

A Hsp27 stresszfehérje szerepe neurodegeneratív betegségekben membrán és lipid nézőpontokból

Korábbi eredmények

Korábbi munkánk során laborunkban előállítottunk egy transzgenikus egértörzset, melyben nagy mennyiségben expresszálódik egy humán kismolsúlyú hősokkfehérje, a Hsp27. A hősokkfehérjék, más néven stresszfehérjék, (Hsp) evolúciósan konzervált *chaperon*ok melyek a sejteket ért stressz hatására gyorsan indukálódnak. A kismolsúlyú hősokkfehérjék legfontosabb feladatai közé tartozik, hogy megkötik a hibás szerkezetű, instabil fehérjéket, ezáltal megakadályozzák, hogy azok egymással kapcsolódva aggregátumokat képezzenek, valamint biztosítják annak lehetőségét, hogy térszerkezetük a későbbiekben helyreálljon (Nakamoto és Vigh 2007). A kismolsúlyú hősokkfehérjék ezen kívül anti-apoptotikus és antioxidáns tulajdonságokkal is rendelkeznek, a membránok működésében és védelmében is szerepet játszanak (Horváth és mtsai. 2008), valamint a sejtvezetékhez kapcsolódva stabilizálhatják azt. Megfigyelték, hogy a stresszfehérjék, köztük a Hsp27 neuroprotektív szerepet töltenek be különböző idegrendszer károsító hatásokkal szemben. Ezt megerősítik saját korábbi kísérleteink is, melyek során kimutattuk, hogy a Hsp27 fehérje túltermelése védő hatással rendelkezik az akut etanol kezelés egyensúlyt és mozgáskoordinációt károsító tulajdonságával szemben, valamint csökkenti a krónikus etanol kezelés által kiváltott idegsejt pusztulás mértékét felnőtt állatokban (Tóth és mtsai, 2010). A Hsp27 túltermelő törzset az Alzheimer-kór (AD) validált állatmodelljével (APP^{swe}/PS1^{dE9} transzgenikus vonal) összekeresztelve megvizsgáltuk, hogy a kismolsúlyú hősokkfehérje túltermelése milyen hatással van a betegség tüneteinek kialakulására. A magatartás tesztek eredményei szerint a Hsp27 hatására javult az AD modell állatok tanulási képessége, elektrofiziológiai vizsgálatokkal pedig kimutattuk, hogy a Hsp27 túltermelése enyhíti az AD modell állatokban megfigyelhető szinaptikus diszfunkciókat. Ezen kívül megfigyeltük, hogy a Hsp27 fehérjét túltermelő AD modell állatok agyában csökken az amiloid plakkok száma (Tóth és mtsai. 2013).

Ugyancsak laborunkban állítottuk elő a humán apolipoprotein-B100 (ApoB100) fehérjét túltermelő transzgenikus egértörzset. Az ApoB100 egy nagyméretű glikoprotein, az alacsony

sűrűségű (LDL) és a nagyon alacsony sűrűségű (VLDL) lipoprotein molekulák fő fehérjekomponense. A lipoproteinek feladata a lipidek (trigliceridek, koleszterin) vérben történő szállítása, az LDL és VLDL magas szintje összefüggésben áll az érlemezésedés valamint a szív- és érrendszeri betegségek kialakulásával. Az ApoB100 túltermelő egerek szérumban lipid profilja az emberéhez hasonló, koleszterindús tápon tartva magas szérumban koleszterin-szinttel rendelkeznek, ami megnövekedett oxidatív stresszhez, és lipidperoxidáció kialakulásához vezet, ezért az ApoB100 egértörzs az érlemezésedés elterjedt állatmodellje (Csont és mtsai. 2007). Korábbi kísérleteinkben kimutattuk, hogy a normál tápon tartott ApoB100 túltermelő állatokban megemelkedik a szérumban triglicerid szintje, és ez összefüggésben áll különböző neurodegeneratív elváltozásokkal is. A transzgenikus állatokra megváltozott agyi lipidmetabolizmus, kiterjedt kortikális neuronális apoptózis, és ennek következtében az agykamrák nagymértékű tágulata jellemző (Bereczki és mtsai. 2008, Lénárt és mtsai. 2012). Ezen kívül kimutattuk az állatok rövidtávú szinaptikus plaszticitásának károsodását (Lénárt és mtsai. 2012), ami idős korra a kognitív funkciók romlásához vezet (Löffler és mtsai. 2013).

A projekt célkitűzései

A korábbi kísérleti eredményeinkre alapozva a jelen projektben a következő vizsgálatokat végeztük el:

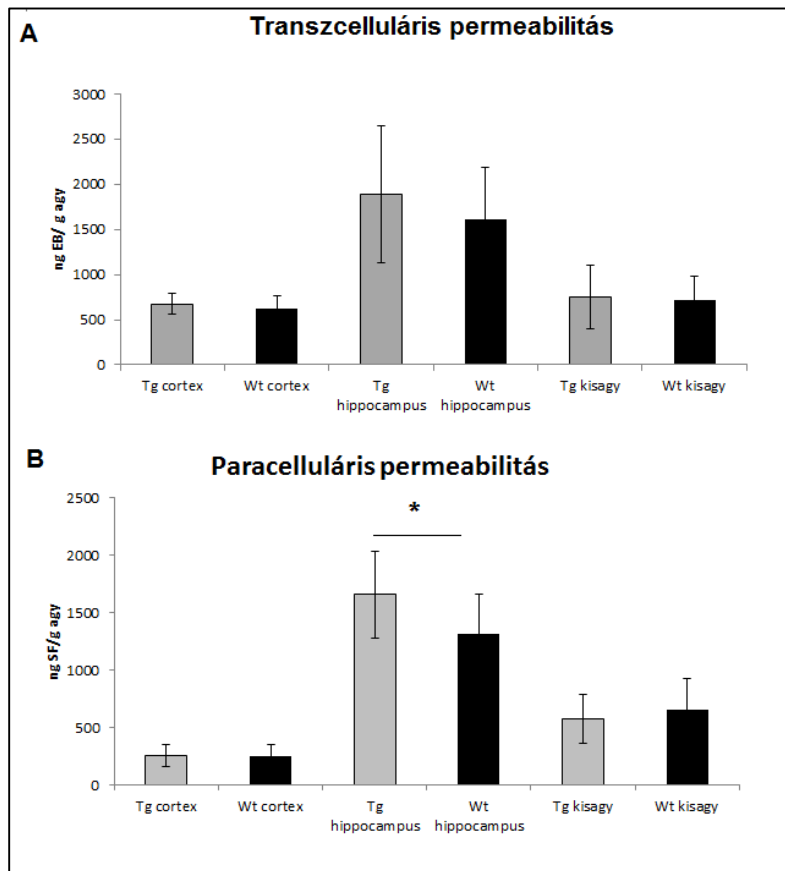
- Részletesen tanulmányoztuk a hiperlipidémia hatására kialakuló idegrendszeri elváltozásokat, különös tekintettel a neurovaszkuláris egység állapotára. Megvizsgáltuk az agyi ereket alkotó endotélsejtek membránjában végbemenő állapotváltozásokat, valamint kielemeztük, hogy a Hsp27 túltermelés milyen hatással van a mikroerek génexpressziójára.
- Mivel az idegrendszeri betegségeket rendszerint gyulladós folyamatok kísérik, megvizsgáltuk a Hsp27 hatását egy akut gyulladós folyamat lezajlása során.
- Kimutattuk a Hsp27 és Hsp70 termelődését elősegítő koindukálószer, az LA1011 neuroprotektív hatását az Alzheimer kór transzgenikus állatmodelljében.

- Külföldi kollaborációs partnerünkkel, Lea Sistonennel együttműködésben egy másik Hsp koindukálószer, a BGP-15, HSF1 transzkripciós faktor működésére kifejtett hatását vizsgáltuk.

Eredmények

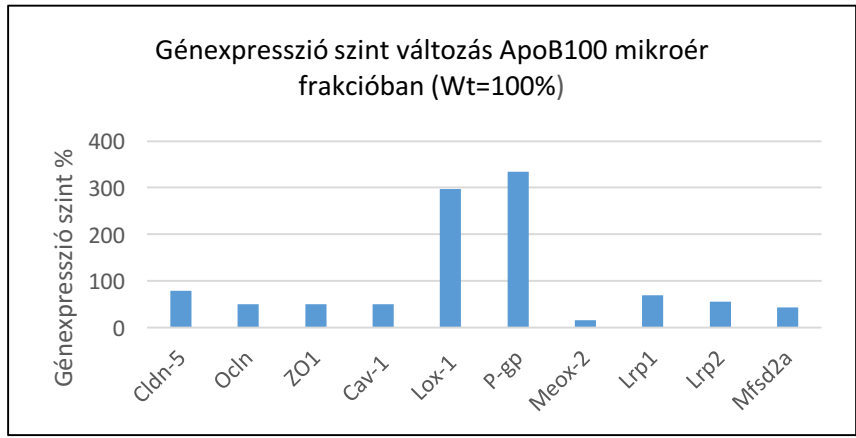
Az utóbbi évek kutatási eredményei azt bizonyították, hogy a hiperlipidémia nemcsak a kardiovaszkuláris betegségek rizikófaktora, de hatással van a cerebrovaszkuláris rendszerre is, ezáltal hajlamosíthat neurodegeneratív betegségek kialakulására, azonban a folyamat pontos patomechanizmusa még nem tisztázott. Kísérleteinkben célul tűztük ki annak vizsgálatát, hogy a megemelkedett szérum triglicerid szint milyen molekuláris és morfológiai elváltozásokat okozhat a neurovaszkuláris egységet alkotó sejtekben az ApoB100 túltermelő transzgenikus egerekben. A neurovaszkuláris egység legfontosabb funkciója a vér-agy gát (blood-brain barrier, BBB) létrehozása, ami elengedhetetlen a központi idegrendszer homeosztázisának fenntartásához. A vér-agy gátat az agyi kapillárisok endotélsejtjei, a periciták és az erek falát beborító asztrocita végtalpak alkotják. A vér és az agy elszeparálását, a BBB fizikai barrier funkcióját a szomszédos endotélsejtek közti szoros kapcsolatok (tight junction, TJ) biztosítják. Ugyanakkor az agyi endotélsejtek különböző membrántranszportereket és receptorokat is expresszálnak, ezáltal a központi idegrendszer számára szükséges tápanyagok aktív transzportjéért és a toxikus anyagok effluxáért is felelősek.

Első lépésben megvizsgáltuk, hogy a krónikus hipertrigliceridémia milyen hatással van a BBB permeabilitására 6 hónapos ApoB100 túltermelő állatokban. Az endotél sejteken keresztül történő transzcelluláris permeabilitást Evans-kék, a sejtek közötti paracelluláris permeabilitást Na-fluoreszcein intravénás injektálásával tanulmányoztuk. Eredményink szerint a kisagy és az agykéreg területén sem a transzcelluláris sem a paracelluláris permeabilitás nem változott hiperlipidémia hatására (1. A, B ábra, Hoyk és mtsai.). Ezzel szemben a hippokampusz átjárhatósága megemelkedett, a paracelluláris permeabilitás szignifikánsan magasabb értéket mutatott az ApoB100 túltermelő egerekben a vad típushoz viszonyítva (1. B ábra, Hoyk és mtsai.).



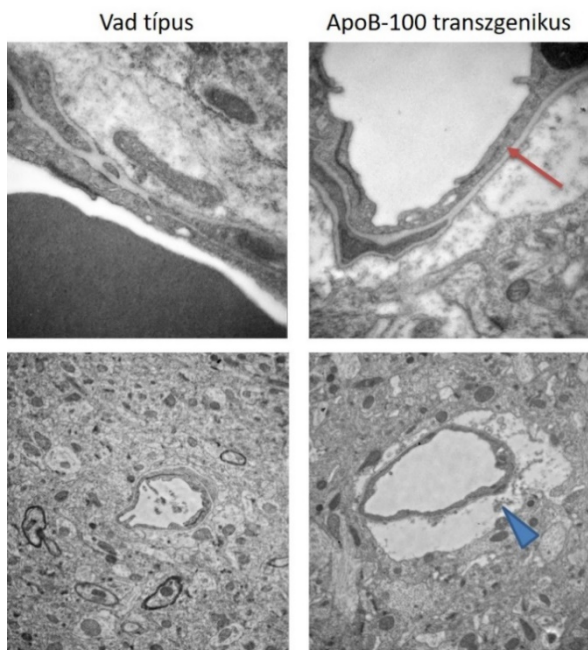
1. ábra: A vér-agy gát áteresztőképességének meghatározása ApoB100 transzgenikus (Tg) és vad típusú (Wt) állatok különböző agyrégióiban.

A permeabilitási vizsgálatok eredményeinek megerősítéséhez az állatok agyából mikroér frakciót izoláltunk, melyen a sejt közötti kapcsolatok kialakításában és a transzportfolyamatokban fontos szerepet betöltő gének expressziójának változásait figyeltük (2. ábra, Hoyk és mtsai.). A RT-PCR vizsgálatok eredményei szerint egyes tight junction fehérjéket kódoló gének expressziója jelentősen lecsökkent a transzgenikus állatokban, az occludin és zonula occludens 50%-os míg a klaudin-5 20%-os visszaesést mutatott, mely változások összefüggésben állhatnak a megemelkedett paracelluláris permeabilitással. Összhangban a génexpressziós változásokkal, az ApoB egerek agyából készült elektronmikroszkópos felvételeken megfigyelhető, hogy ellentétben a vad típussal, az endotél sejtek közötti szoros kapcsolatok nagy hányada nem folytonos, hanem felszakadozott képet mutat (3. ábra, Hoyk és mtsai.).



2. ábra Sejtkapcsoló fehérjék, transzportproteinek és szabályozó faktorok expressziós szintjének vizsgálata ApoB100 túltermelő és kontrol állatokban.

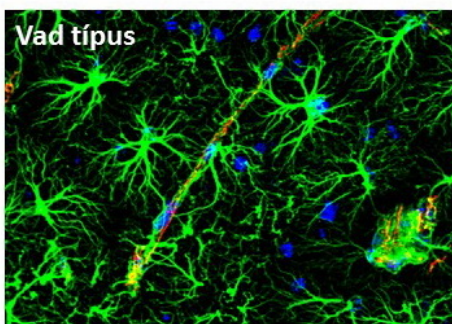
A mikroér frakcióban szintén jelentős csökkenést mutatott a homeobox-gén, Meox2 expressziója (2.ábra, Hoyk és mtsai.), melynek szintje a vad típushoz képest 16%-ra esett vissza a transzgenikus egerekben. A Meox2 fontos szabályozószerepet tölt be a vaszkuláris differenciációban, és kimutatták, hogy jelentősen lecsökken a szintje Alzheimer-kóros páciensekben. Az ApoB egerek agyában szintén jelentősen mérséklődött az Mfsd2a transzportprotein mennyisége, mely elengedhetetlen a vér-agy gát normális működéséhez, és fontos szerepet játszik egy omega3 zsírsav, a DHA felvételében. Megfigyeltük azt is, hogy a transzgenikus állatokból izolált kortikális mikroér mintákban mintegy háromszorosára emelkedett



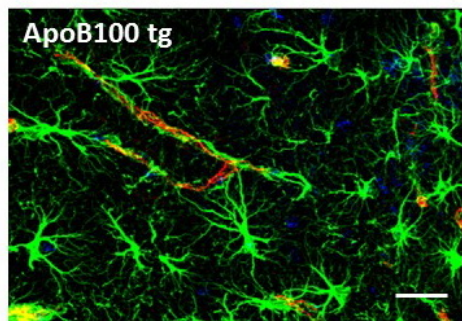
a P-glycoprotein (permeability glycoprotein, P-gp) és a LOX1 (ox-LDL receptor 1) gének expressziója. Az oxidált-LDL receptor (LOX1) szintjének növekedése erőteljes oxidatív folyamatokra, emelkedett ox-LDL szintre utal, illetve az agyi erekben elindult endotél károsodással állhat kapcsolatban.

3. ábra. Kortikális mikorerek ultrastrukturális elváltozásai ApoB100 túltermelő transzgenikus egerekben. Piros nyíl: az endotél sejtek közötti szoros kapcsolatok felszakadozása. Kék nyílhegy: ödémás asztrocita végtalp.

A génexpressziós vizsgálatok eredményei alapján tehát elmondhatjuk, hogy az endotél sejtekben hipertrigliceridémia hatására bekövetkező változások egyértelműen hozzájárulhatnak a vér-agy gát permeabilitásának növekedéséhez. Mivel azonban a gát funkció kialakításához és fenntartásához szükséges az endotél és a glia sejtek közötti interakció is, a vér-agy gát másik fontos sejt alkotóelemének, az asztrocitáknak a morfológiáját is megvizsgáltuk. Ennek érdekében kladin-5 és GFAP kettős immunfestést végeztünk, mivel így egyszerre tettük láthatóvá a kapillárisok lefutását és a velük kapcsolatban álló asztroglia sejteket. Míg a vad típusú állatokban a GFAP festődés az asztrociták sejttesteiben és a kapillárisokhoz asszociáltan egyaránt megfigyelhető volt, addig a transzgenikus állatokban a GFAP elsősorban sejttes festődési mintázatot mutatott (4. ábra). Ezen kívül az elektronmikroszkópos felvételeken is jól látható az asztrocita végtalpak ödémás elváltozása a transzgenikus állatokban (3. ábra), ami szintén hozzájárulhat a vér-agy gát barrierfunkciójának megváltozásához (Hoyk és mtsai.).

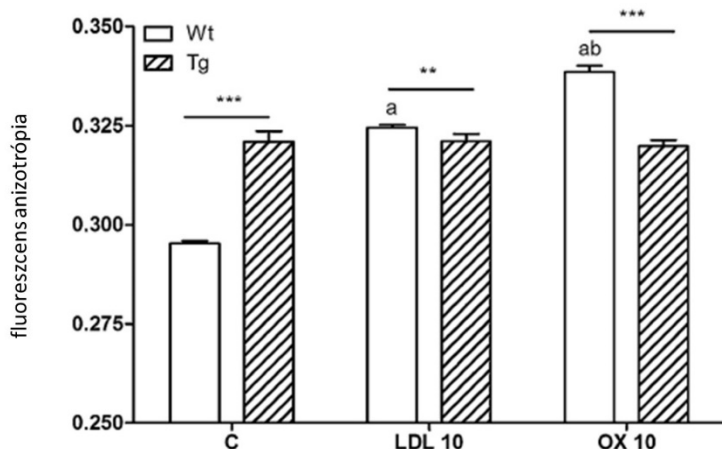


4. ábra. Kladin-5 (piros) és GFAP (zöld) kettős immunfestés vad típusú és apoB-100 transzgenikus egerek hippocampusában, DAPI (kék) sejtmag festéssel. Lépték: 20 μ m.



Az ApoB-100 endotélsejtekben betöltött szerepének pontosabb tisztázására transzgenikus és vad típusú egerekből izolált primer sejttenyészetben is végeztünk vizsgálatokat. Megállapítottuk, hogy a transzgenikus agyi endotél sejteken kimutatható az ApoB-100 emelkedett szintje. Az oxidált LDL (ox-LDL) dóziszfüggő toxikus hatást mutatott a sejtvonalon, míg a natív LDL nem idézett elő sejtpusztulást. Az ApoB-100 transzgenikus egerekből származó agyi endotél sejtek

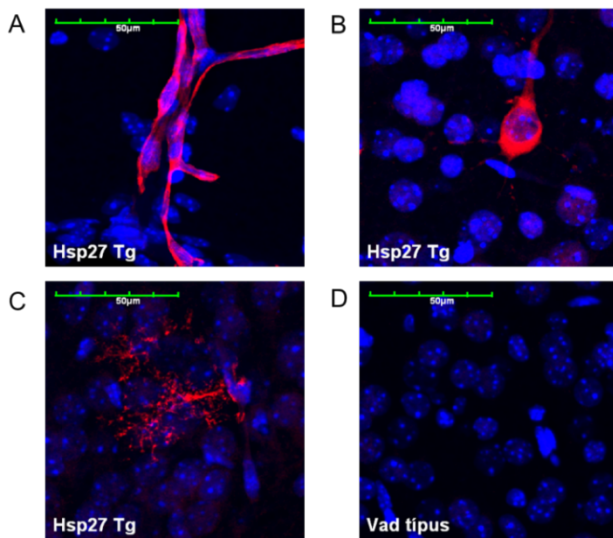
részleges protekciót mutattak az ox-LDL károsító hatásával szemben. A membránok fluiditását fluoreszcens anizotrópia módszerrel határoztuk meg TMA-DPH próba segítségével. ox-LDL hatására a vad típusú endotél sejtek nagymértékű rigidizációval válaszoltak, míg a transzgen állatokból származó sejtek nem mutattak membrán fizikai állapot változást, vagyis a kezelés hatására a vad típusú sejtek membránja keményebb lett az ApoB-100 transzgenikus egerekből származó agyi endotélsejtek membránjánál (5. ábra, Lénárt és mtsai. 2015). Összességében megállapíthatjuk, hogy az ApoB100 túltermelő egértörzsben a krónikusan magas szérumszintű triglicerid szint a vér-agy gát alkotó sejtek morfológiai és biokémiai elváltozásaihoz, ezáltal a vér-agy gát permeabilitásának növekedéséhez vezetnek, melyek hozzájárulhatnak a törzsre jellemző neurodegeneratív tünetek kialakulásához.



5. ábra LDL és ox-LDL hatása a membrán fluiditásra vad típusú és ApoB100 transzgenikus állatokból származó endotél sejtekben. (a) $p < 0.001$ vad típushoz viszonyítva; (b) $p < 0.001$ LDL kezelt vad típushoz viszonyítva; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ vad típus a transzgenikushoz képest.

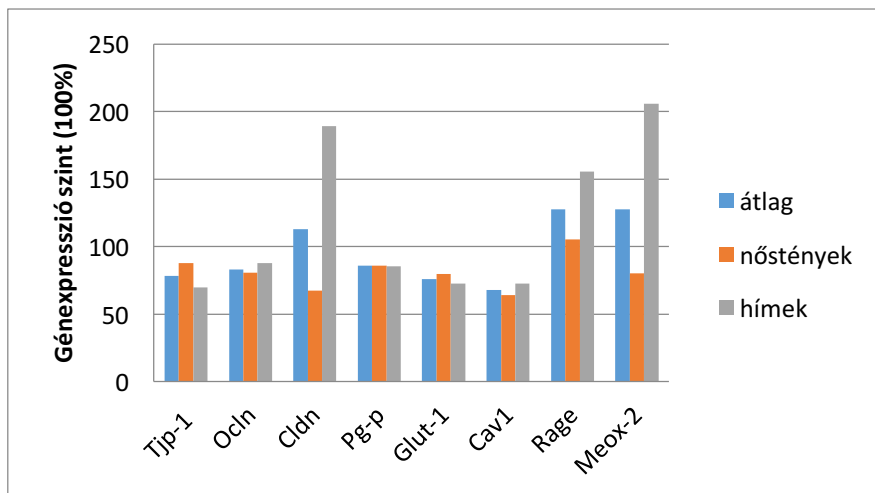
Irodalmi adatok szerint egyes stresszfehérjék mérsékelhetik a vér-agy gát permeabilitásának növekedését különböző stressz körülmények között, ezért megvizsgáltuk, hogy a Hsp27 túltermelése milyen hatással van az endotél sejtekben termelődő fehérjék expressziójára, melyek a vér-agy gát barrier funkciójának fenntartásáért és a transzportfolyamatok szabályozásáért felelősek. Ehhez első lépésben ellenőriztük, hogy a vér-agy gát alkotó sejtekben is termelődik-e a humán Hsp27 (transzgenikus) fehérje. Ezért Hsp27 transzgenikus egerek agyából mikroérfrakciót preparáltunk, és a génkifejeződést RT-PCR segítségével vizsgáltuk. A transzgenikus állatokból származó mikroér mintákban magas szintű humán Hsp27 expressziót tudtunk kimutatni,

melyet humán Hsp27 specifikus ellenanyaggal végzett immunfestéssel is megerősítettünk (6. ábra, Dukay és mtsai.).



6. ábra A transzgenikus Hsp27 kifejeződésének vizsgálata immunfluoreszcens festéssel fagyasztott metszeteken. Anti-humánHsp27 (piros), DAPI magfestés (kék), Lépték: 50 μm

A következőkben a tight junction proteinek (Tjp1, Ocln, Cldn) és az endotél sejteken keresztül történő sejtranszportban résztvevő gének (Pg-p, Glut-1, Cav1, Rage, Meox-2) expressziós szintjét vizsgáltuk vad és Hsp27 transzgenikus egerekben. Azt találtuk, hogy a claudin és a Meox-2 gén expressziója közel kétszeresére emelkedett a magas Hsp27 szinttel rendelkező hím transzgenikus egerekben, míg nőstényekben, - ahol a Hsp27 fehérje szintje mérsékelten emelkedett- nem változott jelentősen (7. ábra).

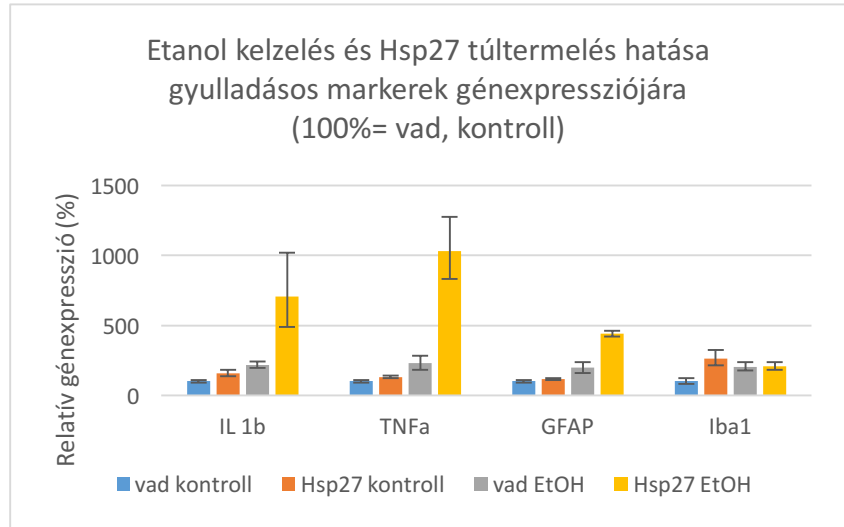


7. ábra TJ proteinek és transzport fehérjék génextpressziójának változása Hsp27 túltermelő egerekből származó mikroér mintában százalékban kifejezve, ahol a vad típusban mért expresszió szint= 100%

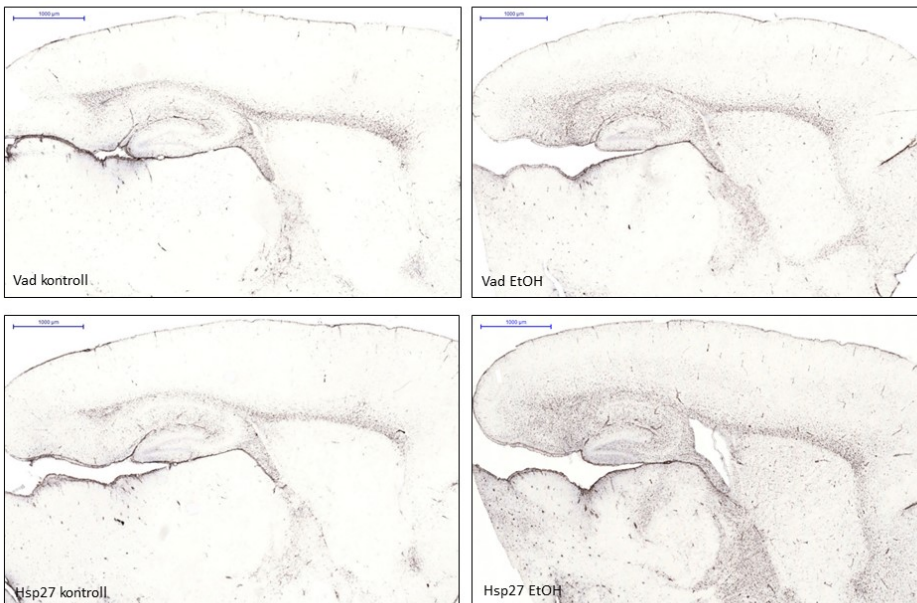
Az idegrendszeri betegségek egyik közös jellemzője a gyulladással járó folyamatok indukálódása. A neuroinflammáció összetett folyamat, magában foglalja a citokinek, kemokinek, gyulladással járó mediátorok szintézisét és gliasejtek proliferációjának fokozódását. A gyulladással járó folyamatoknak lehet pozitív hatása, például az akut fázis során limitálják a patogének proliferációját, azonban a túlzott vagy szükségtelen gyulladás szövetkárosodáshoz vezethet. Az agyban az immunfunkciók ellátásért főleg a mikroglia és asztrocita sejtek felelősek. A mikroglia, az agy parenchimájának makrofágja, egészséges körülmények között nyugvó állapotban van, azonban sérülés hatására gyorsan aktiválódik, és funkciója megváltozik (fagocitózis, citokin és ROS termelés). Az asztrociták normál körülmények között is fontos feladatokat látnak el a vér-agy gát részeként, sérülés hatására azonban megváltozik a génexpressziójuk, proliferálnak, hipertrófikussá válnak és kialakul az úgynevezett reaktív asztrogliózis. A reaktív asztrogliózis pozitív hatásai közé tartozik, hogy növekedési faktorok és neurotrofinok termelése által elősegíti a neuronok és gliák túlélését, azonban a gliális hegeképzés révén gátolhatja a sejtek növekedését, migrációját és ezáltal sérülést követően a regenerációt. Korábbi tanulmányok szerint a Hsp27 részt vesz a gyulladással járó folyamatok szabályozásában, de pontos funkciója még tisztázatlan, mert mind pro-, mind anti-inflammatorikus molekulák felszabadításában szerepet játszhat. Következő kísérletsorozatunkban ezért a Hsp27 gyulladással járó folyamatokban és neuroglia aktivációban betöltött szerepét vizsgáltuk Hsp27 túltermelő transzgenikus egerekben etanol kezelés által kiváltott akut idegrendszeri károsodás során. Mivel a fejlődő agy a szinaptogenetikus periódus során kifejezetten érzékeny az etanol citotoxikus hatására, ezért vad típusú és Hsp27 túltermelő transzgenikus egereket 5g/kg etanollal kezeltük a megfelelő időablakban, míg a kontroll állatok azonos mennyiségű fiziológiás sóoldat injekciót kaptak.

A gyulladással járó faktorok (TNF α , IL-1 β), illetve a mikroglia (Iba-1) és asztrocita (GFAP) aktivációs marker gének expresszióját RT-PCR analízissel határoztuk meg. Megfigyeltük, hogy 24 órával a kezelés után a vad típusú állatokban a vizsgált markergének szintje megduplázódott. A TNF α , IL-1 β és a GFAP szintjét a Hsp27 túltermelés önmagában nem befolyásolta jelentősen, etanol kezeléssel kombinálva azonban többszörösére emelte. Az Iba-1 expressziójának növeléséhez már a Hsp27 túltermelés önmagában is elegendő volt, amit az etanol kezelés nem fokozott tovább (8. ábra, Dukay és mtsai.).

8. ábra. Gyulladásos faktorok és glia aktivációs markergének expressziós szintjének változása etanol kezelés hatására vad típusú és Hsp27 túltermelő transzgenikus egerek agyszövetében.

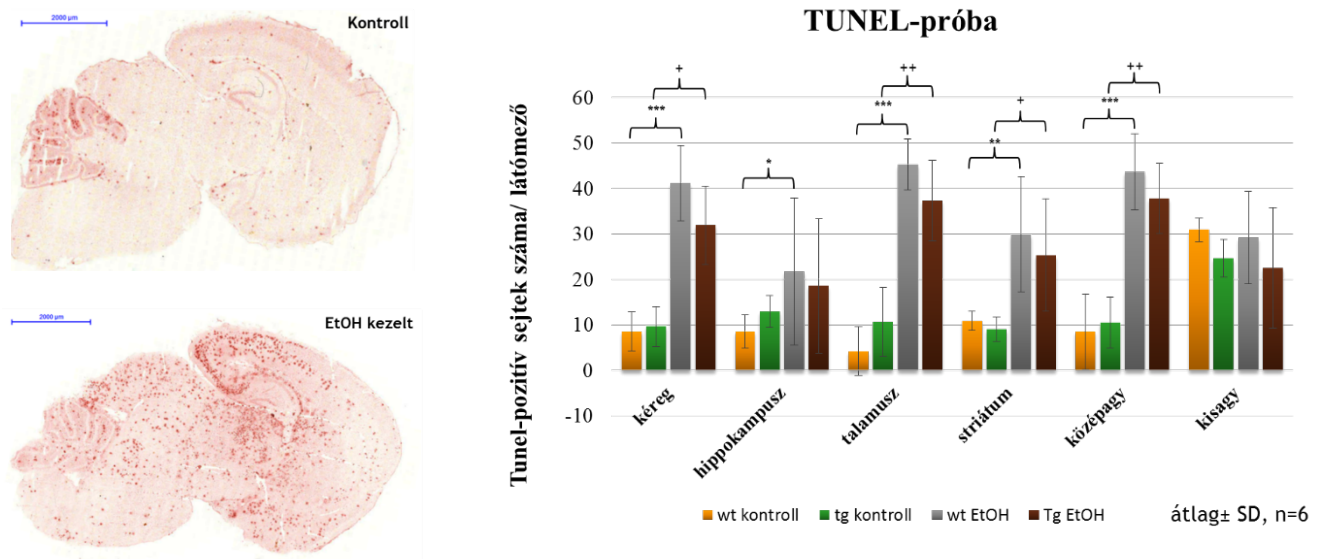


Az asztroglia sejtek morfológiai változásait GFAP immunfestés segítségével vizsgáltuk egy héttel az etanol kezelés után. A kontroll csoportokhoz viszonyítva etanol kezelés hatására megemelkedett a GFAP pozitív asztrociták száma (9. ábra). Az etanol kezelt Hsp27 túltermelő egerekben a vad típushoz képest erősebb GFAP festődést láthatunk, amely elsősorban az erek mentén kifejezett.



9. ábra Asztrogliózis mértékének vizsgálata GFAP immunfestés segítségével egy héttel az etanol kezelést követően.

Az alkohol kezelés által előidézett apoptózist TUNEL-próbával tettük láthatóvá. 24 órával a kezelés után a legtöbb TUNEL-pozitív sejt a kortikális, a hipotalamikus és a striatális régióban volt látható, míg a hippocampusz és a kisagy területén nem tapasztaltunk jelentős sejtelhalást a kezelést követően. Összehasonlítva a vad és transzgenikus állatokat azt tapasztaljuk, hogy a Hsp27 túltermelése enyhén mérsékelte az apoptózist, de a különbség nem volt szignifikáns (10. ábra, Dukay és mtsai).



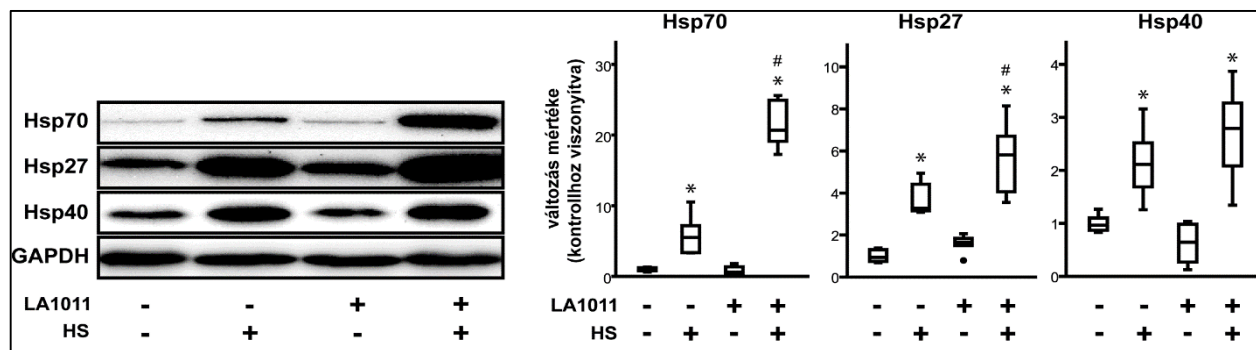
10. ábra Az apoptotizáló sejtek jelölése TUNEL-próba segítségével etanol kezelést követően. Lépték 2000 μm *: wt kontroll – wt EtOH; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ †: tg kontroll – tg EtOH † $P < 0,05$; †† $P < 0,01$; ††† $P < 0,001$

Eredményeink alapján arra következtethetünk, hogy a Hsp27-nek szerepe lehet a gyulladásos folyamatok szabályozásában azáltal, hogy fokozza különböző citokinek expresszióját, valamint befolyásolja a glia aktivációt akut agysérülést követően.

A környezeti paraméterek hirtelen megváltozására a plazmamembrán gyors változásokkal reagál, melyek hozzájárulnak a sejt stresszválaszának szabályozásához. Kísérleteink során például megfigyeltük, hogy hőkezelés hatására megváltozik a membránlipidek zsírsavösszetétele, ami fontos szerepet játszik a stressz adaptáció folyamatában (Péter és mtsai. 2016). A membrán mikrodoménekből bekövetkező változások mintegy stressz-szenzorként módosítják a stressz gének, köztük a hősokkfehérjék expresszióját is. Másrészt egyes hősokkfehérjék maguk is

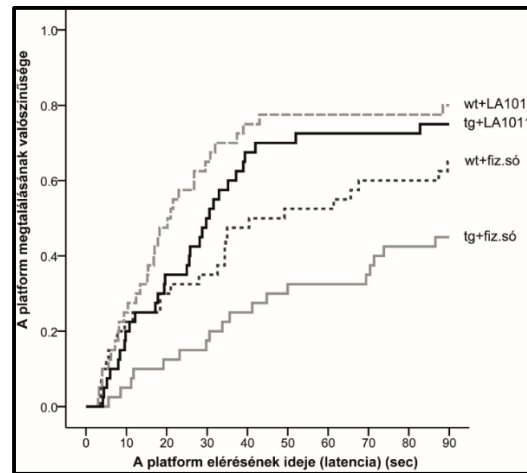
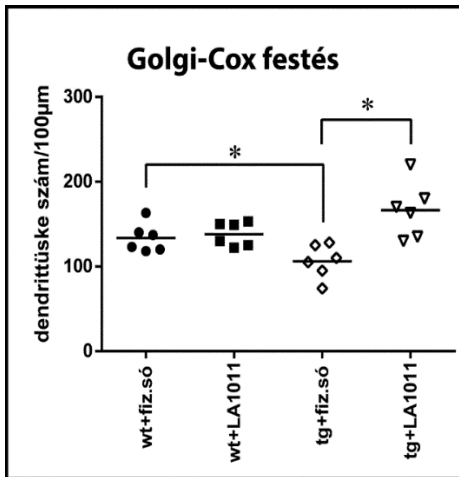
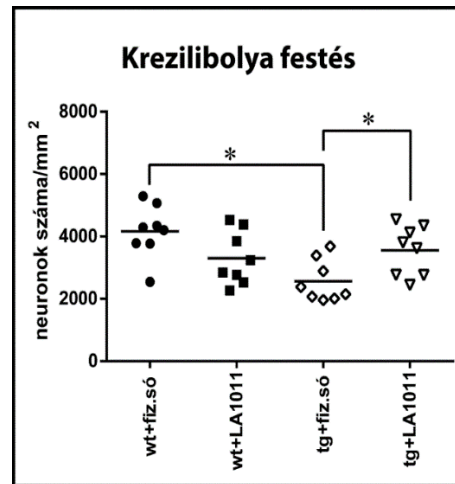
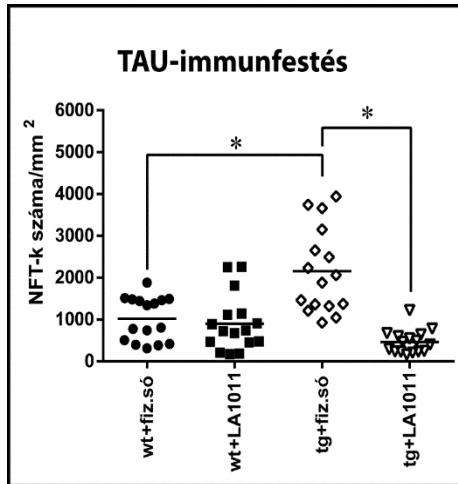
képesek a membránhoz asszociáltan megváltoztatni annak rigiditását és stabilitását, ezáltal biztosítva a membrán védelmét stresszkörülmények között (Glatz és mtsai. 2015). A sejtmembránok felépítése és funkciója gyakran változást szenved különböző humán betegségek során is. E felismerésből kiindulva született meg az elképzelés, miszerint a plazmamembrán struktúráját, és az azt felépítő különböző lipidek és fehérjék működését befolyásolva megváltoztathatunk bizonyos betegségekhez köthető szignalizációs útvonalakat. Ez az úgynevezett membrán lipid terápia, mely a membrán lipidösszetételének farmakológiai modulációja által hatékony kezelési módot jelenthet olyan megbetegedésekben, mint a daganatos elváltozások, diabétesz vagy az időskori neurodegeneráció (Escriba és mtsai. 2015).

Mivel a hősokkfehérjék fontos szerepet játszanak a sejtek egészséges fehérjehomeosztázisának (proteosztázis) fenntartásában, ígéretes terápiás célpontok lehetnek a különböző, idős korban kialakuló neurodegeneratív betegségek kezelésében. A szervezet proteosztázis fenntartó képessége ugyanis az életkor előrehaladtával romlik, elősegítve a demencia kialakulását, azonban irodalmi adatok szerint chaperon fehérjék túlermelése enyhítheti a tüneteket. Feltételezzük, hogy a hősokkfehérjék expressziójának farmakológiai modulációja, akár a sejt felszíni membránok specifikus perturbációja (hiperfluidizációja, mikrodomén átrendeződése) révén protektív hatású neurodegeneratív betegségekben. A célunk olyan kismolekulák azonosítása volt, melyek Hsp koindukáló hatásuknál fogva növelni képesek a sejtek fehérje homeosztázisát. A koindukálószernek előnye, hogy erősítik a sejtek válaszát stressz körülmények között, anélkül, hogy megváltoztatnák a normál állapotú sejtek stresszfehérje szintézisét. E tulajdonságuk rendkívül hasznos terápiás célú felhasználásuk esetén, hiszen szelektíven hatnak a sérült, beteg szövetekre. Az LA1011 egy újonnan kifejlesztett dihidropiridin származék, mely a kiindulási molekulacsaláddal ellentétben nem mutat kalcium antagonistá hatást. Kísérleteinkben kimutattuk, hogy az LA1011 vegyület 5 μ M-os koncentrációban önmagában nem, de stresszhatással (hőkezeléssel) kombinálva hatékonyan megemeli a Hsp27 és a Hsp70 termelésének szintjét neuroblasztóma sejt vonalban (11. ábra, Kasza és mtsai. 2016).



11. ábra LA1011 vegyület (5 μ M) hatásának vizsgálata a fontosabb hősokk fehérjék mennyiségére western blot segítségével. Az adatok átlagok \pm SD. HS=hősokk (1 óra, 42°C-on). * $p < 0,05$ (kezeletlen, nem hősokkolt kontrollhoz viszonyítva). # $p < 0,05$ (kezeletlen, hősokkolt mintához viszonyítva).

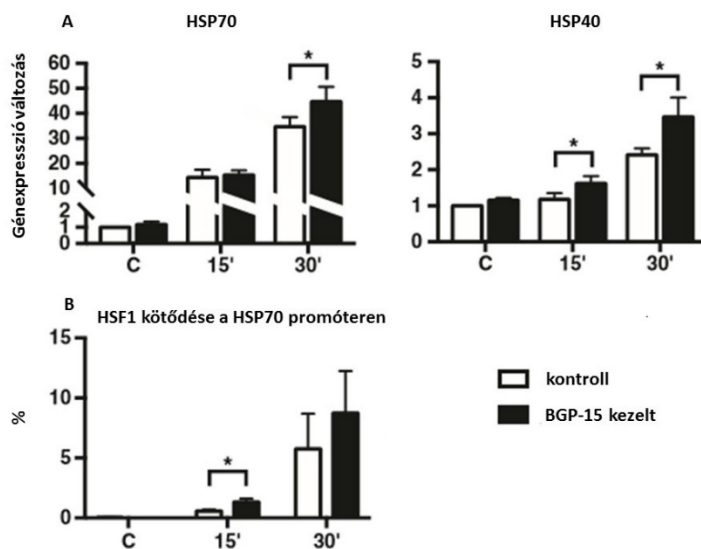
Következő lépésben az Alzheimer kór állatmodelljében vizsgáltuk az LA1011 neuroprotektív hatását. 3 hónapos vad típusú és APP^{swe}/PS1^{dE9} (AD modell) állatok 6 hónapon keresztül naponta 3 mg/kg dózisú LA1011 kezelésben részesültek intraperitoneális injekció formájában, miközben a kontroll állatok azonos térfogatú fiziológiás sóoldat injekciót kaptak. A kezelés végén az állatok térbeli tanulási képességét és memóriáját a Morris féle vizilabirintus teszt segítségével vizsgáltuk. A kísérlet eredménye szerint az LA1011 kezelés hatékonyan kivédte a tanulási képességek romlását az AD modell állatokban, továbbá a vad típusú állatokban is javította a memóriát (12. D ábra, Kasza és mtsai. 2016). Az állatok agyából készült hippokampusz metszeteken kimutattuk, hogy a krónikus LA1011 kezelés hatására az AD modell állatokban nőtt a dendrittüskék és neuronok száma, miközben csökkent a PHF-tau mennyisége (12. A,B,C ábra, Kasza és mtsai. 2016). A Hsp koindukáló szerrel végzett kezelés protektálta a neuronokat illetve csökkentette az amiloid plakk képződést a transzgenikus AD egerekben. Megfigyeléseink tehát igazolták a Hsp koindukáló szer neuroprotektív hatását. Az LA1011 AD modellben kifejtett jótékony hatását valószínűleg a Hsp27 és a Hsp70 szintjének emelésével magyarázhatjuk.



12. ábra Krezilibolya, tau és Golgi-Cox festés eredménye 6 hónapig tartó LA1011 (3 mg/kg) kezelést követően vad típusú (Wt) és AD transzgenikus (Tg) állatok hippokampusz metszetein. (D) Az LA1011 térbeli tájékozódó képességre és memóriára gyakorolt hatásának vizsgálata MWM teszttel. Az egyes csoportok tanulási eredményeinek összehasonlítását log rank teszttel (n=8 állat/csoport) végeztük el a következő párosításokban: wt+fiz.só / wt+LA1011 (p=0.047), wt+fiz.só / tg+fiz.só (p = 0.036) és tg+fiz.só / tg+LA1011 (p = 0.001).

Szintén stresszfehérje koindukáló hatással rendelkezik a hydroxylamin származék, BGP-15, melyről korábban kimutattuk, hogy javítja az inzulin érzékenységet különféle diabétesz modellekben. A szer, beépülve a koleszterin gazdag membrán régiókba, képes stabilizálni a lipid raftokat stresszkörülmények között. Külföldi kollaborációs partnerünkkel, Lea Sintonennel és munkatársaival együttműködésben tovább vizsgáltuk a BGP-15 stresszfehérje koindukáló képességének molekuláris hátterét. Eredményeinkből megállapítottuk, hogy a BGP-15 kezelés a

stresszválasz korai szakaszában fokozza a hősokkfehérjék termelődését azáltal, hogy megnöveli a stresszfehérjék expresszióját szabályozó transzkripciós faktor, a HSF1 DNS-kötő képességét (13. ábra, Budzyński és mtsai. 2017). A vizsgálatok során arra is fény derült, hogy ez a hatás legalább részben a BGP-15 hiszton-deacetiláz enzim aktivitását gátló képességének köszönhető. Az enzim gátlása következtében kialakuló hiperacetiláció a kromatin szerkezet átrendeződéséhez vezet, ami megkönnyíti a transzkripciós faktorok DNS-hez történő bekötődését. Összességében tehát a BGP-15 kezelés csökkenti a sejtekben a hősokkválasz aktiválódásához szükséges küszöbértéket, és javítja a sejtek túlélését letális stresszkörülmények között.



13. ábra BGP-15 kezelés hatása a HSF1 aktivitására. (A) Stresszfehérjék mRNA szintjének változása hősokk hatására (42 °C, 15 ill. 30 perc) BGP-15 kezeléssel és anélkül. (B) A HSF1 DNS-kötő aktivitásának vizsgálata a HSP70 promóter régióján. * $p \leq 0.05$

A sejtek stresszválaszának és a termelődő hősokkfehérjék szintjének helyreállítása tehát kulcsfontosságú lehet különböző megbetegedésekben, mint például a diabétesz vagy az időskori neurodegeneratív elváltozások. A HSF1 által szabályozott stresszfehérjék a sejtek egészséges proteosztázisát támogatva hozzájárulnak a fehérje lerakódásokkal járó idegrendszeri betegségek tüneteinek csökkentéséhez. A stresszhatásra aktiválódó HSF1 ezen kívül közvetlenül a szinapszisok működésének szabályozásában is részt vesz a szinaptikus fehérjék expressziójának fokozása által (Hooper és mtsai. 2016).

Pályázathoz kapcsolódó közlemények

A projekt során elért eredményeinket részletesen a következő publikációkban ismertettük:

Budzyński MA, Crul T, Himanen SV, Toth N, Otvos F, Sistonen L, Vigh L: Chaperone Co-inducer BGP-15 Inhibits Histone Deacetylases and Enhances the Heat Shock Response through Increased Chromatin Accessibility. *Cell Stress Chaperones*. 2017; doi: 10.1007/s12192-017-0798-5.

Péter M, Glatz A, Gudmann P, Gombos I, Török Z, Horváth I, Vigh L, Balogh G: Metabolic crosstalk between membrane and storage lipids facilitates heat stress management in *Schizosaccharomyces pombe*. *PloS One*. 2017; 12(3):e0173739. doi: 10.1371/journal.pone.0173739.

Koprivanacz K, Tőke O, Besztercei B, Juhász T, Radnai L, Merő B, Mihály J, Péter M, Balogh G, Vigh L, Buday L, Liliom K: The SH3 domain of Caskin1 binds to lysophosphatidic acid suggesting a direct role for the lipid in intracellular signaling. *Cell Signal*. 2017; 32:66-75. doi: 10.1016/j.cellsig.2017.01.019.

Kasza Á, Hunya Á, Frank Z, Fülöp F, Török Z, Balogh G, Sántha M, Bálint Á, Bernáth S, Blundell KL, Prodromou C, Horváth I, Zeiler HJ, Hooper PL, Vigh L, Penke B: Dihydropyridine Derivatives Modulate Heat Shock Responses and have a Neuroprotective Effect in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*. 2016; 53(2):557-71. doi: 10.3233/JAD-150860.

Hooper PL, Durham HD, Török Z, Hooper PL, Crul T, Vigh L: The central role of heat shock factor 1 in synaptic fidelity and memory consolidation. *Cell Stress Chaperones*. 2016; 21(5):745-53. doi: 10.1007/s12192-016-0709-1.

Laurinyecz B, Peter M, Vedelek V, Kovacs AL, Juhasz G, Maroy P, Vigh L, Balogh G, Sinka R: Reduced expression of CDP-DAG synthase changes lipid composition and leads to male sterility in *Drosophila*. *Open Biol*. 2016; 6(1):50169. doi: 10.1098/rsob.150169.

Balajthy A, Somodi S, Pethő Z, Péter M, Varga Z, Szabó GP, Paragh G, Vigh L, Panyi G, Hajdu P: 7DHC-induced changes of Kv1.3 operation contributes to modified T cell function in Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Pflugers Arch*. 2016; 468(8):1403-18. doi: 10.1007/s00424-016-1851-4.

Glatz A, Pilbat AM, Németh GL, Vince-Kontár K, Jósvay K, Hunya Á, Udvardy A, Gombos I, Péter M, Balogh G, Horváth I, Vigh L, Török Z: Involvement of small heat shock proteins, trehalose, and lipids in the thermal stress management in *Schizosaccharomyces pombe*. *Cell Stress Chaperones*. 2016; 21(2):327-38. doi: 10.1007/s12192-015-0662-4.

Antal O, Peter M, Hackler L jr, Man I, Szebeni G, Ayaydin F, Hideghety K, Vigh L, Kitajka K, Balogh G, Puskas LG: Lipidomic analysis reveals a radiosensitizing role of gamma-linolenic acid in glioma cells. *Biochim Biophys Acta*. 2015; 1851:1271-82

Escriba PV, Busquets X, Inokuchi J, Balogh G, Torok Z, Horvath I, Harwood JL, Vigh L: Membrane lipid therapy: Modulation of the cell membrane composition and structure as a molecular base for drug discovery and new disease treatment. *Prog Lipid Res.* 2015; 59:38-53.

Lénárt N, Walter FR, Bocsik A, Sántha P, Tóth ME, Harazin A, Tóth AE, Vizler C, Török Z, Pilbat AM, Vigh L, Puskás LG, Sántha M, Deli MA: Cultured cells of the blood-brain barrier from apolipoprotein B-100 transgenic mice: effects of oxidized low-density lipoprotein treatment. *Fluids Barriers CNS.* 2015;12:17. doi: 10.1186/s12987-015-0013-y

Hoyk Z, Tóth ME, Lénárt N, Dukay B, Nagy D, Vigh J, Veszelka S, Kittel Á, Zvara Á, Puskás L, Deli MA, Sántha M: Neurovascular pathology in ApoB-100 transgenic mice. (*kézirat*)

Dukay B, Tóth ME, Vigh L, Sántha M: Investigating the role of Hsp27 in neuroinflammation and apoptosis using a mouse model of fetal alcohol syndrome. (*kézirat*)

Irodalomjegyzék

Berezki E, Bernát G, Csont T, Ferdinandy P, Scheich H, Sántha M (2008) Overexpression of human apolipoproteinB-100 induces severe neurodegeneration in transgenic mice. *J Promote Res* 7(6): 2246-2252.

Csont T, Berezki E, Bencsik P, Fodor G, Görbe A, Zvara A, Csonka C, Puskás LG, Sántha M, Ferdinandy P (2007) Hypercholesterolemia increases myocardial oxidative and nitrosative stress thereby leading to cardiac dysfunction in apoB-100 transgenic mice. *Cardiovasc Res* 76(1):100-109.

Horvath I, Multhoff G, Sonnleitner A, Vigh L (2008) Membrane-associated stress proteins: more than simply chaperones. *Biochim Biophys Acta* 1778:1653-1664

Lenart N, Szegedi V, Juhasz G, Kasztner A, Horvath J, Berezki E, Toth ME, Penke B, Santha M (2012) Increased Tau Phosphorylation and Impaired Presynaptic Function in Hypertriglyceridemic ApoB-100 Transgenic Mice *PLOS ONE* 7:(9) Paper e46007. 12 p

Löffler T, Flunkert S, Havas D, Sántha M, Hutter-Paier B, Steyrer E, Windisch M (2013). Impact of ApoB-100 expression on cognition and brain pathology in wild-type and hAPPsl mice. *Neurobiol Aging* 34(10):2379-2388.

Nakamoto H, Vigh L (2007) The small heat shock proteins and their clients. *Cell Mol Life Sci* 64:294-306.

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* 15:807–817.

Toth ME, Szegedi V, Varga E, Juhasz G, Horvath J, Borbely E, Csibrany B, Alföldi R, Lenart N, Penke B and Santha M (2013) Overexpression of Hsp27 ameliorates symptoms of Alzheimer's Disease in APP/PS1 mice. *Cell Stress Chaperones* 18:759-771.