vivőanyaggal kezelt kontroll állatok naponta egyszer kis mennyiségű (650 mg) májpástétomot kaptak pellet formájában, míg a kezelt patkányok a napi RST dózisukat (0,25 mg/kg) májpástétomba keverve orálisan kapták. A két utobbi csoport a májpástétomot (RST-nal vagy anélkül) a vemhesség 11. napjától 10 napig (vagy a fialásig) kapta. A születés utáni első napon az abszolút kontroll, a vivőanyaggal kezelt kontroll és a vivőanyagban lévő RST-nal kezelt újszülött patkányok nagyagyát eltávolítottuk. A mintákat western blot elemzéshez homogenizáltuk, illetve szövettani vizsgálatokhoz (hematoxin-eozin festés vagy a fluoreszcens immunhisztokémia/konfokális mikroszkópia) paraffinba ágyaztuk.

A western blot analízishez és a fluoreszcens immunhisztokémiához tizenegy, a H2A, H2B, H3 és H4 „core” hiszton fehérje lizinjeinek metilációs helyeire és állapotára specifikus antitestet választottunk ki. A sejtspecifikus markereket neuronok, asztrociták, oligodendrociták és mikroglia sejtek kimutatására, valamint az arányaik esetleges változásának ellenőrzésére használtuk. Az anti-Ki67 antitestet a proliferáló sejtek kimutatására alkalmaztuk.

A 6 µm vastag paraffinba ágyazott szövet metszeteit deparaffináltuk, rehidráltuk, majd hematoxin-eozin festést vagy fluoreszcens immunhisztokémiát/konfokális mikroszkópiát végeztünk.

Az újszülött patkányok homogenizált agyát western blot analízissel kvantitatív elemzésnek vetettük alá. A western blot analízis során a digitális képeket a mérések összehasonlíthatósága érdekében azonos beállításokkal dolgoztuk fel. A sávok denzitometriás elemzését az ImageJ szoftverrel végeztük. A statisztikai összehasonlításokhoz a SigmaPlot szoftvert használtuk.

4. EREDMÉNYEK

4.1. Az abszolút kontrollok és a vivőanyaggal kezelt kontrollok hiszton metilációs mintázata nem különbözik szignifikánsan

A prenatalisan RST-nal kezelt újszülött agy epigenetikai mechanizmusainak vizsgálata során feltételeztük, hogy a májpástétom, amit a RST vivőanyagaként használtunk, nem

vált ki jelentős változásokat a hiszton metilációs mintázatban. Ennek ellenőrzése érdekében a metilált hisztonok szintjeit western blot analízissel vizsgáltuk meg az abszolút kontroll és vivőanyaggal kezelt kontroll újszülött patkányok agymintáiból. Munkánk során figyelmünket a négy „core” hiszton H2A, H2B, H3 és H4 fehérje különböző helyein lévő lizin csoportok metilációjára összpontosítottuk, és a H2AK118me1, H2BK5me1, H3, H3K4me1, H3K4me3, H3K9me3, H3K27me3, H3K36me2, H4, H4K20me2 és H4K20me3 módosításokat vizsgáltuk meg. Adataink alapján kizárhattuk a májpástétom mint táplálékkiegészítő lehetséges hatását ezen helyek metilációs mintázatára, mert nem volt szignifikáns különbség az abszolút kontroll és a hordozóval kezelt kontroll újszülött patkányok között: a vivőanyaggal kezelt kontroll értékek az abszolút kontroll értékeinek szűk sávjába estek (93,2%±7,7% és 106,4%±10,7% közé). A szignifikáns különbség hiánya miatt a további adatok bemutatása során a vivőanyaggal kezelt kontrollokat említjük "kontrollként", és azokat használjuk referenciapontként.

4.2. A prenatális RST kezelés nem befolyásolja az újszülött agy sejtösszetételét

A méhen belüli RST expozíció nem eredményezett olyan strukturális rendellenességeket az újszülött patkány agyában, amelyeket a fénymikroszkópos vizsgálatok alátámasztanak. A mikroglia és neuronális sejtmarkerek immunofluoreszcens jelölése kimutatta, hogy ezen sejtek aránya nem változik a kontroll és a RST-nal kezelt csoportok között. A sejt-specifikus markerek kvantitatív western blot analízise megerősítette, hogy a RST prenatális expozíciója nem okoz eltéréseket az újszülött agy sejtösszetételében, hiszen a neuron és glia aránya nem változik szignifikánsan a kontroll és a kezelt csoportok között. Ezeket a megfigyeléseket Ki67 fluoreszcens immunohisztokémiai jelölés is alátámasztotta: a Ki67-jelölt/DAPI-jelölt sejtmagok aránya a kontroll és a prenatálisan RST-nal kezelt újszülött patkány agyában megegyezik.

4.3. Az *in utero* RST kitettség befolyásolja a hiszton metilációs mintázatot az újszülött patkány agyában

Megállapítottuk, hogy a prenatális RST kezelés általános, kismértékű növekedést idéz elő a H2AK118me1, H2BK5me1, H3, H3K9me3, H3K27me3, H3K36me2, H4, H4K20me2 és H4K20me3 mennyiségében, de ezek a változások nem voltak szignifikánsak (kontroll 101,0%–111,7%-ára nőttek). A hiszton H3 fehérje 4. lizinjének mono- és trimetilációs szintjei (H3K4me1 és H3K4me3) azonban a kezelést követően szignifikánsan

megnövekedtek (a kontrollok szintjének $134,3\% \pm 1,6\%$ és $127,8\% \pm 8,5\%$ -a). Ezeknek a módosításoknak a szerepe a transzkripció aktiválásában ismert.

4.4. A H3K4me1 és H3K4me3 növekedése döntően a neuronok sejtmagjaiba lokalizálódik

A hiszton H3 fehérje 4. lizinje megemelkedett mono- és trimetilációs szintjeinek sejttípushoz történő lokalizálására sejtspecifikus markereket használtunk. Megállapítottuk, hogy ezen metilációs mintázatok leginkább a NeuN-immunopozitív idegsejtek magjaiban voltak megfigyelhetők. A posztembrionális fejlődésnek ebben az időszakában az újszülött agyszövet parenchimáját túlnyomó részben idegsejtek képezik. Megfigyeltük, hogy a neuronok mellett néhány Iba1-pozitív mikroglia és GFAP-pozitív asztrocita is erősebb H3K4me1 és H3K4me3 immunpozitív jelet mutatott, bár ezeknek a sejteknek a száma az újszülött agyban elhanyagolható volt.

5. MEGBESZÉLÉS

A rendelkezésre álló limitált humán adatok alapján, valamint a kezdeti állatkísérletekből vélhető teratogén hatásai miatt a statinok alkalmazása a terhesség alatt jelenleg elővigyázatosságból nem ajánlott. A kezdeti állatkísérletek azt bizonyították, hogy a statinok hatással lehetnek a magzat testtömegére és túlélési arányára, illetve befolyásolhatják a magzati fejlődést. Feltételezések szerint a lipofil statinok (simvastatin, lovastatin, atorvastatin, cerivastatin vagy fluvastatin) nagyobb kockázatot jelenenek a magzatra nézve, mint a hidrofil statinok, mert a hatékonyabb placentális transzportnak köszönhetően nagyobb koncentrációban érik el a magzatot. A simvastatin méhen belüli expozíciója például csökkentette az utódok életképességét és megzavarta a hím reprodukív rendszer fejlődését. Mivel a RST viszonylag hidrofil, a placentán történő átjutása valószínűleg korlátozott.

A statinoknak való kitétség előfordulhat, főleg a terhesség kezdetén, különösen annak fényében, hogy a terhességek fele nem tervezett. A magzatra gyakorolt kockázatot viszont mérlegelni kell az anyával szembeni kockázattal is. A terhesség és a szoptatás ideje alatt az anya hiperkoleszterinémias állapota hatással lehet a szív- és érrendszerének állapotára. Vannak adatok, amelyek a statinok használatának kedvező hatásait bizonyítják. A statinok rendkívül hasznosnak bizonyultak a preeklampszia megelőzésében, csökkentve a magzati rendellenességek és morbiditás kockázatát.

Mindezekből adódik, hogy a statinok magas kockázatú anyáknál történő alkalmazásának felülvizsgálata elkerülhetetlen.

Az emlős embrionális fejlődés pontos molekuláris kölcsönhatásokat igényel a belső tényezők, így a genetika és az epigenetika, valamint a külső anyai tényezők, például a környezeti faktorok, a gyógyszerek vagy akár az anyai táplálkozás között. Számos környezeti tényezőnek lehet hosszú távú hatása a felnőtt utódban. A táplálkozás és étrend ma ez egyik legismertebb környezeti tényező, amely hozzájárulhat a homeosztázis, az anyagcsere és a génexpresszió fiziológias és patofiziológias szabályozásához. Az anya étrendje és a táplálkozási összetevők befolyásolhatják a magzat epigenetikai mechanizmusait, és ezáltal hatással lehetnek a fejlődési folyamatokra is. Ezért volt fontos, hogy kizárjuk a májpestéomnak (a RST hordozójának) az interferenciáját az epigenetikai mechanizmusokkal.

Az idegrendszer számos sejtípust tartalmaz, amelyeket a differenciálódás során eltérő morfológia, anatómiai elhelyezkedés, funkció és sajátos génexpressziós mintázat határoz meg. A fejlődő emlős agyban először neuronok jönnek létre, majd a neuronokat támogató gliasejtek. Az első posztnatális napon az újszülött patkány agyának több mint 90%-át neuronok, míg 6%-át nem neuronális sejtek teszik ki; ez utóbbinak 15-30%-a mikroglia. Fénymikroszkópos vizsgálataink során nem találtunk a RST-hoz közvetlenül köthető hisztotoxicitásra utaló elváltozást az újszülött agy szerkezetében vagy sejtösszetételében. Ez alátámasztja azt a véleményt, hogy a statinok terhesség alatt történő alkalmazása nem jelent kockázatot a magzat központi idegrendszeri rendellenességeinek kialakulására.

Munkánk során azonosított megváltozott hiszton metilációs jelek nagy részben neuronokban, és sokkal kisebb mértékben mikrogliaokban lokalizálódtak. Az embrionális fejlődés során a neuronok hiszton metilációs mintázata a környezeti tényezők széles spektrumára érzékeny. A hiszton metilációban bekövetkezett változásokat számos neurológiai és pszichiátriai rendellenességgel hozták összefüggésbe, illetve kötötték az agy megfelelő fejlődéséhez és működéséhez.

A hiszton H3 fehérje 4. lizin aminosavjának mono- és trimetilációja (H3K4me1 és H3K4me3) általában az eukromatinban található. Ez a módosítás a transzkripció szabályzásra jellemző, és a promóter és enhanszer régiók tipikus hiszton módosítása. Ismert, hogy ezek a metilációs módosítások a génaktivációval függnek össze, amelyek lehetővé teszik a transzkripcióban aktív kromatin állapot kialakítását és a

kromatinmódosító faktorok DNS-hez való hozzáférését. A H3K4 metiláció megfelelő szabályozása kulcsfontosságú lehet az egészséges idegrendszer fejlődése szempontjából, mivel azok a mutációk, amelyek a H3K4 metiláció csökkenésével vagy növekedésével járnak, potenciálisan értelmi fogyatékosághoz, autizmushoz, mikrokefáliához, illetve kora gyermekkorban különböző neurológiai betegségekhez vezethetnek. Valószínű, hogy ez az epigenetikai jel egyes idegrendszer fejlődési rendellenességek patofiziológiájában általánosan előfordul.

Vizsgálataink kimutatták, hogy a vemhesség 11. napjától alkalmazott prenatális RST kezelés a hiszton H3 fehérje 4. lizinje metilációs mintázatának megváltozását okozta az újszülöttek agyában. A vizsgált módosítások közül a RST szelektíven megnövelte a H3K4 mono- és trimetilált szintjeit az újszülött agyban. A RST által kiváltott epigenetikai változások nem jók vagy rosszak, ha nem bizonyítják egyértelműen. Bár a klinikumban még nem állnak rendelkezésre hasonló adatok, eredményeink arra figyelmeztetnek, hogy a prenatális statin terápiát körültekintően kell alkalmazni. További vizsgálatok szükségesek ahhoz, hogy részletesebb képet kapjunk a gyógyszer epigenetikai mintázatra gyakorolt hatásáról és annak következményéről.

6. KONKLÚZIÓ

Munkánkban leírtuk, hogy újszülött patkányok agyában a korábbi méhen belüli RST kitettség megváltoztatta a metilációs mintázatot. Megfigyeltük, hogy a prenatális RST kezelés szignifikánsan megemelte a H3K4me1 és H3K4me3 szinteket a kontrollhoz viszonyítva. Ezen erősebb metilációs jelek döntően az idegsejtek magvaiban voltak jelen. Nem találtunk az újszülött agyban olyan hisztopathológiai elváltozást, amely összefüggésbe volt hozható a RST kezeléssel. Azt feltételezzük, hogy a H3K4me1/me3 megemelkedett szintje felelős lehet a fejlődő agysejtekben a heterokromatikus szerkezet fellazulásáért, ami akár a génexpressziós program megváltozásához is vezethet. E folyamat pontos mechanizmusának megismerése további vizsgálatokat igényel, amelyek során meg kell határozni, hogy a H3K4 metilációs mintázatban megfigyelt változások (1) specifikus lókuszekhez kapcsolhatók vagy egész genomra terjednek ki, (2) a RST-ra adott adaptív vagy maladaptív választ tükrözik, vagy (3) a prenatális RST kezelésre adott választ követő szekunder, esetleg terciér folyamatok eredményei. Azonban a RST-nak kitett utódok embrionális fejlődése szabályozásában szerepet játszó genomi szekvenciák azonosítása továbbra is hatalmas kihívást jelent. Bár humán adatok még nincsenek,

eredményeink arra hívják fel a figyelmet, hogy a statin terápia óvatosságot és további vizsgálatokat igényel.

7. A TANULMÁNY FŐBB MEGÁLLAPÍTÁSAI

- 1) Bebizonyítottuk, hogy a RST epigenetikai változásokat idéz elő az újszülött patkány agyában, ha az anyákat naponta RST-nal kezeltük a vemhesség 11. napjától;
- 2) Az újszülött agyban sejt-specifikus markerek elemzésével kimutattuk, hogy a prenatális RST kezelés nem befolyásolja az idegszövet fénymikroszkópos citoarchitektúráját és a sejttípus-arányokat;
- 3) Megállapítottuk, hogy a prenatális RST kezelés a H2AK118me1, H2BK5me1, H3, H3K9me3, H3K27me3, H3K36me2, H4, H4K20me2 és H4K20me3 szinteket általánosan, de nem szignifikánsan növeli meg a kontrollhoz viszonyítva;
- 4) Jelentős emelkedést észleltünk a H3K4me1 és H3K4me3 szintekben (a kontroll $134,3\% \pm 19,2\%$ -a és $127,8\% \pm 8,5\%$ -a), amelyekről ismert, hogy a transzkripció aktiválásában játszanak szerepet;
- 5) A sejttípusra specifikus markerek és a metilációs jelek fluoreszcens/konfokális immunhisztokémiai vizsgálatával kimutattuk, hogy a H3K4me1 és H3K4me3 szintek növekedése döntően az idegsejtek magjában van jelen;
- 6) Arra következtetünk, hogy a prenatális RST kezelés epigenetikai változásokat idéz elő, amelyek befolyásolhatják az idegsejtek differenciálódását és fejlődését, és ezeket a lehetőségeket a humán RST terápia esetén figyelembe kell venni.

8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt köszönetet szeretnék mondani PhD mentoromnak, Dr. Gulya Károly Professzor Úrnak személyes útmutatásáért, szakmai tanácsaiért és munkám folyamatos támogatásáért. Hálás vagyok az SZTE SZAOK–TTIK Sejtbiológia és Molekuláris Medicina Tanszék minden dolgozójának az inspiráló tudományos légkör megteremtéséért. Hálás vagyok kollégáimnak az eredményes vitákért, ösztönzésükért és támogatásukért. Itt mondok köszönetet családomnak és barátaimnak szeretetükért, feltétel nélküli támogatásukért, és azért, hogy mindig ott voltak mellettem. A kísérleteket az Európai Kohéziós Alapok forrásaiból a Nemzeti Fejlesztési Minisztérium finanszírozta (GINOP 2.3.2-15-2016-00030 és 2.3.2-15-2016-00034), valamint részben az SZTE SZAOK Elméleti Orvostudományok Doktori Iskolája támogatta.