

A neuron-mikroglia közti fraktalkin szignalizáció szerepe az akut és krónikus stresszválasz szabályozásában

Doktori tézisek

Winkler Zsuzsanna

Semmelweis Egyetem
Szentágotthai János Idegtudományi Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Kovács Krisztina, DSc., tudományos tanácsadó

Hivatalos bírálók: Dr. Dobolyi Árpád, DSc., tudományos tanácsadó
Dr. Ábrahám István, DSc., egyetemi tanár

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Rácz Károly, MD, DSc., egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Kalló Imre, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Dr. Földes Anna, Ph.D., tudományos munkatárs

Budapest
2017

Bevezetés

A stresszorok olyan hormonális, metabolikus és viselkedésbeli válaszokat indítanak, amelyek célja a szervezet homeosztázisának helyreállítása. Stressz során aktiválódik a szimpatikus idegrendszer, és a hipotalamusz-hipofízis-mellékvesekéreg (HPA) – tengely. A megküzdés akkor hatékony, ha a stressz-válasz szükség esetén gyorsan aktiválódik, és lezárul, ha a potenciális veszélyeztető ágens már nincs jelen. A stressz-válasz során kialakult új egyensúlyi állapotot allosztázisnak nevezzük. Ha a stressz-válasz nem megfelelő, túlzott vagy elhúzódó, illetve ha a szervezetet folyamatosan érik a különböző stresszorok, akkor az egyensúly helyreállításának már olyan magas lesz a „költsége” a szervezet számára, hogy metabolikus-, immun-, pszichiátriai betegségekhez vezethet.

A stresszorok négy kategóriába sorolhatók, fizikai; pszichogén; szociális; metabolikus stresszorokról. Az időtartam alapján a stresszorok akut-, ismétlődők- vagy krónikusak lehetnek. A stressz-válasz során, gyorsan ható ágensek (mint pl. katekolaminok, neuropeptidek) és lassabb hatású, génexpressziót szabályozó kortikoszteroidok hozzájárulnak a megfelelő válasz kialakításához, amelyek fokozott éberséget, fókuszált figyelmet alakítanak ki, valamint növelik a glukoneogenezis, glikogénolízis, proteolízis vagy lipolízis mértékét, így biztosítva a kiemelten fontos szervek energia ellátását. A kortikotropin felszabadító hormon (CRH)-t a hipotalamusz paraventriculáris magjának (PVN) parvocelluláris neuronjai termelik, a CRH nélkülözhetetlen a neuroendokrin stressz-válasz elindításában és az adekvát viselkedés, valamint a metabolikus válasz kialakításában. Számos afferens pálya serkenti a CRH neuronokat PVN-ben, mint felszálló agytörzsi pályák, melyek a viszceroszenzoros ingereket közvetítik, míg a pszichogén stresszorok hatását komplex limbikus útvonal mediálja.. A metabolikus, tápanyaggal kapcsolatos információk PVN neuronjait a hipotalamikus arcuatus mag felől érik el.

A hipotalamusz arcuatus magja két fő idegsejt populációt tartalmaz, amelyek a szervezet energia-egyensúlyát szabályozzák. Az orexigén neuronok neuropeptid Y-t és agouti related peptid (NPY/AgRP), az anorexigén neuronok pro-opiomelanocortint és a kokain és amfetamin által szabályozott transzkript expresszálnak (POMC/CART). Ezek az idegsejtek olyan transzportereket, receptorokat fejeznek ki, amivel képesek az energia-háztartással kapcsolatos tápanyagokat (glükóz, szabad zsírsavak), hormonokat (leptin, inzulin, ghrelin) érzékelni, és továbbítani a PVN neuronjaihoz.

A külső és belső környezetből érkező stresszhatásokat a szervezet veszélyként értelmezi és aktiválja az elsődleges védelmi funkciót ellátó veleszületett immunitás sejtjeit. A mikroglia, a központi idegrendszer immunsejtjeként képes detektálni számos külső, szervezetet veszélyeztető hatást, mint pl. a stresszt és részt vesz a homeosztatisz folyamatok helyreállításában.

Az agyban kétirányú mikroglia-neuron kommunikáció történik. Az információ feldolgozásában, nemcsak a pre- és posztszinaptikus neuronok vesznek részt hanem glia sejtek is, együtt kialakítva a négy-tagú szinapszist, mint funkcionális egységet. A mikroglia sejtek specifikus receptoraikkal képesek érzékelni a neurotranszmittereket, neurohormonokat, citokineket és kemokineket. A mikroglia sejtek aktivációjuk során morfológiai és funkcionális változásokon mennek keresztül; a hosszú vékony nyúlványaik visszahúzódnak és megrövidülnek, a nyúlvány elágazások száma csökken, szélsőséges esetben amöboid fagocitotikus formába is kerülhetnek. Az aktivált mikroglia sejtek képesek a gyulladáskeltő-, és gyulladásgátló citokinek széles spektrumát kifejezni a körülményektől függően.

A neuronális szignálok mikroglia felé történő jelátvitelében döntő fontosságú a fraktalkin/ fraktalkin receptor (CX₃CR1) szignalizáció. A fraktalkin fehérje a CX₃C kemokinek egyetlen tagja, amit a központi idegrendszerben legfőképpen a neuronok expresszálnak. Membrán-kötött és szolubilis formában létezik, funkciója a sejt-sejt adhézió illetve kemotaxis. A fraktalkin specifikus G-protein kapcsolt hét-transzmembrán receptorát (CX₃CR1) a központi idegrendszerben a mikroglia sejtek fejezik ki.

Célkitűzés

A disszertációm célja a hipotalamikus mikroglia szerepének vizsgálata, akut és krónikus-, pszichogén illetve metabolikus stresszorok által indukált stresszválaszban.

Továbbá, céloom volt még, hogy feltárjam, hogy a neuronok és mikroglia sejtek közti fraktalkin/fraktalkin receptor szignalizáció hogyan befolyásolja:

- a stressz-indukálta mikroglia aktivációt
- a megküzdési stratégiát akut pszichogén stressz során, vagy a krónikus stressz által indukált szorongásos, depresszió-szerű és anhedonikus magatartást
- az akut illetve krónikus stressz során kialakuló hormonális stresszválaszt
- az állatok metabolikus fenotípusát illetve inzulin-indukálta hipoglikémia során fellépő ellenregulációs válaszukat?

Módszerek

Kísérleti állatok

Kísérleteimet hím, C57BL/6 és fraktalkin receptor deficiens ($CX_3CR1^{-/-}$) egereken, végeztem. A $CX_3CR1^{-/-}$ -ben a *cx3cr1* gén egy részét *gfp* riportergénre cserélték, így $CX_3CR1^{-/-}$ egerek zöld fluoreszcens fehérjét (GFP) expresszálnak a myeloid-eredetű sejteken és nincs működőképes fraktalkin receptoruk (CX_3CR1). Az interleukin-1 (IL-1) vércukor szabályozására gyakorolt hatását, IL-1 a/b knockout állatokon tanulmányoztuk. Kontroll állatként ezekben a kísérletekben is a genetikai hátteret adó, C57BL/6 egereket használtuk.

In vivo kísérletek:

- *Akut pszichogén stressz – restraint (mozgáskorlátozás)*

Restraint stressz során átlátszó, jól szellőző Falcon csövekbe helyeztük az állatokat 1 órán keresztül. Az eljárás során az állatok a szűk helyből fakadóan mozgásukban erősen korlátozva voltak, ami pszichogén stresszként hatott rájuk, de fizikai sérülést nem szenvedtek.

- *Krónikus pszichogén stressz – „két csapás” stressz protokoll*

A két csapás stressz protokollban kombináltuk a korai élet során elszenvedett megpróbáltatásokat (anyai szeparáció –maternal separation, MS) és a felnőttkori krónikus variábilis stresszt (CVS). Az anyai szeparáció során az utódokat születésük után 1-14 napos koruk között, napi 3 órán keresztül az anyaállattól elválasztva tartottuk. A CVS egy általánosan elfogadott stressz paradigma rágcsálókön, mely kiszámíthatatlanul ismétlődő és elkerülhetetlen fizikai, pszichogén és szociális stresszorokat foglal magába. Az állatokat a három hetes CVS során, felnőtt korukban napi kétszer stresszeltük a protokoll szerint.. A kontroll állatokat posztnatalisan nem szeparáltuk, és felnőtt korukban sem zavartuk őket.

- *Akut metabolikus stressz – inzulin-indukálta hipoglikémia:*

Egy éjszaka éheztetés után az állatokat inzulinnal (1.0 IU/kg, Actrapid) vagy fiziológiás sóoldattal kezeltük intraperitoneálisan (ip.). 60 perccel az inzulin beadása után az egereket feldolgoztuk és vérplazmát illetve agyukat a felhasználásig mélyhűtőben illetve fixálóban tároltuk.

- *Krónikus metabolikus kihívás – Magas zsírtartalmú diéta:*

Az egerek 22-25 napos koruktól, 10 héten keresztül normál vagy zsírdús tápot kaptak, testtömegüket rendszeresen mértük, majd a diéta végén perfundáltuk a későbbi szövettani vizsgálatok céljából. Az elhízalt kísérleti állatok egy másik csoportján hidegtűrés tesztet végeztünk.

- *Intracerebroventrikuláris (icv) beadások:*

C57BL/6 egerek ketamin/xylazin koktéllal történő altatás után egyszeri dózisban minociklint (Sigma-Aldrich, 20 µg/total volume of 2 µl), illetve IL-1 receptor

antagonistát (Anakinra, Kineret, 100mg/0,67ml; SOBI) kaptak a jobb oldali agykamrába sztereotaxis készülék segítségével.

In vitro kísérlet

Az egér mikroglia BV2 sejt vonalat az MTA Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet Szövettenyésztő Laboratóriuma biztosította a számunkra, és 10% FCS, valamint penicillin/streptomycin tartalmú DMEM-F12 1:1 arányú keverékében tenyésztőedényekben, 37°C-on, 5% CO₂-t tartalmazó gázkörnyezetben tartottuk fent. A sejttenyészetet 2-deoxy-glükózzal (Sigma, 1 mM, 3órán keresztül), illetve inzulinnal kezeltük (1nM, egy éjszakán keresztül).

- *Magatartástesztek:*

A vad típusú és fraktalkin receptor deficiens egerek viselkedését alapállapotban és krónikus variábilis stressz után olyan szorongást-, illetve depresszív viselkedést mérő tesztekben teszteltem, mint pl. nyílt tér teszt, emelt keresztpalló teszt, erőltetett úszás teszt, „tail suspension test”, cukor preferencia teszt. A viselkedés teszteket videóval rögzítettem és később H77 eseményrekorder, ill. EthoVision XT videókövetéses szoftverrel elemeztem ki.

- *Metabolikus paraméterek vizsgálata indirekt kalorimetriával:*

Az egerek egyesével voltak elhelyezve TSE Phenomaster ketrecekben (TSE Systems GmbH Bad Homburg, Germany) és 1 napos akklimatizációt követően 72 órán keresztül mértük az alap táplálékfogyasztásukat, a lokomotoros aktivitásukat, az oxigén fogyasztásukat (ml/h/kg), és CO₂ termelésüket (ml/h/kg). Az energia leadásuk, légzési hányadosuk és zsírsav oxidációjuk az indirekt kalorimetria alapján számított értékek. Az állatok metabolikus paramétereit az egy éjszakán keresztül történő éhezés és ip. inzulin beadás utáni 3 órában is megmértük.

- A *hidegtűrés tesztben* az egerek rektális hőmérsékletét mértük a 4 °C-os kitettség előtt, majd 60, 120, 180 és 240 perc elteltével.
- A plazma ACTH és kortikoszteron mérés *radioimmunoassay (RIA)* módszerrel történt.

- A catekolaminok vérplazma mintából történő koncentráció meghatározásához 2-CAT ELISA kitet használtam (Labor Diagnostica Nord, Nordhorn, Germany).
- A kvantitatív és kvalitatív génexpresszió analízist *valós idejű PCR*-rel illetve *in situ hibridizációs* hisztokémiai módszerrel végeztem.
- A szövettani elemzést szabadon úszó agymetszeteken hajtottam végre. A stressz-indukálta neuronális (c-Fos marker) és mikroglia aktivációt (Iba-1 marker) *DAB-Ni/DAB/fluoreszcens immunhisztokémiai módszerrel* tettem láthatóvá. A mikroszkópos képek elemzéséhez ImageJ szoftvert, és Matlab programot használtam.
- A *statisztikai elemzés* (két-utas ANOVA Bonferroni post hoc teszttel, párosítatlan t-teszt) GraphPad Prism szoftver (ver. 6.01; San Diego, CA, USA) segítségével történt.

Eredmények

Akut és krónikus stressz hatása a hipotalamikus mikroglia sejtekre

Vizsgálataim során azt tapasztaltam, hogy akut és krónikus pszichogén stressz csak kis mértékben idézett elő mikroglia aktivációt a hipotalamusz paraventriculáris magjában (PVN). Restraint stresszt követően, az Iba1-immunhisztokémiai festés kvantitatív elemzéséből kiderült, hogy vad típusú egerek (C57BL/6) PVN-ban nem változott szignifikáns mértékben az Iba1+ mikroglia sejtek száma, sem az Iba1+ sejtek által elfoglalt terület nagysága. Krónikus pszichogén stressz (MS+CVS) hatására szignifikánsan lecsökkent az Iba1+ sejtek száma paraventriculáris magban.

Kísérleteimmel igazoltam viszont, hogy krónikus és akut metabolikus kihívások, mint pl. a zsír-dús diéta (HFD), és az inzulin-indukálta hipoglikémia markáns Iba1+ mikroglia aktivációt idéznek elő a hipotalamusz arcuatus magjában (ARC), az agy egyik fő energia érzékelő területén. Míg normál diétán tartott és éheztetett kontroll állatok agyában, túlnyomórészt csak nyugvó formájú (mérsékelt Iba1 immunoreaktivitás, vékony nyúlványok) mikroglia sejteket találtunk, addig magas zsírtartalmú tápon tartott, elhízott, illetve hipoglikémiás állatok hipotalamuszában aktivált fenotípussal rendelkező (megvastagodott, rövidebb nyúlványok) Iba1+ mikroglia sejteket figyeltünk meg. Továbbá, inzulin-indukálta hipoglikémia során ezek az aktivált morfológiával rendelkező mikroglia sejtek specifikusan az orexigén NPY+/c-Fos+ aktivált idegsejtek köré koncentráálódtak ARC-ban.

A neuron-mikroglia közti fraktalkin-fraktalkin receptor szignalizáció szerepe a stressz által kiváltott mikroglia aktivációban

A fraktalkin receptor deficiens ($CX_3CR1^{-/-}$) egerek paraventriculáris magjában kevesebb Iba1+ mikroglia sejtet detektáltunk akut és krónikus pszichogén stressz után, mint a funkcióképes receptorról rendelkező egerekben (C57BL/6).

Továbbá, a működőképes fraktalkin receptor (CX_3CR1) hiányában kisebb mértékű mikroglia aktiváció történt a hipotalamusz arcuatus magjában akut hipoglikémia és hosszantartó zsír-dús diéta hatására.

A fraktalkin-fraktalkin receptor szignalizáció hatása az akut stresszhelyzetben megjelenő megküzdési stratégiára, illetve a krónikus stressz-indukálta szorongásos és depresszív viselkedés kialakulására

A funkcióját veszített fraktalkin receptorral rendelkező ($CX_3CR1^{-/-}$) egerek lokomotoros aktivitása nem különbözött a vad típusú egerektől normál körülmények között sem a saját ketrecükben, sem az új, idegen környezetben. Viszont szignifikáns stressz komponenst tartalmazó magatartás tesztekben (erőltetett úszás teszt, „tail suspension test”) kevesebb időt töltöttek immobilitással, inkább választották az aktív megküzdési stratégiát, mint a vad típusú egerek.

Krónikus variábilis stressz nem alakított ki anhedóniát $CX_3CR1^{-/-}$ egerekben, amit a cukor preferencia teszttel mértünk. Ugyanakkor, fraktalkin receptor deficiens egerek MS+CVS hatására nem mutattak kevésbé szorongó fenotípust az emelt keresztpalló, és a nyílt tér tesztben.

Az akut és krónikus pszichogén stressz által kiváltott hipotalamusz-hipofízis-mellékvesekéreg (HPA) tengely működésében tapasztalt különbségek a $CX_3CR1^{-/-}$ egerekben

Akut restraint stress jelentős c-Fos expressziót idéz elő a paraventriculáris magban, és aktiválja a HPA-tengelyt. Restraint stressz hatására a fraktalkin receptor deficiens egerek PVN-ban szignifikánsan több c-Fos+ aktivált neuront mértünk, mint a vad típusú egerekben. $CX_3CR1^{-/-}$ vérplazma kortikoszteron koncentrációja is magasabb volt, mint C57BL/6 állatoké alapállapotban és akut restraint stresszt, valamint erőltetett úsztatás követően.

Krónikus pszichogén stressz (MS+CVS) jelentős mellékvese-tömeg gyarapodást idézett elő stresszelt állatokban genotípustól függetlenül. De a krónikus variábilis stressz által kiváltott csecsemőmirigy involúció csak a fraktalkin receptor deficiens egerekben következett be. A mellékvese tömegének növekedése a fokozott hipofizeális stimuláció, míg a csecsemőmirigy zsugorodása a hosszantartó glükokortikoid-kitettség következménye. A három hetes krónikus stressz procedúra végén viszont már nem detektáltunk szignifikáns különbséget a vérplazma kortikoszteron, és az agyi kortikotropin-releasing hormon (CRH) mRNS szintjében.

A fraktalkin- fraktalkin receptor szignalizáció hatása a metabolikus fenotípusra, és az akut/krónikus metabolikus kihívásokra adott ellenregulációs válasz kialakításában

A 11 hétig tartó magas zsírtartalmú diéta jelentős elhízást eredményezett az egerekben, de CX₃CR1^{-/-} egerek testtömege szignifikánsan kevesebb volt, mint a vad típusú zsíros tápon tartott állatoké. A normál tápon és zsír-dús tápon tartott fraktalkin receptor deficiens egerek jobban tolerálták a hideget a hidegtűrés teszt során, mint a C57BL/6 állatok.

A metabolikus ketrecben történő mérésekből kiderült, hogy a fraktalkin receptor hiánya nem befolyásolja az állatok tápálékfelvételét, légzési hányadosukat, zsírsav oxidációjukat normál körülmények között, és éhezés alatt sem.

A CX₃CR1^{-/-} egerek viszont többet mozogtak, energia leadásuk magasabb volt alapállapotban és inzulin beadás után vércukor szintjük sem csökkent olyan alacsonyra, mint a vad típusú egereké. Valós idejű kvantitatív PCR méréssel, inzulin beadás után fokozott CRH mRNS expressziót mértünk CX₃CR1^{-/-} egerek hipotalamuszában, illetve jelentősen emelkedett NPY/AgRP mRNS szinteket detektáltunk az arcuatus magban C57BL/6 állatokhoz képest. A fraktalkin receptor deficiens egerek plazma katekolamin koncentrációi is szignifikánsan magasabbra emelkedtek az akut metabolikus kihívás hatására.

Az aktivált állapotú gliasejtek bizonyos veszély szignálok hatására proinflammatorikus citokineket kezdenek el felszabadítani, mint például az interleukin-1 (IL-1). Inzulin-indukálta hipoglikémia szignifikánsan fokozta IL-1 mRNS expresszióját *in vivo*, C57BL/6 egerek hipotalamuszában. Ellenben ez az agyi IL-1 mRNS növekedés nem történt meg a fraktalkin receptor deficiens egerekben inzulin beadása után. Továbbá kimutattam továbbá, hogy az interleukin-1 hiánya IL1a/b KO egerekben, vagy IL-1b centrális gátlása icv. beadott IL-1 receptor antagonistával mérsékelte inzulin vércukor csökkentő hatását C57Bl6 egereken. A mikroglia *in vivo* gátlása minociklinnel szintén fokozott ellenregulációs katekolamin választ indukált. Mindezen adatok arra utalnak, hogy a mikroglia eredetű IL-1 gátolja a vércukor csökkenés ellen ható központi ellenregulációs mechanizmusok teljes kifejlődését.

Következtetések

- Akut és krónikus-, metabolikus és pszichogén stresszorok stresszor- és régió-specifikus módon mikroglia aktivációt idéznek elő a hipotalamuszban.
- A neuron-mikroglia közti fraktalkin receptor szignalizáció hozzájárul a stressz által kiváltott mikroglia aktivációhoz.
- A fraktalkin jelátvitel hiánya aktív megküzdést eredményez a szervezetet veszélyeztető kihívásokkal szemben, fokozott génexpressziós és hormonális válasz kialakítása révén.
- Az aktivált mikroglia sejtek és a mikroglia-eredetű IL-1 téves/gátló jelként szolgálhat a metabolizmust szabályozó neuronok felé és ezáltal a glükóz csökkenésre adott ellenregulációs folyamatok jelentősen gyengülnek.

Összefoglalva, ezek az eredmények hozzájárulnak az akut és a krónikus stresszorokra adott hormonális, metabolikus és viselkedésbeli válaszok, a mikroglia sejtek és a fraktalkin szignalizáció által szabályozott folyamatok összefüggéseinek megismeréséhez.

Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt köszönöm témavezetőmnek, Dr. Kovács Krisztinának szakmai támogatását tanulmányaim, és doktori munkám során. Hálás vagyok, hogy elindított a tudományos karrierem útján és útmutatást adott szakmai fejlődésem során.

Köszönettel tartozom a Molekuláris Neuroenokrinológiai Laboratórium minden jelenlegi és régi munkatársának, akik szakmai tanácsaikkal, segítségükkel hozzájárultak a munkám sikeréhez. Hálás vagyok a vidám munkakörnyezetért, amit jelenlétükkel biztosítottak:

Benkő Julianna, Ferenczi Szilamér, Gulyás Krisztina, Horváth Krisztina, Juhász Balázs, Kővári Dóra, Kuti Dániel, Küblerné Pintér Bernadett, Kriszt Rókus, Polyák Ágnes és Zelei Edina.

Köszönöm az MTA KOKI munkatársainak, különösen Dénes Ádámnak, Lénárt Nikolettnek, és Fekete Csabának, Demeter Kornélnak, Barna Lászlónak a kísérleteimhez nyújtott technikai támogatásukat.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm családomnak és barátaimnak a biztatásukat, türelmüket és lelki támogatásukat doktori munkám során és a disszertáció írásakor.

Saját publikációk jegyzéke

I. Az értekezés témájában megjelent eredeti közlemények:

Winkler Z, Kuti D, Ferenczi S, Gulyas K, Polyak A, Kovacs KJ. (2017) Impaired microglia fractalkine signaling affects stress reaction and coping style in mice. Behav Brain Res, 334: 119-128.

Polyak A, Winkler Z, Kuti D, Ferenczi S, Kovacs KJ. (2016) Brown adipose tissue in obesity: Fractalkine-receptor dependent immune cell recruitment affects metabolic-related gene expression. Biochim Biophys Acta, 1861: 1614-1622.

Polyak A, Ferenczi S, Denes A, Winkler Z, Kriszt R, Pinter-Kubler B, Kovacs KJ. (2014) The fractalkine/Cx3CR1 system is implicated in the development of metabolic visceral adipose tissue inflammation in obesity. Brain Behav Immun, 38: 25-35.

II. Egyéb – nem az értekezés témájában megjelent – eredeti közlemények:

Ferenczi S, Szegi K, Winkler Z, Barna T, Kovacs KJ. (2016) Oligomannan Prebiotic Attenuates Immunological, Clinical and Behavioral Symptoms in Mouse Model of Inflammatory Bowel Disease. Sci Rep, 6: 34132.

Kriszt R, Winkler Z, Polyak A, Kuti D, Molnar C, Hrabovszky E, Kallo I, Szoke Z, Ferenczi S, Kovacs KJ. (2015) Xenoestrogens Ethinyl Estradiol and Zearalenone Cause Precocious Puberty in Female Rats via Central Kisspeptin Signaling. Endocrinology, 156:3996-4007.