

Hiperlipidémia okozta neurodegeneratív és vér- agygát- elváltozások ApoB-100 transzgenikus egerekben

Lénárt Nikolett

Doktori (Ph. D.) értekezés tézisei

Témavezető: **Dr. Sántha Miklós**
tudományos főmunkatárs



Szegedi Tudományegyetem, Természettudományi és Informatikai

Kar, Biológia Doktori Iskola

MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Biokémia Intézet



2014
Szeged

Bevezetés

Az utóbbi évtizedekben számos olyan klinikai tanulmány született, amely a hiperlipidémia (elsősorban a hiperkoleszterinémia) és az időskori kognitív károsodással járó kórképek (demenciák) közötti összefüggés megértését célozta. A neurovaszkuláris szemlélet kialakulásával a demenciák pathomechanizmusának vaszkuláris aspektusára helyeződött a hangsúly, ezáltal a hiperlipidémia okozta cerebrovaszkuláris elváltozások vizsgálata is előtérbe került. Az időskori demencia és kognitív hanyatlás gyakran vaszkuláris eredetű és az esetek többségében diszlipidémiával és atherosclerosissal jár. A betegség hátterében stroke, trauma, agyvelőgyulladás, magas vérnyomás, cukorbetegség, elhízás vagy magas koleszterinszint áll. A magas szérum-LDL-koleszterinszint érlemeszesedéshez, hosszú távon pedig szívelégtelenséghez vezet. A VLDL és LDL molekulák fő apoprotein komponense az ApoB-100.

Munkánk során a hiperlipidémia és a neurodegeneráció közötti kapcsolatot vizsgáltuk a humán ApoB-100 fehérjét overexpresszáló transzgenikus egerek segítségével. Ez az egértörzs lipidekben gazdag diétán tartva az atherosclerosis egyik validált modellje. Korábban csoportunk is előállította ezt a törzset, és kimutatta, hogy a transzgenikus egerek normál tápon tartva magas szérumtriglicerid-szinttel, koleszterindús tápon tartva magas szérumkoleszterin-szinttel rendelkeznek, ami megnövekedett oxidatív stresszhez, és lipidperoxidáció kialakulásához vezet, továbbá az állatok agykérgében a membrán-kötött APP mennyisége jelentősen megnő. Normál tápon tartott transzgenikus egerekre hipertrigliceridémia, kiterjedt kortikális, neuronális apoptózis, és ennek következtében az agykamrák nagymértékű tágulata jellemző. Indukált ischemiás körülmények között az agyi mikroerek denzitásának jelentős csökkenése, illetve ezt kompenzáló a kapillárisok átmérőjének növekedése tapasztalható.

Célkitűzés

Munkánk során a hiperlipidémia és a neurodegeneráció közötti kapcsolatot vizsgáltuk hipertrigliceridemiás hApoB-100 transzgenikus egerek segítségével. Feltételezésünk szerint a tartós hiperlipidémia nem csak a kardiovaszkuláris, hanem a cerebrovaszkuláris rendszert is érinti, ott is érkárosodást indukál. Az endothel károsodás következtében fellépő hipoperfúzió és ischemia oxidatív stresszt okoz, ami a vér-agy gát integritásának sérüléséhez vezet. Ezek az elváltozások a neurodegeneratív folyamatok elindításának irányába hatnak, amelyek szinaptikus és neuronális diszfunkcióban, végül neuronális apoptózisban manifesztálódnak.

Munkánk során a következő kérdésekre kerestük a választ:

- Milyen hatással van a krónikus hipertrigliceridémia az agyi lipidmetabolizmusra?
- Mik a hiperlipidémia következtében kialakuló neurodegeneratív elváltozások főbb jellemzői?
- Milyen hatása van a hiperlipidémianak a vér-agy gát funkcióra?
- Hogyan modellezhetjük a hiperlipidémia hatására *in vivo* kialakult endothel diszfunkciót *in vitro* a vér-agy gát izolált primer sejttypusain (endothel, astrocyta, pericyta)?

Alkalmazott módszerek

- Kolorimetriás szérumtriglicerid-szint mérés
- Lipid festések agyszöveten: Nílus vörös, illetve Flipin festés
- Hisztológiai vizsgálatok agyszöveten: Immunhisztokémia, Kongó vörös festés, Fluoro-Jade C festés, Golgi-Cox ezüstimpregnáció
- Szemi-kvantitatív, illetve kvantitatív western blot kortikális mintákon
- Elektrofiziológiai mérések (PPF, LTP) túlélő agyselejteken
- *In vivo* vér-agy gát funkció vizsgálat (parenchimális Na-fluoreszcein és Evans-kék permeabilitás)
- Génexpressziós vizsgálatok kortikális mikroér preparátumokon
- Primer kapilláris endothelsejtek/pericyták, illetve astrocyták izolálása
- Immuncitokémia primer endothelsejteken, astrocytákon és pericytákon
- *In vitro* valós idejű viabilitás (xCELLigence rendszerrel) vizsgálat, és toxicitási teszt(LDH teszt) primer sejteken
- *In vitro* ROS mérés primer sejteken

A kísérletek kivitelezését több kutatócsoporttal együttműködve valósítottuk meg:

A neurodegeneratív elváltozások morfológiai vizsgálatában, valamint az elektrofiziológiai mérések elvégzésében prof. Penke Botond, dr. Szegedi Viktor és a Neurodegeneratív betegségek kutatólaboratóriumának munkatársai (SZTE ÁOK Orvosi Vegytani Intézet) nyújtottak segítséget.

A vér-agy gát funkcionális vizsgálatában és a vér-agy gát sejtjeivel való *in vitro* munkákban dr. Deli Mária és a Biológiai barrierék kutatócsoport (MTA SZBK Biofizika Intézet) együttműködését kértük.

Eredmények

A bevezetőben említett kísérleti előzményekből kiindulva a hipertrigliceridémia agyi lipidmetabolizmusra gyakorolt hatását vizsgáltuk. Kimutattuk, hogy transzgenikus egerek agykérgében az ApoB, ApoE és LDLr mennyisége szignifikánsan magasabb, míg az ApoA-I mennyisége szignifikánsan alacsonyabb a vad típusú állatokéhoz képest. Az ApoE és az LDLr mennyiségének növekedése fokozott celluláris koleszterin és foszfolipid metabolizmusra utal. Az ApoA-I mennyiségének redukciója a cerebrális erekben hozzájárulhat a gyulladás, illetve a ROS endothel károsító hatásának csökkent tolerálásához. A magas trigliceridszint az agyban trigliceridtartalmú lipidcseppek kialakulásához vezet, míg a szabad koleszterin mennyisége nem mutat változást. Jóllehet, a kortikális APP mennyiségének növekedését mutattuk ki, amiloid plakk képződést a heterozigóta transzgenikus állatok agyszövetében nem tudtunk kimutatni. Ez részben az ApoE megnövekedett mennyiségével magyarázható, ami aktívan részt vesz az A β peptid folyamatos eltávolításában. Kimutattuk továbbá, hogy transzgenikus egerek agyában a Tau-fehérje már fiatal korban több oldalláncán is hiperfoszforilálódik (TaupSer^{262, 199/202, 396, 404}), ami a mikrotubulus-hálózat dezorganizációjához, szövettanilag neurofibrilláris kötegek (TaupSer⁴⁰⁴) megjelenéséhez, az axonális transzportfolyamatok és a szinaptikus transzmisszió károsodásához, végül pedig a neuronok elhalásához vezet. Mindezek a neurodegeneratív elváltozások dendrittüskesűrűség csökkenésben, valamint kiterjedt kortikális és hippocampális apoptózisban nyilvánulnak meg. A tapasztalt morfológiai elváltozások funkcionális következményeit vizsgálva már fiatal korban a rövidtávú

szinaptikus plaszticitás károsodását (csökkent PPF arányokat) és egyidejűleg a PKC- γ fehérje mennyiségének markáns csökkenését mutattuk ki. A tapasztalt funkcionális és morfológiai elváltozások arra sarkalltak minket, hogy megvizsgáljuk a vér-agy gát hiperlipidémia általi érintettségét is. Azt tapasztaltuk, hogy a transzgenikus állatokban a vér-agy gát kis molekulákra, ugyan nem szignifikánsan, de átjárhatóbbá válik. Ezt a hatást a lipid diéta azonban tovább nem fokozta. Nagy mólsúlyú anyagokra való átjárhatóság tekintetében a lipid diéta szinte minden agyterületen fokozta a transzcelluláris permeabilitást. A transzgenikus állatokból izolált mikroerek génexpressziós mintázatát vizsgálva feltűnő volt a magas LOX1 és ApoB expresszió. Kimutattuk, hogy az ApoB-100 fehérje az agyi kapilláris endothelsejtekben, valamint a pericytákban és astrocytákban is expresszálódik. A fehérje megnövekedett mennyisége a transzgenikus állatok agykérgében western blottal is kimutatható. Megtalálható ezen kívül az agyi kapillárisok és venulák falában, illetve ezek környezetében is. Immuncitokémiás vizsgálataink során azt tapasztaltuk, hogy az ApoB-100 fehérje a vad típusú állatok vér-agy gát sejtjeiben is kimutatható. Ez újdonságnak számít, a szakirodalomban eddig nem volt ismert, pontos szerepét azonban nem ismerjük. A periférián betöltött funkciójából adódóan valószínűleg a sejtek jobb lipid hasznosítását segíti elő. Mindezt ApoB immunreaktivitást mutató primer kapilláris endothelsejtek és astrocyták növekedési kinetikájának vizsgálata során is megfigyeltük, a transzgenikus állatokból származó sejtek szignifikánsan gyorsabban nőttek a vad típusú sejtekhez képest. A LOX1 megnövekedett mennyisége a mikroerekben fokozott cerebrovaszkuláris lipidperoxidációra és oxidatív károsodásra utal. Ennek nyomán a primer sejtek oxLDL-lel szembeni érzékenységét vizsgáltuk. Azt tapasztaltuk, hogy

az egyes sejttípusok érzékenysége eltérő. Legérzékenyebbek az astrocyták és endothelsejtek, legkevésbé érzékenyek pedig a pericyták bizonyultak. Valamennyi sejttípuson az oxLDL dóziszfüggő viabilitás csökkentő hatását figyeltük meg. A viabilitás csökkenést minden esetben LDH teszttel igazoltuk. Azt tapasztaltuk, hogy vad típusú astrocyták és endothelsejtek szignifikánsan nagyobb membránkárosodást és viabilitás csökkenést mutatnak az oxLDL hatására, mint a transzgenikus sejtek. Ezzel szemben a pericyták minimális viabilitás csökkenést, ugyanakkor erőteljes membránkárosodást mutatnak. A jelenség megértését célozva megmértük a sejtek ROS termelését oxLDL kezelés hatására. Azt találtuk, hogy transzgenikus endothelsejtekben és pericytákban a bazális ROS termelődés szignifikánsan nagyobb a vad típushoz képest, amit az oxLDL kezelést transzgenikus sejtekben csak tovább fokoz. Astrocytáknál fordított a helyzet: a vad típusú sejtekben nagyobb a ROS termelődés a transzgenikus sejtekhez képest. Mindezen megfigyeléseink az irodalmi adatokkal megegyezők, azonban további vizsgálatok szükségesek az oxLDL által kiváltott endothel diszfunkció mechanizmusának pontos megértéséhez.

Főbb eredményeink

- Kimutattuk, hogy transzgenikus egerek agyszövetében a magas szérumtriglicerid-szint hatására intracelluláris triglicerid tartalmú lipidcseppek jelennek meg.
- A cerebrális ApoB, ApoE és LDLr receptor mennyisége szignifikánsan nagyobb transzgenikus egerek agyában, míg az ApoA-I mennyisége szignifikánsan kevesebb, a vad típushoz képest.
- Bár az APP mennyiségének növekedését tapasztaltuk transzgenikus egerek kortikális mintáiban a vad típushoz képest, amiloid plakkokat nem detektáltunk heterozigóta transzgenikus állatok agyszövetében.
- Kimutattuk, hogy a Tau-fehérje számos oldalláncán hiperfoszforilálttá válik a transzgenikus egerek agyszövetében a vad típushoz viszonyítva, ami hisztológiailag neurofibrilláris kötegek megjelenéséhez vezet.
- A transzgenikus állatok hippocampusában a dendrittüskék számának csökkenését és károsodott preszinaptikus funkciót, míg a kéregben és a hippocampusban intenzív neuronális apoptózist mutattunk ki.
- A transzgenikus egerek vér-agy gátja lipidekben gazdag diéta hatására nagy mólsúlyú anyagokra (Evans-kék) nézve szignifikánsan áteresztővé válik a vad típushoz képest.

- Kimutattuk, hogy az ApoB-100 fehérje vad típusú állatokból izolált primer sejtekben (endothel, astrocyta, pericyta) is jelen van.
- Transzgenikus egerek agyából izolált primer endothelsejtek, astrocyták, pericyták oxLDL-re való érzékenysége különböző. Legérzékenyebbek az endothelsejtek és astrocyták bizonyultak.
- Transzgenikus egerekből származó pericyták és endothelsejtek szignifikánsan több ROS-t termelnek a vad típusból izolált sejtekhez képest.

Összefoglalás

Hipotézisünk szerint a tartós hiperlipidémia hApoB-100 transzgenikus egerek cerebrovaszkuláris rendszerében érkárosodásokat indukál. Az ennek következtében fellépő agyi hipoperfúzió és magas szérumlipid-szint oxidatív stresszhez és gyulladáshoz vezet. Az oxidált lipidek, főként az oxiszterinek, endothel diszfunkciót és vér-agy gát-károsodást okoznak. A vér-agy gát károsodása és a szöveti ischemia neurodegeneratív folyamatokat indukál az agyban. Eredményeink azt mutatják, hogy a hApoB-100 egértörzs a hiperlipidémia okozta neurofibrilláris degeneráció modellezésére alkalmas, azonban további vizsgálatok szükségesek az oxidált lipidek patogenezisben betöltött szerepének tisztázásához.

Közlemények

MTMT azonosító:10030597

Lénárt N, Szegedi V, Juhász G, Kasztner A, Horváth J, Bereczki E, Tóth ME, Penke B, Sántha M: **Increased Tau Phosphorylation and Impaired Presynaptic Function in Hypertriglyceridemic ApoB-100 Transgenic Mice** PLOS ONE 7:(9) Paper e46007. 12 p. (2012) IF: 3.730

Tóth ME, Szegedi V, Varga E, Juhász G, Horváth J, Borbély E, Csibrány B, Alföldi R, Lénárt N, Penke B, Sántha M: **Overexpression of Hsp27 ameliorates symptoms of Alzheimer's disease in APP/PS1 mice** CELL STRESS & CHAPERONES 18:(6) pp. 759-771. (2013) IF: 2.537

Zádor F, Lénárt N, Csibrány B, Sántha M, Molnár M, Tuka B, Vécsei L, Marton A, Vízler Cs, Oláh M, Borsodi A, Benyhe S, Páldy E: **Low dosage of rimonabant leads to anxiolytic like behavior with a cannabinoid receptor independent manner via inhibiting expression levels and G-protein activity of kappa opioid receptors** Neuropharmacology 89, 298-307. (2015)

Lénárt N, Walter FR, Bocsik A, Sántha P, Török Z, Pilbat AM, Puskás LG, Sántha M, Deli MA: **Effect of ApoB100 overexpression in cultured cells of the neurovascular unit** (2014) submitted to Fluids and barriers of the CNS

Dénes Á, Coutts G, Lénárt N, Pelegrin P, Skinner J, Rothwell N, Allan MS, Brough D: **AIM2, NLRC4 and ASC inflammasomes contribute to acute brain injury** (2014) manuscript in preparation

Poszterelőadások:

Lénárt N, Szegedi V, Juhász G, Kasztner A, Tóth EM, Penke B, Sántha M: **Chronic hypertriglyceridemia induces early tau hyperphosphorylation and impaired long-term potentiation in apoB-100 transgenic mice** 2012. május 23-24. Straub-Napok, Szeged

Lénárt N, Bernát G, Scheich H, Sántha M **Hyperlipidemia induced neurodegeneration in apoB-100 transgenic mice** 2012. június 2. CEELA, Budapest

Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, dr. Sántha Miklósnak a munkám során nyújtott szakmai irányításért és jó tanácsokért. Hálás vagyok, hogy lehetőséget biztosított számomra, hogy a csoportjában dolgozhassak.

Ezúton szeretném megköszönni az Állatgenetikai és Molekuláris Neurobiológia csoport valamennyi jelenlegi - dr. Tóth Erzsébet Melinda, Csibrány Balázs, Hegyvári Ibolya, Nagy Dóra és Dukay Brigitta - és egykori munkatársának – dr. Bereczki Erika, Gonda Szilvia, Mari Mónika, Kasztner Anikó és Alföldi Róbert - a felém nyújtott baráti és szakmai támogatást, segítséget, valamint a jó munkához nélkülözhetetlen kellemes, baráti légkört.

Külön köszönetemet és hálámat szeretném kifejezni dr. Deli Máriának és a Biológiai Barrierék Kutatócsoport valamennyi tagjának- Walter Fruzsina, Bocsik Alexandra, dr. Sántha Petra, dr. Veszélka Szilvia, dr. Kiss Lóránd, dr. Tóth Andrea és Harazin András - akik munkám során rengeteg szakmai és baráti segítséggel láttak el.

Köszönettel tartozom prof. Penke Botondnak és munkatársainak, dr. Szegedi Viktornak és dr. Juhász Gábornak az elektrofiziológiai vizsgálatok elvégzéséért, valamint Horváth Jánosnak és Furdán Szabinának a Golgi ezüstimpregnáció elvégzésében nyújtott segítségéért.

Ezúton szeretném köszönetemet és hálámat kifejezni az MTA SZBK Biokémia Intézet valamennyi munkatársának a nap mint nap tapasztalt segítőkész és támogató hozzáállásért, a kialakult kellemes baráti légkörért.

Végül pedig kedves barátaimnak- Nagy Lajos István, dr. Faragó Nóra, dr. Ózsvári Béla- köszönöm, hogy erőt adtak, támogattak és biztattak.

Társszerzői nyilatkozat

Jelölt neve: Lénárt Nikolett

Doktori iskola (Program): SZTE TTIK, Biológia Doktori Iskola

Közlemény címe: Increased Tau Phosphorylation and Impaired Presynaptic Function in Hypertriglyceridemic ApoB-100 Transgenic Mice

Szerzői: Lénárt Nikolett, Szegedi Viktor, Juhász Gábor, Kasztner Anikó, Horváth János, Bereczki Erika, Tóth Erzsébet Melinda, Penke Botond, Sántha Miklós

Megjelenés helye, ideje: PLoS One 2012; 7(9):e46007. doi: 10.1371/journal.pone.0046007.

Epub: 2012 Sep 24

Társszerzői nyilatkozat

Alulírott társszerzők kijelentjük, hogy a fenti közleményben szereplő eredmények elérésében a jelölt szerepe meghatározó fontosságú. A jelölt által a Szegedi Tudományegyetemre benyújtott tézisekben és az értekezésben szereplő, valamint a közösen publikált eredmények eddig nem szerepeltek más Ph.D. értekezés tudományos eredményei között. Tudomásul vesszük, hogy az értekezés tudományos eredményei a jövőben nem használhatók fel más tudományos fokozat megszerzésére indított eljárás során.

Lénárt Nikolett (jelölt)

dr. Szegedi Viktor

dr. Juhász Gábor

Kasztner Anikó

Horváth János

dr. Bereczki Erika

dr. Tóth Erzsébet Melinda

dr. Penke Botond

dr. Sántha Miklós

Lénárt Nikolett
S. Szegedi Viktor
Juhász Gábor
Kasztner Anikó
Horváth János
Bereczki Erika
Tóth Erzsébet Melinda
Penke Botond
Sántha Miklós

Szeged, 2014. szeptember 22.