

SZAKMAI BESZÁMOLÓ

Porkoláb Gergő

Magyar Állami Eötvös Ösztöndíj pályázat a 2022/23. tanévre

2022.09.05. – 2022.12.09.

A klaudin-5 fehérje mennyisége mint új fejlődésbiológiai jel a vér-agy gát érése során

1. Rövid szakmai háttér

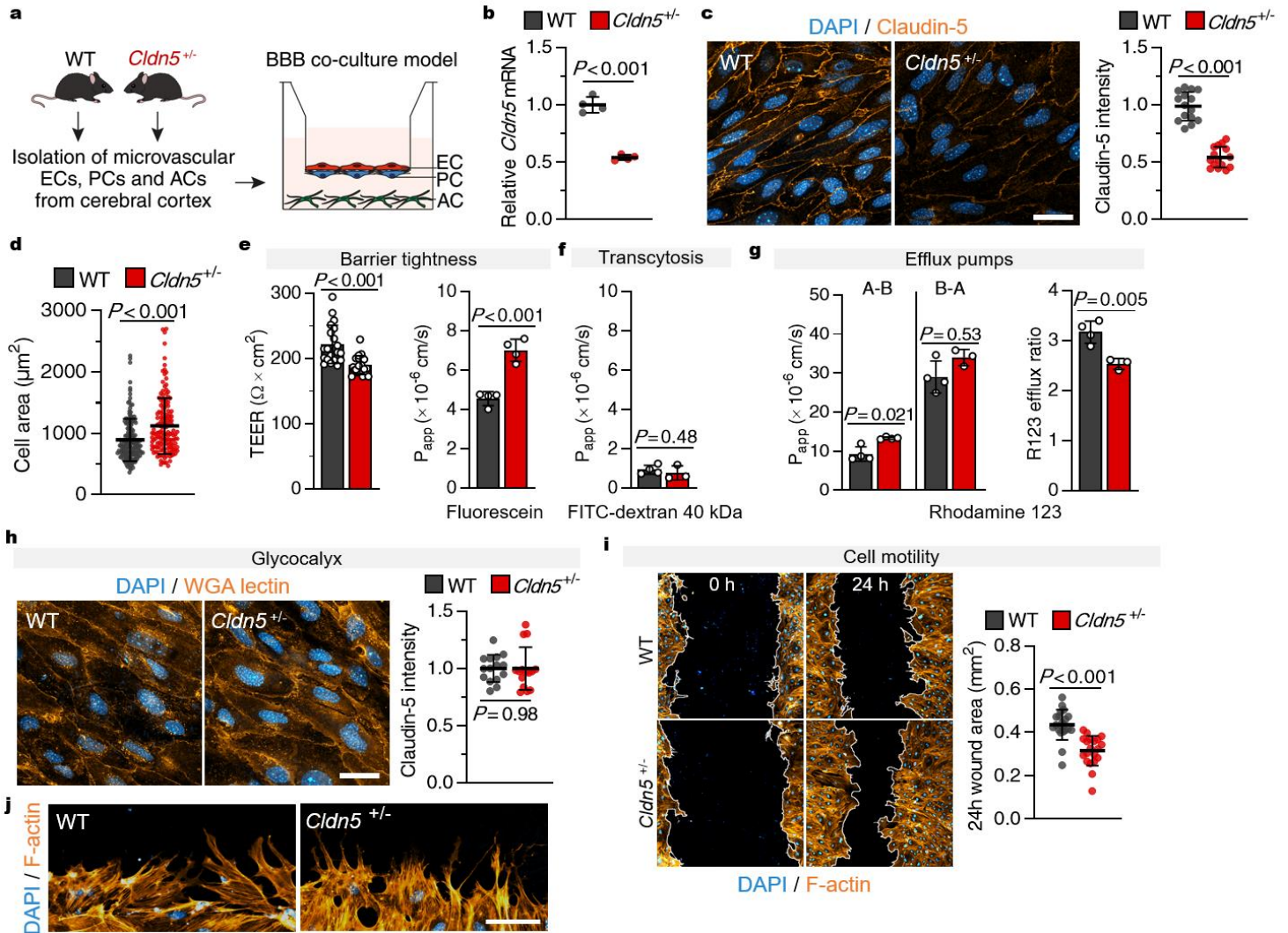
Az agyi hajszálerek endotélsejtjei által kialakított **vér-agy gát** megakadályozza a kórokozók és káros anyagok agyszövetbe való bejutását, miközben speciális szállítófehérjéi segítségével táplálja az agyat. A vér-agy gát számos **terápiás hatóanyag** agyi bejutását is akadályozza, megnehezítve ezzel a **központi idegrendszeri betegségek** gyógyszeres kezelését, míg sérülése vagy megváltozott működése ugyanezen betegségek kialakulásához vezet (Sweeney és mtsai, 2019). A gát anatómiai alapját az agyi endotélsejteket összekötő szoros kapcsolatok alkotják, melyek legfontosabb alkotóeleme a **klaudin-5** sejtkapcsoló fehérje (Hashimoto és Campbell, 2020). A szoros kapcsolatokon kívül az agyi endotélsejtekre jellemző az **alacsony mértékű endocitózis**, valamint a terápiás szempontból igen fontos **efflux pumpák** és a vastag, erősen negatív töltésű sejtfelszíni **glikokalix** réteg megléte. Noha a vér-agy gát tulajdonságok kialakításában számos sejt és jelátviteli útvonal szerepét leírták, kialakulásuk időbeli sorrendje és az egymásra való hatásuk a vér-agy gát érése során jelenleg ismeretlen (Profaci és mtsai, 2020).

2. Hipotézis és célkitűzések

Hazai kutatócsoportunkban a tavalyi év során azonosítottunk egy **cARLA** nevű molekulakombinációt, amely több fejlődésbiológiai útvonalat együttesen célozva hatékonyan képes a **vér-agy gát tulajdonságok fokozására** sejtenyészetes körülmények között (Porkoláb és mtsai, előkészületben). A cARLA-kezelés specifikusan növelte a klaudin-5 sejtkapcsoló fehérje mennyiségét és a sejthatárokon való folytonosságát endotélsejteken, valamint csökkentette az endocitózis mértékét, fokozta az efflux pumpák aktivitását és növelte a sejtfelszíni glikokalix meglétét. Ezek alapján azt feltételeztük, hogy maga a gát szorossága – mint korábban nem vizsgált fejlődésbiológiai jel – a **klaudin-5** fehérje mennyiségén keresztül **direkt módon szabályozhatja további vér-agy gát tulajdonságok kialakulását**. Ezt a hipotézist az ösztöndíjas időszak alatt sejtenyészetes körülmények között funkcionális tesztek, konfokális mikroszkópia és RNS-szekvenálás segítségével vizsgáltam **Prof. Matthew Campbell** (Trinity College Dublin, Írország) laboratóriumában, amely a klaudin-5 sejtkapcsoló fehérjével kapcsolatos alap- és klinikai kutatások nemzetközi központja.

3. Eredmények

A kísérleti terv első lépéseként agyi endotélsejteket, pericitákat és asztrocitákat izoláltam vad típusú (WT, *Cldn5*^{+/+}) és heterozigóta (*Cldn5*^{+/-}) egerekből, majd a háromféle sejtípusból összeállítottam a vér-agy gát ko-kultúra modelljét (1.a ábra). A várakozásoknak megfelelően a heterozigóta tenyészetek kb. 50%-kal kevesebb kladuin-5-öt fejeztek ki mRNS (1.b ábra) és fehérje (1.c ábra) szinten egyaránt.



1. ábra. Vér-agy gát tulajdonságok összehasonlítása vad típusú és kladuin-5 heterozigóta primer egér tenyészetekben. **(a)** A vér-agy gát modell sematikus felépítése. EC: endotélsejt, PC: pericita, AC: asztrocita. **(b)** A kladuin-5 fehérjét kódoló *Cldn5* kifejeződése mRNS szinten, $n=4$, és **(c)** fehérje szinten, $n=15$, konfokális mikroszkópia alapján. **(d)** Az endotélsejtek átlagos területe, $n=150$ sejt/csoport. **(e)** Transzendenteliális elektromos rezisztencia (TEER, balra, $n=20$) és nátrium fluoreszcéinnel szembeni látszólagos permeabilitási együttható (P_{app} , jobbra, $n=4$). **(f)** Transzcitózis vizsgálata 40 kDa-os FITC-dextrán átjutásának mérésével, $n=3-4$. **(g)** Az efflux pumpa ligand rodamin 123 (R123) kétirányú permeabilitásának vizsgálata (balra, $n=4$) és az ebből számolt efflux arány (jobbra, $n=4$). **(h)** Glikokalix festés búzacsíra agglutinin lektin (WGA) segítségével, $n=15$. **(i)** Sejtmigrációs kísérlet 0 és 24 óra elteltével, $n=20$, illetve **(j)** a vándorló sejtfront nagyobb nagyítású konfokális mikroszkópos felvételeken. Mércse: 50 μm . Statisztikai analízis: kétmintás t-próba, Welch-korrekción.

A csökkent mennyiségű kladin-5 fehérjét kifejező heterozigóta endotélsejtek nagyobb területűek voltak (**1.d ábra**), illetve gyengébb gáttulajdonságokkal rendelkeztek transzendenteliális elektromos rezisztenciájukat és nátrium fluoreszcinnel szembeni áteresztőképességüket tekintve (**1.e ábra**). A 40 kDa-os FITC-dextrán transzcitózisában nem tapasztaltam különbséget a két genotípus között (**1.f ábra**). A vad típusú tenyészetek aktívabb efflux pumpa funkciókkal rendelkeztek (**1.g ábra**), a glikokalix festés intenzitásában és mintázatában azonban nem tapasztaltam különbséget a két csoport között (**1. h ábra**). Érdekes és új felfedezés, hogy a *Cldn5* heterozigóta endotélsejtek fokozottabb sejtmigrációra képesek sebzést követően (**1.i és 1.j ábra**).

Az ösztöndíj 3 hónapos időszaka alatt ezen felül vizsgáltam a kladin-5 szintjét emelő cARLA molekulakombináció és az epilepsziás sérülést kiváltó kainsav (Greene és mtsai, 2022) hatását mindkét genotípus esetében, a fentihez hasonló funkcionális tesztek segítségével. Mindkét genotípus 3-3 kezelési csoportjából RNS-t izoláltam, melyen RNS-szekvenálást végeztünk el a dublini csoport segítségével. A munkatervben vállaltakon felül lehetőségem nyílt további RNS-szekvenálási kísérletek elvégzésére, melyeket vad típusú és heterozigóta egerekből izolált agyi mikroereken hajtottunk végre. Ezek az eredmények jelenleg is kiértékelés alatt állnak.

4. Eredmények hasznosulása, az ösztöndíj hatása a szakmai tevékenység fejlődésére

Az ösztöndíjas időszak alatt egy innovatív hipotézist vizsgáltam több módszer kombinációjával. Noha az adatok kiértékelése nem teljes, az eredmények rendkívül érdekesek és biztatóak. Elsőként bizonyíthatjuk, hogy a pusztán a kladin-5 fehérje sejten belüli mennyisége további vér-agy gát tulajdonságokat és vér-agy gáthoz kötődő jelátviteli útvonalakat befolyásolhat. A kutatási eredményeink áttörést jelenthetnek a vér-agy gát egészséges és kóros fejlődésének pontosabb megértésében, amely a jövőben hozzájárulhat olyan agyi betegségeket célzó terápiák kifejlesztéséhez, mint az epilepszia vagy skizofrénia.

A tanulmányút során egy nagyon magas színvonalú kutatócsoport munkájába kapcsolódhattam be egy saját projekttel, amely tartalmilag beleillik a PhD munkám eddigi irányába. Számos új és korszerű módszert tanultam, miközben az itthon megszerzett tudásomat kamatoztattam a dublini laborban. A személyes fejlődésemet tekintve úgy érzem, a tanulmányút és az elvégzett kutatás meghatározó szerepet játszott, az ír-magyar együttműködés kialakítása a két kutatócsoport között pedig mindkét fél számára nagy előnyökkel járhat a közeljövőben, amiért rendkívül hálás vagyok.

5. Irodalomjegyzék

- Greene, C., Hanley, N., Reschke, C. R., Reddy, A., ...Campbell, M. (2022). Microvascular stabilization via blood-brain barrier regulation prevents seizure activity. *Nature Communications* (accepted)
- Hashimoto, Y., & Campbell, M. (2020). Tight junction modulation at the blood-brain barrier: Current and future perspectives. *Biochimica et Biophysica Acta. Biomembranes*, 1862(9), 183298.

- Profaci, C. P., Munji, R. N., Pulido, R. S., & Daneman, R. (2020). The blood-brain barrier in health and disease: Important unanswered questions. *The Journal of Experimental Medicine*, 217(4), e20190062.
- Sweeney, M. D., Zhao, Z., Montagne, A., Nelson, A. R., & Zlokovic, B. V. (2019). Blood-Brain Barrier: From Physiology to Disease and Back. *Physiological Reviews*, 99(1), 21–78.