

Rozprawa doktorska

Wpływ białka HMGB1 na właściwości barierowe i immunomodulujące śródbłonna naczyniowego w patogenezie miażdżycy

Aleksandra Legęza- Zdunek

Klinika Chorób Wewnętrznych i Farmakologii Klinicznej
Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Promotor

prof. dr hab. n. med. Marlena Broncel

Promotor pomocniczy

dr n.med. Paulina Gorzelak-Pabiś

Łódź 2022

9. Streszczenie:

Białko HMGB1 (high mobility group box) to niehistonowe, zasadowe białko chromosomalne o dużej ruchliwości elektroforetycznej. Zaliczane jest do grupy tzw. "sygnałów zagrożenia" (danger signals), uwalnianych przez uszkodzone tkanki i indukującym procesy zapalne. **Celem pracy** była ocena wpływu białka HMGB1 oraz ocena wpływu białka HMGB1 w połączeniu z LPS-em na właściwości barierowe, apoptozę oraz ekspresję mRNA okludyny, MCP-1 i IL-33 w komórkach śródbłonka naczyniowego. **Material i metody:** Ludzkie komórki śródbłonka żyły pępowinowej (HUVEC) indukowano białkiem HMGB1 w stężeniach- (0,1 µg/ml, 1µg/ml, 2.5µg/ml), oraz białkiem HMGB1 w połączeniu z LPS-em w stężeniu 100ng/ml. Ocenę integralności śródbłonka naczyniowego dokonano metodą xCELLigens, żywotność i apoptozę oceniono metodą cytometrii przepływowej, ekspresję mRNA okludyny, MCP-1 i IL-33 oznaczono metodą Real-Time PCR.

Wyniki: Białko HMGB1 w stężeniu 0,1 µg/ml nie wpływa na integralność śródbłonka naczyniowego, apoptozę i żywotność komórek, a także na ekspresję mRNA MCP-1, zwiększa zaś ekspresję mRNA IL-33. Białko HMGB1 w stężeniu 1µg/ml wpływa na integralność śródbłonka naczyniowego oraz na ekspresję mRNA okludyny. Natomiast nie ma wpływu na apoptozę i żywotność komórek oraz ekspresję mRNA zarówno MCP-1 jak i IL-33. Białko HMGB1 w stężeniu 2,5µg/ml wpływa na integralność śródbłonka naczyniowego, jak również na ekspresję mRNA okludyny i MCP-1, natomiast nie ma wpływu na apoptozę i żywotność komórek, a także na ekspresję mRNA IL-33. LPS w stężeniu 0,1 µg/ml zmniejsza integralność śródbłonka, ekspresję okludyny, nie oddziałując na apoptozę i żywotność komórek HUVEC. LPS powoduje wzrost ekspresji mRNA MCP-1. Indukowanie HUVEC jednocześnie LPS i HMGB1 powoduje nieodwracalne w ciągu 24h zmniejszenie integralności śródbłonka, z równoczesnym zmniejszeniem ekspresji okludyny i wzrostem ekspresji MCP-1.

Wnioski: Zróżnicowany wpływ HMGB1 na integralność śródbłonka, MCP-1 i IL-33 w zależności od zastosowanego stężenia może być wynikiem dwojakiego działania HMGB1. W wysokim stężeniu białko działa prozapalnie, zwiększając ekspresję MCP-1, natomiast w niskim stężeniu działa immunomodulująco, powodując istotny wzrost ekspresji przeciwzapalnej IL-33. Białko HMGB1 w zależności od stężenia odwracalnie zmniejsza integralność śródbłonka naczyniowego, nie wpływając na żywotność komórek śródbłonka. Jednoczesna stymulacja komórek śródbłonka naczyniowego LPS i HMGB1 powoduje nieodwracalne w ciągu 24h zmniejszenie integralności śródbłonka naczyniowego z

równoczesnym zmniejszeniem ekspresji okludyny i wzrostem MCP-1, co może sugerować rozwój tolerancji na LPS pod wpływem HMGB1.

10. Summary:

High mobility group box 1 (HMGB1) is a non-histone, basic chromosomal protein with high electrophoretic mobility. It belongs to the “danger signals” released by injured tissues and it induces inflammatory processes.

The aim of the study was to evaluate the influence of HMGB1 protein and HMGB1 protein in combination with LPS on barrier properties, apoptosis and mRNA expression of occludin, MCP-1 and IL-33 in vascular endothelial cells.

Material and methods: Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were induced with HMGB1 protein in concentrations - (0.1 µg/ml, 1 µg/ml, 2.5 µg/ml), and HMGB1 protein in combination with LPS at concentration 100 ng / ml. Vascular endothelial integrity was assessed by xCELLigens system, viability and apoptosis were assessed by flow cytometry, occludin, MCP-1 and IL-33 mRNA expression was determined by Real-Time PCR.

Results: HMGB1 protein at a concentration of 0.1 µg/ml does not affect the vascular endothelium integrity, apoptosis and cell viability, as well as the mRNA expression of MCP-1; and significantly increases the mRNA expression of IL-33. HMGB1 protein at 1 µg/ml concentration affects the integrity of the vascular endothelium and the mRNA expression of occludin. However, it has no effect on apoptosis, viability and on mRNA expression of both MCP-1 and IL-33. HMGB1 protein at 2.5 µg/ml concentration affects the integrity of the vascular endothelium as well as the mRNA expression of occludin and MCP-1, while it has no effect on apoptosis and viability, as well as on the mRNA expression of IL-33. LPS at a concentration of 0.1 µg/ml reduces endothelial integrity, occludin mRNA expression without affecting the apoptosis and HUVEC cell viability. LPS increases the mRNA expression of MCP-1. Simultaneous stimulation of HUVECs with LPS and HMGB1 causes an irreversible decrease of endothelial integrity within 24h, with simultaneous decrease of occludin mRNA expression and increase of MCP-1 mRNA expression.

Conclusions: The differentiated effects of HMGB1 on endothelial integrity, MCP-1 and IL-33 depending on the concentration used may be a result of a dual action of HMGB1. At high concentration, the HMGB1 protein is pro-inflammatory, increasing the expression of MCP-1, while at low concentration, it has immunomodulatory properties, causing a significant increase in anti-inflammatory IL-33 expression. HMGB1 protein, depending on its concentration, reversibly reduces the integrity of the vascular endothelium, without affecting the viability of endothelial cells. Simultaneous stimulation of vascular endothelial cells with

LPS and HMGB1 causes irreversible within 24h reduction of vascular endothelial integrity with simultaneous decrease in occludin expression and increase in MCP-1, which may suggest development of LPS tolerance under the influence of HMGB1.