

**SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI ÉS INFORMATIKAI KAR**



XXXI. OTDK Biológia Szekció

**A Hsp27 fehérje védelmének a vizsgálata
transzgenikus egerekben**

Alföldi Róbert

MSc II. évfolyam

Témavezető: Dr. Sántha Miklós

Állatgenetikai és Molekuláris Neurobiológiai Csoport

MTA SZBK, Biokémia Intézet

Belső konzulens: Dr. Hermes Edit

Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszék

Természettudományi és Informatikai Kar, SZTE

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	1
TARTALMI ÖSSZEFOGLALÓ	2
IRODALMI ÁTTEKINTÉS	3
A hősokk-, vagy stressz fehérjék.....	3
A kismolsúlyú stresszfehérjék.....	3
A humán Hsp27 fehérje.....	3
A szívelégtelenség.....	4
A Doxorubicin HCl és sejtkárosító mellékhatásai	4
Az Aldoszteron és sejtkárosító mellékhatásai	5
Neurodegeneratív betegségek és az Alzheimer-kór	5
Az etanol sejtkárosító hatásai	6
CÉLKITŰZÉSEK	7
ELŐZMÉNYEK.....	8
Transzgenikus egérvonalak előállítása	8
ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	9
A transzgenikus utódok genotipizálása	9
DNS tisztítás transzgenikus egerek farokmintáiból	9
A Hsp27 transzgenikus egerek genotipizálása PCR analízissel	9
Fehérje tisztítása transzgenikus egerekből	10
Western blot analízis	10
Immunhisztokémia	11
Vad típusú és hHsp27 transzgenikus egerek Doxorubicinnel való kezelése.....	11
Az egerek testsúlyának és szívtömegének mérése	11
Western blot analízis, aktív kaszpáz-3 fehérje kimutatása.....	12
DNS fragmentálódás vizsgálata TUNEL Assay segítségével.....	12
Vad típusú és hHsp27 transzgenikus egerek Aldoszteronnal való kezelése	13
Etanol itatás	13
Fluoro Jade C festés	13
AD/Hsp azaz APPswe/PS1dE9/Hsp27 genotípusú transzgenikus egértörzs előállítása	14
Statisztikai analízis.....	14
EREDMÉNYEK	15

A Hsp27 transzgenikus törzs jellemzése	15
A Hsp27 fehérje termelődésének vizsgálata.....	15
Doxorubicin kezelés hatásának vizsgálata vad típusú és hHsp27 transzgenikus egereken	17
Doxorubicin kezelt egerek testsúlyának és szívtömegének változása.....	17
A doxorubicin kezelés hatására bekövetkező apoptózis vizsgálata	19
Az aldoszteron kezelés szívkárosító hatásának vizsgálata	22
Apoptózis vizsgálata.....	22
Az etanol idegsejt károsító hatásának vizsgálata vad típusú és hHsp27 transzgenikus egerekben	22
A Hsp27 védő hatásának vizsgálata Alzheimer-kór egérmodellben.....	24
DISZKUSSZIÓ ÉS TOVÁBBI CÉLKITŰZÉSEK	27
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	31
IRODALOMJEGYZÉK.....	32
Nyilatkozat	35

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AD	Alzheimer kór (Alzheimer disease)
AD/Hsp	APP ^{swe} /PS1 ^{dE9} /Hsp27-genotípus
A β	Amyloid beta
APAF-1	Apoptotic protease activating factor 1
APP	Amyloid Precursor Protein
Hsp	Hő sokkfehérje (Heat shock protein)
SOD	Szuperoxid-dizmutáz (Superoxide-dismutase)

TARTALMI ÖSSZEFOGLALÓ

A hősokkfehérjék funkciója igen sokrétű az emlős szervezetben. Meghatározó szerepet játszanak a sejtek életében normál körülmények között és stresszhatás alatt is. A hősokkfehérjék szintézise megnövekszik, ha a sejteket stresszhatás éri, például hypoxia, oxidatív stressz, különböző toxinok, stb. A stresszválaszban játszott általános szerepük miatt a hősokkfehérjéket gyakran stresszfehérjéknek is nevezik.

Munkánk során egy kismolsúlyú hősokkfehérje, a Hsp27 kardioprotektív illetve neuroprotektív hatásának tanulmányozását tűztük ki célul *in vivo*, transzgenikus egerekben.

Kardiotoxikus ágensként doxorubicint valamint aldosteront alkalmaztuk. A doxorubicin ismert tumor ellenes szer, amelyet elterjedten használnak a daganat-terápiában. Kiterjedt alkalmazását a szívre gyakorolt káros hatása korlátozza. Az aldosteron tartósan megemelkedett szintje pedig szív- és érrendszeri károsodást idéz elő. Klinikai megfigyelések bizonyították, hogy a kórosan megemelkedett aldosteron szint a szív- és érrendszeri betegségben szenvedőknél kétszeresére növeli a halálozás kockázatát. Jelen kutatásainkban megfigyeltük, hogy a doxorubicin és az aldosteron szívre gyakorolt toxikus hatását a Hsp27 fehérje képes befolyásolni, jelentősen csökkenteni.

A Hsp27 fehérje feltételezett neuroprotektív szerepét két kísérletben vizsgáltuk. Az első kísérletben vad típusú és transzgenikus egereket több héten keresztül 20% EtOH tartalmú ivóvízzel itattuk. Kimutattuk, hogy a Hsp27 túltermelő transzgenikus egerek agyában szignifikánsan kevesebb neuron pusztult el a vad típusú állatokhoz képest. A második kísérletsorozatban Hsp27 transzgenikus állatokat az Alzheimer-kór egérmódeli törzsével kereszteztük, és azt vizsgáltuk, hogy a Hsp27 túltermelése képes-e a betegség jellemző tüneteinek kialakulását befolyásolni, azt számottevően lassítani illetve megakadályozni. Eredményeink azt mutatják, hogy a Hsp27 fehérjét túltermelő transzgenikus AD modell egerek agyában szignifikánsan kevesebb amyloid plakk alakult ki az AD modellhez viszonyítva.

A kísérletek során a Hsp27 feltételezett kardio- valamint neuroprotektív hatását molekuláris biológiai eszközökkel (western blot analízis, immunhisztokémia, TUNEL Assay) vizsgáltuk.

Kulcsszavak: hősokkfehérje, kardiotoxicitás, apoptózis, neurotoxicitás, Alzheimer-kór, transzgenikus egér

IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A hősokk-, vagy stressz fehérjék

A stresszfehérjék a pro- és eukarióta élővilágban egyaránt előforduló fehérjék, melyek szintézise általánosan elterjedt a sejtek normál működése során és stressz folyamatok alatt is. Fokozott termelődésüket először hőstressz alatt fedezték fel ¹, majd később megfigyelték, hogy számos folyamat során fokozódik a szintézisük, mint például a hirtelen bekövetkező környezeti változások, oxidatív stressz, hypoxia, alkoholok és különféle gyógyszerek, toxinok hatására. A hősokkfehérjék intracelluláris chaperonok, kiemelkedő szerepet játszanak a fehérjék helyes konformációjának kialakításában és a különböző sejtorganellumok közötti szállításukban, valamint a fehérjeaggregáció gátlásában ². A hibás vagy rosszul feltekeredett fehérjéket pedig a sejt proteaszóma rendszeréhez irányítják.

A kismolsúlyú stresszfehérjék

A stresszfehérjéket általában molekulatömegük alapján 5 nagy családba soroljuk, ezek a Hsp100, a Hsp90, a Hsp70, a Hsp60 és a 10-40 kDa nagyságú kismolsúlyú Hsp-k családja.

A kismolsúlyú csoportba tartozó fehérjék jellemzője egy mindegyikükben fellelhető 100 aminosavas, konzervált alpha-crystallin domén, mely a szubsztrátok kötésének helyéül szolgál, valamint a fehérjeaggregáció megakadályozásáért felelős ³.

A kismolsúlyú hősokkfehérjék közé tartozik többek között a Hsp27 fehérje is, mely emberben és patkányban 27 kDa nagyságú, de egérben a 25 kDa-os izoformája található meg. A Hsp27 fehérjék legfontosabb tulajdonsága közé sorolható azon képességük, hogy az instabil térszerkezetű fehérjékhez képesek kapcsolódni, így megakadályozzák azok aggregációját, valamint biztosítják későbbi helyreállításuk lehetőségét ^{4,5}. A kismolsúlyú hősokkfehérjék önmagukban ATP-független chaperonok révén ugyan a fehérjék javítására nem képesek, de továbbítani tudják azokat más, ATP-függő chaperonoknak, mint pl a Hsp70 család tagjai.

A humán Hsp27 fehérje

Számos sejttypusban megtalálható, de elsősorban olyan szövetekben termelődik nagyobb mennyiségben, ahol fokozottabb az oxidatív metabolizmus. Ilyen például a szívizom, a vázizom és az agy. Normál élettani körülmények között akár 1 MDa-os oligomer komplexet is alkothatnak⁶, de ez a forma stressz hatására percekben belül felbomlik poszt transzlációs

foszforilálódás következtében⁷, majd a stressz elmúltával foszfatázok defoszforilálják a fehérjét.

A Hsp27 anti-apoptotikus hatása is ismert. Meggátolja a különböző fehérjék pro-apoptotikus hatását a külső útvonalon, a mitokondriális úton pedig a citokróm c-hez kapcsolódik és így gátolja annak APAF-1-hez való kötődését, amely következtében elmarad a kaszpáz aktivációjában szerepet játszó kulcsfehérjék aktiválódása.

A szívelégtelenség

A szívelégtelenség egy olyan patofiziológiás állapota a szívnek, melyben pumpafunkciója sérül, és nem képes ellátni a szervezet vérkeringésének igényeit. Több tényező is kiválthatja a szív ezen kóros állapotát, melyek közül legfontosabb a miokardiális infarktus, az ishémias szívbetegségek, a koszorúér betegségek és a magas vérnyomás. Ezen esetek közül majd mindegyikben a szívizomsejtek sérülésre és pusztulásra a legtipikusabb szövettani kép. A kardiovaszkuláris betegségek a vezető halálokok közé tartoznak Európában és azon belül Magyarországon is, ezért korai felismerésük, diagnózisuk és célzott gyógykezelésük kiemelkedően fontos.

A Doxorubicin HCl és sejtkárosító mellékhatásai

A Doxorubicin-hidroklorid egy ismert, a gyógyászatban máig használatos citosztatikus tumor ellenes szer, amely a rákos megbetegedések számos fajtájánál használható. Alkalmazhatósága azonban limitált, mivel irreverzibilis kardiomiopátiát idézhet elő magas kumulatív dózis (550mg/m^2) esetén, főleg gyermekeknél. A szer szívtoxikus hatása összefüggésbe hozható az apoptózissal, az oxidatív stressz által okozott károsodásokkal, és a szívizomsejtek DNS szintézisére gyakorolt közvetlen hatásával⁸.

Több elmélet is született a Doxorubicin szívtoxikus mellékhatásának magyarázatára, de eddig a *szabadgyök elmélet* a legelterjedtebb és leginkább elfogadottabb elmélet, ami szerint a citokróm P-450 katalizálásával a doxorubicin molekula adriamicinon részének B gyűrűje szemikinon formává redukálódik. Ez a folyamat aerob viszonyok között szuperoxid szabadgyök keletkezéséhez vezet, így már kis mennyiségű doxorubicin is elég ahhoz, hogy nagy mennyiségű szabadgyök keletkezését katalizálja⁹⁻¹¹.

Az Aldoszteron és sejtkárosító mellékhatásai

Az aldoszteron a mineralokortikoidok családjába tartozó szteroid hormon, amelyet a mellékvesekéreg külső részében található zona glomerulosa sejtek termelnek. Az aldoszteron normál körülmények között befolyásolja a nátriumretenciót és a és káliumexrécíót, de számos tanulmány azt is kimutatta, hogy tartósan megemelkedett szintje szív- és érrendszeri károsodást idéz elő. Ezen kívül klinikai megfigyelések azt bizonyították, hogy a kórosan megemelkedett aldoszteron szint a szív-és érrendszeri betegségben szenvedőknél kétszeresére növeli a halálozás kockázatát ¹²⁻¹⁴. Azon mechanizmusok, amelyek az aldoszteron indukálta apoptózist közvetítik még nem teljesen tisztázottak. Az eddigi *in vitro* vizsgálatok (szívizomsejt kultúrán) arra utalnak, hogy mind a mineralokortikoid-függő¹⁵ mind a független¹⁶ utak is szerepet játszhatnak a folyamatban.

Neurodegeneratív betegségek és az Alzheimer-kór

A neurodegeneratív betegségek nagy hányadára jellemező a különböző sejten kívüli és sejten belüli fehérjeplakkok kialakulása. Előfordul azonban, hogy az egyes betegségeknél hasonló fehérjeaggregátumok képződnek (pl. tauopathiák), ezért sok esetben nem könnyű a neurodegeneratív betegségeket egymástól elkülöníteni. Általánosan viszont minden neurodegeneratív betegségre jellemző az idegsejtek károsodása, sejtspecifitása és pusztulásának a régiója.

Az Alzheimer-kór (Alzheimer's disease, rövidítve AD) az egyik leggyakrabban előforduló, demenciával járó neurodegeneratív betegség, melynek legfőbb tünete a memória és a kognitív funkciók folyamatos beszűkülése, elbutulás (demencia) ^{17,18}. Patológiai jellemzői a neurofibrilláris kötegek megjelenése, az amyloid plakkok kialakulása, oxidatív stressz, idegsejtek elhalása, és végső soron az agyszövet sorvadása ^{19,20}. Az amyloid plakkok feltételezhetően neurotoxikusak is lehetnek a körülöttük megfigyelhető elhalt idegsejtek alapján, így a körülöttük húzódó, velük érintkező axonokat károsítják, ezzel előidézve a károsodott neuronális kötegek mennyiségének növekedését és a betegség előrehaladását. Az amyloid plakkok valamint a neurofibrilláris kötegek jellemzően specifikus régiókban fordulnak elő, például az emléknymok kialakításában és a térbeli tájékozódásban szerepet játszó entorhinális kéregben, a tanulásban szerepet játszó hippokampusban, és az emocionális tanulásért, memóriáért felelős amygdalában.

Az etanol sejtkárosító hatásai

A tartós alkoholfogyasztás sejtkárosító hatásai a tudomány számára ismert, sejtípustól független folyamatok²¹. Az etil-alkohol metabolizmusa során keletkező acetaldehidek és szabadgyökök igen károsak a sejtek számára, károsabbak, mint maga a kiindulási anyag.

Az etanol lebontása során a szervezetben először acetaldehiddé oxidálódik, majd további oxidációs lépések során ecetsavvá alakul. Ezután a szervezet az ecetsavat tovább bontja vízre és CO₂-ra.

Alkoholok hatására az agyban fokozódik a reaktív oxigéngyökök termelődése, amelyek kölcsönhatásba lépnek az ott található membrán lipidekkel (lipidperoxidáció) és fehérjékkel (aggregátum képzés). Ezen módosulások hatására a membrán struktúrájában változások lépnek fel, amik sok esetben neuron pusztuláshoz vezethetnek²².

A fent említett stresszel járó folyamatok, más hatásokhoz hasonlóan aktiválják a stresszfehérjéket, és növelik azok termelődésének mértékét.

CÉLKITŰZÉSEK

Munkánk során arra kerestük a választ, hogy a Hsp27 fehérje rendelkezik-e:

a) kardioprotektív hatással:

a/1) akut Doxorubicin kezelés alatt és

a/2) akut Aldoszteron kezelés alatt.

illetve,

b) neuroprotektív hatással:

b/1) krónikus Etanol kezelés alatt és

b/2) Alzheimer-kór során kialakuló neurodegenerációval szemben.

A fentiek ismeretében munkacsoportunk a következő feladatok megvalósítását tűzte ki célul:

- i. Transzgenikus és vad típusú egércsoportok akut Doxorubicin kezelése
- ii. Transzgenikus és vad típusú egércsoportok akut Aldoszteron kezelése
- iii. Transzgenikus és vad típusú egércsoportok krónikus Etanol kezelése
- iv. Hsp27 transzgenikus egértörzs keresztezése az AD validált állatmodelljével
- v. Kardiomiocita apoptózis vizsgálata immunhisztokémiai módszerekkel
- vi. A szívizom aktivált kaszpáz-3 jelenlétének detektálása immunblottolós módszerrel
- vii. Amyloid plakk festés és mennyiségi összehasonlítása a különböző genotípusú állatokban
- viii. Apoptózis és neurodegeneráció vizsgálata immunhisztokémiai módszerekkel
- ix. Idegsejt elhalás vizsgálata Fluoro Jade C festéssel

ELŐZMÉNYEK

Transzgenikus egérvonalak előállítása

A korábbiakban csoportunk létrehozott egy olyan transzgenikus egértörzset, amely különböző szöveteiben a humán Hsp27 fehérje túltermelődik. A transzgenikus vonal előállításánál a hagyományos pronukleusz mikroinjekciós eljárást alkalmazták²³. Petesejt donorként FVB egértörzset használtak. 6-8 hetes nőstény egereket szuperovuláltattak. A megtermékenyített petesejteket a petevezetékéből izolálták, és a kumulus sejtektől rövid hyaluronidáz enzimes kezeléssel választották el. Mikroinjektálásra Hoffman optikával és kondenzorral felszerelt Nikon Eclipse TS 100 mikroszkópot és Leitz-típusú mikromanipulátort használtak. A megtermékenyített petesejtek hím pronukleuszát 2 ng/μl linearizált, tisztított hHsp27 DNS-sel injektálták. A mikroinjektálás végén az ép és egészséges petesejteket izolálták, és CBA vazektomizált hímekkel párosított, CD1 álvemhes anyák petevezetékébe ültették vissza.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

A transzgenikus utódok genotipizálása

DNS tisztítás transzgenikus egerek farokmintáiból

Az megszületett utód egerekből 10 napos korban szövetmintát vettünk (farokvég). A begyűjtött szövetmintát 55 °C-on emésztettük 200 µl TNES (10 mM Tris, pH 7,5, 400 mM NaCl, 100 mM EDTA, 0,6% SDS) pufferben 10 µl proteináz K (10 µg/ml) hozzáadásával. Másnap a mintánkban lévő fehérjéket 55 µl 6 M NaCl-dal kisoztuk, majd 10 perc centrifugálás (13000 rpm, szobahőmérsékleten) után a felülúszóhoz 200 µl kloroformot adtunk. Ezután ismét mikrofugáltuk 10 percig szobahőmérsékleten, 13000 rpm-en. Majd 200 µl jéghideg, 95%-os etanollal precipitáltuk a DNS-t. 30 perc mikrofugálás után (13000 rpm, 4 °C-on) a pelletet 500 µl 70%-os etanollal mostuk át. Ezután 2 percig centrifugáltuk (13000 rpm, szobahőmérsékleten), a pelletet beszárítottuk 37 °C-on, majd visszaoldottuk 100 µl TRIS-HCl pH 7,4 pufferben (65 °C-on, 1 órán keresztül). A DNS oldatok koncentrációját spektrofotométerrel OD 260 nm-en (Nanodrop) határoztuk meg. A DNS-t -20 °C-on tároltuk a felhasználásig. A transzgén jelenlétét PCR reakcióval mutattuk ki.

A Hsp27 transzgenikus egerek genotipizálása PCR analízissel

A 25 µl össztérfogatú PCR reakcióelegy tartalmazott:

- | | |
|---|-----------------------------|
| - 10 µl templát DNS-t (40 ng/ µl) | - 2,5 µl 10mM dNTP |
| - 6,5 µl H ₂ O-t, 2,5 µl 10 x PCR puffer | - 2,5 U Taq polimeráz enzim |
| - 0,5-0,5 µl forward és reverz primer | (Fermentas) |

A PCR reakciókhoz a használt primerek:

Hsp27 forward primer: 5'-GTC CCT GGA TGT CAA CCA CT- 3'

Hsp27 reverz primer: 5'-GAC TGG GAT GGT GAT CTC GT- 3'

A PCR reakciót MJ Research PTC-200 PCR géppel végeztük, a következő paraméterekkel:

- | | |
|-------------------------------|---------------------------|
| - denaturáció: 95 °C - 4 perc | - elongáció: 72 °C - 40 s |
| - denaturáció: 95 °C - 1 perc | - ciklus szám - 37 |
| - annaeling: 65 °C - 40 s | - végül 72 °C - 5 perc |

Végül a PCR termékeket 1,5 µl (2%) etídium bromidot tartalmazó, 1,5 %-os agaróz gélen szeparáltuk, 120 V-on.

Fehérje tisztítása transzgenikus egerekből

Az egértörzsek agyából és szívéből összfehérjét tisztítottunk. A szerveket izoláltuk, és szárazjégre helyeztük. A homogenizáló oldatunk 1 g szövetre számítva 1 ml RIPA puffert (RIPA Lysis and Extraction Buffer), 200 µl NEM (N-ethylmaleimide) és 200 µl PMSF (phenylmethylsulfanylfluorid) proteáz gátlót tartalmazott. A szerveket potterrel homogenizáltuk, majd Eppendorf csövekbe mértük át, és 30 percig centrifugáltuk (4 °C, 10000 rpm). A felülúszó fehérjekoncentrációját megmértük spektrofotométer segítségével 280 nm-en (NanoDrop). Végül a mintákat kihígítottuk 5 µg/ml-es végkoncentrációra víz és mintapuffer segítségével, majd 5 percig 95 °C-on felfőztük őket. Felhasználásig –80 °C-on tároltuk a mintákat.

Western blot analízis

A humán Hsp27 fehérje jelenlétét az egyes szervekben Western blot analízissel határoztuk meg. A fehérjék elválasztására poliakrilamid gélelektroforézist (SDS-PAGE) alkalmaztunk. A poliakrilamid gélre 50 µg fehérjét vittünk fel. A gél egy 5%-os gyűjtő és egy 15%-os szeparáló részt tartalmazott. A különböző molekulatömegű fehérjéket 140 V-os 90 perces futtatással választottuk el, majd a fehérjéket HybondP PVDF (Amersham) membránra blottoltuk. A blottolási idő 1 óra volt 200 mA áramerősségen. A blottolás után a membránt 5% tejport tartalmazó TPBS-ben (Tween 20 – 1 x PBS) áztattuk 1 órán át szobahőmérsékleten. Ezután a membránt az elsődleges, nyúlban termeltetett anti-humán Hsp27 antitesttel (1:5000, Stressgen) kezeltük overnight, 4 °C-on.

Másnap a membránt 3 x 10 perces TPBS mosás után másodlagos, anti-nyúl antitesttel 2 órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk (1:10000 Chemicon). Ezt újabb 3 x 10 perces TPBS mosás követte. A kemilumineszens reagenssel (ECL Advance Western Blotting Detection Reagent, Amersham) a membránt 1 percig inkubáltuk, majd röntgenfilmet tettünk rá, amit 2-10 perc exponálás után előhívtunk.

Immunhisztokémia

A 10 µm vastagságú fagyasztott metszeteket 3% H₂O₂ tartalmú metanolban 40 percig fixáltuk szobahőmérsékleten, majd 2 x 5 percig PBS-ben mostuk. Ezután egy 5 perces kollagenázzal való feltárás következett (1:100 arányban, 100 µl/metszet), és ismét PBS-ben történő mosás 2 x 5 percig. A blokkolást 5%-os kecske szérummal végeztük (100 µl/metszet, 1 órán át szobahőmérsékleten). Majd 5 perc PBS-ben való mosás után a mintákat 50-50 µl elsődleges ellenanyaggal inkubáltuk (anti-humán Hsp27-1:50, Stressgen; hasított kaszpáz-3, 1:250, Cell Signaling; Anti-Aβ ellenanyag, 1:60, Invitrogen).

A másodlagos ellenanyag előtt ismét PBS-ben mostuk a metszeteket 3 x 5 percig. Másodlagos ellenanyagként kecske anti-nyúl IgG peroxidáz-konjugált ellenanyag (Jackson ImmunoResearch) 1:500 arányú hígítását használtuk, 1 óra inkubációs idővel, szobahőmérsékleten. PBS-sel való mosás után peroxidáz reagenssel előhívtuk a mintákat. A sejtmagokat hematoxilinnel festettük meg, majd a lemezeket levegőn szárítottuk, és glicerines zselatinnal lefedtük.

Vad típusú és hHsp27 transzgenikus egerek Doxorubicinnel való kezelése

A kísérlet alatt 24 darab hím, 6 hónapos egeret használtunk fel. Ezek közül 12 egyed hHsp27 transzgenikus (FVB háttérrel), 12 darab vad típusú (FVB) egér volt.

Az egereket ezen túlmenően további két csoportra osztottuk:

- i) doxorubicinnel kezelt csoport (6 db hHsp27Tg és 6 db FVB vad típusú)
- ii) kontrol - 0,9% NaCl-al oltott csoport (6 db hHsp27Tg és 6 db FVB vad típusú)

Az állatokat egyszeri alkalommal intraperitoneálisan 25 mg/kg doxorubicin oldattal oltottuk be (Doxorubicin HCl-Adriamycin, Santa Cruz Biotechnology). A kontrol csoport 0,9%-os NaCl oldatot kapott. Az állatokat az oltástól számított 72 óra elteltével diszlokáltuk, majd szívüket izoláltuk további vizsgálatok céljából.

Az egerek testsúlyának és szívtömegének mérése

A vizsgált egerek testsúlyát laboratóriumi mérlegen (Scaltec spb64), közvetlenül az állatok feldolgozása előtt lemértük. A szívük tömegét közvetlenül azok kivétele után analitikai mérlegen (Kern ALS120-4N) mértük meg.

Western blot analízis, aktív kaszpáz-3 fehérje kimutatása

A gél egy 5%-os gyűjtő, és egy 15%-os szeparáló részt tartalmazott, amelyre 50 µg fehérjét vittünk fel. A fehérjét 50 V-on a gyűjtő gélben, majd 90 V-on a szeparáló gélben futtattuk és választottuk el. Ezután a gélt 10 percig 20% metanol tartalmú 1x Transzfer pufferben áztattuk (Transzfer puffer tartalma: 0,30% Tris base, 1,44% glycine, 98,26% UP víz). A gélen lévő fehérjemintákat ezután HybondP PVDF (Amersham) membránra blottoltuk át. A blottolási idő 60 perc volt 60 V feszültségen, szintén 20% metanolt tartalmazó 1x Transzfer pufferben. Blottolás után a membránt 5% tejport tartalmazó TPBS-ben (Tween 20 – 1x PBS) áztattuk 1 órán át szobahőmérsékleten, 60 rpm-en rázaton. Ezután a membránt elsődleges ellenanyaggal egy éjszakán át inkubáltuk 4 °C-on, rázaton. Az elsődleges ellenanyag nyúlban termeltetett anti-hasított kaszpáz-3-at (1:500 hígításban, Cell Signaling) tartalmazott. Másnap a membránt 3 x 15 perces TPBS mosás után másodlagos ellenanyaggal (kecskében termelt anti-nyúl IgG, peroxidáz-konjugált 1:30000 hígítás, Jackson ImmunoResearch) 45 percen át szobahőmérsékleten inkubáltuk. Ezt újabb 3 x 15 perces TPBS mosás követte. A kemilumineszcens reagenssel (Luminata Forte Western HRP Substrate, Millipore) 2 percig inkubáltuk a membránt, majd a röntgenfilmet 30 perc exponálás után előhívtuk.

DNS fragmentálódás vizsgálata TUNEL Assay segítségével

A vizsgálathoz ApopTag Peroxidase *In Situ* Apoptosis Detection Kit-et (Chemicon) használtunk. Az analízishez 10 µm vastagságú, fagyasztott metszeteket készítettünk a szívizomból, melyeket 3 percig jéghideg acetonban fixáltuk, majd -20°C-on tároltuk őket a felhasználásig.

Az analízis első lépéseként 1% paraformaldehidben fixáltuk a metszeteket (10 perc, szobahőmérsékleten), majd PBS-ben mostuk őket. Ezután -20 °C-ra előhűtött etanol:ecetsav (2:1) oldatában utófixáltuk (-20 °C, 5 perc), amit szintén PBS-ben való mosás követett. Az endogén peroxidázok kioltása céljából a metszeteket 3% H₂O₂-ban áztattuk (szobahőmérséklet, 5 perc), majd ismét PBS-ben mostuk őket. Mosás után minden metszetre 55 µl Equilibration Buffert mértünk, majd legalább 10 másodpercig inkubáltuk őket szobahőmérsékleten. Ezt követően 55-55 µl TdT (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase) enzimet mértünk a mintákra, és 37 °C-on 1 órán át inkubáltuk. Az enzimet Working Strength stop/wash pufferrel inaktiváltuk (15 mp rázatás, 10 perc áztatás

szobahőmérsékleten), majd a puffert lemostuk PBS-sel (3 x 1 perc szobahőmérsékleten). A specifikusan kötődött enzimhez anti-digoxigenin peroxidáz konjugátumot adtunk (65 µl / minta) és a metszeteken 30 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. Miután eltávolítottuk az anti-digoxigenint a metszetekről PBS-sel (4 x 2 perc), a mintákat peroxidáz reagenssel előhívtuk.

Vad típusú és hHsp27 transzgenikus egerek Aldoszteronnal való kezelése

A kísérlet alatt 20 darab hím, 8 hetes egeret használtunk fel. Ezeknek fele hHsp27 transzgenikus (FVB háttérrel), a másik fele vad típusú (FVB) egér volt.

Az egereket ezen túlmenően további két csoportra osztottuk:

- i) aldoszteronnal kezelt csoport (5 db 8 hetes, hHsp27Tg és 5 db 8 hetes, FVB vad típusú)
- ii) kontrol - 0,9% NaCl-al oltott csoport (5db 8 hetes, hHsp27Tg és 5 db 8 hetes, FVB vad típusú)

Az állatokat egyszeri alkalommal subcután 1 mg/kg aldoszteron tartalmú oldattal oltottuk be (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, ALDOSTERONE - A9477). A kontrol csoport ugyanígy 0,9%-os NaCl oldatot kapott. Az állatokat az oltástól számított 7 óra elteltével dislokáltuk, majd szívüket izoláltuk további vizsgálatok céljából.

Etanol itatás

A vizsgálathoz 4 hónapos hHsp27 transzgenikus egereket és vad típusú társaikat használtunk, csoportonként 10-10 darabot. A kísérlet során az etanol kezelt csoportok ivóvíz helyett 10%-os etanol oldatot kaptak 4 napon át, majd 15%-osat újabb 4 napon át, végül 5 hétig 20%-osat.

Ezután az állatokat feldolgoztuk, agyukból fagyasztott metszeteket készítettünk, és az elhalt idegsejteket Fluoro Jade C festéssel láthatóvá tettük.

Fluoro Jade C festés

A festéshez 10 µm vastagságú fagyasztott metszeteket használtunk. A mintákat leszálló alkoholsorban rehidráltuk (3 perc 96% EtOH, 1 perc 70% EtOH, majd 1 perc desztillált víz), majd 30 percig 0,06%-os kálium-permanganát oldattal kezeltük. Ezután a mintákat mostuk, majd 0,0004%-os, 0,1% ecetsavat tartalmazó Fluoro Jade C oldattal

festettük 30 percig. Ismételt mosás után hagytuk a lemezeket megszáradni, majd xilolba áztattuk őket 2 percre, és miután megszáradtak, DPX-el lefedtük azokat.

AD/Hsp azaz APPswe/PS1dE9/Hsp27 genotípusú transzgenikus egértörzs előállítása

Először a csoportunk által korábban előállított FVB háttérű, hHsp27 fehérjét túltermelő állatokat 4-szer visszakeresztettük C57BL/6 törzssel, hogy homogén C57BL/6 háttérű hHsp27 fehérjét túltermelő törzset hozzunk létre. Majd ezt a törzset az Alzheimer-kór klasszikus validált egérmódelijével (APPswe/PS1dE9 törzs, Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA) összekeresztettük. Így egy új genotípusú egértörzset, az APPswe/PS1dE9/Hsp27 vonalat létrehozva.

Az újszülött egereket PCR analízissel genotipizáltuk a következő primerek segítségével az előzőekben már leírt módon:

Hsp27 forward primer: 5'- GTC CCT GGA TGT CAA CCA CT -3'

Hsp27 reverz primer: 5'- GAC TGG GAT GGT GAT CTC GT -3'

APP forward primer: 5'- GAC TGA CCA CTC GAC CAG GTT CTG -3'

APP reverz primer: 5'- CTT GTA AGT TGG ATT CTC ATA TCC G -3'

Psen forward primer: 5'- AAT AGA GAA CGG CAG GAG CA -3'

Psen reverz primer: 5'- GCC ATG AGG GCA CTA ATC AT -3'

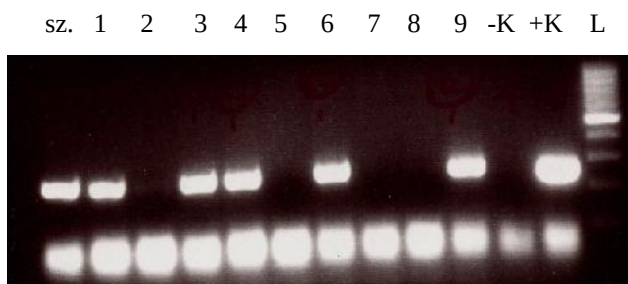
Statisztikai analízis

Az adatok kiértékelésére egy-utas ANOVA tesztet, valamint post-hoc Fisher tesztet alkalmaztunk. A statisztikai elemzést az Origin 8 software segítségével végeztük el. A különbségeket ($p < 0,05$) értéknél vettük szignifikánsnak

EREDMÉNYEK

A Hsp27 transzgenikus törzs jellemzése

Kísérleteink során a laborunkban korábban létrehozott, humán Hsp27 fehérjét túltermelő egértörzset vizsgáltuk. A transzgenikus egyedeket ellenkező nemű FVB állatokkal keresztezve heterozigóta transzgenikus egérvonalat hoztunk létre. A törzs tenyésztése során minden újszülött állatot PCR reakció segítségével genotipizáltunk (1. ábra).

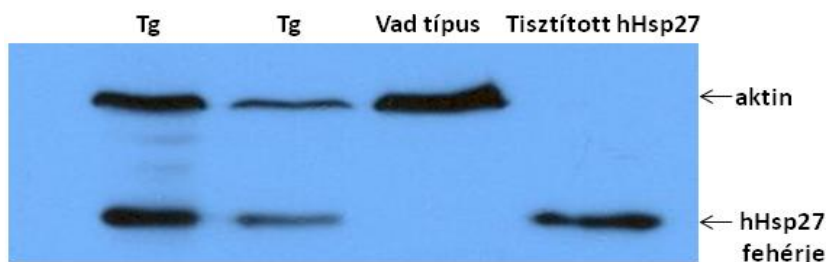


1. ábra hHsp27 transzgén detektálása PCR-módszerrel

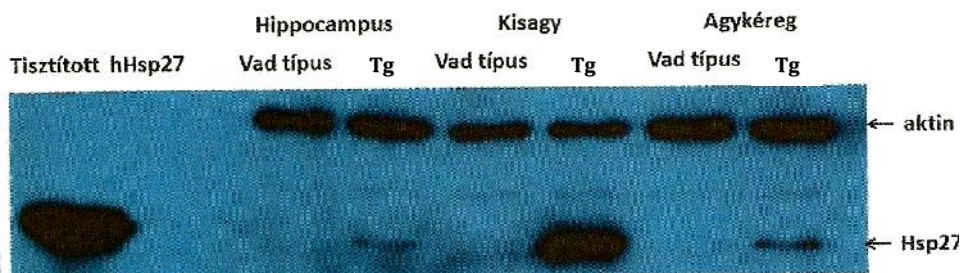
sz. - hHsp27 transzgenikus szülő
1-9. - született utódok
-K - vad típusú állat
+K - Hsp27 plazmid
L - 100 bp DNS marker

A Hsp27 fehérje termelődésének vizsgálata

A transzgenikus egyedekben a humán Hsp27 fehérje tényleges kifejeződését és túltermelését első lépésben Western blot analízissel határoztuk meg. Negatív kontrollként vad típusú egerek szerveiből izolált fehérjét (vad típus), pozitív kontrollként tisztított hHsp27 fehérjét használtunk (2.-3. ábra). A vizsgálat során használt ellenanyag az egér endogén Hsp25-tel nem keresztreagált. Mind a szívben, mind a különböző agyrégiókból származó mintákban kimutatható volt a humán Hsp27 fehérje jelenléte a transzgenikus állatokban. A különböző agyrégiók esetében mennyiségi eltéréseket tapasztaltunk, a transzgén legnagyobb mértékben a kisagyban fejeződik ki, de az agykéregben és a hippocampusban is megfigyelhető.



2. ábra Transzgenikus Hsp27 fehérje kimutatása szív mintákból anti-hHsp27 ellenanyag segítségével



3. ábra Transzgenikus Hsp27 fehérje kimutatása agyszövetből anti-hHsp27 ellenanyag segítségével

A humán Hsp27 fehérje termelődését immunhisztokémiai módszerrel is ellenőriztük. A transzgenikus egerek és vad típusú alomtársaik szívéből és agyából fagyasztott metszeteket készítettünk, melyeket anti-humán Hsp27 ellenanyaggal jelöltünk meg. A transzgenikus egerek szívéből készült metszeteken megfigyelhető erős barna háttér festődés a humán Hsp27 fehérje jelenlétére utal (4. ábra).



hHsp27 transzgenikus

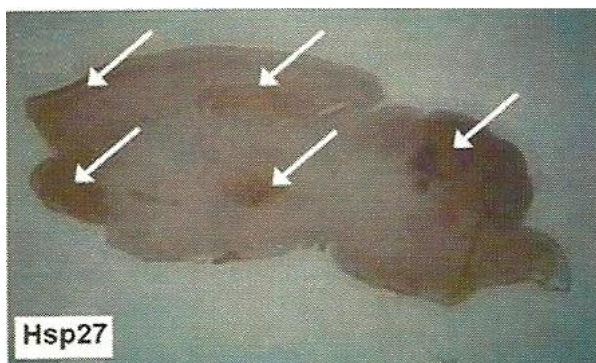


vad típusú kontroll

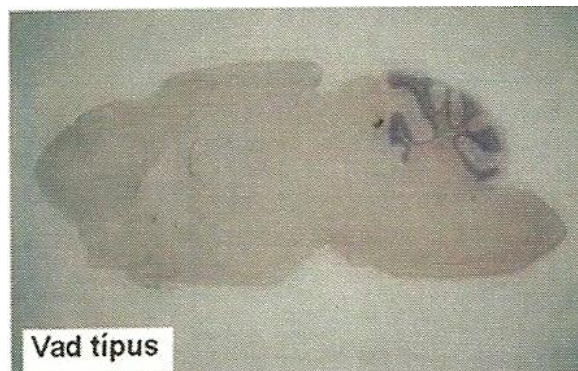
4. ábra a hHSP27 fehérje erős háttér festődése a hHsp27 transzgenikus egerek szívében

10x nagyítás

A transzgenikus állatok agyában nagymértékű Hsp27 fehérje termelődés volt megfigyelhető több régióban, elsősorban a kortextben, a kisagyban és a hippocampusban, amelyeket az ábrán fehér nyilakkal jelöltünk (5. ábra).



Hsp27



Vad típus

5. ábra hHsp jelenlétének és eloszlásának a kimutatása agyban

A nagymértékű Hsp27 fehérje termelődése elsősorban az agykéregben, a kisagyban és a hippocampusban megfigyelhető
elsődleges ellenanyag: anti-hHsp27

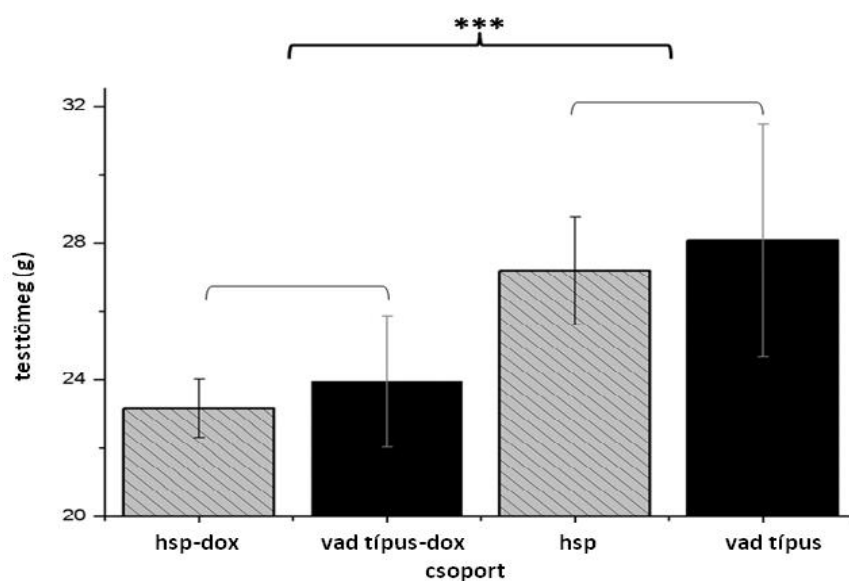
4x nagyítás

Doxorubicin kezelés hatásának vizsgálata vad típusú és hHsp27 transzgenikus egereken

Kísérleteink első szakaszában a humán Hsp27 fehérje kardioprotektív szerepét vizsgáltuk. Szívkárosító anyagként először doxorubicint alkalmaztunk, mivel a szakirodalomból ismert, hogy használata kardiomiopátiát idézhet elő. Az állatokat négy kísérleti csoportra osztottuk, minden csoporthoz 6 hHsp transzgenikus vagy 6 vad típusú (FVB) egér tartozott. Az állatokat egyszeri alkalommal intraperitoneálisan 25 mg/kg doxorubicin oldattal oltottuk be. A kezeletlen csoport ugyancsak intraperitoneálisan 0,9%-os NaCl oldatot kapott.

Doxorubicin kezelt egerek testsúlyának és szívtömegének változása

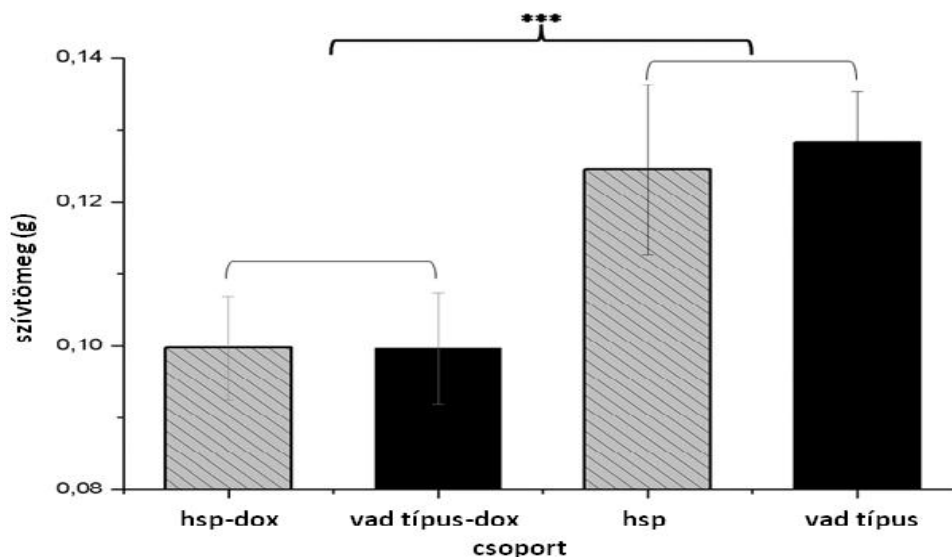
Az állatok testsúlyát az oltástól számított 72 óra elteltével, cervikális diszlokáció után lemértük. A mérések során azt tapasztaltuk, hogy az egerek testsúlya szignifikánsan ($p < 0,001$) lecsökkent a doxorubicin kezelés hatására (6. ábra). A Hsp27 transzgenikus és vad típusú állatok testsúlya között nem találtunk szignifikáns különbséget sem a dox kezelt, sem a kontrol csoportokban.



6. ábra Egerek testsúlyának változása doxorubicin kezelés hatására

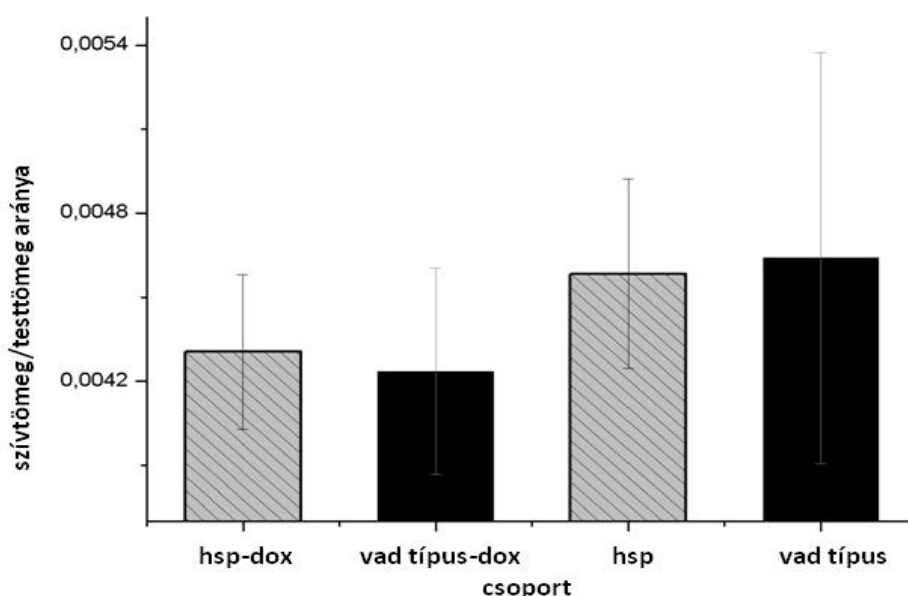
*** $p < 0,001$

A feldolgozás során a dox kezelt és kontroll egerek szívét eltávolítottuk, és lemértük. Hasonlóan az állatok testtömegéhez, dox kezelés hatására a szív tömege is szignifikánsan csökkent ($p < 0,001$). A vad és transzgenikus csoportok között nem találtunk különbséget (7. ábra).



7. ábra A különböző csoportokba tartozó egerek szívének súlyváltozása doxorubicin kezelése hatására
*** $p < 0,001$

A következőkben az állatok szívének tömegét a testsúlyhoz viszonyítva ábrázoltuk (8. ábra). Látható, hogy dox kezelés hatására az állatok szívének tömege a testtömeghez viszonyítva is csökkent mind a vad, mind a Hsp27 transzgenikus állatok esetében, de ez a különbség nem olyan jelentős, statisztikailag nem szignifikáns ($p < 0,08458$). Ez annak köszönhető, hogy doxorubicin hatására a test tömege és a szív tömege is arányosan csökkent. A testsúly és szív tömeg hirtelen bekövetkező, jelentős csökkenése tökéletesen szemlélteti a doxorubicin toxikus hatását a szervezetre.

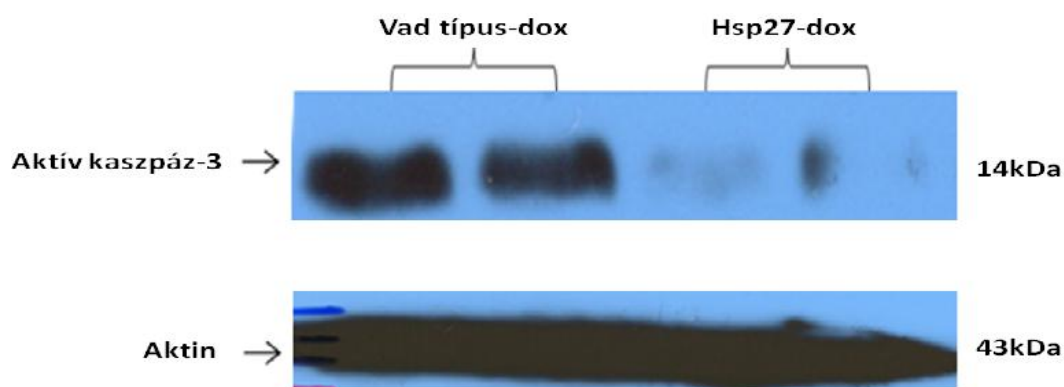


8. ábra Szívtömeg/testtömeg arányának alakulása doxorubicin kezelés után

A doxorubicin kezelés hatására bekövetkező apoptózis vizsgálata

A doxorubicin kezelést követően 72 órával az állatok egy részének szívéből fehérjét tisztítottunk, másik részéből fagyasztott metszeteket készítettünk. A mintákon az apoptózis mértékét vizsgáltuk két féle módszerrel, aktivált kaszpáz-3 fehérje kimutatásával, illetve DNS fragmentálódás vizsgálatával, TUNEL Assay segítségével.

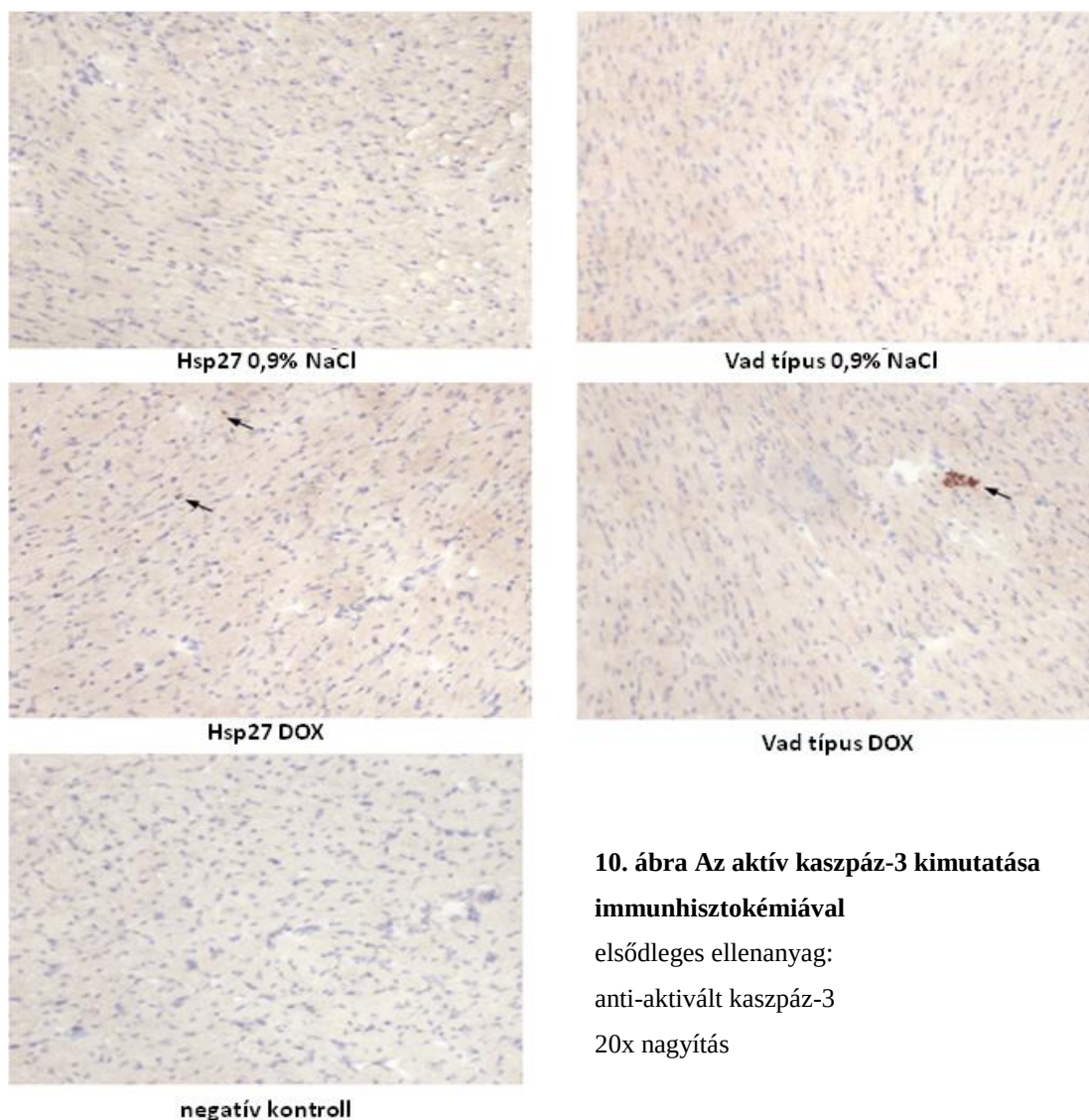
Az apoptotikus jelátvitel egyik fontos markere a kaszpáz-3 fehérje citokróm-c által történő hasítása és aktiválása. Az aktivált (hasított) kaszpáz-3 megjelenését első lépésben Western blot technikával vizsgáltuk. A kísérlet során olyan ellenanyagot használtunk, amely kizárólag a kaszpáz-3 hasított (aktivált) formáját ismeri fel, és nem reagál a teljes fehérjével. A 9. ábrán látható, hogy a vad típusú, doxorubicinnel kezelt (vad típusú DOX) egerek szívében az aktivált kaszpáz-3 nagyobb mennyiségben volt jelen, mint a transzgenikus, doxorubicinnel kezelt (hsp27 DOX) társaik szívében, ahol az csak nyomokban volt kimutatható (9. ábra).



9. ábra Az aktív kaszpáz- 3 kimutatása Western-blot analízissel

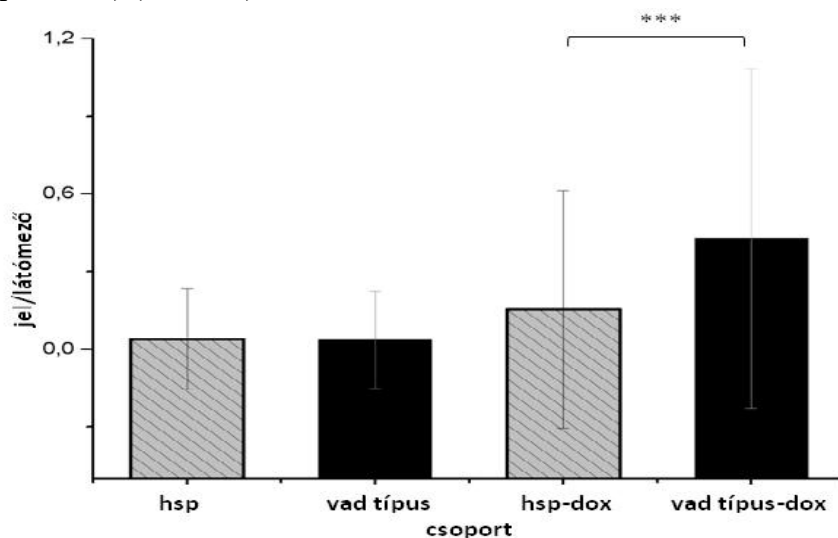
elsődleges ellenanyag: anti-aktivált kaszpáz -3

A Western blot analízissel kapott eredményeinket immunhisztokémiával is megerősítettük. A különböző csoportokba tartozó egerek szívéből fagyasztott metszeteket készítettünk, és anti-aktív kaszpáz-3 ellenanyaggal festettük meg. A DOX kezelt egerek szívéből készült metszeteken egyértelmű festődést kaptunk, míg a fiziológias sóval kezelt egerekből származó metszeteken nem találtunk festődő sejteket. Különbséget tapasztaltunk a doxorubicinnel kezelt csoportok között is a genotípus vonatkozásában, a vad típusú egerekből származó mintákon több sejt festődött, mint a hHsp27 transzgenikus egerekből származó mintákon (10. ábra).



10. ábra Az aktív kaszpáz-3 kimutatása immunhisztokémiával
 elsődleges ellenanyag:
 anti-aktivált kaszpáz-3
 20x nagyítás

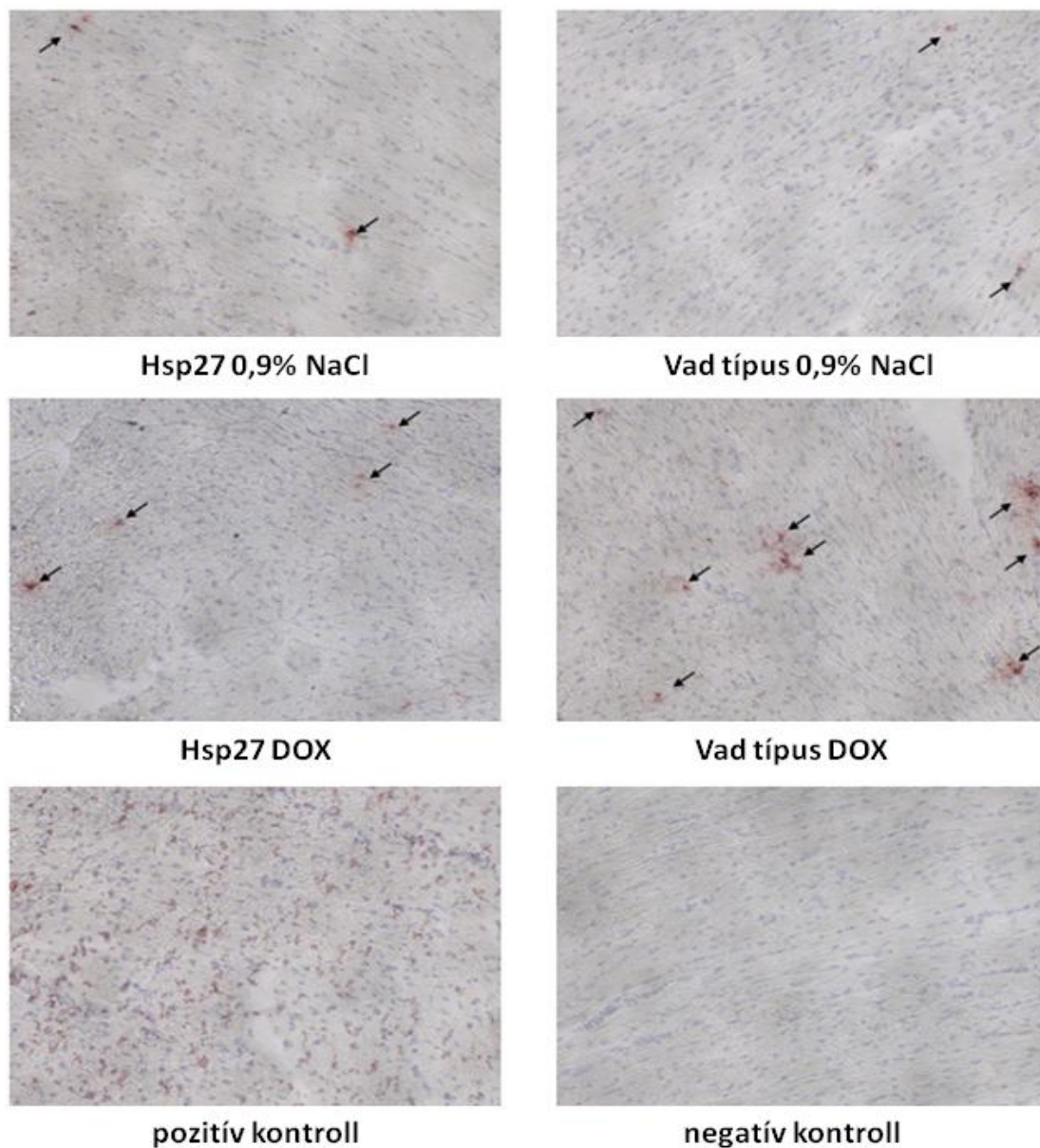
Az immunfestést kvantitatívan is kiértékeltek, a festődő sejteket leszámoltuk, és látómezőnként átlagoltuk. A doxorubicin kezelt vad típusú egerek szívében szignifikánsan nagyobb mértékű aktivált kaszpáz-3 festődés volt kimutatható, mint a transzgenikus egerek szívében (** $p < 0,001$) (11. ábra).



11. ábra Aktív kaszpáz-3 fehérjét tartalmazó sejtek átlaga látómezőnként

A szívizomban fellépő apoptózis mértékét TUNEL assay segítségével is megvizsgáltuk. A módszer az apoptotikus sejtekben létrejövő DNS fragmentálódás kimutatására szolgál. Az elemzés lényege, hogy a DNS fragmentek végén levő szabad OH-csoportokhoz egy terminális deoxinukleotidil transzferáz enzim digoxigenin kapcsolt dUTP-t köt, amely anti-digoxigenin ellenanyag segítségével láthatóvá tehető.

Az egerek szívéből készült fagyasztott metszeteket a TUNEL assay gyári protokollja szerint megfestettük. Pozitív kontrollként DNáz-I kezelt metszeteket, negatív kontrollként pedig olyan metszeteket használtunk, amelyekhez a festés során nem tettünk TdT enzimet. A 12. ábrán látható, hogy a dox kezelés hatására megemelkedett az apoptózis mértéke, azonban a Hsp27 transzgenikus egerekből készült metszeten kevesebb festődő sejt látható a vad típussal összehasonlítva.



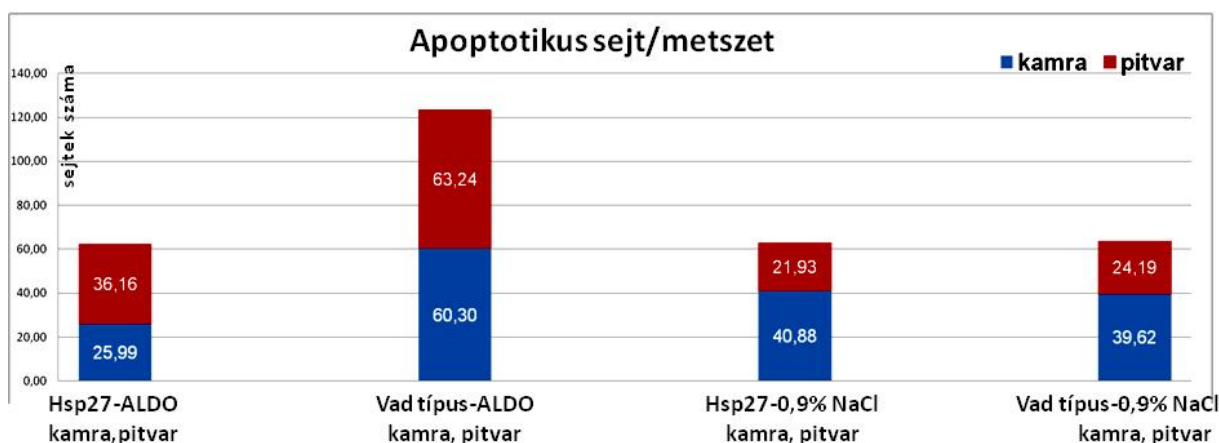
12. ábra DNS fragmentálódás kimutatása, TUNEL assay,
20x nagyítás

Az aldosteron kezelés szívkárosító hatásának vizsgálata

A kísérlet során az állatokat négy csoportra osztottuk: aldosteron kezelt Hsp27 (n=5), aldosteron kezelt vad típus (n=5), kontroll Hsp27 (n=5), kontroll vad típus (n=5). Az állatokat egyszeri alkalommal subcután 1 mg/kg aldosteron tartalmú oldattal oltottuk be. A kontroll csoport azonos térfogatú 0,9%-os NaCl oldatot kapott. Az állatokat 7 órával az oltás után feldolgoztuk. Testsúlyukat és szívük tömegét feldolgozás előtt megmértük, nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget a csoportok között.

Apoptózis vizsgálata

Az állatok szívéből fagyasztott metszeteket készítettünk, az aldosteron kezelés következtében fellépő apoptózist TUNEL assay segítségével vizsgáltuk. A metszeteket festés után lefotóztuk, majd az apoptotikus jeleket mind a kamrákban mind a pitvarokban leszámoztuk. A 13. ábrán látható, hogy aldosteron kezelés hatására megnőtt az apoptotikus sejtek száma, de a Hsp27 állatok szívében kevesebb jel látható a vad típushoz viszonyítva.



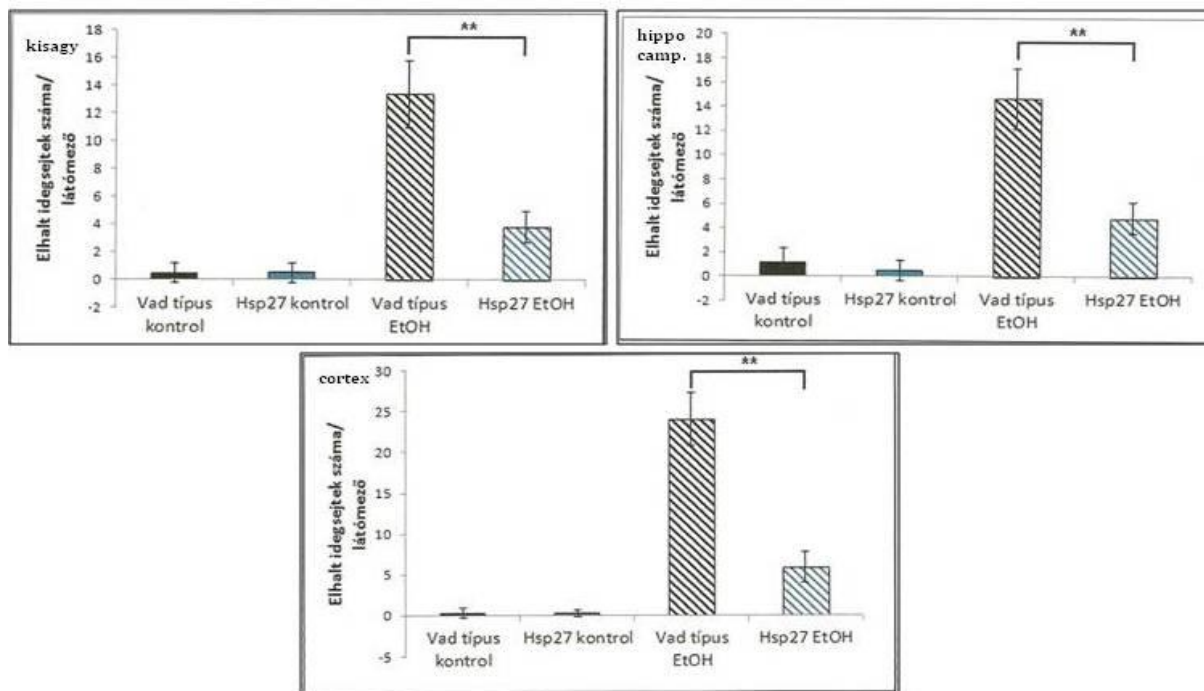
13. ábra Apoptotikus sejtek számának növekedése aldosteron kezelés hatására
8 hetes állatoknál

Az etanol idegsejt károsító hatásának vizsgálata vad típusú és hHsp27 transzgenikus egerekben

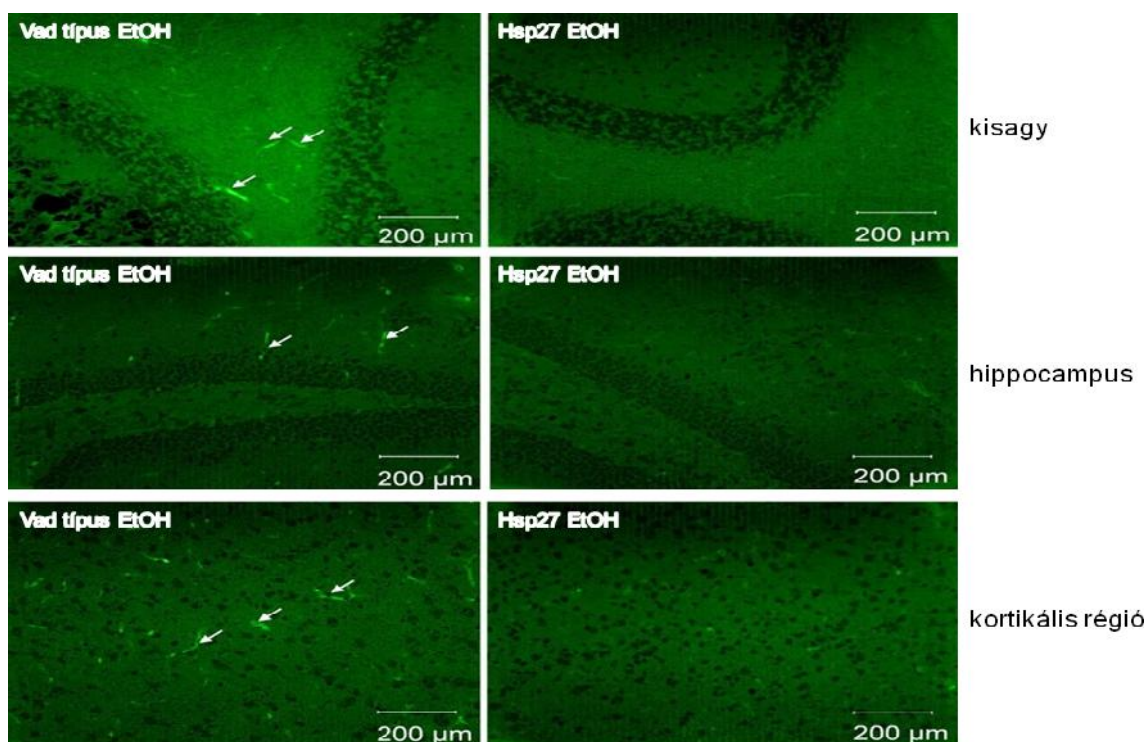
Egy másik kísérletsorozatban a humán Hsp27 fehérje neuroprotektív hatásait tanulmányoztuk. Első lépésben az etanol által kiváltott idegsejt elhalást vizsgáltuk. A kísérlet során Hsp27 transzgenikus és vad típusú állatok ivóvizét 5 hétig 20%-os etanollal helyettesítettük, majd a kezelés után az állatok agyából fagyasztott metszeteket készítettünk. Az idegsejtek pusztulását Fluoro Jade C festéssel vizsgáltuk. Ez egy anionos festék, amely specifikusan csak az

elpusztult neuronokhoz képes kötődni ²⁴. Különböző agyrégiókról mikroszkópos képet készítettünk (15. ábra), a kortextről és a kisagyról 5-5 darabot, míg a hippocampusról 3 darabot, majd a fotókon, a fluoreszcensen jelölt sejteket megszámoltuk (14. ábra).

Mint a mellékelt grafikonok is mutatják mindhárom régióban szignifikánsan ($p < 0,01$) kevesebb elhalt idegsejt volt számolható a Hsp27 transzgenikus, etanollal itatott állatok agyában, mint a vad típusúakéban.



14. ábra Az etanol neurotoxikus hatásának kimutatása a különböző agyi régiókból – mennyiségi összehasonlítás



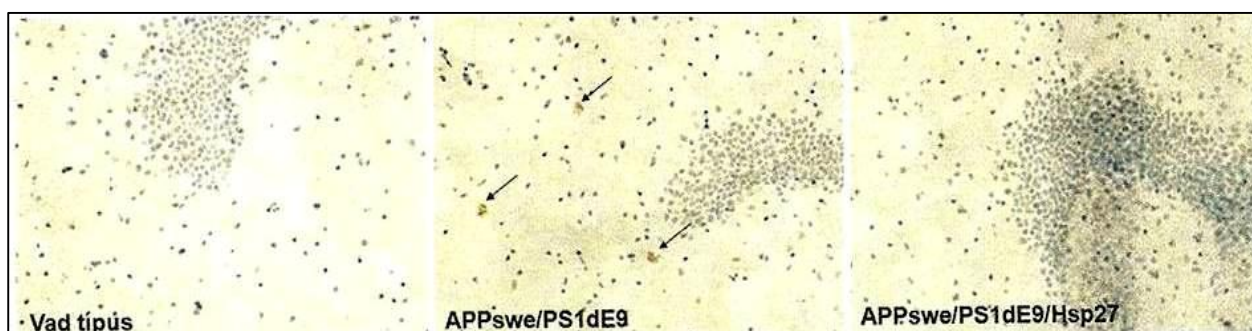
15. ábra Elhalt idegsejtek Fluoro Jade C festése krónikus etanol kezelés után

20x nagyítás

A Hsp27 védő hatásának vizsgálata Alzheimer-kór egérmodellben

Az alábbi kísérletünk célja az volt, hogy megvizsgáljuk a Hsp27 fehérje rendelkezik-e neuroprotektív hatással az Alzheimer-kór tüneteivel szemben. Ehhez először az FVB genetikai háttéren lévő Hsp27 transzgenikus törzsünket négyszer kereszteztük a C57BL/6 vonallal, így C57BL/6 háttérű Hsp27 egértörzset kialakítva. Ezután a már azonos háttéren lévő törzseinket (C57BL/6), az általunk újonnan előállított Hsp27 törzset és az Alzheimer-kór validált állatmodelljét (APPswe/PS1dE9, AD) összekereszteltük. Így olyan AD modell törzset kaptunk, amely a Hsp27 fehérjét túltermeli. (APPswe/PS1dE9/Hsp27, AD/Hsp). 7 hónapos állatok agyából fagyasztott metszeteket készítettünk, melyeken immunhisztokémiai módszerekkel és Fluoro Jade C festéssel vizsgáltuk az Alzheimer-kór során előforduló tüneteket, az amyloid plakkok kialakulását illetve az idegsejtek pusztulását.

Amyloid plakk festés: Az amyloid plakkok kimutatását fagyasztott metszeteken, anti-A β elsődleges ellenanyaggal vizsgáltuk.

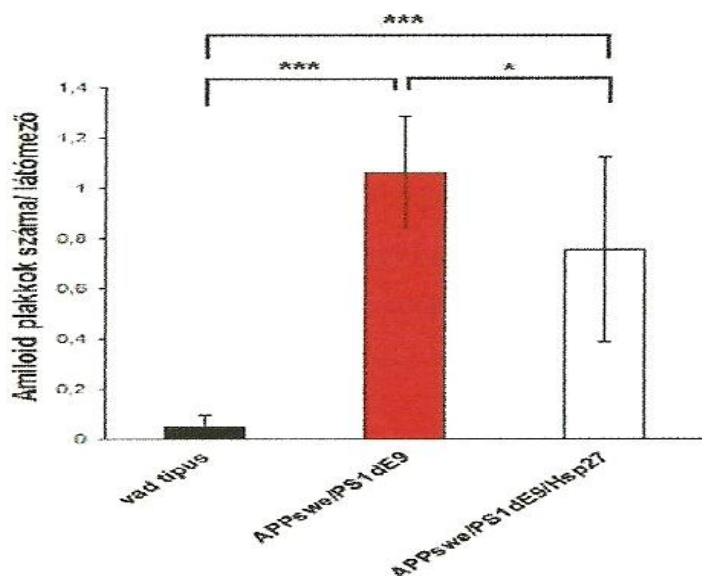


16.ábra Amyloid plakkok immunfestése hippocampusban

elsődleges ellenanyag: anti-A β

20x nagyítás

Mint a mellékelt képek is szemléltetik az AD-s állatok agyában jelentős A β lerakódást és plakk képződést tapasztaltunk (16.ábra). A lerakódás egyaránt megfigyelhető volt a hippocampusban és a kortikális régiókban is. Az AD/Hsp27 genotípusú állatoknál is megfigyelhető volt plakk képződés, de szignifikánsan ($p < 0,05$) alacsonyabb számban, mint az AD-s állatok agyában (17.ábra). A kapott eredmények alapján arra következtethetünk, hogy a Hsp27 fehérje vagy gátolja a plakk képződést az említett folyamatok során, vagy azok (A β peptid) eltávolítását és lebontását segítik elő.



17.ábra Amyloid plakkok immunfestése –mennyiségi kimutatás

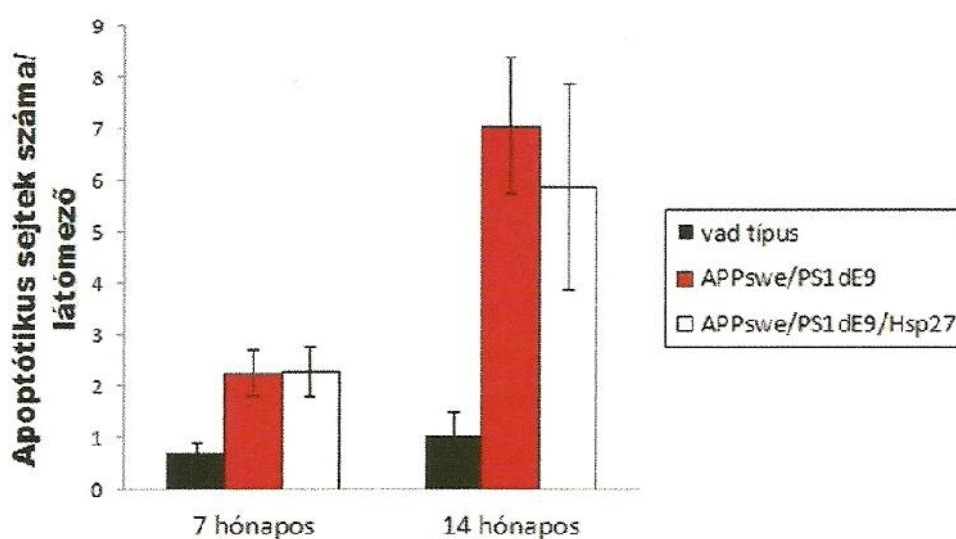
(n=6)

* $p < 0,05$

** $p < 0,01$

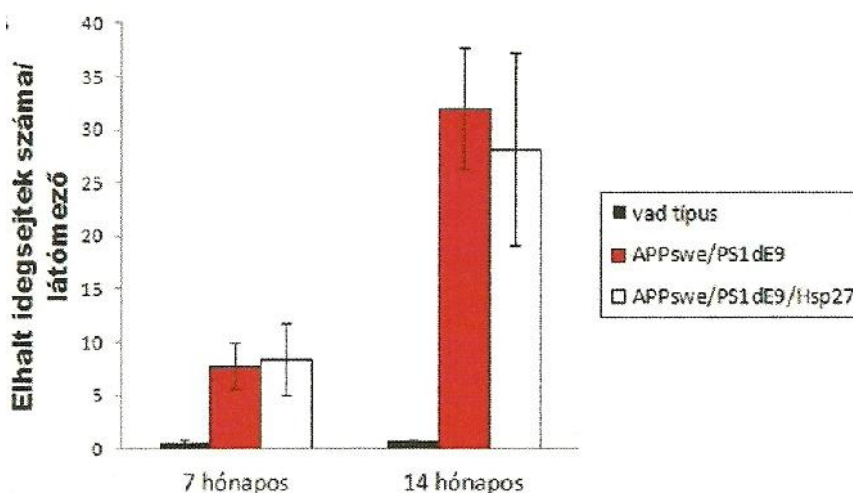
*** $p < 0,001$

Kaspáz-3 immunfestés: Az állatok agyából készült metszeteken az apoptotikus sejteket aktivált kaspáz-3 immunfestéssel tettük láthatóvá. 7 hónapos korban a transzgenikus törzsekben (AD és AD/Hsp) több apoptotikus sejtet számoltunk a vad típushoz viszonyítva, az AD és AD/Hsp csoportok között azonban nem találtunk különbséget. Ezek után megismételtük a festést 14 hónapos állatokból készült mintákkal is. A 18. ábrán látható, hogy a korral jelentősen megnőtt az apoptotikus sejtek száma a transzgenikus törzsekben, míg a vad típusban nem változott számottevően. 14 hónapos korban az AD/Hsp állatokban kevesebb apoptotikus sejtet számoltunk az AD csoporthoz képest, azonban ez a különbség statisztikailag nem szignifikáns.



18.ábra Aktivált kaspáz-3 immunhisztokémia agykéreg és hippocampus

Fluoro Jade C festés: Az elhalt neuronokat Fluoro Jade C festéssel is láthatóvá tettük az állatok agyában. Hasonló eredményeket kaptunk, mint a kaszpáz-3 festés során. 7 hónapos korban nem találtunk számottevő különbséget az AD és AD/Hsp csoportok között. 14 hónapos korra az elhalt idegsejtek mennyisége drasztikusan megemelkedett a transzgenikus törzsekben, az AD és AD/Hsp csoportok között látható különbség ebben az esetben sem szignifikáns.



19.ábra Idegsejtek elhalásának vizsgálata Fluoro Jade C festéssel kortex és hippocampus

DISZKUSSZIÓ ÉS TOVÁBBI CÉLKITŰZÉSEK

Számtalan tanulmány bizonyítja a stresszfehérjék, köztük a Hsp27 fehérje védő szerepét a különböző károsító hatásokkal szemben a legkülönbözőbb szövetekben, főként a szívizomban és az agyszövetben.

A Hsp27 fehérje transzlációja stressz során megnövekszik, majd a káros hatás megszűnésével szintje drasztikusan lecsökken. Stressz körülmények között több fontos feladata van; először megköti a károsodott fehérjéket, így megakadályozza, hogy azok aggregálódjanak, és megkönnyíti a sérült fehérjék eltávolítását. Ezen kívül gátolja az apoptózis folyamatát, stabilizálja a citoszkeletont, segíti a sejteket az oxidatív stressz, a szabadgyökök és a rendellenes szerkezetű fehérjék által okozott károsodásokkal szembeni védekezésben ²⁵.

A Hsp27 kardioprotektív hatása

Kísérleteink során két kardiotoxikus ágenssel szemben vizsgáltuk a humán Hsp27 fehérje szívben kifejtett védő hatását. Első lépésben akut doxorubicin kezelést alkalmaztunk. Eredményeink azt mutatják, hogy a doxorubicin indukálta toxicitás apoptózist váltott ki a szívizomszövetben. Western blot analízissel megállapítottuk, hogy a szívizomban a kezelés hatására megnövekedett az aktivált kaszpáz-3 szintje, azonban a hHsp27 transzgenikus csoportban ez a növekedés mérsékeltebb a vad típusú társaikhoz képest. A Western blottal kapott eredményeinket immunhisztokémiai vizsgálattal, hasított kaszpáz-3 festéssel is megerősítettük.

A doxorubicinnel kiváltott apoptózis mértékét TUNEL assay segítségével is megvizsgáltuk. Hasonló eredményeket kaptunk, mint a kaszpáz-3 festéssel. Dox kezelés hatására az apoptotikus sejtek száma megemelkedett, azonban a Hsp27 transzgenikus állatok szívéből készült metszeteken kevesebb festődő sejtet számoltunk a vad típusúhoz viszonyítva. A fenti eredményekből arra következtethetünk, hogy a Hsp27 túltermelése csökkenti a doxorubicin kezelés által kiváltott apoptózis mértékét a szívizomban. Ezen eredményeink egybevágóak Li Liu és mtsai által bemutatott korábbi adatokkal⁸.

A Hsp27 fehérje szívizomra gyakorolt védő hatását egy másik kardiotoxikus ágenssel is szemléltetni szeretnénk volna. Burniston és mtsai korábban kimutatták patkányokban, hogy egy egyszeri, 1mg/kg-os aldosteron kezelést követően 7 órával apoptotikus sejtek figyelhetők meg a szívizomban²⁶. Ezért a fenti paraméterekkel elvégeztük a kísérletet Hsp27

transzgenikus és vad típusú egereken, majd az akut aldosteron kezelést követően TUNEL assayt végeztünk az állatok szívéből készült metszeteken. Hasonlóan, mint a doxorubicin esetében, itt is kevesebb apoptotikus sejtet számoltunk az aldosteron kezelt transzgenikus állatcsoportnál a vad típussal összehasonlítva. A kis mintaszám miatt statisztikai analízist ebben az esetben nem végeztünk. Kutatócsoportunkban további kísérletek folynak annak érdekében, hogy a Hsp27 aldosteron kezeléssel szembeni védő hatását megerősítsük.

Az, hogy ez a két vegyület pontosan milyen útvonalakon keresztül károsítja a szívizomsejteket, még nem teljesen tisztázott, de az irodalomban fellelhető adatokból, és saját eredményeinkből az látszik, hogy mindkét szer alkalmazása végeredményben a sejtek apoptózisához vezet. A stresszfehérjéről már korábbi vizsgálatok során bebizonyosodott, hogy különböző útvonalakon keresztül gátolhatja az apoptózis folyamatát²⁵. Kimutatták, hogy a sejtet érő káros hatások következtében felhalmozódó sérült fehérjék egymással összekapcsolódva nagy fehérjeaggregátumokat képeznek, amelyek apoptózist indukálhatnak²⁷. A Hsp27 azáltal, hogy megköti a hibás szerkezetű fehérjét, és megakadályozza, hogy azok aggregálódjanak, meggátolhatja az apoptózis kialakulását. Ezen kívül a Hsp27 direkt módon is gátolhatja a kaspáz kaskád aktivációját. Különböző tanulmányok kimutatták, hogy a Hsp27 kölcsönhatásba léphet az apoptoszóma egyes komponenseivel. Így azáltal, hogy megakadályozza az apoptoszóma komplex megfelelő működését, negatívan szabályozza a pro-kaspáz-9 aktivációját. Ezen kívül a pro-kaspáz-3-mal kölcsönhatásba lépve gátolja a kaspáz-3 aktivitását, de egyes elméletek szerint a citokró-m-c felszabadulását is megakadályozza a mitokondriumból²⁸⁻²⁹.

A közvetlen apoptózist gátló hatásukon kívül a stresszfehérjéknek fontos szerepük van az oxidatív stressz elleni védelemben. Ez azért különösen fontos, mert jelenleg a legelterjedtebb és leginkább elfogadott elmélet a doxorubicin szívizomzatra gyakorolt káros hatásának magyarázatára a szabadgyök elmélet. A keletkező reaktív oxigén gyökök károsítják a sejtek alkotóelemeit, ami végül apoptózishoz vagy nekrotizishoz vezethet. Korábbi megfigyelések szerint a Hsp27 megvédi a sejteket a szabadgyökökkel szemben, valószínű azáltal, hogy megemeli a sejt glutation szintjét, amely egyik feladata a reaktív oxigén gyökök detoxifikálása³⁰.

A Hsp27 fehérje védő hatása etanol kezeléssel szemben

Kísérletünk másik szakaszában a Hsp27 neuroprotektív hatását vizsgáltuk különböző idegsejteket károsító folyamatokkal szemben, elsőként krónikus etanol kezelés során. Számos

tanulmány szerint, a hosszú távú etanol kezelés hatására megemelkedik a szabadgyökök mennyisége az agyban, ami a fehérjék károsodásához valamint a lipid peroxidáció mértékének növekedéséhez vezet. Ez az idegsejtekre nézve különösen veszélyes, mivel SOD és kataláz aktivitásuk alacsony³¹. Kimutatták, hogy az erős antioxidánsok képesek az etanol káros hatásaival szemben megóvni az idegsejteket³². Az irodalomban fellelhető adatok szerint a kismolsúlyú hősokkfehérjék, köztük a Hsp27, segíthetik a sejteket az oxidatív károsodásokkal szembeni védekezésben.

Kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy krónikus etanol kezelés után a Hsp27 fehérjét túltermelő transzgenikus egerek agyában szignifikánsan kevesebb idegsejt károsodott a vad típusú állatokhoz hasonlítva. Feltételezhetjük, hogy ez legalább részben a Hsp27 oxidatív stresszel szembeni védő hatásának köszönhető.

A Hsp27 védő szerepe az AD szerű tünetek kialakulása során

Az A β peptid és annak oligomerizációja kiemelkedő szerepet játszik az Alzheimer-kór tüneteinek kialakulása során. Ezért az A β termelődésének gátlása, lebontásának elősegítése illetve oligomerizációjának megakadályozása fontos lehet a betegség megelőzésében vagy terápiájában. A fehérjének több formája ismert (monomerek, oligomerek, nagyobb aggregátumok), viszont még nem teljesen tisztázott, melyik toxikus az idegsejtekre. A toxikus forma egy sor kedvezőtlen molekuláris folyamatot indít el a betegség lefolyása alatt, amelyek végül idegsejtek rendellenes működéséhez vezetnek. Ugyanakkor több kutatás is kimutatta, hogy a stresszfehérjék mérsékelni tudják a tünetek kialakulását különböző neurodegenerációs betegségek modelljeiben³³, így potenciális jelöltek lehetnek azok terápiája során.

Kísérletünkben azt vizsgáltuk, hogy a Hsp27 túltermelésének van-e védő hatása az Alzheimer-kórra jellemző tünetek kialakulása során. Ehhez az Alzheimer-kór validált állatmodelljét összekereszteltük a laborunkban előállított Hsp27 túltermelő egértörzsszel, majd az állatok agyából készült metszeteken vizsgáltuk az amyloid plakkok kialakulását és az idegsejtek pusztulását. Tapasztalataink szerint a kor előrehaladtával (14. hónap) jelentősen nőtt az elhalt idegsejtek száma a transzgenikus állatokban a vad típusúakhoz képest, viszont szignifikáns különbséget nem találtunk az AD és az AD/Hsp transzgenikus csoportok között. Az amyloid plakkok számolásakor azt tapasztaltuk, hogy az AD/Hsp-s egerek agyában jelentősen kevesebb plakk található, mint az AD egerek esetében. A fenti eredményekből arra következtethetünk, hogy a Hsp27 fehérje jelen esetben nem az anti-apoptotikus tulajdonsága révén fejt ki védelmét, hanem valamely azt megelőző lépésben. Kísérletünkből nem deríthető

ki, hogy a Hsp27 fehérje milyen molekuláris mechanizmus által csökkenti az amyloid plakkok számát ($A\beta$ fokozott lebontás, $A\beta$ oligomerizációjának befolyásolása, $A\beta$ peptid keletkezés befolyásolása, aggregátum csökkentés, stb.). A stresszfehérjék valószínűleg ennél összetettebb módon, egyszerre több ponton is hatnak, és a neuroprotektív hatásukat komplexebben fejtik ki.

Az $A\beta$ peptid által indukált neurotoxicitás molekuláris folyamata a mai napig sem teljesen tisztázott. Ezek a mechanizmusok igen sokfélék, például több adat utal arra, hogy az $A\beta$ kölcsönhatásba léphet a neuronok membránjaival, és megváltoztathatja azok fluiditását, ami különféle diszfunkciókat okozhat a sejtek működésében. Ezen kívül azáltal, hogy csökken a membránok fluiditása, fokozódik az APP hasítása, ami további $A\beta$ termelődéshez vezethet ³⁴. Több tanulmány kimutatta, hogy a kismolsúlyú hősokkfehérjék fontos szerepet játszanak a membrán stabilizálásában stressz körülmények között, ami alapján elképzelhető, hogy a Hsp27 is védelmet nyújthat az $A\beta$ membránkárosító hatásaival szemben. Ezen kívül az $A\beta$ toxicitásában szerepet játszik az oxidatív stressz megemelkedett mértéke, ami ellen a kismolsúlyú hősokkfehérjék szintén védelmet nyújthatnak.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm Dr. Sántha Miklósnak, csoportunk vezetőjének a lehetőséget, hogy a csoport munkájában részt vehettem, a szakmai irányítást az elméleti és gyakorlati munkában, valamint a dolgozat megírásában nyújtott segítséget.

Külön köszönet Tóth Melindának az elméleti és gyakorlati munkában nyújtott kimagasló szakmai segítségért.

Köszönöm Gonda Szilviának a transzgenikus egerek előállítását, valamint köszönettel tartozom még Lénárt Nikolettnek, Mari Mónikának, Csibrány Balázsnak és Dr. Hermes Edit Tanárnőnek, akiktől a kísérleteim során minden segítséget megkaptam.

IRODALOMJEGYZÉK

1. Ritossa F. *A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in drosophila.* **Cellular and Molecular Life Sciences** **1962**; 12: 571–73
2. Morimoto RI, Sarge KD, Abravaya K. *Transcriptional regulation of heat shock genes. A paradigm for inducible genomic responses.* **J. Biol Chem.** **1992**; 31:21987-90. Review
3. De Jong W. W, Caspers, G.-J, Leunissen, J. A. M. **Int. J. Biol. Macromolecules** **1992**; 22: 151-62.
4. Horwitz J. *α -Crystallin can function as a molecular chaperone* **Proc. Natl Acad. Sci. USA.** **1992**; 89: 10449–53
5. Jakob U, Gaestel M, Engel K. Buchner J. *Small heat shock proteins are molecular chaperones.* **J. Biol. Chem.** **1993**; 268: 1517–20
6. Arrigo A. P, Suhan, J. P. *Dynamic changes in the structure and intracellular locale of the mammalian low-molecular-weight heat shock protein.* **Mol. Cell. Biol.** **1988**; 8: 5059–71
7. Arrigo A. P, Welch W. J. *Characterization and purification of the small 28,000dalton mammalian heat shock protein.* **J. Biol. Chem.** **1987**; 262: 15359–69
8. Li Liu, Xiaojin Zhang, Bo Qian, Xiaoyan Min, Xiang Gao, Chuanfu Li, Yunlin Cheng, Jun Huang. *Over-expression of heat shock protein 27 attenuates doxorubicin-induced cardiac dysfunction in mice.* **European Journal of Heart Failure** **2007**; 9: 762–69
9. Doroshow JH, *Effect of antracycline antibiotics on oxygen radical formation in rat heart.* **Cancer Res.** **1983**; 43:460-72
10. Bachur NR, Gee MV, Friedman RN. *Nuclear catalyzed antibiotic free radical formation.* **Cancer Res.** **1983**; 42:1078-81
11. Mitchell JB, Krishna MC, Samuni A. *Clinical uses of nitroxides as superoxide-dismutase mimics in Toxicology of Human Environment.* (Rhodes, C. J. ed.), **Taylor and Francis; London.** **2000**; 113-38
12. Beygui F, Collet J.-P, Benoliel J.-J. *High plasma aldosterone levels on admission are associated with death in patients presenting with acute ST-elevation myocardial infarction.* **Circulation**, **2006**; 114: 2604-10
13. Beygui F, Montalescot G, Vicaut E. *Aldosterone and longterm outcome after myocardial infarction: A substudy of the French nationwide Observatoire sur la Prise en charge hospitaliere, l'Evolution a un an et les caRactéristiques de patients présentant un infArctus du myocarde avec ou sans onde Q (OPERA) study.* **Am. Heart J.** **2009**; 157,4: 680–87
14. Weir R.A.P, Tsorlalis I.K, Steedman T. *Aldosterone and cortisol predict medium-term left ventricular remodelling following myocardial infarction.* **Eur. J. Heart Failure**, **2011**; 13: 1305–13

15. De Angelis N, Fiordaliso F, Latini R, Calvillo L, Funicello M, Gobbi M. *Appraisal of the role of angiotensin II and aldosterone in ventricular myocyte apoptosis in adult normotensive rat.* **J. Mol. Cell. Cardiol.** **2002**; 34: 1655–65
16. Mano A, Tatsumi T, Shiraishi J, Keira N, Nomura T, Takeda M, et al. *Aldosterone directly induces myocyte apoptosis through calcineurin-independent pathways.* **Circulation**, **2004**; 110: 317–23
17. Ray WJ, Ashall F, Goate AM. *Molecular pathogenesis of sporadic and familial forms of Alzheimer's disease.* **Mol Med Today** **1998**; 4:151-57
18. Cotman CW, Anderson AJ. *A potential role for apoptosis in neurodegeneration and Alzheimer's disease.* **Mol Neurobiol.** **1995**; 10: 19-45
19. McGrath LT, McFgleenon BM, Brennan S, McColl D, McIlroy S, Passmore AP. *Increased oxidative stress in Alzheimer's disease as assessed with 4-hydroxynonenal but not malondialdehyde.* **QJM** **2001**; 94:485-90
20. Boland B, Campbell V. *Beta-amyloid (1-40)-induced apoptosis of cultured cortical neurones involves calpain-mediated cleavage of poly-ADP-ribose polymerase.* **Neurobiol Aging** **2003**; 24:179-86
21. Baker RC, Kramer RE. *Cytotoxicity of short-chain alcohols.* **Annu Rev Pharmacol Toxicol.** **1999**; 39:127-50. Review
22. Mason RP, Walter MF, Mason PE. *Effect of oxidative stress on membrane structure: small-angle X-ray diffraction analysis.* **Free Radic Biol Med.** **1997**; 23:419-25
23. Hogan B, Beddington R, Costantini F, Lacy E. *Manipulating the mouse embryo.* **CSHL Press.** **1994**;
24. Schmued LC, Stowers CC, Scallet AC, Xu L., *Fluoro-Jade C results in ultra high resolution and contrast labeling of degenerating neurons.* **Brain Res.** **2005**; 1035:24-31
25. Concannon C. G, Gorman A. M, Samali A. *On the role of Hsp27 in regulating apoptosis.* **Apoptosis** **2003**; 8: 61–70
26. Burniston JG, Saini A, Tan LB, Goldspink DF. *Aldosterone induces myocyte apoptosis in the heart and skeletal muscles of rats in vivo.* **J Moll Cell Cardiol.** **2005**; 39:395-399
27. Soldatenkov VA, Dritschilo A. *Apoptosis of Ewing's sarcoma cell is accompanied by accumulation of ubiquitinated proteins.* **Cancer Res.** **1997**; 57:3881-3885
28. Concannon CG, Orrenius S, Samali A. *Hsp27 inhibits cytochrome c-mediated caspase activation by sequestering both pro-caspase-3 and cytochrome c.* **Gene Expr.** **2001**; 9:195-201
29. Samali A, Robertson JD, Peterson E. *Hsp27 protects mitochondria of thermotolerant cells against apoptotic stimuli.* **Cell Stress and Chaperones.** **2001**; 6:49-58

30. Mehlen P, Kretz-Remy C, Preville X, Arrigo AP. *Human hsp27, Drosophila hsp27 and human alphaB-crystallin expression-mediated increase in glutathione is essential for the protective activity of these proteins against TNFalpha-induced cell death.* **EMBO J.** **1996;** 15:2695-2707
31. Halliwell B, *Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now?* **J Neurochem.** **2006;** 97. 6:1634-58. Review
32. Sun GY, Xia J, Draczynska.Lusiak B, Simonyi A, Sun AZ. *Grape polyphenols protect neurodegenerative changes induced by chronic ethanol administration.* **Neuroreport** **1999;** 10:93-96
33. Muchowski PJ, Wacker JL. *Modulation of neurodegeneration by molecular chaperons.* **Nat. Rev Neurosci** **2005;** 6:11-22
34. Peters I, Igbavboa Um Schütt T, Haidari S, Hartig U, Böttner S, et al. *The interaction of beta-amyloid protein with cellular membranes stimulates its own production.* **Biochim Biophys Acta.** **2009;** 1788. 5:964-972

Nyilatkozat

Alulírott Alföldi Róbert biológus MSc szakos hallgató, kijelentem, hogy a dolgozatban foglaltak saját munkám eredményei, és csak a hivatkozott forrásokat (szakirodalom, eszközök, stb.) használtam fel.

aláírás:

dátum: 2012.12.27.