

A hypothalamus-hipofízis-gonád tengely és a humorális immunválasz kölcsönhatásának molekuláris mechanizmusa és szerepe az autoimmun betegségek kialakulásában: neuro-immuno-endokrin kölcsönhatások

Zárójelentés

A központi idegrendszer és az immunrendszer kölcsönhatásai jelentősen befolyásolják a két rendszer működését. Korábbi kísérleti adatok arra utalnak, hogy a neuroendokrin folyamatok, mint a stresszválasz szabályozásában résztvevő hypothalamus-hipofízis-mellékvese tengely működése és a humorális immunválasz szabályozása több szinten is kapcsolódik egymáshoz. Azonban a fertilitást irányító hypothalamus-hipofízis-gonád (HPG) tengely és az immunrendszer kölcsönhatásának a mechanizmusairól igen keveset tudunk.

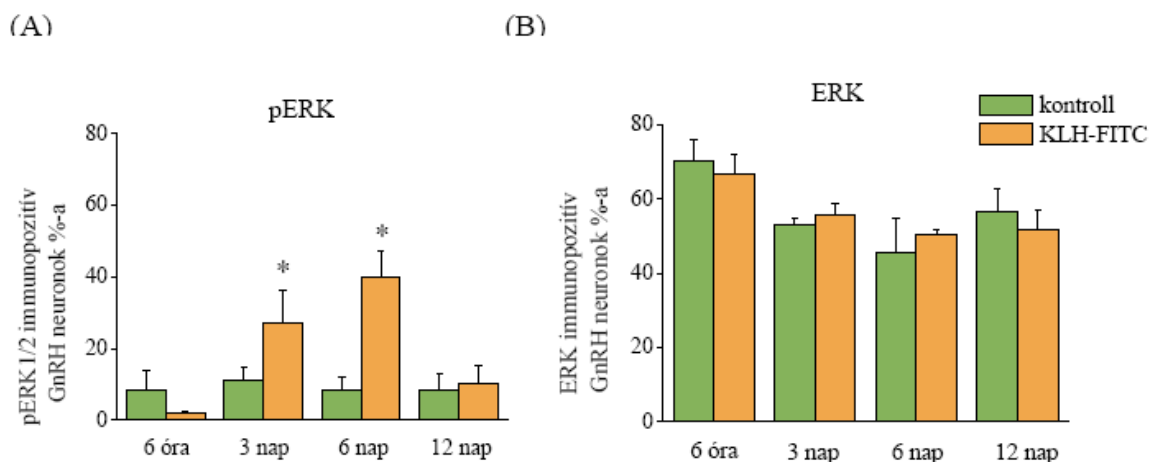
1. Az immunológiai kihívás és az ösztrogén hatása a GnRH neuronok jelátvivő rendszerére

A gonadotropin releasing hormon (GnRH) neuronok fontos szerepet játszanak a HPG tengely és így a fertilitás szabályozásában, valamint az ösztrogén feedback mechanizmusaiban is. Ezért a kísérleteink első felében arra kerestük a választ, hogy az immunkihívás hogyan befolyásolja ezen neuronok működését és az ösztrogén miként modulálja ezt a kölcsönhatást.

1.1 A T-sejt-függő antigénre adott humorális immunválasz hatása a jelátvivő rendszerekre a GnRH neuronokban.

Több jelátviteli kaszkád immunstimulus-érzékenységet tanulmányoztuk, mivel annak pontos mechanizmusa, hogy az immunkihívás hogyan képes megváltoztatni a reprodukív funkciókat a GnRH neuronok működésének módosításán keresztül, nem ismert. Ehhez kísérleteinkben a humorális immunválasz kiváltásához T-sejt-függő antigénnel, KLH-FITC-cel immunizáltuk az egereket, majd a kezelés után 6 órával, 3, 6 és 12 nappal megvizsgáltuk először az ERK1/2 foszforiláció, CREB foszforiláció változását a GnRH idegsejtekben kettős jelöléses fluorescens immunohisztokémia és konfokális lézer szkennig mikroszkóp (CLSM) segítségével. Az immunizálás után 6 órával nem tapasztaltunk változást, 3 nappal a kezelést követően azonban már emelkedést mutatott a pERK1/2 immunreaktív GnRH idegsejtek száma, mely növekedés a 6. napon érte el a maximumát (1.ábra), vagyis az ERK1/2 foszforilációs változás maximuma abba az időintervallumba esik, amikor már az ellenanyagtermelés is szignifikánsan emelkedik. Az ERK1/2 foszforilációja a 12. napon újra az alapszinthez közeli értéket mutatott (1.ábra). Az ERK fehérje expressziós szintjének vizsgálatából az is kiderült, hogy a pERK1/2 immunpozitív sejtek számában megfigyelt változás csak az ERK molekula foszforilációs mértékének a következménye, mivel az ERK fehérje expressziós szintje nem változott egyik vizsgált időpontban sem (1.ábra). Ezen kívül azt is megfigyeltük, hogy az ERK, valamint a pERK1/2 egységesen ugyanolyan expressziós mintázatot mutatott a GnRH

neuronokban, függetlenül a GnRH idegsejtek lokalizációjától (medialis septum, anteroventricularis mag, medialis preopticus area és anterior hypothalamus), valamint a GnRH neuronok száma sem változott az immunizálást követően. A CREB nem foszforilálódott a GnRH neuronban a kezelés hatására. A KLH-FITC oltás hatékonyságának igazolásához az immunizálást követő 6. napon megmértük a FITC ellen termelt ellenanyagok (IgM, IgG) szintjét a szérumban ELISA módszerrel. Annak bizonyítására pedig, hogy az ERK1/2 foszforilációs változás valóban specifikus a FITC antigénre, és nem az immunválasz erősítéséhez használt komplett Freund adjuváns (CFA) okozza a foszforiláció növekedését, megvizsgáltuk a GnRH neuronok foszforilációs státuszát 6. nappal CFA oltás után is. Azt tapasztaltuk, hogy a CFA nem volt hatással az ERK1/2 foszforilációra.



1.ábra. Az ERK1/2 foszforiláció időbeli változása a GnRH neuronokban KLH-FITC-cel történő immunizálás után. Az oszlopdiagramok a pERK1/2 (A) ill., az ERK (B) immunreaktív GnRH neuronok százalékaát (±SEM) mutatják intakt nőstény egerekben 6 órával, 3, 6 és 12 nappal a KLH-FITC kezelést követően. * $p < 0.05$, $n = 5-5$ /csoport.

1.2 A T-sejt-függő antigénre adott humorális immunválasz hatása az ERK1/2 foszforilációra az egér agy különböző előagy és köztiagi területein.

A következő kísérletben megvizsgáltuk, hogy a megfigyelt T-sejt-dependens humorális immunválasz-indukált ERK1/2 foszforilációs változás általános jelenség-e az egér agyban vagy specifikus a GnRH neuronokra. Az ERK1/2 foszforiláció növekedés a 3. napon már láthatóan emelkedett, maximumát azonban az immunizálást követő 6. napon érte el, ezért a továbbiakban valamennyi kísérletünket erre az időpontra terveztük. Elsőként Western blot analízissel hasonlítottuk össze az immunizált és a kontroll egerek egyes agyi régióinak pERK1/2 fehérje szintjét, melyek a következők voltak: septum (S), hypothalamus (HT), striatum (ST), thalamus (T), hippocampus (H) és cortex (C). A vizsgált területek egyikén sem láttunk változást a pERK1/2 fehérje expressziós szintjében. Annak ellenőrzésére, hogy az egyes mintákból azonos fehérjemennyiségeket futtattunk, aktin kontrollt alkalmaztunk. Ezután további agyterületeket hasonlítottunk össze kvantitatív immunhisztokémia segítségével. Ez lehetővé tette az agyi régiók

részletesebb, pontosabb analízisét, az esetleges pERK1/2 immunpozitív sejtszámváltozás vizsgálatát is. A következő agyi területeket ill., magokat elemeztük: anteroventralis periventricularis mag (AVPV), medialis preopticus area (mPOA), paraventricularis mag (PVN), piriformis cortex (Pir), cingularis cortex (Cg), motoros cortex (M1-2). Összhangban a Western blot eredményeivel a kvantitatív immunhisztokémia eredményei alapján a KLH-FITC 6 nappal az immunizálás után nem indukál ERK1/2 foszforilációs változást egyik általunk vizsgált területen sem, összevetve a kontroll és az immunizált egereket (AVPV: $45,37 \pm 5,08$; $51,75 \pm 1,71$; mPOA: $127,5 \pm 8,72$; $127,5 \pm 15,89$; PVN: $248,04 \pm 17,74$; $253 \pm 30,58$; Pir: $196,63 \pm 17,9$; $179,88 \pm 13,21$; Cg: $57,5 \pm 4,48$; $75,5 \pm 13,2$; M1-2: $84,08 \pm 3,43$; $75,03 \pm 10,45$).

1.3 Az immunkihívás GnRH neuronokban indukált ERK1/2 foszforilációjának lehetséges mechanizmusának vizsgálata

Az immunstimulus-okozta ERK1/2 foszforiláció antigén-specifikusságának megállapításához T-sejt-független antigénre adott humorális immunválaszt indukáltunk az egerekben. A humorális immunválasz ezen típusának kiváltásához ugyancsak FITC-et használtunk antigénként, a korábbiakban használt KLH helyett viszont dextránt alkalmaztunk hordozóként. A dextrán-FITC ugyanis számos azonos antigénepitóppal rendelkezik, mely ismétlődő epitópok hatékonyan kapcsolják össze a B-sejtek membrán immunglobulinjait (mIg), ami a B-sejtek T-sejt nélküli aktivációjához vezet. Az immunizálás ebben az esetben is hatékony volt, a dextrán-FITC-cel történő immunizálás utáni 6. napon azonban nem láttunk változást a GnRH neuronok ERK1/2 foszforilációjában a kontroll (PBS-sel "oltott") csoporthoz viszonyítva. Ez az eredmény arra utal, hogy az ERK1/2 foszforiláció növekedés létrejötte függ az antigen típusától.

A gyulladási folyamatok során a periférián aktiválódott T-sejtek bejuthatnak az agyba, és ott esetleg közvetlenül befolyásolhatják az ERK1/2 foszforilációt. Ezért megvizsgáltuk, hogy a KLH-FITC oltás hatására történik-e agyi T-sejt bevándorlás. Ennek vizsgálatához áramlási citofluorimetriával összehasonlítottuk a KLH-FITC-cel kezelt és a kontroll egerek agyában lévő CD3⁺ T-sejtek százalékos arányát. A KLH-FITC-cel immunizált egerekben a kijelölt sejtpopuláció 7,9 %-a, a kontroll állatokban pedig a 7,2 %-a volt CD3⁺ T-sejt. Vagyis a kontroll és az immunizált egerek között nem találtunk különbséget a CD3⁺ T-sejtek arányában, KLH FITC hatására tehát nem történik T-sejt bevándorlás az agyba.

Kísérleteink folytatásaként a prosztaglandinok immunstimulus által okozott ERK1/2 foszforiláció növekedésben betöltött szerepét vizsgáltuk meg. A kísérleti állatokat a KLH-FITC-cel történő oltást megelőzően, valamint azt követően a perfúzióig minden nap Indomethacinnal, a prosztaglandin (PG) szintéziséhez szükséges ciklooxygenáz 1, 2 (COX1,2) enzim nem szelektív inhibitorával kezeltük. Az Indomethacin kezelés azonban nem eredményezett szignifikáns változást a csak KLH-FITC-cel kezelt csoporthoz képest.

A citokinek immunkihívás által kiváltott ERK1/2 foszforilációban betöltött szerepét az agyban lévő IL-1 β , TNF- α és az IL-10 mennyiségének mérésével vizsgáltuk meg. Az IL-1 β és a TNF- α proinflammatorikus citokinek ELISA-val meghatározott expressziós szintje nem mutatott változást a KLH-FITC-cel immunizált egerek agyában a kontrollhoz (PBS) képest. Ezzel szemben az IL-10 jelentős növekedést mutatott a 6. napon mind az agyban mind a periférián. IL-10 KO állatokon elvégezve a kísérletet megmutattuk, hogy a IL-10 hiánya gátolja a a KLH-FITC

indukálta ERK1/2 foszforilációt a 6. napon, ami az Il-10 fontos szerepére utal ebben a folyamatban.

1.4 A gonadális szteroidok és az immunológiai kihívás interakciójának vizsgálata

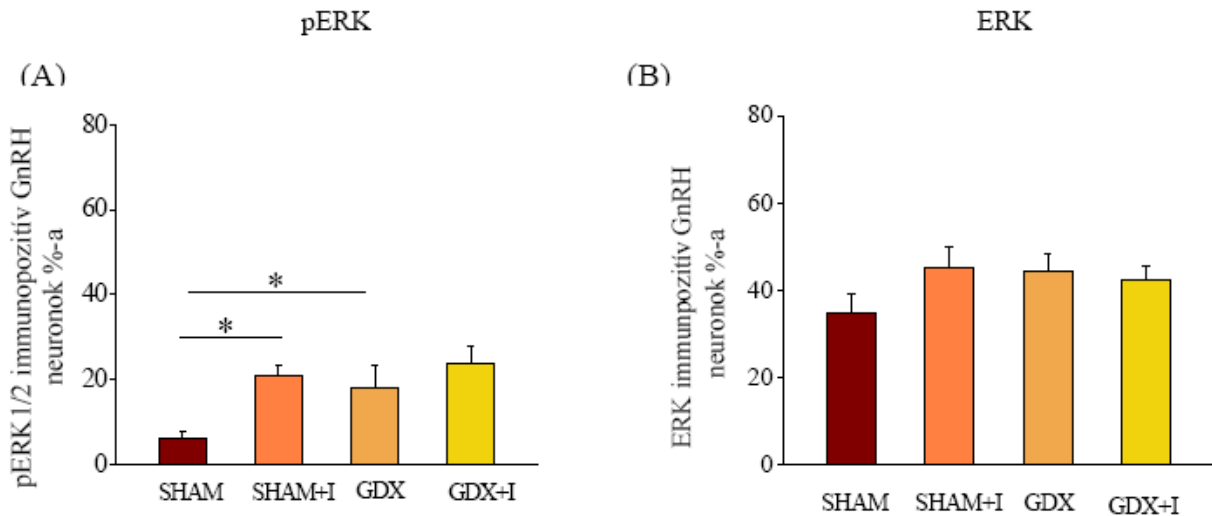
A továbbiakban azt vizsgáltuk, hogy a gonadális szteroidok miként hatnak az ERK1/2 foszforilációra és ez interakcióba kerül-e a KLH-FITC okozta változásokkal. Először megvizsgáltuk, hogy a gonadális szteroidok miként befolyásolják az ERK1/2 foszforilációt az agy különböző területein. Az ovariectomia szignifikánsan növelte az anteroventralis periventricularis magban (AVPV) a pERK1/2 pozitív sejtek számát. A többi analizált agyi régióban, mint a medialis preopticus magban (mPOA), a piriform kéregben (Pir), a bed nucleus striae terminalisban (BNST) és a cingularis kéregben (Cg) nem láttunk változást. Ovariectomizált egerekben az ösztrogén kezelés szignifikánsan növelte a pERK1/2 immunpozitív neuronok számát az mPOA-ban és az AVPV-ben, míg a Pir-ben, a BNST-ben és a Cg-ben nem mutatott különbséget. Eredményeink ebben a kísérletben is azt mutatják, hogy az ösztrogén befolyásolja az ERK1/2 foszforilációt a különböző agyi területeken.

A továbbiakban arra voltunk kíváncsiak, hogy az ovariectomia hogyan befolyásolja az ERK1/2 foszforilációt egysejt szinten a GnRH neuronban és egy olyan neuronális fenotípusban, mint a kolinerg neuron, ami a basalis előagyban helyezkedik el és nem érintett a fertilitás szabályozásában. A gonadectomia szignifikánsan növelte az ERK1/2 foszforiláció mértékét a GnRH neuronokban az álműtött állatokhoz viszonyítva. Ugyanakkor sem az 1 órás ösztrogén kezelés, sem a folyamatos ösztrogén kezelés nem befolyásolta szignifikánsan a gonadectomia- okozta ERK1/2 foszforiláció növekedést. Ezzel ellentétben az ovariectomia csökkentette, míg az 1 órás ösztrogén kezelés növelte az ERK1/2 és a CREB foszforilációt a kolinerg neuronokban az alfa típusú ösztrogén receptoron keresztül.

Megvizsgáltuk azt is, hogy az ösztrogén kezelés miként befolyásolja a GnRH neuronban az intracelluláris Ca^{2+} koncentrációt, mivel az Ca^{2+} jelentős szerepet játszik az ERK1/2 foszforiláció szabályozásában. In vitro kísérleteinkben GnRH specifikus genetikai Ca^{2+} szenzorral rendelkező transzgenikus egerek agyszövet szeletein végzett kísérleteink kimutatták, hogy az ösztrogén (1-100nM) jelentősen növeli a Ca^{2+} spike-ok előfordulási gyakoriságát a GnRH neuronokban. Ebből arra következtethetünk, hogy feltehetőleg nem a Ca^{2+} -on keresztül szabályozza az ösztrogén az ERK1/2 foszforilációt a GnRH neuronban.

További kísérleteinkben azt tanulmányoztuk, hogy a gonadális szteroidok befolyásolják-e az immunológiai kihívás ERK1/2 foszforiláció módosító hatását a GnRH idegsejtekben, mivel az ösztrogén szabályozó szerepe az immunstimulus által okozott agyban zajló folyamatokban jól ismert. Ehhez első lépésként petefészekirtott (GDX) és álműtött egerekben (SHAM) hasonlítottuk össze a T-sejt-függő B-sejt-közvetített immunválaszt kiváltó KLH-FITC hatását az oltást követő 6. napon (2. ábra). A gonadectomizált egerekben nem sikerült kimutatnunk a KLH-FITC ERK1/2 foszforiláció moduláló hatását, ezzel szemben az álműtött állatokban szignifikánsan növelte az immunizálás a foszforiláció mértékét a korábbiakban bemutatott intakt nőstényekhez hasonlóan (2. ábra). Ezek alapján feltételeztük, hogy a gonadális szteroidok, vagy azok valamelyike nélkülözhetetlen az immunstimulus- okozta ERK1/2 foszforiláció növekedés kiváltásához. Így kísérleteink második részében ösztrogén visszapótlás után vizsgáltuk meg a KLH-FITC hatását petefészekirtott egerekben, hormonkezelést nem kapott gonadectomizált egerekhez viszonyítva. Összesen négy kísérleti csoportot hoztunk létre: gonadectomizált, 17- β -ösztradiollal kezelt, nem immunizált (E2); gonadectomizált, 17- β -ösztradiollal kezelt, immunizált

(E2+I); gonadektomizált, vivőanyaggal kezelt, nem immunizált (V) és gonadektomizált, vivőanyaggal kezelt, immunizált (V+I) csoportokat. Azt találtuk, hogy az ösztrogénnel kezelt, immunizált egerek ERK1/2 foszforilációs szintje szignifikáns növekedést mutatott a másik három kísérleti csoporthoz képest, a „csak” ösztrogén-kezelt, a „csak” immunizált és a „nem kezelt” egerekhez viszonyítva is.



2. ábra. A gonadektómia hatása immunstimulus-indukált ERK1/2 foszforilációra. Az oszlopdiagramok a pERK1/2 (A) ill., az ERK (B) immunreaktív GnRH neuronok százalékának átlagát (\pm SEM) ábrázolják álműtött, nem immunizált (SHAM); álműtött, immunizált (SHAM+I); gonadektomizált, nem immunizált (GDX) és gonadektomizált, immunizált (GDX+I) nőstény egerekben. * $p < 0.05$, $n = 6-6$.

1.5 Az immunstimulus-indukált ERK1/2 foszforiláció szerepe a hypothalamus-hypophysis-gonád (HPG) tengely szabályozásában

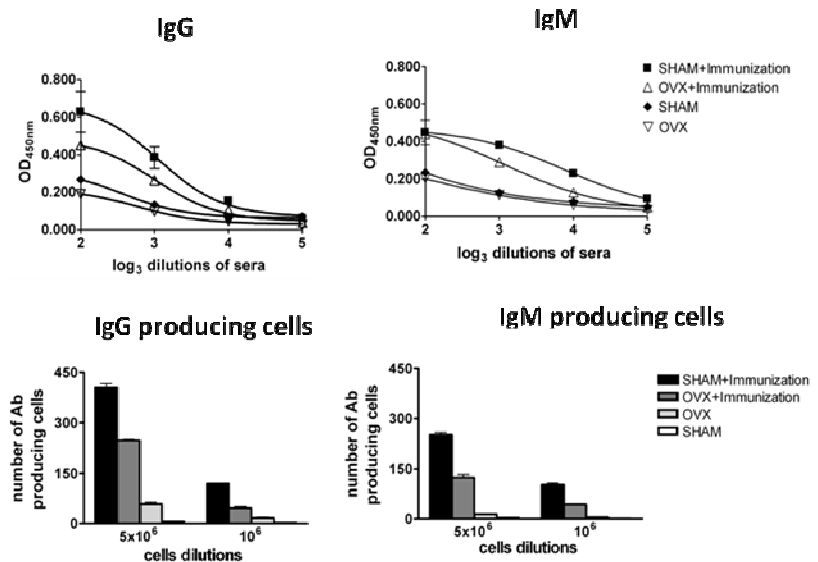
A GnRH neuronokban megfigyelt immunstimulus-indukált ERK1/2 foszforiláció hypothalamus-hipofízis-gonád tengely szabályozásában betöltött szerepének vizsgálatához az esetleges hormonszint változásokat próbáltuk nyomonkövetni. Egyrészt indirekt módon az egerek ösztroz ciklusának megállapításával következtettünk a szervezetükben zajló hormonális változásokra. Ehhez két héttel az immunizálást megelőzően, illetve az azt követő két hétben minden nap vaginális kenetet vettünk a kísérleti állatoktól, és meghatároztuk az ösztroz ciklusuk stádiumát. A KLH-FITC-cel immunizált egerek ösztroz ciklusában azonban nem láttunk eltérést a kontroll egerekhez viszonyítva. A hormonszint közvetlen vizsgálatához a plazma luteinizáló hormon (LH) koncentrációját mértük négy időpontban: 6 órával, 3, 6 és 12 nappal az immunizálás után. Azonban egyik időpontban sem láttunk szignifikáns változást a két kísérleti csoport között

2. Az ösztrogén hatása a T sejt dependens és T sejt independens immunválaszra

A HPG tengely végpontjában termelődő ösztrogén jelentősen befolyásolja az immunsejtek aktivitását. Figyelemre méltó tény az is, hogy az autoimmun betegségek (rheumatoid arthritis, szisztémás lupus erithrematosus) előfordulási gyakorisága jóval nagyobb nőkben, mint férfiakban, és ez a szexuális dimorfizmus az ösztrogén szint csökkenésével postmenopauzában megszűnik. Azonban e jelenségek molekuláris folyamatai korántsem mondhatók nem tisztázottaknak. További kísérletinkben azt vizsgáltuk, hogy az ösztrogén hogyan hat az immunválasz molekuláris mechanizmusaira. Ezért meghatároztuk az ösztrogén hatásait a KLH-FITC illetve a Dextran-FITC kiváltotta immunválaszra. Az ösztrogén az ösztrogén receptorokon és ösztrogén “response element”-en keresztül megváltoztatja a gének átírását. Ezen kívül képes megváltoztatni, mint ahogy a korábbi kísérletekben is láttuk a jelátvivő rendszerek aktivitását (nem-kalsszikus hatás) és ez kölcsönhatásba kerülhet a B és T sejtekben az immunválasz során megfigyelhető jelátvivő mechanizmusokkal. Ezért meghatároztuk a nem-kalsszikus ösztrogén hatásokat a B és T sejtekben.

2.1 Az ovariectomia hatása a T sejt dependens (TD) és T sejt independens (TI) immunválaszra

Azért, hogy meghatározzuk az ovariectomia hatását TD-re és TI-re, ELISA segítségével megvizsgáltuk az IgM és az IgG termelést KLH-FITC és dextran-FITC immunizációt követő 6. napon áloperált és ovariectomizált (OVX) egerekben. Az OVX egerekben a FITC specifikus IgM és IgG termelés szignifikánsan alacsonyabb volt, mint az áloperáltakban (3. ábra). Az ELISPOT mérések szerint az antitest termelő B sejtek száma szignifikánsan alacsonyabbnak mutatkozott az OVX egerekben az immunizálás után, ami arra utal, hogy a gonadális szteroidok megnövelték a TD immunválasz intenzitását. Az OVX indukálta antitest válasz T sejtektől függő jelenség, mivel TI immunválaszban nem figyelhető meg.



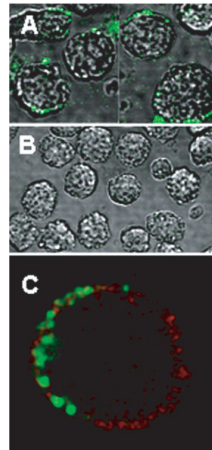
3. ábra. A TD immunválasz hatása az IgG és IgM koncentrációra és az antitesteket termelő B sejtek mennyiségére (* $p < 0.05$) ovariectomizált (OVX) és áloperált (SHAM) egerekben ($n=6$ /csoport).

2.2 Az ösztrogén hatása az antitest termelésre

A következő kísérleteinkben megvizsgáltuk, hogy vajon az ösztrogén tehető-e felelőssé az OVX állatokban megfigyelhető csökkent TD immunválaszért. OVX egerekben az ösztrogén visszapótlás szignifikánsan megemelte a FITC specifikus IgM és IgG produkciót, ami azt jelzi, hogy az OVX-ben megfigyelhető csökkent antitest termelésért, TD immunválasz alatt az ösztrogén hiánya tehető felelőssé.

2.3 Az ösztrogén hatásamechanizmusa a lymphocitákon: ösztrogén receptor expresszió

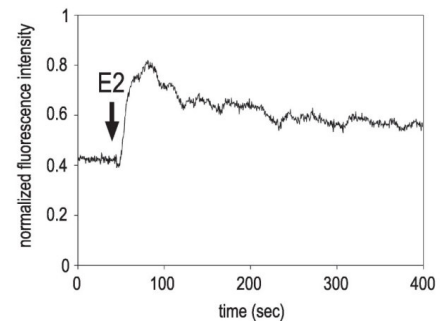
Mivel az ösztrogén nem-klasszikus hatását is nagyrészt az ösztrogén receptorokon fejt ki, ezért flow citometriával, CLSM-vel és fluorescens immunohisztokémiával megvizsgáltuk az ösztrogén receptor α ($ER\alpha$) és β ($ER\beta$) expressziót B és T sejteken. Az $ER\beta$ alacsony mennyiségben volt jelen, míg az $ER\alpha$ fokozott expressziót mutatott mind a B és mind a T sejtekben. Az $ER\alpha$ egyaránt jelen volt a B és a T sejtek citoplazmájában illetve a magjában. Megvizsgáltuk azt is, hogy az ösztrogén kötődik-e a membrán receptorhoz. Ezekben a vizsgálatokban membrán impermeabilis fluorescensen jelölt ösztrogén konjugált BSA-FITC-et használtunk. Megállapítottuk, hogy az ösztrogén kötődhet a B és a T sejteken lévő membrán receptorhoz (4. ábra) és ez koncentráció függő is.



4. ábra. A. CLSM –vel a T sejteken lévő ösztradiol-BSA-FITC expresszió (zöld jele+DIC kép). B. Hátter aktivitás BSA-FITC-vel T sejteken. C. Hasonló ösztradiol-BSA-FITC kötődés B sejtek membránján (Zöld: E2-BSA-FITC; Piros: anti-B220 PE/Cy5 antibody).

2.4 Az ösztrogén hatása a Ca^{2+} oszcillációjára B és T sejtekben

A Ca^{2+} intracelluláris koncentrációja ($[Ca^{2+}]_i$) fontos szerepet játszik az ösztrogén nem klasszikus hatásaiban. Ezért CLSM-vel és Fluo-4 kalcium indikátor segítségével megvizsgáltuk, hogy az ösztrogén (1-100nM) és a membrán impermeabilis ösztrogén-BSA (1-100nM) hogyan hat a B és T sejtek $[Ca^{2+}]_i$ -jára. Mind az ösztrogén mind pedig az ösztrogén-BSA megemelte $[Ca^{2+}]_i$ -t a T sejtekben. Ezzel szemben a B sejtekben nem okoztak változást, annak ellenére, hogy az IgM indukálta $[Ca^{2+}]_i$ megtartott volt.



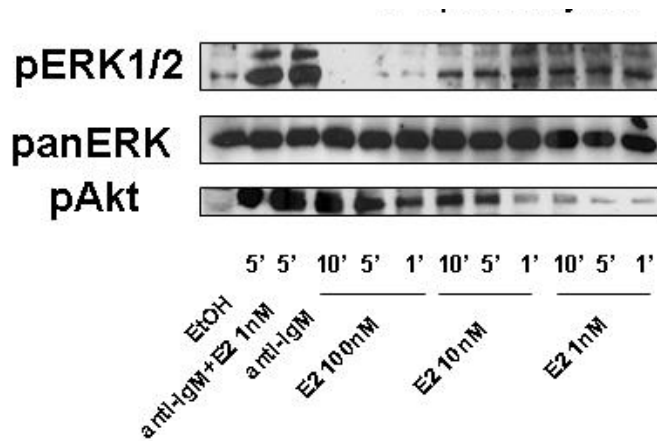
5. ábra. 100nM ösztrogén (E2) hatása a T sejtek Ca^{2+} koncentrációjára

2.5 Az ösztrogén hatása az ERK, az Akt foszforilációra és az NFκB transzlokációra B és T sejtekben.

A következő kísérletben Western blottal tovább vizsgáltuk az ösztrogén nem klasszikus hatásait B és T sejteken. Az kísérleti eredmények azt mutatták, hogy az ösztrogén gyors, dózis függő módon foszforilálja az ERK1/2 és az Akt molekulákat a B és T sejtekben (6. ábra). Ezek után meghatároztuk, hogy az ösztrogén receptor a membrán receptorához kötődve aktiválja-e ezeket a jelátviteli molekulákat.

Kísérleteink azt mutatták, a membrán impermeábilis ösztrogén-BSA csak a T sejtekben

foszforilálta az ERK-et és az Akt-ot, ami arra utal hogy a T sejtekben főleg a membránon lévő receptor, míg a B sejtekben a sejtmagban elhelyezkedő receptor felelős a megfigyelt jelenségért. A további vizsgálatokban az ERK és az Akt jelátviteli útvonal végpontjában lévő, NFκB transzkripciósfaktort tanulmányoztuk. CLSM és Western blot vizsgálatokkal kimutattuk, hogy az ösztrogén fokozza az NFκB magi transzlokációját, ami fokozott transzkripcióaktivitásra utal.



6. ábra. Ösztrogén (E2) hatása (dózis, idő) az ERK1/2 és Akt foszforilációra izolált B sejtekben. Reprezentatív western blot.