

A kinurénsav és analógja (SZR104) erős gyulladásgátló hatásúak és befolyásolják a H3 hisztonok intracelluláris eloszlását és metilációs mintázatát újszülött patkány agyból származó immunaktivált mikroglia tenyészetekben

Biróné Lajkó Noémi

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, 2022

TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA

(MTMT2 AZONOSÍTÓ: 10073718)

AZ ÉRTEKEZÉST MEGALAPOZÓ TUDOMÁNYOS PUBLIKÁCIÓK

I) **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: **5.924**) (Q1)

II) 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. (IF: -)

III) Szabo* M, **Lajkó* N**, Dulka K, Szatmári I, Fülöp F, Mihály A, Vécsei L, Gulya K (2022) Kynurenic acid and its analog SZR104 exhibit strong antiinflammatory effects and alter the intracellular distribution and methylation patterns of H3 histones in immunochallenged microglia-enriched cultures of newborn rat brains. **Int J Mol Sci.** 23(1079) doi: 10.3390/ijms23031079. (IF **5,924**) (Q1) (*Ezek a szerzők egyenlő mértékben járultak hozzá a munkához, ezért ez megosztott elsőszerzős közlemény.)

AZ ÉRTEKEZÉST KÖZVETLENÜL NEM MEGALAPOZÓ TUDOMÁNYOS PUBLIKÁCIÓ

I) Dulka K, Szabo M, **Lajkó N**, Beleczi I, Hoyk Z, Gulya K (2021) Epigenetic consequences of in utero exposure to rosvastatin: Alteration of histone methylation patterns in newborn rat brains. **Int J Mol Sci.** 22(7):3412. doi: 10.3390/ijms22073412. (IF: **5.924**) (Q1)

Tudományos közlemények száma: 4

Kumulatív impakt faktor: 17.772

AZ ÉRTEKEZÉSHEZ KÖZVETLENÜL KAPCSOLÓDÓ POSZTER ELŐADÁSOK

I) 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)

II) Szabo M, **Lajkó 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-poszter)

AZ ÉRTEKEZÉSHEZ KÖZVETLENÜL NEM KAPCSOLÓDÓ POSZTER ELŐADÁSOK

I) Dulka K, Szabo M, **Lajkó 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-poszter)

II) Légrádi Á, Szabó M, Yaquub M, Dulka K, **Lajkó 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-poszter)

1. BEVEZETÉS

Számos kísérleti és klinikai tanulmány kimutatta, hogy az endogén triptofán metabolitok, köztük a kinurénsav (KYNA), nagyon sok neurofiziológiai és neuropatofiziológiai mechanizmusban vesznek részt és fontos szerepet játszanak az immunválaszok szabályozásában is. Mivel a KYNA nem jut át a vér-agy gáton, szükség volt olyan KYNA analógokat szintetizálni (például az SZR104; N-(2-(dimethylamino)ethyl)-3-(morpholinomethyl)-4-hydroxyquinoline-2-carboxamide), amelyek ezen a barrieren átjutnak, s ezáltal lehetséges kezelést nyújthatnak a neurodegeneratív és neuroinflammatorikus folyamatokkal szemben.

A mikroglia sejtek a központi idegrendszer (KIR) saját immunsejtjei, amelyek az idegszövet homeosztázisának megváltozása esetén komplex celluláris és molekuláris mechanizmusokkal válaszolnak. Sérülés vagy gyulladás esetén az aktivált mikroglia morfológiája megváltozik, nagyobb mértékben expresszál fő hisztokompatibilitási antigéneket és fagocitótikussá válik. Ezen túlmenően inflammatorikus citokineket és más, potenciálisan citotoxikus anyagokat is felszabadít, amelyek fokozzák a gyulladásos válaszokat azáltal, hogy a lézió vagy a sérülés helyére más sejteket toboroznak és aktiválnak. A mikrogliaiban gyulladás hatására például megnövekedhet a C-X-C motívum kemokin ligand 10 (CXCL10) szekréciója. A CXCL10 kemotaxist, apoptózist, a sejt növekedésének gátlását és angiostázist indukál. A CXCL10 és receptora (C-X-C motívum kemokin receptor 3) fontos szerepet tölt be a leukociták vándorlásában és a gyulladt szövetekbe történő infiltrációban, valamint a gyulladás fenntartásában, ami szövetkárosodáshoz vezethet (ilyen mechanizmusok figyelhetők meg a sclerosis multiplex patofiziológiája során is). Ehhez hasonlóan a C-C motívum kemokin receptor 1 (CCR1) és ligandjai is szerepet játszanak a sclerosis multiplex patogenezisében.

A sejtmagi DNS a kromatin struktúrát kialakító hiszton fehérjékkel asszociált. Az eukarióta sejtek azon képességét, hogy megőrizhessék változatos fenotípusukat, a DNS molekula kémiai módosulásai, a kromatinhoz kapcsolódó fehérjék aktivitása és a hiszton fehérjék nagyszámú és változatos poszttranszlációs módosítása (PTM) biztosítja. Habár a hisztonok tipikusan a sejtmagban találhatóak, ahol a transzkripciót szabályozzák, sokféle funkciót láthatnak el különböző celluláris és extracelluláris helyeken is. Ha extracelluláris milióbe kerülnek, sérülés-asszociált molekuláris mintázattá (damage-associated molecular pattern; DAMP) válnak, amelyek gyulladást, citotoxicitást, koagulációt és apoptózist okoznak. A hiszton módosulások (acetiláció, metiláció, foszforiláció, ubikvitináció stb.) olyan PTM-ok, amelyeket a sejtmagban a megfelelő enzimek hoznak létre. Ebből következően a transzkripció folyamata nagyon változatos, mert a módosított hisztonok és a DNS molekula eltérő módon

léphetnek kölcsönhatásba egymással. A sejtmagból transzportálódó különféle módosított hiszton citoplazmatikus akkumulációja valószínűleg celluláris stressz eredménye. A hiszton módosulások kulcsfontosságú epigenetikai szabályozó elemek, amelyek számos celluláris funkcióban játszanak szerepet. A specifikus hiszton PTM-ok közvetlenül, helyspecifikusan aktiválják vagy csendesítik a transzkripciót, így kiemelt szerepük van a génexpresszió szabályozásában. A hiszton metilációja a lizin (lys (K)) és arginin oldalláncnál viszonylag stabil, így a genom specifikus régiókban megjelenő epigenetikai információ potenciális hordozója. A H3 hisztonfehérje számos monometilációja (pl. H3K9me1, H3K27me1 és H3K79me1) és néhány dimetilációja (pl. H3K36me2) az aktív transzkripció folyamatokhoz köthető, míg más dimetilációk (pl. H3K9me2) és a legtöbb trimetiláció (pl. H3K9me3, H3K27me3, H3K79me3) génrepressziós szerepet tölt be.

Munkánk során a KYNA és analógja, az SZR104 hatásait több összefüggésben vizsgáltuk meg: (a) hogyan változik meg a mikroglia sejtek fagocitotikus aktivitása, (b) milyen epigenetikai változások következnek be gyulladás hatására a hiszton metilációban és (c) hogyan változik a mikroglia sejtekben a metilálatlan és metilált hisztonok eloszlása és lokalizációja. A CXCL10 és CCR1 gyulladásos markerek mellett a módosítatlan H3 hiszton és metilációjának (H3K9me3 és H3K36me2) kvantitatív szintjét is mértük, amely módosítások ellentétesen hatnak a génexpresszió szabályozására és részt vesznek az immunmodulációban is; ehhez western blot analízist és többszörös fluoreszcens jelölésű immuncitológiai módszereket hívtunk segítségül.

2. CÉLKITŰZÉSEK

A KIR-ben a kinurenin metabolikus útvonal számos fiziológiai és patofiziológiai mechanizmusban játszik szerepet, amelyek közül az immunmodulátor folyamatokat is kezdjük megismerni. Mivel a KYNA immunszuppresszív hatások szabályzásában is részt vesz, ezért úgy véltük, hogy a gyulladásos mechanizmusok és mikroglia funkciók tanulmányozásához egy, a vér-agy gáton átjutó analógot is megvizsgálunk, amely a neurodegeneratív és neuroinflammációs megbetegedések gyógyításához is szolgáltathat információt.

A mikroglia sejtek aktivációjakor számos celluláris és molekuláris folyamat figyelhető meg. E sejtek aktivált állapotban gyulladásos citokineket és más, potenciálisan citotoxikus anyagokat termelnek (például a CXCL10 vagy a CCR1 és ligandjaik), amelyek az inflammatorikus válaszokat úgy befolyásolják, hogy más sejteket aktiválnak és toboroznak a sérülés vagy lézió helyén. A hiszton módosulások kulcsfontosságú epigenetikai szabályozók, amelyek számos celluláris funkciót befolyásolnak (pl. gyulladás, koaguláció, apoptózis).

Vizsgálatainkban a célkitűzéseink a következők voltak:

- 1) meghatározni, vajon a KYNA és az SZR104 megváltoztatja-e a mikroglia sejtek funkcióit (pl. fagocitotikus aktivitás);
- 2) meghatározni, vajon a KYNA és az SZR104 befolyásolja-e az epigenetikai mechanizmusokat gyulladási állapotban a hiszton metiláció módosítása révén a mikroglia sejtekben;
- 3) meghatározni, vajon a KYNA és az SZR104 hatással van-e a metilálatlan és a metilált hisztonok intracelluláris eloszlására, illetve lokalizációjára a mikroglia sejtekben.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

A vizsgálatokhoz meghatározott tisztaságú (>98%) másodlagos mikroglia kultúrákat használtunk, amelyek újszülött Sprague-Dawley patkány előagyából származtak. A tenyésztés 6. napján (subDIV6) a mikroglia-dúsított másodlagos tenyészeteket bakteriális lipopoliszachariddal (LPS; 20 ng/ml végkoncentráció, Dulbecco's Modified Eagle Medium-ban (DMEM) oldva), KYNA-val (1 μ M végkoncentráció, DMEM-ben oldva), SZR104-gyel (1 μ M végkoncentráció, DMEM-ben oldva), illetve ezek kombinációival (LPS + KYNA vagy LPS + SZR104) kezeltünk. Az LPS kezelés széleskörben elfogadott és használt gyulladási modell. Hat különböző kezelési csoportot alakítottunk ki: (a) kontroll (kezeletlen) kultúrák, (b) 20 ng/ml LPS-kezelt kultúrák, (c) 1 μ M KYNA-kezelt kultúrák, (d) 1 μ M SZR104-kezelt kultúrák, (e) LPS + KYNA-kezelt kultúrák (az előzőekben jelölt dózisban) és (f) LPS + SZR104-kezelt kultúrák (az előzőekben jelölt dózisban). A másodlagos tenyészeteket immuncitokémiai és western blot módszerek segítségével értékeltük ki, amelyekhez különféle antitesteket használtunk: egy mikroglia-specifikus fehérje (CD11b/c), két gyulladási marker fehérje (CXCL10 és CCR1), egy módosítatlan core-hiszton (H3) és két specifikus hiszton H3 lys módosított fehérje (H3K9me3 és H3K36me2) elleni antitestet. A mikroglia sejtekben a folyadék-fázisú fagocitotikus kapacitást fluoreszcens mikrogöngyök (2 μ m átmérő; 2 μ l 2,5%-os fluoreszcens mikrogöngyök folyékony szuszpenziója 2 ml DMEM-ben) 60 perces inkubációs idővel történő felvételével határoztuk meg.

A western blotok szürkeárnyalatos digitális képeit az autoradiográfias filmek szkennelésével hoztuk létre (Epson Perfection V750 Pro asztali szkennelő). A digitális képeket a mérések összehasonlíthatósága érdekében azonos beállításokkal dolgoztuk fel. Az immunreaktív sávok denzitometriás méréséhez az egyes mintákból azonos mennyiségű fehérjét vittünk fel, majd a számszerűsített adatokat a kontrollhoz viszonyított százalékban határoztuk meg. A statisztikai összehasonlításoknál egyszempontos varianciaanalízist (ANOVA), illetve

Mann-Whitney tesztet alkalmaztunk, ahol a valószínűség értéke $p < 0,05$ volt. A számadatokat középérték \pm a középérték standard hibája (SEM) formátumban tüntettük fel; mindegyik esetben legalább öt, egymástól független kísérletet végeztünk el.

Az immunfluoreszcens mintákból Leica DMLB epifluoreszcens mikroszkóp és Leica DFC700 T CCD kamera segítségével digitális felvételeket készítettünk, amihez a LAS X Application Suite X (Leica) programot használtuk. Az immunfluoreszcens képek kvantitatív mikroszkópos analízisét és a fluoreszcens mikroglyöngyök mérését ImageJ (v 1.47) program segítségével végeztük el. A hiszton immunjelek intracelluláris lokalizációjának vizsgálatához az egész sejt, valamint külön a sejtmag denzitását, területét és az integrált optikai denzitását (fluoreszcencia/terület) is megmértük. Ezek alapján javított teljes sejt fluoreszcencia (corrected total cell fluorescence; CTCF) értékeket számoltunk ($CTCF_{\text{egész sejt}} - CTCF_{\text{sejtmag}}$). A statisztikai összehasonlításokat SigmaPlot program segítségével végeztük el; Kruskal-Wallis egyirányú varianciaanalízis segítségével kaptuk meg az eredményeinket, majd ezt követően a Dunn metodikát alkalmaztuk a páronkénti többszörös összehasonlításokhoz, a csoportok közötti statisztikailag szignifikáns különbségek megállapítására.

4. EREDMÉNYEK

4.1. A KYNA és az SZR104 csökkenti az LPS-indukált CXCL10 fehérje szintjét, míg a CCR1 szintet differenciáltan módosítja

Kezeletlen (kontroll) és kezelt mikroglia-dúsított másodlagos sejt kultúrákból (subDIV7) származó CD11b/c-vel jelölt mikroglia sejtekben az LPS kezelést követően a CXCL10 gyulladási marker immunreaktivitása nagymértékben megnövekedett. Az LPS kezelés hatására tipikus amőboid morfológiát és a CXCL10 immunreaktivitás citoplazmába lokalizálódását figyeltük meg. A KYNA vagy az SZR104 egyedüli, illetve LPS-sel kombinált kezelése után a tenyészetek CXCL10 immunreaktivitása a kontroll szintre csökkent. Kvantitatív fénymikroszkópos mikrodenzitometriás analízis segítségével azt is kimutattuk, hogy LPS kezelést követően a CXCL10 fehérje immunreaktivitása a mikroglia sejtekben megemelkedett (körülbelül a négyszeresére), míg a KYNA vagy az SZR104 önmagában, illetve az LPS-sel kombinált kezelése után szignifikánsan, a kontroll szintre csökkentette a CXCL10 szintjét. Hasonló, de gyengébb válasz volt megfigyelhető kontroll és kezelt sejtekben egy másik gyulladási marker, a CCR1 immunreaktivitásában is. Az LPS-sel kezelt kultúrákban a kontrollhoz viszonyítva a CD11b/c-jelölt mikroglia sejtek CCR1 immunreaktivitásának növekedését figyeltük meg. Kvantitatív fénymikroszkópos mikrodenzitometriás analízis segítségével kimutattuk, hogy a sejt kultúrában a CCR1 szintje LPS kezelést követően

szignifikánsan, 48%-kal megnövekedett, míg a KYNA vagy az SZR104 kezelés önmagában, illetve az LPS + KYNA kombinált kezelés hatástalannak bizonyult. Érdekes módon az LPS + SZR104 kombinált kezelés hatására a CCR1 szintje az LPS-kezeléshez viszonyítva szignifikánsan lecsökkent a kontroll csoport szintjére. A kvantitatív western blot analízisnél azt figyeltük meg, hogy a CCR1 immunreaktivitása az LPS kezelést követően szignifikánsan megnőtt. A KYNA és az SZR104 egyedül, illetve LPS-sel kombinálva sem okozott szignifikáns változást a CCR1 szintjében.

4.2. A KYNA és az SZR104 gátolja a mikroglia fagocitózist

Az LPS-sel kezelt sejttenyészetekben a mikroglia sejtek fagocitotikus aktivitása szignifikánsan megnövekedett. A kezeletlen kultúrákban ez az aktivitás alacsony szintű: az egy sejtben mért mikrogyöngyök száma átlagosan kettő. LPS kezelést követően ez a szám nagymértékben megnövekedett, egy sejtben átlagosan kilenc fagocitált mikrogyöngy figyelhető meg. Az LPS-sel kezelt kombinált tenyészetekben a KYNA vagy az SZR104 kezelés meggátolta a mikrogyöngyök fagocitózisának emelkedését, s az a kontroll szintre tért vissza. A KYNA és az SZR104 gátló hatása statisztikailag szignifikáns volt. A kvantitatív western blot alapján a másodlagos sejttenyészetekben mért Iba1 fehérje (mikroglia marker) expressziója nem változott a különböző farmakológiai anyagokkal (LPS, KYNA és SZR104) való kezelés hatására sem.

4.3. A KYNA és az SZR104 megváltoztatja a H3 hiszton intracelluláris eloszlását és a H3 lys metilációs mintázatát

A módosíthatatlan H3 hiszton fehérjék további PTM-ok forrásai lehetnek. Bár a H3 immunreaktivitás jelen volt a kezeletlen mikroglia citoplazmájában és sejtmagjában is, a H3 hiszton legnagyobb mennyisége a sejtmagi import következtében a magban halmozódott fel. Érdekes, hogy a legtöbb kísérleti manipuláció (kivéve az LPS + SZR104 kezelés) eredményeként a H3 hiszton akkumulációja mind a sejtmagban, mind pedig a citoplazmában megnövekedett, ami azt jelezte, hogy mindkét vegyület növelte a fehérje *de novo* szintézisét és a sejtmagi importot. A kezelések közül a KYNA hatására volt a legerősebb a módosíthatatlan H3 fehérje sejtmagi akkumulációja. Amikor az LPS és az SZR104 kezeléseket kombináltuk, sem a sejtmagi, sem a citoplazmatikus H3 immunreaktivitás nem változott meg a kontrollhoz viszonyítva. Ezt a megfigyelést a H3 immunjelek kvantitatív denzitometria során mért értékei is alátámasztják. A sejtmagi CTCF értékek a kontrollhoz viszonyítva egyedül az LPS vagy a KYNA kezelést követően növekedtek meg szignifikánsan, azonban az LPS-kezelésekhez

viszonyítva az LPS + KYNA és az LPS + SZR104 kombinált kezelés hatására ez az érték szignifikánsan lecsökkent. Ezzel szemben, a citoplazmatikus CTCF értékek egy csoport kivételével (LPS + SZR104 kezelés) mindenhol magasabbak voltak. Továbbá, a citoplazmatikus H3 szintjei is különböztek a kombinált kezelésekben: az LPS + KYNA kezelés esetében például növekedett, míg LPS + SZR104 kezelésnél csökkent a citoplazmatikus H3 fehérje szintje a kontrollhoz viszonyítva. A sejtmagi és a citoplazmatikus H3 hiszton eloszlás az LPS + SZR104 kezelésben hasonló volt a kezeletlen mikrogliaokban látottakhoz.

Ha a H3 hiszton citoplazmatikus szintjét western blot segítségével kvantitatívan vizsgáltuk, csak az LPS + KYNA kezelésnél mutatkozott szignifikáns növekedés. Ennek oka valószínűleg az, hogy a western blot előkészítéskor alkalmazott denaturáló környezet miatt a H3 fehérje szerkezete megváltozott, s bizonyos immunreaktív tulajdonságok csak az immuncitokémiai módszerekkel egyedileg azonosított sejtekben voltak észlelhetők. Vizsgálataink azt mutatták, hogy kezeletlen (kontroll) és különböző anyagokkal kezelt mikroglia-dúsított másodlagos tenyészetekben (subDIV7) a CD11b/c jelölt mikroglia sejtekben a H3K9me3 immunpozitivitása az LPS kezelést követően a többi csoporthoz viszonyítva megnövekedett.

Noha erős H3K9me3 immunreaktivitást detektáltunk mind a sejtmagban, mind pedig a citoplazmában az LPS kezelést követően, az LPS-t KYNA-val vagy SZR104-gyel kombinálva csökkenést tapasztaltunk. Kvantitatív fluoreszcens mikrodensitometriás módszerek segítségével kimutattuk, hogy a H3K9me3 fehérje akkumulációja az LPS kezelést követően a sejtmagban volt szignifikáns, de LPS + KYNA, illetve LPS + SZR104 kombinált kezelések során ez a felhalmozódás csökkent. A KYNA önmagában nem okozott szignifikáns változást a kontrollhoz viszonyítva. Az SZR104-nek erőteljesebb gátló hatása volt a H3K9me3 extranukleáris transzlokációjára. Hasonló értékeket és tendenciákat fedeztünk fel, amikor a citoplazmatikus H3K9me3-at vizsgáltuk: a KYNA vagy az SZR104 önmagában, illetve az SZR104 LPS-sel kombinálva is, visszaállította az LPS- okozta H3K9me3 fehérje citoplazmatikus akkumulációját. A H3K9me3 citoplazmába való transzlokációjának gátlásában az SZR104 erősebbnek bizonyult, mint a KYNA.

Amikor a H3K36me2 immunreaktivitásának intracelluláris eloszlását mértük CD11b/c jelölt mikroglia sejtekben, az immunjel az LPS kezelést követően a kontroll csoporthoz viszonyítva megnövekedett és kizárólag csak a mikroglia sejtmagjában volt megfigyelhető. Más kezelés nem volt észrevehető hatással a H3K36me2 immunreaktivására, így például az LPS + SZR104 kezelés sem okozott eltérést a sejtmagi H3K36me2 szintjében, a kontroll értékhez volt hasonló. A H3K36me2 immunpozitív jelek kvantitatív mikrodensitometriás

mérése kimutatta, hogy az LPS kezelés drámaian megnövelte a H3K36me2 mennyiségét a CD11b/c jelölt mikroglia sejtmagjában, míg a többi kezelés csak kisebb hatással bírt. Ráadásul a KYNA vagy az SZR104 önmagában, illetve LPS-sel kombinálva a H3K36me2 jelet szignifikánsan csökkentette az LPS kezeléshez viszonyítva. Kísérleteinkben extracelluláris hiszton nem volt detektálható.

5. MEGBESZÉLÉS

Az endogén kinurenin rendszer befolyásolja az immunrendszer működését. Újabb vizsgálatok arról számolnak be, hogy számos, gyulladással kapcsolatos marker fehérje mennyisége a KYNA vagy KYNA analóg kezelést követően lecsökken. A lehetséges szabályozó azIDO, a kinurenin útvonal kulcsenzime, amelynek csak nemrég fedezték fel az immunitásban betöltött fontos modulátor szerepét. Mivel a KYNA, mint az endogén kinurenin rendszer metabolitja, antiinflammatorikus tulajdonságokkal rendelkezik, tudni szeretnénk volna, hogy hatása túlmutat-e az intermediér metabolizmuson vagy az intracelluláris jelátviteli útvonalakon, valamint befolyásolja-e a hiszton metabolizmust és/vagy ezen fehérjék intracelluláris transzportját. Azt kívántuk megvizsgálni, (a) hogyan viselkedik a KYNA és a vér-agy gáton átjutó analógja, az SZR104 mikroglia tenyészetben; (b) hogyan változtatja meg a fagocitotikus aktivitást mikroglia sejtekben kísérleti körülményeink között; (c) hogyan befolyásolják a pro- és antiinflammatorikus jelek a hisztonfehérjék metilációját; és (d) hogyan változik a módosíthatatlan és a metilált hisztonok intracelluláris lokalizációja gyulladást kiváltó vagy gyulladást csökkentő szerek hatására.

Kísérleteinkben elsőként azt vizsgáltuk, hogy a KYNA és az SZR104 rendelkezik-e antiinflammatorikus tulajdonságokkal. Ezt az LPS-kezelésre bekövetkező CXCL10 és CCR1 termelés csökkenésével igazoltuk. Eredményeink megerősítik azokat a korábbi tanulmányokat, amelyek hasonló CXCL10 csökkenést mutattak ki más gyulladáscsökkentő szerekkel kezelt aktivált mikroglia tenyészetekben. Míg a KYNA és az SZR104 kezelés lecsökkenti a LPS- okozta CXCL10 immunreakciót, addig az LPS + SZR104 kombinált kezelés szignifikánsan gátolja a CCR1 immunreaktivitást ebben a kísérletben. A KYNA és az SZR104 strukturális különbsége lehet az oka annak, hogy ezek az anyagok különböző válaszokat váltottak ki a vizsgálatok során. Mivel nagy tisztaságú mikroglia tenyészeteket használtunk, így ez volt az első alkalom, hogy ezekre a vegyületekre mikroglia-specifikus immunválaszokat azonosíthattunk.

A fagocitált mikrogyöngyök száma az LPS-kezelést követően több mint négyszeresére emelkedett, ami valószínűleg a Toll-szerű receptor 4 (TLR4) és a tranziens receptor potenciál

ankyrin 1 és 4 (TRPA1, 4) receptorok stimulálására vezethető vissza. Ezek a receptorok olyan membrán és citoplazmatikus folyamatokban vesznek részt, amelyek fagocitózishoz vezetnek; egyrészt megnövelik a membrán Ca^{++} permeabilitását és a citoplazma kation koncentrációját (TRPA hatás), másrészt szabályozó hatással vannak a génexpresszióra is (TLR4 hatás). A KYNA és az SZR104 kezelés hatására ezeknek a sejteknek az LPS kezelést követően megnövekedik a fagocitotikus aktivitása. Úgy véljük, hogy a KYNA és az SZR104 *in vitro* körülmények között gátolja az LPS hatását, ami elsősorban a TLR4 repressziója révén valósul meg úgy, hogy feloldja a gyulladáshoz kapcsolódó gének szabályozását, megakadályozva ezzel a fagocitózist. Ezen túlmenően a KYNA és az SZR104 közvetlenül elősegíti a gyulladásgátló tumor nekrozis faktor-stimuláló gén-6 (TSG-6) expresszióját, valamint ezzel egyidőben csökkenti a tumor nekrozis faktor- α (TNF- α) termelést monocita sejt kultúrákban. Ez a jelenség valószínűleg a citoplazmatikus aril-hidrokarbon receptoron keresztül valósul meg, mivel az irodalomban található kísérleti bizonyítékok arra utalnak, hogy a KYNA az aril-hidrokarbon receptor-asszociált (AHR) jelátviteli útvonal endogén ligandja és mieloid sejtekben az AHR jelúton gátolja a fagocitózist.

A KYNA és az SZR104 erős gyulladáscsökkentő hatása mind a gyulladással marker fehérjékre, mind a hiszton metilációs markerekre hatással volt mikroglia-dúsított kultúrákban. Kimutattuk, hogy a KYNA és az SZR104 hatására az LPS kezelést követően a H3K9me3 és a H3K36me2 immunreaktivitása visszatér a kontroll (kezeletlen) szintre. Eredményeink arra utalnak, hogy LPS kezelés után a metilált H3K9 fehérjék sejtmagból történő citoplazmatikus transzlokációja a mikroglia immunstresszre adott sejt válasza. A metilált hisztonok ilyen transzlokációját a KYNA és az SZR104 csökkentheti vagy gátolhatja; ez megerősíti ezeknek a szereket a gyulladáscsökkentő hatását a mi kísérleti elrendezésünkben. Azt is megfigyeltük, hogy a KYNA és az SZR104 eltérő hatással van a citoplazmatikus H3 lokalizációjára: az LPS + KYNA hatására megnövekszik, míg LPS + SZR104 hatására visszaáll a citoplazmatikus H3 fehérje szintje a kontroll értékre. A KYNA és az SZR104 eltérő hatásai mögött meghúzódó részletes molekuláris mechanizmusokat még nem ismerjük.

A hisztonok alapvető strukturális és funkcionális komponensei a kromatinnak. Ezek a fehérjék tipikusan a sejtmagban helyezkednek el, de extranukleáris és extracelluláris funkcióval is rendelkeznek. Az extracelluláris hisztonok hozzájárulnak például a bakteriális fertőzést követő endotél diszfunkcióhoz, veseelégtelenséghez, illetve szepszis során bekövetkezett halálhoz. Korábbi tanulmányok leírták a hisztonok citoplazmatikus akkumulációját is bizonyos patológiás állapotokban. LPS általi mikroglia aktivációban a DNS sérül és a genom instabilitása figyelhető meg.

A hisztonok PTM-ainak változása egy fontos folyamat része, amely különböző celluláris funkciókat befolyásol, többek között szabályozza a transzkripciót, a génexpressziógátlást és az immunitást is. A metilációs helyek befolyásolják például az epigenetikai faktorok kötődését a hiszton farkakhoz, amelyek megváltoztatják a DNS-nek a hisztonfehérjékkel történő interakcióját és az aktivált DNS-ben lévő gének elérhetőségét. Korábbi irodalmi adatok szerint neuronális kultúrában három, a triptofán metabolikus útból származó metabolitot találtak (kinurenin, 3-OH-kinurenin és antranilát), amelyek a H3K4 trimetilációt megnövelték, fokozva ezáltal a génexpressziót a hippocampusban (kivéve a pán-neuronális kódoló markereket). Dimetilált és trimetilált H3K9 helyek, azaz transzkripcionálisan represszív markerek gyakrabban találhatók meg csendesített géneknél és jellemzők a heterokromatikus régiókra. A H3K9me3 szerepet játszik a kromatin felnyitásban a gyulladásszerű gének promótereinél, de kezelés-rezisztens tumorok esetében is ezek szignifikánsan megnövekedett szintjét figyelték meg. A magas glükóztartalom mellett tenyésztett makrofág kultúrákat a fiziológias mennyiségű glükózt tartalmazó tenyészetekkel összehasonlítva azt láthatjuk, hogy a citokin gének expressziója megnövekedett és a H3K9me3 szintje lecsökkent. Adataink szerint a módosíthatatlan H3 hiszton fehérjék és a gyulladásszerű marker fehérjék (például a CXCL10 és a CCR1) expresszióját valószínűleg egymástól függetlenül más pro- és antiinflammatorikus anyagok szabályozzák, illetve a hisztonfehérjék és a metilált formáik szubcelluláris lokalizációját – még azonosíthatatlan mechanizmusok révén – mind a pro-, mind az antiinflammatorikus szerek befolyásolhatják.

Kísérleti eredményeinket korábbi irodalmi adatok is alátámasztják:

1) A KYNA és az SZR104 gyulladáscsökkentő hatása csökkentheti a TNF- α termelődését és növelheti a TSG-6 expresszióját, míg az interleukin-1 β szintet szépszisben megemelheti. Megjegyzendő, hogy azIDO-nak, a kinurenin jelút egyik kulcsenzimének az immunitásban betöltött szerepére csak nemrégiben derült fény, tovább hangsúlyozva ennek a rendszernek az immunmoduláló funkcióban betöltött egyre fontosabb szerepét.

2) Az SZR104 és a KYNA által okozott mikroglia fagocitózis gátlás az AHR útvonalon keresztül valósulhat meg, ami TLR4 expresszió csökkenést okozhat, citoskeletális változásokat indukálhat vagy az NF- κ B jelátviteli útvonalat módosíthatja.

3) A hiszton metilációs módosítások változásai a gyulladásszerű válaszok szabályozásában fontos folyamatnak tekinthetők, mivel elnyomják a gyulladásszerű fehérjék szintézisét. A hisztonok citoplazmatikus felhalmozódása figyelhető meg számos patológiai állapotban (például mint apoptózis prekurzor). Az LPS-sel aktivált mikrogliaokban például DNS sérülés vagy genom instabilitás figyelhető meg.

Összefoglalva, a H3 hiszton lizin helyei alapvető epigenetikai markerek a gyulladásos állapotokban. A KYNA és analógja, az SZR104 hatással vannak a KYNA jelátviteli útvonalakra, amelyek potenciálisan csökkenthetik a neuroinflammációt és elősegíthetik az antiinflammatorikus hatásokat. Eredményeink alátámasztják az endogén KYNA gyulladáscsökkentő hatásairól szóló korábbi tanulmányokat és felvetik annak a lehetőségét, hogy az újonnan tervezett KYNA analógok, amelyek áthatolnak a vér-agy gáton, epigenetikailag befolyásolhatják a génexpressziót azáltal, hogy aktiválják a gyulladáscsökkentő mechanizmusokat. Eredményeink ezért hozzájárulhatnak a KIR-t célzó gyulladáscsökkentő gyógyszerek fejlesztéséhez.

6. A TANULMÁNY FŐBB MEGÁLLAPÍTÁSAI

- 1) A KYNA és a KYNA analóg SZR104 erős antiinflammatorikus tulajdonságokkal rendelkezik, amit az LPS-kezelés hatására lecsökkenő CXCL10 és CCR1 termelés bizonyít mikrogliadúsított tenyészetekben. Míg a KYNA és az SZR104 egyaránt csökkentette az LPS által kiváltott CXCL10 növekedést, addig csak az LPS + SZR104 kombinált kezelés járt szignifikáns gátló hatással a CCR1 immunreaktivitásra.
- 2) A KYNA és az SZR104 további gyulladáscsökkentő hatását bizonyította, hogy gátolta az LPS kezelés hatására megnövekedett fagocitotikus aktivitást mikrogliasejtekben *in vitro*.
- 3) A KYNA és az SZR104 az LPS kezelést követően visszafordította a H3K9me3 és a H3K36me2 immunreaktivitását a kontroll, kezeletlen kultúrákban található szintre.
- 4) Az LPS kezelés által kiváltott celluláris válasz következtében a metilált H3K9 fehérjék citoplazmatikusan transzlokálódtak a sejtmagból; ezt a hatást csökkentette vagy gátolta a KYNA és az SZR104.
- 5) A KYNA és az SZR104 eltérő hatást váltott ki a H3 citoplazmatikus lokalizációjára: az LPS + KYNA növelte, míg az LPS + SZR104 kezelés a kontroll értékre állította vissza a citoplazma H3 szintjét.

7. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani PhD mentoromnak, Dr. Gulya Károly professzor úrnak a személyes útmutatásaiért, a szakmai tanácsaiért és a kutatói munkám folyamatos támogatásáért.

Szívből jövő köszönetemet fejezem ki a Sejtbiológia és Molekuláris Medicina Tanszék minden dolgozójának az ösztönző tudományos megbeszélésekért. Köszönetemet szeretném kifejezni kollégáimnak a gyümölcsöző eszmecsereért, biztatásukért és támogatásukért.

Szeretném megköszönni Dr. Fábián-Dulka Karolinának és Dr. Szabó Melindának a folyamatos támogatásukat, tanácsaikat és biztatásukat.

Szeretném kifejezni legmélyebb hálámat családomnak érzelmi támogatásukért, feltétel nélküli szeretetükért és azért, hogy mindig mellettem álltak.

Ezt a tanulmányt az Európai Kohéziós Alapok forrásaiból a Nemzeti Fejlesztési Minisztérium finanszírozta (GINOP 2.3.2-15-2016-00030 és 2.3.2-15-2016-00034). Munkámat az SZTE SZAOK Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola ösztöndíjjal is támogatta. A finanszírozók nem vettek részt a tanulmány megtervezésében, az adatok gyűjtésében és elemzésében, a publikálás döntési folyamataiban vagy a tézis előkészítésében.

8. TÁRSSZERZŐI LEMONDÓ NYILATKOZAT

Alulírott társszerzők kijelentik, hogy Biróné Lajkó Noémi PhD értekezésének tézispontjaiban bemutatott – közösen publikált – tudományos eredmények elérésében a pályázónak meghatározó szerepe volt, ezért ezeket a téziseket más a PhD fokozat megszerzését célzó minősítési eljárásban nem használta fel, illetve nem kívánja felhasználni.

A pályázó tézispontjaiban érintett, közösen publikált közlemény:

Dulka K, Nacsa 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.

Szeged, 2022. június 15.



Dr. Dulka Karolina, társszerző



Dr. Nacsa Kálmán, társszerző



Dr. Gulya Károly, társszerző