

A HSPB1 neuroinflammációban betöltött moduláló szerepének vizsgálata transzgenikus egérmodellben

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

Dukay Brigitta Dóra

Témavezetők: Dr. Sántha Miklós, DSc, tudományos tanácsadó

Dr. Tóth E. Melinda, PhD, tudományos munkatárs



ELKH Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Biokémiai Intézet

Biológia Doktori Iskola

Szegedi Tudományegyetem

Természettudományi és Informatikai Kar

2021

Szeged

Bevezetés

A neuroinflammáció, azaz a központi idegrendszer gyulladással járó folyamata kulcsfontosságú szerepet játszik a legtöbb agyat érintő akut és krónikus megbetegedés patofiziológiájában. A gyulladás egy nagyon sokrétű folyamat, amelynek alapjául a fokozottan termelődő citokinek, kemokinek és egyéb gyulladással járó mediátorok szolgálnak, de emellett magába foglalja a mikroglia sejtek aktivációját, a reaktív asztrogliózist és a perifériás immunsejtek infiltrációját is. A központi idegrendszeri gyulladás az agyszövet első védelmi vonalaként funkcionál, azonban a túlzott, krónikussá vagy szabályozatlanná vált gyulladás másodlagos károsodáshoz vezethet.

Az evolúciósan konzervált hősokkfehérjék a sejteken belül elsősorban molekuláris chaperonként funkcionálnak, és hozzájárulnak a sejt fehérje homeosztázisának fenntartásához. A sejtet ért károsító hatásokra gyorsan indukálódnak, szintézisük fokozódik, és védik a sejtet a károsító folyamatokkal szemben. A hősokkfehérjék számos ponton képesek beavatkozni a gyulladást okozó és a gyulladást csökkentő folyamatok szabályozásába is. Az újonnan szintetizált intracelluláris hősokkfehérjék a jelátviteli útvonalak komponenseivel kölcsönhatva modulálják a gyulladással járó mediátorok felszabadulását. A sejtet ért stressz hatására azonban a hősokkfehérjék kikerülhetnek az extracelluláris térbe is. Nagymértékű károsodás során passzívan szabadulnak fel a nekrotikus sejtekből, és egy erős gyulladást okozó hatást indukálhatnak. Enyhe stressz esetén viszont aktív szekrécióval jutnak ki a sejtéből lizoszómák, illetve exoszómák segítségével. Ha ezek a vezikulák a sejtet kívül felrepednek, akkor a hősokkfehérjék a sejt felszíni immunreceptorokon keresztül fejtik ki hatásukat, ha viszont összeolvadnak a sejtmembránnal, akkor az intracelluláris útvonalakon hatnak.

Az agyban a HSPB1 konstitutívan expresszálódik, de az egyes sejttípusok között eltérések lehetnek. Szakirodalmi adatok alapján a HSPB1-et elsősorban az asztrocita sejtek termelik, a neuronokban kisebb mértékben van jelen, míg a mikroglia sejtekben csak csekély expressziót mutat. A HSPB1 jól ismert chaperon funkciója mellett számos olyan folyamatban vesz részt, amelyek szoros összefüggésben állnak a neuroinflammációval. Képes hozzákötödni például a sejtvázkötő filamentumokhoz, amely nem csak a sejtek stressz elleni védekezésében lehet meghatározó, de a gliasejtek aktivációját is nagymértékben befolyásolhatja. A gyulladást gyakran kíséri neurodegeneráció, azonban a HSPB1 apoptózist gátló szerepét már többféle károsító hatást követően bizonyították. 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, ugyanis a sejt típusától vagy a sejt állapotától függően eltérő hatásokat válthat ki. Számos tanulmány igazolja a HSPB1 immunregulációs szerepét, azonban az adatok nagy része vagy perifériás gyulladáshoz kapcsolódik, vagy neuroinflammáció esetén a legtöbb kísérletet sejtenyészetekben hajtották végre, így arról, hogy a HSPB1 milyen szerepet tölt be a központi idegrendszeri gyulladásban *in vivo*, kevés adat áll rendelkezésünkre.

Célkitűzések

Csoportunk korábban igazolta a humán HSPB1 túltermelő transzgenikus egerekben a hHSPB1 védő hatását akut és krónikus idegrendszeri károsodások során egyaránt. Mivel ezen betegségekben központi szerepet játszanak a gyulladáshoz vezető 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
- 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 sejt típusai felelősek?

- a) Mely sejt típus a fő citokin forrás?
- b) Az extracelluláris vagy az intracelluláris hHSPB1 játszik-e szerepet a gyulladáshoz vezető folyamatok szabályozásában?
- c) Hogyan változik az egyes sejt típusokban a hHSPB1 expressziós mintázata kezelést követően?

A 2. kérdés megválaszolásában Prof. Dr. Deli Mária és a Biológiai Barrierék Kutatócsoport (SZBK Biofizikai Intézet) nyújtott segítséget.

Alkalmazott módszerek

In vivo kísérletek

- Akut etanol kezelés: hét napos hHSPB1 túltermelő transzgenikus, illetve vad típusú egerek szubkután injektálása 2x2,5g/ttkg etanollal vagy fízíológíás sóoldattal
- DNS tisztítás transzgenikus egerek farokmintáíból, és a hHSPB1 transzgén jelenlétének kimutatása PCR analízissel
- Fehérjetisztítás és a hHSPB1 fehérje mennyiségi vizsgálata Western-blot analízissel
- Totál RNS izolálás és reverz transzkripció teljes agy homogenizátumból, majd a hHSPB1, a citokinek, valamint a mikroglia és az asztrocita marker gének elemzése RT-PCR segítségével
- A sejtpusztulás kvantifikálása TUNEL-próba segítségével
- A hHSPB1 sejtspecifikus kifejeződésének vizsgálata fluoreszcens immunhisztokémia segítségével
- A hHSPB1 agyi expressziós szintjének, valamint a mikroglia és az asztrocita sejtek aktiválódásának tanulmányozása peroxidázos immunhisztokémia segítségével

In vitro kísérletek

- Primer sejt kultúrák készítése hHSPB1 túltermelő transzgenikus és vad típusú állatok agyából
- Az izolált primer sejttenyészetek tisztaságának meghatározása fluoreszcens immunfestéssel

- A primer sejtek életképességének vizsgálata (valós idejű impedancia mérés, Resazurin-próba, sejtmagszámolás)
- A primer sejt kultúrák kezelése etanollal és citokinekkal
- A hHSPB1 intracelluláris szintjének elemzése fluoreszcens immunfestéssel
- A primer sejt kultúrák által a felülszóba felszabadított hHSPB1 és TNF α fehérjék koncentrációjának vizsgálata ELISA segítségével

Eredmények

In vivo eredmények

1. Kísérleteink során mRNS és fehérje szinten is igazoltuk, hogy a transzgenikus kontroll állatok agyában megfigyelhető magas szintű hHSPB1 expresszió tovább emelkedett etanol kezelés hatására. Kimutattuk, hogy a transzgenikus fehérjét elsősorban az asztrociták és a neuronok termelik, míg a mikroglia sejtekben csak ritkán figyeltünk meg kettős jelölődést.

2. A korai posztnatális etanol-expozíciós modellünkben a gyulladásozó folyamatok már 7 órával etanol kezelést követően megkezdődtek:

- a *Tnf* expressziója szignifikáns növekedést mutatott, amelynek szintje szignifikánsan magasabb volt a hHSPB1 túltermelő egerekben, mint a vad típusú alomtársaikban.

3. Kísérleteink során a legerősebb gyulladásozó választ 24 órával etanol kezelés után figyeltük meg, amikor intenzív gyulladás és sejtpusztulás volt megfigyelhető az állatok agyában:

- a gyulladásozó citokinek (*Tnf*, *Il1b*) expressziósozó szintje etanol kezelés hatására a vad típusú állatokban nagyjából kétszeresére emelkedett, míg a hHSPB1 túltermelés etanol kezeléssel kombinálva többszörösére emelte az összes vizsgált gyulladásozó citokin szintjét, tehát egy sokkal intenzívebb reakciósozó váltott ki, mint önmagában az etanol kezelés.
- 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 a gyulladásozó (*Cd68*) és a gyulladásozó (*Arg1*) mikroglia markerek

expressziós változásai is, ugyanis etanol kezelésre adott válaszként a hHSPB1 túltermelő állatokban mindkét marker expressziós szintje szignifikánsan magasabb volt a vad típusú állatokhoz képest.

- az asztrocita marker *Gfap* expressziós szintje is nagymértékben megemelkedett etanol kezelés hatására, és szignifikánsan magasabb volt a hHSPB1 túltermelő állatok agyában a vad típusú állatokhoz viszonyítva. Ebben az időpontban morfológiai változást az asztrocitáknál nem detektáltunk.
- a hHSPB1 túltermelő transzgenikus egerek agyában megfigyelt fokozottabb gyulladási válasz nem okozott nagyobb mértékű sejtpusztulást.

4. Egy héttel etanol kezelést követően megkezdődött a gyulladási folyamatok csillapodása:

- a gyulladáskeltő citokinek szintje, valamint a mikroglia és az asztrocita markerek expressziója mindkét genotípusban a kontroll csoporthoz hasonló szintre csökkent vissza.
- a mikroglia sejtek mindkét genotípus esetén a nyugalmi állapotukra jellemző morfológiát mutattak, és eloszlásuk egyenletes volt az egész agyban.
- 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 mikrogliaéhoz 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 eredmények

- A primer sejt kultúrák tisztaságának ellenőrzése során a mikroglia tenyészet 93%-os, az asztrocita tenyészet 78%-os, a neuron tenyészet pedig 85%-os tisztaságúnak bizonyult.
- A primer sejt kultúrákból nem szabadult fel detektálható mennyiségű hHSPB1 fehérje sem kontroll körülmények között, sem citokin, illetve etanol kezelést követően.
- A primer sejtek közül az asztrociták és a neuronok bizonyultak az elsődleges hHSPB1 expresszáló sejteknek:
 - a primer neuronok intracelluláris hHSPB1 szintje sem etanol, sem citokin kezelés hatására nem változott meg szignifikáns mértékben.
 - a primer transzgenikus asztrociták nagymértékű hHSPB1 expresszió emelkedést mutattak, ugyanis citokin kezelést követően a kontroll sejtekhez képest majdnem ötszörösére emelkedett a hHSPB1 expresszió mértéke, míg etanol kezelés után duplájára nőtt.
- A TNF α fő forrásai a mikroglia sejtek voltak.
- A hHSPB1 túltermelés gyulladásozó körülmények között szignifikáns mértékben modulálta a gliasejtek TNF α termelését:
 - citokin kezelést követően a primer mikroglia tenyészetek közül csak a hHSPB1 transzgenikus egerekből származó sejtek TNF α termelése nőtt meg szignifikáns mértékben a kontroll sejtekhez képest, míg a vad típusú sejtekre nem volt hatással.
 - a primer asztrociták esetén éppen ellenkezőleg, a vad típusú sejtek TNF α termelését indukálta a gyulladásozó környezet, és a transzgenikus sejtekre nem volt hatással.
 - a primer mikroglia és asztrocita sejtek esetében is szignifikáns különbség alakult ki citokin kezelés után a két genotípus között.

Diszkusszió

Eredményeink alapján elmondható, hogy a hHSPB1 túltermelés szerepet játszik az akut neuroinflammáció szabályozásában. Nevezetesen, a hHSPB1 túltermelés modulálta az etanol által kiváltott gyulladós folyamatokat, ami a gyulladáskeltő citokinek magasabb expressziójában, valamint a mikroglia és asztrocita sejtek fokozottabb 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. Ugyanakkor a gyulladásgátló mikroglia marker fokozottabb expressziója a transzgenikus állatokban arra enged következtetni, hogy a hHSPB1 kedvező, gyulladásgátló folyamatokat is indukál. Továbbá, a hHSPB1 transzgenikus egerekben a vad típusúakhoz hasonlóan lecsökkent a gyulladás mértéke egy héttel a kezelést követően, ami arra utal, hogy a hHSPB1 túltermelés a gyulladás akut fázisát erősíti fel, és nem fordítja át krónikus jellegűvé. *In vitro* kísérleteink alapján azt feltételezzük, hogy az általunk használt modellben a hHSPB1 intracelluláris formája lehet felelős a megfigyelt gyulladásszabályozó hatásokért. A hHSPB1 elsősorban az asztrocita sejteken keresztül fejtethette ki moduláló hatásait, ugyanis szakirodalmi adatok alapján a primer asztrocitákban a magas intracelluláris hHSPB1 szint közvetlenül befolyásolhatja a TNF α felszabadítást, míg a primer mikroglia sejtek esetén egy közvetett hatásról lehetett szó. A magas gyulladáskeltő citokin szint fő forrásai a mikroglia sejtek lehetnek. Összességében a dolgozat által bemutatott adatok hozzájárulnak a hHSPB1 központi idegrendszeri gyulladásban betöltött szabályozó szerepének jobb megismeréséhez, hogy ezáltal a HSPB1 potenciális terápiás célponttá válhasson a gyulladással járó központi idegrendszeri betegségek kezelésében.

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, Livia Fülöp, Botond Penke, László Vigh, 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.
IF₂₀₁₉: 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* 12: 380. DOI: [10.3389/fncel.2018.00380]
IF₂₀₁₈: 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

Társszerzői nyilatkozat

Mint az alábbi közlemények felelős szerzője nyilatkozom, hogy Dukay Brigitta Dóra doktorjelölt, mint elsőszerző jelentős mértékben hozzájárult az alábbi tudományos publikációk létrehozásához. Kijelentem, hogy a Jelölt által a tézisben közölt kísérleti eredményeket a társszerzők tudományos fokozat megszerzéséhez nem használták fel, és ezt a jövőben sem fogják megtenni.

3. **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, Livia 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>
4. **Brigitta Dukay***, Bálint Csoboz*, Melinda E. Tóth. (2019) Heat Shock Proteins in Neuroinflammation. *Frontiers in Pharmacology* 10:920. DOI: 10.3389/fphar.2019.00920.

Szeged, 2021.02.25.

.....

Tóth E. Melinda
tudományos munkatárs