

CRH neuronok szerepe a stresszválasz szabályzásában

Doktori tézisek

Horváth Krisztina

Semmelweis Egyetem
Szentágotthai János Idegtudományi Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Kovács Krisztina, D.Sc., tudományos tanácsadó

Hivatalos bírálók: Dr. Patócs Attila, MD, D.Sc., egyetemi tanár
Dr. Tóth Máté, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Komplex vizsga szakmai bizottságának elnöke:

Dr. Bereczki Dániel, MD, D.Sc., egyetemi tanár

Komplex vizsga szakmai bizottságának tagjai:

Dr. Dobolyi Árpád, D.Sc., egyetemi docens
Dr. Kovács Tibor, MD, Ph.D., egyetemi docens

Budapest
2024

Bevezetés

A homeosztázis – a belső környezet dinamikus állandósága – az élő szervezet stabilitásának alapvető elve. Bármely külső vagy belső inger (stresszor), mely a homeosztázis zavarához vezet, stresszválaszt indukál. A stressz, a szervezet nem specifikus válasza, mely lehetővé teszi az élőlények változó környezetükhöz való alkalmazkodását. A stresszreakció kialakításában és szabályozásában az agy számos struktúrája részt vesz. Mivel a különféle stresszorokra adott válasz megszervezésében eltérő agyi régiók eltérő sejttípusai és neuronhálózatai vesznek részt, az egyes stresszorok által kifejtett pontos hatásmechanizmus máig tisztázatlan.

A hipotalamikus paraventricularis mag (PVH) corticotropin-releasing hormont (CRH) termelő neuronjainak kiemelkedő szerepe van a stresszel kapcsolatos információk (nociceptív, vizuális, szomatoszenzoros, akusztikus, belső és véreredetű jelek) integrálásában, illetve a homeosztázis megőrzése érdekében adaptív neuroendokrin, autonóm, metabolikus és viselkedésbeli válaszok indukálásában. A neuroendokrin stresszreakció a hipotalamo-hipofízis-mellékvese tengelyen keresztül érvényesül. Stresszor hatására a PVH hipofizeotróp parvocelluláris CRH neuronjai CRH-t bocsátanak ki az adenohipofízis (a hipofízis elülső lebenyének) portális keringésébe. A felszabadult CRH indukálja a hipofízis kortikotróp sejtjeinek ACTH szekrécióját, mely a szisztémás keringésen keresztül eljutván a mellékvese kéregállományába, glükokortikoid felszabadulást eredményez. Egerek esetén a legjelentősebb glükokortikoid a kortikoszteron (CORT). A stresszválasz által kiváltott szervezet szintű változásoknak elegendő erőforrást és időt kell biztosítaniuk az élőlény számára, hogy visszaállhasson az egyensúlyi állapot. A neuroendokrin stresszreakció alkalmazkodóképességét egy többlépcsős negatív visszacsatoló rendszer biztosítja, melynek fő elemei a glükokortikoidok. Ha a szervezet válasza nem arányos a stresszor által jelentett fenyegetés mértékével, patológiás stresszreakció alakulhat ki, mely akár tartós károsodást is okozhat.

Bár a CRH^{PVH} neuronok elsődleges szerepe ismert, a központi idegrendszerben széles körben expresszálódik CRH a PVH hipofiziotróp sejtjein kívül is. Ezen CRH neuronok feltérképezése és stresszválasz megszervezésében betöltött szerepének feltárása kiindulópontot adhat az agyi stresszrendszer szisztematikus funkcionális elemzéséhez, valamint a stressz által kiváltott pszichopatológiai betegségek hátterében húzódó folyamatok megértéséhez.

Célkitűzések

I. Elsődleges célom az volt, hogy feltérképezsem a hipotalamikus és az extrahipotalamikus CRH neuronokat, illetve meghatározzam az egyes CRH neuron-populációk eltérő akut stresszreakciókban betöltött szerepét.

Fő kérdéseim:

- > A Crh-IRES-Cre;Ai9 egér megfelelő modell a kutatásomhoz?
- > Hol találhatóak tdTomato pozitív profilok az egér agyában?
- > Hol találhatóak különböző stresszorok által aktivált neuron-populációk az egér agyában?
- > Mely tdTomato pozitív (feltételezett CRH) neuronok aktiválódnak különböző akut kihívásokra az egér agyában?

II. A következő célom az volt, hogy meghatározzam a krónikus stressz egerekre gyakorolt hatását és feltárjam azon viselkedésbeli-, és stresszel kapcsolatos molekuláris különbségeket, melyek a krónikus stresszorok változékonyságából és kiszámíthatatlanságából erednek.

III. Végül, hogy megvizsgáljam a CRH^{PVH} neuronok pontos szerepét a stresszreakció megszervezésében: összehasonlítottam a CRH^{PVH} neuronok szelektív kemogenetikai aktivációjának hatását az akut és ismételt restraint stressznek kitett egerek hormonális, viselkedési és molekuláris válaszaira.

Módszerek

Kísérleti állatok

Kísérleteinkhez fiatal felnőtt hím, C57BL/6J; Crh-IRES-Cre és Crh-IRES-Cre;Ai9 egereket használtunk.

Akut stressz protokollok

Crh-IRES-Cre;Ai9 egereinket 5 különböző akut stressznek tettük ki:

1. hipertóniás sóoldat injekció (HS)
2. lipopoliszacharid injekció (LPS)
3. éter
4. restraint
5. ragadozószag

Krónikus stressz protokollok

A krónikus stressz hatását C57BL/6J egereken vizsgáltuk. Egereink egy csoportját krónikus ismétlődő restraint stressznek (CRS) tettük ki. A krónikus variábilis stressznek kitett csoport (CVS) állatait három héten keresztül különböző módokon (szociális vereség, víz elkerülés stressz, erőltetett úszás, vizes alom, dőlt ketrec, izoláció, zsúfoltság, rázatás, restraint, áramütések, patkány ürülék szag) stresszeltük.

Intracerebrális vírus injektálások

CRH-IRES-Cre transzgenikus egerek PVH-jába pAAV8/hSyn-DIO-hM3D(Gq)-mCherry aktivátor (act.DREADD csoport) vagy pAAV-hSyn-DIO-mCherry kontroll (Restraint csoport) vírus konstruktot injektáltunk. Az egereket a műtét után, 3 hét felépülést követően vizsgáltuk tovább. A CRH^{PVH} sejtaktiváció kiváltásához intraperitoneálisan injektált DREADD agonista Compound 21-et (C21) használtunk.

> CRH^{PVH} neuronok szerepe az akut stresszreakció megszervezésében

A Restraint csoport egereit akut restraint stressznek tettük ki, míg az act. DREADD csoport egereinek CRH^{PVH} neuronjait egyszeri C21 injekcióval aktiváltuk. Az aktivált neuronokat c-Fos immunohisztokámiával azonosítottuk.

> CRH^{PVH} neuronok szerepe a krónikus stresszreakció megszervezésében

Állataink egy csoportját (Restraint) 2 héten keresztül napi egyszer restraint stressznek tettük ki. Az act. DREADD csoport egereinek CRH^{PVH} neuronjait 2 héten keresztül napi egyszer C21 injekcióval aktiváltuk. Abszolút kontroll csoportunk (Kontroll) állatait 2

héten keresztül fiziológias sóoldattal oltottuk. Megfigyeltük az állatok 2 hét alatti testtömegének és épített fészkek minőségének változását. A kezelési periódus végén nyílt tér és tail suspension tesztet végeztünk. A továbbiakban meghatároztuk az egyes csoportok 2 hetes krónikus kezelés utáni heterotipikus akut stressz indukálta CORT-, és az állatok 2 hetes kezelés utáni alap CORT szintjét.

Viselkedés tesztek

A krónikus ismétlődő (CRS) és variábilis (CVS) stressznek kitett állatok viselkedését nyílt tér tesztel vizsgáltuk. A krónikus CRH^{PVH} aktiváció vs. krónikus restraint indukálta stresszreakciók összehasonlító vizsgálata során megfigyeltük az egerek fészkepítését, nyílt térben való mozgását és magatartáselemeit, illetve tail suspension tesztet végeztünk. A viselkedéstesztek elemzése a Solomoncoder, illetve az EthoVision XT szoftverekkel készült.

Perfúzió és szövet előkészítés

Azon állatokat, melyek agyszövetén immunohisztokémiát végeztünk, 90 perccel a stresszexpozió után perfundáltuk. Az agyszövetekből 3 óra utófixálást és egy éjszakán keresztüli krioprezerválást követően 25 µm vastag metszeteket készítettünk.

Azon állatokat, melyek hipotalamuszán génexpressziós analízist végeztünk, 90 perccel (akut stressz esetén) vagy 24 órával (CRS és CVS esetén) a stressz kezdete után dekapitáltuk. Az agyszövetet a vizsgálatig -90 °C-on tároltuk.

Immunohisztokémia

Az aktivált neuronok detektálására c-Fos immunohisztokémiát végeztünk állataink 25 µm vastag agymetszetein. A szöveteket DAPI Fluoromount-G-vel fedtük le.

RNAscope In Situ Hibridizáció

RNAscope Multiplex Fluorescent Reagent Kit v. 2 (Advanced Cell Diagnostics, Newark, CA, USA) segítségével RNAscope-ot végeztünk Crh-IRES-Cre;Ai9 állataink validálása céljából.

Képalkotás és mikroszkópos elemzés

Immunohisztokémia esetén az agymetszetek digitális képei 20x objektív alatt 3D HISTECH Panoramic MIDI II. slide scanner segítségével készültek. Az agyrégiók és a nevezéktan minden esetben az online Allan Brain Atlasz alapján lettek meghatározva. Analíziseinket a NIS Elements Imaging Software 5.21.01. segítségével végeztük.

Megfigyeltünk az egyes agyrégiók DAPI, c-Fos és tdTomato pozitív sejtjeit. Az egyes területekre jellemző normalizált tdTomato pozitív sejt%-ot a területen elhelyezkedő tdTomato pozitív sejtek száma / összes sejtszám (DAPI pozitív) x 100 képlettel kaptuk meg. Az egyes területekre jellemző normalizált c-Fos pozitív sejt%-ot a területen elhelyezkedő c-Fos pozitív sejtek száma / összes sejtszám (DAPI pozitív) x 100 képlettel kaptuk meg. Az egyes területekre jellemző normalizált aktivált tdTomato pozitív sejt%-ot a területen elhelyezkedő tdTomato és c-Fos pozitív sejtek száma / összes sejtszám (DAPI pozitív) x 100 képlettel kaptuk meg.

Az RNAscope-os metszeteket Nikon Ni-E C2+ laser-scanning konfokális mikroszkóppal 1.4 NA Plan Apo VC DIC 60x objektív alatt vizsgáltuk.

Génexpressziós analízis

A génexpressziós változásokat RT-PCR-rel detektáltuk. A szövetmintákból RNS-t izoláltunk, majd cDNS szintézis után a target gének egyes szakaszaira tervezett primer párokat használtuk az RT-PCR reakcióban.

Kortikoszteron mérés

A szérum CORT szinteket direkt radioimmunoassay (RIA) segítségével határoztuk meg.

Statisztikai analízis

Statisztikai analízist GraphPad Prism software-el végeztük. Elemzésekhez egyutas ANOVA-t (a megfelelő post hoc teszttel), illetve párosítatlan kétoldali t-tesztet végeztünk. Eredményeinket *p < 0.05 esetén tekintettük szignifikánsnak.

Eredmények

I. Az agyi CRH neuron-populációk feltérképezése, illetve eltérő akut stresszreakciókban betöltött szerepének meghatározása.

Modell validálása

A Crh-IRES-Cre;Ai9 egerek PVH területén végzett RNAscope segítségével kimutattuk, hogy a CRH mRNS-t expresszáló neuronok valóban tdTomato pozitív sejtek is egyben. Azonosítottunk azonban olyan tdTomato pozitív sejteket is az anterior talamikus paraventriculáris magban (PVTa), melyek nem tartalmaztak CRH mRNS-t.

A tdTomato pozitív sejtek eloszlása az egéragyban

A Crh-IRES-Cre;Ai9 egéragy számos területén detektáltunk tdTomato pozitív neuronokat, legnagyobb arányban 95 agyterületen.

A stresszreaktív, és a tdTomato+ stresszreaktív neuronok eloszlása az egéragyban

Az öt eltérő akut stresszkihívás hatására a 95 megvizsgált terület neuronjai, illetve tdTomato pozitív sejtjei eltérő mértékben aktiválódtak a kontrollokéhoz képest.

II. A krónikus stressz egerekre gyakorolt hatása.

Viselkedésbeli- és stresszel kapcsolatos molekuláris különbségek

A krónikus variábilis stresszexpozíció (CVS) szorongásos magatartást eredményezett: nyílt tér tesztben lecsökkent az egerek centrum preferenciája, illetve a sarokba való belépésének látenciája a kontrollokéhoz képest.

RT-PCR-el kimutattuk, hogy a két krónikus stresszexpozíció (CVS és CRS) enyhébb hipotalamikus c-Fos mRNS szint emelkedést indukált az akut stresszhez képest. A Fosl2 és Fosb krónikus markerek eltérően változtak az egyes csoportokban.

III. A CRH^{PVH} neuronok szerepe a stresszreakció megszervezésében.

CRH^{PVH} neuronok szerepe az akut stresszreakció megszervezésében

Az akut restraint-nek kitett egerek számos agyterületén kiterjedtebb neuronális aktiváció volt megfigyelhető az act. DREADD-es csoport egereihez képest.

CRH^{PVH} neuronok szerepe az krónikus stresszreakció megszervezésében

A krónikus restraint és a CRH^{PVH} neuronok krónikus kemogenetikai aktivációjának hatására a kéthetes kezelési periódus végére az állatok testtömegének gyarapodása, illetve az épített fészkek minősége elmaradt a kontrollokéhoz képest.

A krónikus restraint-nek kitett egerek szignifikánsan többet és gyakrabban mosakodtak a nyílt tér teszt során a két másik csoport állataihoz képest.

A tail suspension teszt során, az act. DREADD-es csoport egerei szignifikánsan gyakrabban tettek kísérletet a szabadulásra a restraint-elt állatokhoz képest, illetve a teszt második felében mind a restraint-elt és kemogenetikailag CRH^{PVH} neuron aktiválta egerek szignifikánsan több időt töltöttek mozdulatlanul a kontroll állatokhoz képest.

Az alap szérum CORT szint nem tért el szignifikánsan a csoportok között a kéthetes kezelési periódus végén. Azonban a heterotipikus akut stressz (tail suspension) indukálta szérum CORT szint növekedés szignifikánsan magasabban bizonyult a restrain-elt csoport egerei esetén a két másik csoportéhoz viszonyítva.

Következtetések

1. A Crh-IRES-Cre;Ai9 megfelelő egérmodell a stressz által indukált CRH neuronok agyi aktivációjának vizsgálatára.
2. A CRH neuronok széles körben elterjedtek az egér agyában.
3. Eltérő neuronális körök és CRH neuron-populációk aktiválódnak különböző akut stresszorok hatására az egéragyban.
4. A neurogén stresszorok kiterjedtebb neuronális aktivációt indukálnak a szisztémás kihívásokhoz képest.
5. Az agy CRH neuronjainak aktivációja kevésbé megfigyelhető szisztémás kihívások (LPS és HS) esetén, szemben az erős pszichológiai komponenssel rendelkező stresszorokkal.
6. Krónikusan stresszelt egerekben a neuronális aktivitás markere: a c-Fos expresszió deszenzitizálódik. A krónikus markerek mRNS szintje eltérő a krónikusan ismétlődő stressznek (CRS) és krónikus variábilis stressznek (CVS) kitett egerekben.
7. A krónikus variábilis stressz (CVS) szorongásos/depresszív tüneteket vált ki, ellentétben a krónikus ismétlődő restraint-tel (CRS).
8. A CRH^{PVH} szelektív kemogenetikai aktivációja neuroendokrin stresszválaszt vált ki, ami alátámasztja a CRH^{PVH} kulcsszerepét a stresszreakció kialakításában.
9. A szelektíven CRH^{PVH} neuron aktiváció indukálta stresszválasz számos aspektusban eltér a restraint indukálta választól, mely kiemeli a PVH-n kívüli agyi régiók stresszreakció megszervezésében betöltött szerepét.

Saját publikációk

Ph.D. disszertációhoz tartozó publikációk

Horváth K, Juhász B, Kuti D, Ferenczi S, Kovács KJ.

Recruitment of Corticotropin-Releasing Hormone (CRH) Neurons in Categorically Distinct Stress Reactions in the Mouse Brain.

INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES 2023 Jul 21;24(14):11736.

Kuti D, Winkler Z, **Horváth K**, Juhász B, Szilvásy-Szabó A, Fekete C, Ferenczi S, Kovács KJ.

The metabolic stress response: Adaptation to acute-, repeated- and chronic challenges in mice. *ISCIENCE* 2022 Jun 30;25(8):104693.

Egyéb publikációk

Chaves T, Fazekas CL, **Horváth K**, Correia P, Szabó A, Török B, Bánrévi K, Zelena D.

Stress Adaptation and the Brainstem with Focus on Corticotropin-Releasing Hormone.

INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES 2021 Aug 23;22(16):9090.

Josa V, Ferenczi S, Szalai R, Fuder E, Kuti D, **Horvath K**, Hegedus N, Kovacs T, Bagamery G, Juhasz B, Winkler Z, Veres DS, Zrubka Z, Mathe D, Baranyai Z. Thrombocytosis and Effects of IL-6 Knock-Out in a Colitis-Associated Cancer Model.

INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES 2020 Aug 27;21(17):6218.

Kuti D, Winkler Z, **Horváth K**, Juhász B, Paholcsek M, Stágel A, Gulyás G, Czeglédi L, Ferenczi S, Kovács KJ.

Gastrointestinal (non-systemic) antibiotic rifaximin differentially affects chronic stress-induced changes in colon microbiome and gut permeability without effect on behavior.

BRAIN BEHAVIOR AND IMMUNITY 2020 Feb 84:218-228.

Korsós G, **Horváth K**, Likács A, Vezér T, Glávits R, Fodor K, Fekete SG.

Effects of accelerated human music on learning and memory performance of rats.

APPLIED ANIMAL BEHAVIOUR SCIENCE 2018 May 202:94-99.

Fekete SGy, Lukács A, **Horváth K**, Korsós G, Vezér T.

Effects of Mozart Sonata on the rats' learning and memory performance.

MAGYAR ÁLLATORVOSOK LAPJA 2014 March 136(3):167-176.