

A DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**A Hsp27 neuroprotektív szerepének
tanulmányozása transzgenikus egerekben**

TÓTH ERZSÉBET MELINDA

Témavezető: Dr. Sántha Miklós

MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont
Biokémiai Intézet

Biológia Doktori Iskola
Szegedi Tudományegyetem
Természettudományi és Informatikai Kar

2012

Szeged

Bevezetés

A stresszfehérjék, másnéven hősokkfehérjék az élővilágban általánosan elterjedt, evolúciósan konzervált fehérjék, amelyek *chaperon* funkcióval rendelkeznek. A sejteket ért legkülönbözőbb stresszhatások aktiválhatják a hősokkfehérjéket, például hipoxia, ischémia, nehézfém vagy etanol kezelés, de fertőzések során és egyéb betegségekben is megnőhet az expressziójuk. A 27 kDa nagyságú Hsp27 a kismolsúlyú hősokkfehérjék családjába tartozó fehérje. A Hsp27 egyik legfontosabb tulajdonsága, hogy képes hozzákötődni a hibás szerkezetű, instabil fehérjékhez, ezáltal megakadályozza, hogy azok egymással kapcsolódva aggregátumokat képezzenek, ezzel együtt biztosítja annak lehetőségét, hogy térszerkezetük a későbbiekben helyreálljon. A kismolsúlyú hősokkfehérjéknek ezen kívül anti-apoptotikus és oxidatív stresszt csökkentő tulajdonságai is vannak, a membránok működésében és védelmében is szerepet játszanak, valamint a sejtvázhoz kapcsolódva stabilizálhatják azt.

Az Alzheimer-kór az egyik leggyakoribb neurodegeneratív betegség, előfordulásának esélye az életkorral arányosan nő. Jellemző tünetei a memória és a kognitív funkciók folyamatos romlása, amiloid plakkok és neurofibrilláris kötegek kialakulása, szabadgyökök termelődése, végül az idegsejtek pusztulása. A plakkok fő alkotóeleme az A β [1-42] peptid, egy 4 kDa nagyságú polipeptid, ami az amiloid prekursor proteinekből (APP) keletkezik β - és γ -szekretázok proteolitikus hasítása által. Az A β szerkezetében bekövetkező konformációs változások a fehérje aggregációjához

vezethetnek, így oligomerek, protofibrillumok, érett fibrillumok alakulhatnak ki. Az A β aggregációja különböző útvonalakon keresztül okozhatja az idegsejtek pusztulását, és központi szerepet játszik az Alzheimer-kór tüneteinek kialakulásában. Ezért a sejtek azon elemei, amelyek részt vesznek az amiloid termelődésében, lebontásában vagy oligomerizációjában, jó célpontok lehetnek olyan szerek kifejlesztése során, amelyek az Alzheimer-kór megelőzését célozzák. Ismert, hogy a stresszfehérjék termelődése fokozódik különböző neurodegeneratív betegségekben, így védve meg az idegsejteket az oxidatív stressz, a szabadgyökök és a rendellenes szerkezetű fehérjék okozta károsodástól. Az Alzheimer-kórban a hősokkfehérjék az amiloid plakkokhoz és a neurofibrilláris kötegekhez kapcsolódva mutathatók ki, és több tanulmány szerint a stresszfehérjék képesek megakadályozni az A β felhalmozódását és aggregációját.

Az alkoholfogyasztás gyakorlatilag az összes szervre hatással van, közöttük az agy működésére is. Az etanol számos citotoxikus hatással rendelkezik, melyek nagy része sejttípustól független. Befolyásolja többek között a membránlipidek állapotát, denaturálja a fehérjéket, hatására megemelkedik a reaktív oxigén gyökök termelődése, ami lipidperoxidációhoz vezethet. Az etanol közvetlenül is kapcsolódhat membránfehérjékhez, így megváltoztatva azok konformációját, ami azután az egyes fehérjék funkciójának megváltozásához vezet. Ezen kívül számos tanulmány bizonyítja, hogy az etanol hatására csökken a membrán rendezettsége, nő a fluiditása, ami viszont hatással lehet a különböző

receptorok és ioncsatornák működésére, és így befolyásolhatja az egyes jelátviteli folyamatokat az agyban. A hősokk és az etanol kezelés által kiváltott stresszválasz több hasonlóságot mutat. Mindkét hatás károsítja a membránokat, denaturálja a fehérjéket, és hasonló változásokat okoznak a membránok fehérjeösszetételében. Mivel hasonló károsodásokat okoznak, feltételezhető, hogy a stresszfehérjék etanol kezelés során is védelmet biztosítanak. Több tanulmány kimutatta, hogy az etanolkezelés hatására indukálódott hősokkfehérjék kapcsolatban állnak a megnövekedett alkohol tolerancia kialakulásával baktériumokban.

Célkitűzések

Munkánk során arra kerestük a választ, hogy a Hsp27 fehérje rendelkezik-e neuroprotektív hatással 1) akut illetve krónikus etanol kezelés esetén, valamint 2) az Alzheimer-kór során kialakuló neurodegenerációval szemben. Ennek érdekében a következő feladatok megvalósítását tűztük ki célul:

1a) Humán Hsp27 fehérjét túlteremlő transzgenikus egértörzs létrehozása.

1b) Transzgenikus és vad típusú egércsoportok akut etanol kezelése.

1c) Mozgáskoordináció és ataxia vizsgálata magatartás tesztekkel az etanol kezelést követően.

1d) Transzgenikus és vad típusú egércsoportok krónikus etanol kezelése.

1e) Ezt követően idegsejt elhalás vizsgálata Flouro-JadeC festéssel.

2a) A Hsp27 transzgenikus egértörzs keresztezése az Alzheimer-kór validált állatmodelljével (APP^{swe}/PSE1dE9).

2b) Tanulási folyamatok vizsgálata magatartás tesztekkel Hsp27xAD modell transzgenikus egerekben.

2c) Amiloid plakkok festése, és mennyiségi összehasonlítása a különböző genotípusú állatokban.

2d) Elektrofiziológias vizsgálatok.

2e) Apoptózis és neurodegeneráció vizsgálata immunhisztokémiai módszerekkel.

Alkalmazott módszerek

- Rekombináns DNS technikák
- Pronukleusz mikroinjekció
- DNS tisztítás és polimeráz láncreakció (PCR)
- Fehérjetisztítás és Western blot analízis
- Fagyasztott metszetek készítése
- Immunhisztokémia
- Flouro-JadeC festés
- Viselkedési tesztek
- Elektrofiziológiai mérések hippocampusz szeleteken

Eredmények

Munkánk során előállítottuk a humán Hsp27 fehérjét túltermelő transzgenikus egértörzset, amely segítségével *in vivo* vizsgáltuk a Hsp27 neuroprotektív szerepét. Első lépésben a Hsp27 etanol kezeléssel szemben kifejtett védő hatását teszteltük. Az állatokat intraperitoneális etanol injekciót követően különböző magatartás teszteknek vetettük alá. A tesztek során azt tapasztaltuk, hogy az etanol kezelés hatására romlott az egerek egyensúlyérzéke és mozgáskoordinációs képessége, de a Hsp27 túltermelő állatok jobban teljesítettek a tesztek során a vad típusúakkal összehasonlítva. A magatartás tesztek után az állatok ivóvizét öt hétig 20%-os etanollal helyettesítettük, majd Fluoro-JadeC festéssel meghatároztuk az elhalt idegsejtek számát. Azt találtuk, hogy a krónikus etanol kezelés hatására megnőtt az elhalt idegsejtek száma, de a Hsp27 túltermelő állatokban ez szignifikánsan kisebb volt, mint a vad típusban. A fenti kísérletekből arra következtethetünk, hogy a Hsp27 fehérje védő hatással rendelkezik az etanol egyensúlyt és mozgáskoordinációt károsító, valamint idegsejt pusztulást kiváltó tulajdonságival szemben.

Következő lépésben a Hsp27 túltermelő egértörzset az Alzheimer-kór validált állatmodelljével összekeresztelve előállítottuk az APP^{swe}/PS1^{dE9}/Hsp27 egértörzset, ami segítségével azt vizsgáltuk, hogy a Hsp27 képes-e lassítani az Alzheimer-kór tüneteinek kialakulását. Az állatok memóriáját, tanulási képességeit különböző magatartás tesztekkel vizsgáltuk. A kísérletek során azt

tapasztaltuk, hogy az AD modell állatok rosszabbul teljesítettek a vad típushoz képest, de a túltermelt Hsp27 hatására javult az AD modell állatok tanulási képessége. A magatartás tesztek után az állatok agyában immunhisztokémiai festések segítségével meghatároztuk a képződött amiloid plakkok és az elhalt neuronok számát. Az amiloid plakkok immunhisztokémiai festésével kimutattuk, hogy Hsp27 túltermelő állatokban kevesebb plakk található az AD modell állatokhoz képest. Az elhalt idegsejteket kaszpáz-3 immunfestéssel és Fluoro-JadeC festéssel tettük láthatóvá 7 és 14 hónapos állatok agyában. Megállapítottuk, hogy az idegsejt elhalás mértéke jelentősen megnőtt az életkor előrehaladtával, és 14 hónapos korban ugyan az elhalt neuronok száma kevesebb volt a Hsp27 túltermelő AD egerekben, de ez a különbség nem volt szignifikáns. Az elektrofiziológiás vizsgálatok során megfigyeltük, hogy az AD modell állatoknál károsodott a hosszútávú szinaptikus plaszticitás, valamint az idegi hálózat serkentetősége is megnövekedett, de ezeket az elváltozásokat a Hsp27 fokozott expressziója javítja és helyreállítja. A fenti eredmények arra engednek következtetni, hogy transzgenikus egér modellrendszerünkben a Hsp27 fehérjének szerepe van az Alzheimer-kór kialakulásának lassításában és a tünetek enyhítésében. Adataink szerint a Hsp27-nek elsősorban az A β peptid felhalmozódásának és aggregációjának gátlásában, illetve az A β fokozott degradációjában és eltávolításában lehet fontos szerepe.

Összefoglalás

1. Munkánk során előállítottuk a humán Hsp27 fehérjét túltermelő transzgenikus egértörzset.
2. Kimutattuk, hogy Hsp27 fehérje túltermelésének védő hatása van az etanol egyensúlyt és mozgáskoordinációt károsító tulajdonságával szemben akut etanol kezelés során.
3. Kimutattuk, hogy a Hsp27 fehérje védő hatást fejt ki az etanol által kiváltott idegsejt pusztulással szemben krónikus etanol kezelés során.
4. A Hsp27 túltermelő törzset az Alzheimer-kór validált állatmodelljével összekeresztelve előállítottunk egy többszörösen transzgenikus egértörzset (APP^{swe}/PS1^{dE9}/Hsp27).
5. Viselkedési tesztekkel kimutattuk, hogy a Hsp27 túltermelés hatására javult az AD modell állatok tanulási képessége.
6. Elektrofiziológiás vizsgálatokkal kimutattuk, hogy az AD modell állatoknál károsodott a hosszútávú szinaptikus plaszticitás, valamint megnövekedett az idegi hálózat serkenthetősége, de ezt a Hsp27 túltermelése helyreállítja.
7. Kimutattuk, hogy Hsp27 hatására AD modell állatok különböző agyrégiókban (agykéreg, hippokampusz) szignifikánsan kevesebb amiloid plakk mutatható ki.
8. Megállapítottuk, hogy az elhalt idegsejtek száma ugyan kevesebb volt a Hsp27 túltermelő AD egerekben, mint az AD egerekben, de ez a különbség nem volt szignifikáns.

Közlemények

Toth ME, Gonda S, Vigh L, Santha M. (2010). Neuroprotective effect of small heat shock protein, Hsp27, after acute and chronic alcohol administration. *Cell Stress Chaperones*. 15(6):807-17.

(IF: 3.162)

Toth ME, Szegedi V, Varga E, Juhasz G, Horvath J, Borbely E, Lenart N, Penke B and Santha M. (2012) Overexpression of Small Heat Shock Protein, Hsp27 ameliorates symptoms of Alzheimer's Disease. *Kézirat*

Wang S, **Toth ME**, Bereczki E, Santha M, Guan ZZ, Winblad B, Pei JJ. (2011) Interplay between glycogen synthase kinase-3 β and tau in the cerebellum of Hsp27 transgenic mouse. *J Neurosci Res*. 89(8):1267-75.

(IF: 2.985)

Csont T, Gorbe A, Bereczki E, Szunyog A, Aypar E, **Toth ME**, Varga ZV, Csonka C, Fulop F, Santha M, Ferdinandy P. (2010) Biglycan protects cardiomyocytes against hypoxia/reoxygenation injury: role of nitric oxide. *J Mol Cell Cardiol*. 48(4):649-52.

(IF: 5.499)

Poszterelőadás:

Toth ME, Gonda S, és Santha M. (2009) *A Hsp27 neuroprotektív szerepe akut és krónikus etanoladagolás után*. MBKE 2009.évi Vándorgyűlése, Budapest