

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

A poli-ADP-riboziláció és a hidrogén-peroxid központi szerepe az osteogén differenciációban és a dohányfüst toxikus hatásaiban

Kovács Katalin



**DEBRECENI EGYETEM
Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola**

Debrecen, 2014

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

A poli-ADP-ribosziláció és a hidrogén-peroxid központi szerepe az osteogén differenciációban és a dohányfüst toxikus hatásaiban

Kovács Katalin

Témavezető: Dr. Virág László



DEBRECENI EGYETEM
Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

Debrecen, 2014

A poli-ADP-riboziláció és a hidrogén-peroxid központi szerepe az osteogén differenciációban és a dohányfüst toxikus hatásaiban

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az Elméleti Orvostudományok tudományágban

Írta: Kovács Katalin okleveles biológus

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Orvostudomány doktori iskolája
(Jelátviteli folyamatok sejt- és molekuláris biológiája programja) keretében

Témavezető: Prof. Dr. Virág László, az MTA doktora

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Szöllősi János, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Radák Zsolt, az MTA doktora
Dr. Zákány Róza, PhD

A doktori szigorlat időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK,
Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet 2.306 iroda
2014. november 25. 11:00 óra

Az értekezés bírálói:

Ifj. Prof. Dr. Gallyas Ferenc, az MTA doktora
Dr. Bácsi Attila, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Szöllősi János, az MTA doktora
tagok: Ifj. Prof. Dr. Gallyas Ferenc, az MTA doktora
Prof. Dr. Radák Zsolt, az MTA doktora
Dr. Bácsi Attila, PhD
Dr. Zákány Róza, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK,
Belgyógyászati Intézet „A” épület tanterme
2014. november 25. 13:00 óra

1. BEVEZETÉS

1.1. A poli(ADP-ribóz) polimeráz enzimcsalád

A poli(ADP-ribóz) polimerázok (PARP-ok), jellemzően eukariótákban és kivételesen egyes prokariótákban előforduló enzimek, melyek akceptor fehérjék ADP-ribozilációját katalizálják. Ma a PARP enzimcsaládnak 17 tagja ismert, a legjobban tanulmányozott tagja PARP-1. A humán PARP-1 fehérjét kódoló gén az 1-es kromoszómán található, a fehérje 1014 aminosavból áll, molekulatömege 113 kDa. Az enzim felépítése három fő szerkezeti elemmel jellemezhető: a DNS-kötő domén, az automodifikációs domén és a katalitikus domén. A PARP-1 szerepet játszik a DNS hibajavításban, a genom integritásának fenntartásában, a sejtciklus ellenőrzésében, a transzkripció szabályozásában, a sejthalál útvonalak szabályozásában és számos egyéb folyamatban.

1.2. A poli(ADP-ribóz) metabolizmus

A poli-ADP-riboziláció (PARiláció) olyan poszttranszlációs proteinmódosítás, melyet a poli(ADP-ribóz) polimeráz (PARP) enzimek katalizálnak. A PARP-ok az aktivációt követően NAD^+ -ot használnak szubsztrátként, azt nikotinamidra és ADP-ribózra bontják, majd az ADP-ribóz egységeket kovalensen kapcsolják megfelelő akceptor fehérjékhez, és elágazó homopolimereket szintetizálnak. A polimerek hosszúsága a néhány egységnyiitől akár 200 egységnyiig is terjedhet, 20-50 egységenként található elágazásokkal. Poli-ADP-ribozilációs akceptor helyként a fehérjék glutamát, aszpartát és lizin oldalláncai szerepelhetnek. *In vivo* körülmények között a legnagyobb mennyiségben előforduló PARilált fehérje maga a PARP-1. Az auto-poli-ADP-riboziláció az enzim gátlását eredményezi, így szabályozó szerepe van. Az ADP-ribóz egységek mérete és negatív töltése miatt a PARiláció jelentős mértékben befolyásolja a célfehérjék fiziko-kémiai tulajdonságait, ezáltal azok stabilitását, aktivitását és kölcsönhatásait.

A poli-ADP-riboziláció reverzibilis, dinamikus folyamat, a polimerek féléletideje meglehetősen rövid, lebomlásuk a szintézis kezdete után szinte azonnal elkezdődik, a poli(ADP-ribóz) metabolizmusban részt vevő enzimek szigorú szabályozás alatt állnak. A polimerek lebontási reakcióit a poli(ADP-ribóz) glikohidroláz (PARG), és az ADP-ribozil hidroláz 3 katalizálja (ARH3).

1.3. PARP-1 aktivációt kiváltó hatások

Korábban a PARiláció „központi dogmája” az volt, hogy a PARP-1 DNS károsodás hatására aktiválódik. Így az UV sugárzás, radioaktív sugárzás, oxidatív stressz és a DNS alkilálószeres PAR polimer szintézist indukálnak. A ROS/RNS vegyületek közvetlenül okoznak DNS törést és ezzel együtt PARP aktivációt. A vegyületcsoport tagjai közül a PARiláció kapcsán leginkább a hidrogén-peroxid (H_2O_2), a hidroxil gyök ($\bullet OH$), a szuperoxid ($\bullet O_2^-$) és a peroxinitrit ($ONOO^-$) hatását tanulmányozták. A DNS-törés által indukált PARP aktiváció érdekes vonatkozása, hogy a transzkripció során a topoizomeráz I β által létrehozott kétszálú DNS törések PARP-1 aktivációt indukáltak. A két enzim között lévő kapcsolat alapján így feltételezhető, hogy a PARP-1-nek szerepe van a transzkripció szabályozásában.

Számos vizsgálat bizonyítja, hogy a génexpresszióval kapcsolatos kromatin szerkezeti átrendeződései révén a PARP-1 DNS törés hiányában is aktiválódhat. A DNS meghajlása és egyéb nem-B-DNS struktúrák (egyszálú régiók, az úgynevezett kruciform struktúrák, hajtű szerkezetek) is PARP-1 aktivációt okoznak. A protein kinázok általi foszforiláció is szabályozhatja a PARP-1 aktivitását. Leírták a PARP-1 acetiláció illetve mono-ADP-riboziláció általi ativációját is. A jelátviteli útvonalakban szereplő fehérjék kovalens módosítás nélkül, közvetlen fehérje-fehérje kölcsönhatás révén is befolyásolhatják a PARP-1 aktivitását.

1.4. A PARiláció fiziológiai szerepe

1.4.1. DNS hibajavítás és a genom integritás fenntartása

A PARP-1-nek szerepe van az egyszálú DNS-törés javításában, báziskihasításos DNS hibajavításban (BER), a homológ rekombinációban, a nem-homológ DNS végek összekapcsolásában (NHEJ) és a nukleotid kivágásos hibajavításban (NER). A PARP-1 a DNS-kötő doménon keresztül a DNS-töréshez kötődik, dimerizálódik és auto-poli-ADP-ribozilálódik. A PAR polimerek egyrészt hozzájárulnak a kromatin szerkezet fellazulásához, másrészt nagy affinitású kötőhelyek biztosításával egyfajta kihorgonyzó felületet nyújtanak a hibajavításban szereplő enzimek számára, így tulajdonképpen egy multiprotein hálózat alapját képezik. Az auto-poli-ADP-riboziláció inaktíválja a PARP-1-et, mely ezt követően leválik a DNS-ről, helyet adva a hibajavítást végző enzimeknek. A PAR lebontása révén a komplex szétesik, így elindulhatnak a hibajavítási folyamat következő lépései. A PARP és a PARG összehangolt, szabályozott működése szükséges a hatékony DNS hibajavításhoz.

1.4.2. A PARP-1 szerepe a sejthalál útvonalak szabályozásában

Apoptózis során a PARP-1-et a kaspázok egy 24 kDa és egy 89 kDa molekulatömegű fragmentre hasítják. A hasítás révén az enzim inaktiválódik, ami a későbbi DNS fragmentáció során megakadályozza az ATP depléciót és a nekrozist. Maga a PARP-1 nem játszik szabályozó szerepet az apoptózis korai, kaspáz aktivációt megelőző szakaszában, de hasítása elengedhetetlen az apoptózishoz.

A PARP-1-nek kulcsszerepe van a szabályozott nekrozis során. Valószínűleg a PARP-1 nagymértékű aktivitása miatti NAD⁺ szint csökkenés révén a RIP1, a TRAF2, majd a JNK aktiválódása váltja ki a mitokondriális membrán depolarizációt és az AIF hasítását, majd az 57 kDa hasított AIF fragment transzlokációját a mitokondriumból a sejtmagba. A sejtmagban az AIF a ciklofilin-A-val és a H2AX-szel komplexet képezve kromatin kondenzációt, DNS degradációt indukál.

A parthanatos során a PAR polimerek felhalmozódása indukál sejthalált. A PAR polimerek nagy affinitással képesek az AIF C-terminális doménjéhez kötődni, ez valószínűleg az AIF konformáció változását idézi elő és csökkenti az affinitását a mitokondriális membránhoz, így az gyorsan a citoszolba kerülhet. Parthanatos során a teljes, 62 kDa AIF transzlokációját figyelték meg.

A PARP-1 szerepét kimutatták tápanyaghiánnyal indukált autofágia során, ahol a PARP-1 aktivációt valószínűleg a képződött ROS által okozott DNS-törés váltotta ki. Különösen nagy hangsúlyt kaphat az autofágia és annak gátlása tumorsejtekben, hiszen ez egy gyakran aktiválódó túlélési mechanizmus a kemoterápia vagy sugárkezelés esetén.

Tekintve a PARP-1 sokrétű szerepét, úgy vélik, hogy egyfajta „molekuláris kapcsolóként” szolgál a különböző sejthalál útvonalak szabályozásában és a sejthalál folyamatok kimenetele a DNS károsodás súlyosságától, a sejt energetikai állapotától és a PARiláció mértékétől függ.

1.4.3. A génexpresszió és differenciáció szabályozása

A PARP-1 a sejt nyugalmi állapotában nagyrészt a kromoszómák mentén és nukleoluszokban, kromatinhoz kötődve található. A PARP-1 gátlása számos sejt típusban befolyásolja különböző stimulusokra adott génexpressziós mintázatot. A PARP-1 egyrészt ADP-ribozilálhatja a kromatinhoz kötődő fehérjéket (pl. hisztonokat) és ez destabilizálja a kromatin komponensek kölcsönhatását a DNS-sel. Másrészt a PARP-1 auto-poli-ADP-ribozilációja vezethet a kromatin fellazulásához.

A PARilációnak a splicing szabályozásában is szerepe van. Koregulátorként működve szabályozza a transzkripciós faktorok kötődését a kromatinhoz. A PARP-1 a DNS metiláció is befolyásolása révén a génexpresszió epigenetikus szabályozásában is részt vesz.

1.5. A dohányfüst által okozott oxidatív károsodás

A dohányfüst egy több ezer vegyületből álló komplex és változó összetételű aeroszol. A tüdőben a dohányzás által okozott sejthalál hozzájárul a COPD tünet együttes kialakulásához, azonban a sejthalál formáját és ezek relatív szerepét tekintve ellentmondásos eredményeket találunk az irodalomban. A hosszú távú dohányzás másik következménye lehet a krónikus gyulladási folyamatok kialakulása és a csökkent védekezőképesség a légúti fertőzésekkel szemben. A dohányfüst csökkenti az antivirális immunvédekezés és a bakteriális clearance hatékonyságát, csökkenti a komplement mediált fagocitózist és fokozza az allergénpenetráció mértékét.

A dohányfüst toxicitása nagyrészt az oxidatív stresszel kapcsolatos. A gázfázis rövid élettartamú reaktív oxigéngyököket tartalmaz, főként szuperoxidot és nitrogén-monoxidot, melyek reakciójából az igen reaktív peroxinitrit képződhet. A részecskefázis hosszabb élettartamú hidrokinonokban gazdag, melyek redox reakciókban további szuperoxid, hidrogén-peroxid és hidroxil gyök képzéséhez járulnak hozzá, így tartósan fennálló oxidatív stresszt eredményeznek.

A tüdőben a reaktív oxigénvegyületek eliminálásában legfontosabb a GSH, a szuperoxid lebontását katalizáló SOD enzimek, a hidrogén-peroxid lebontását végző kataláz (CAT), valamint egyéb, a GSH metabolizmushoz kapcsolódó enzimek. Ez utóbbi csoportba tartoznak a glutation peroxidázok (GPX), a glutation reduktáz (GR), a glutamát cisztein ligáz (GCL) és a glutation szintáz (GS). A hidrogén-peroxid eliminálásában tiol-tartalmú fehérjék is részt vesznek, humán sejtekben a tioredoxinok (TRX) és a tioredoxin reduktázok (TRR) szerepét írták le.

1.6. Mesenchymalis őssejtek (MSC, mesenchymal stem cells) és az osteogén differenciáció jellemzése

A mesenchymalis őssejtek az egyedfejlődés korai szakaszában megjelenő, de a felnőtt szervezetben is jelenlévő non-hematopoetikus multipotens sejtek, melyek képesek önmegeújulásra és többféle irányú differenciációra. A differenciációs folyamatok több lépésben zajlanak le. Első lépésben a multipotens MSC sejtek elköteleződnek a differenciáció irányába, az elköteleződést a megfelelő „mester” transzkripciós regulátorok szelektív expressziója irányítja. A csontirányú differenciáció irányába elköteleződött osteoprogenitor

sejtekben fokozódik az alkalikus foszfatáz, a csont szialoprotein (BSP, bone sialoprotein) és az I. típusú kollagén expressziója, melynek révén létrejön az extracelluláris kollagénben gazdag mátrix. Ezt az extracelluláris mátrix mineralizációja követi. Az oxidatív stressz és a hypoxia is hatással van a differenciációs folyamatokra. A differenciációban a ROS vegyületek szerepét tekintve ellentmondásos eredményeket találunk. Egyes megfigyelések szerint a ROS vegyületek gátolják az osteogén differenciációt, míg mások eredményei éppen azt bizonyítják, hogy a képződő ROS elősegíti azt.

A PARiláció szerepét számos differenciálódási folyamatban kimutatták, szükséges a kromatin fellazításához és közvetlenül szabályozza egyes transzkripciós faktorok kötődését a kromatinhoz. Eddig nem vizsgálták viszont, hogy az osteogén differenciáció transzkripciós szintű szabályozását bármilyen módon befolyásolja-e a PARP-1 aktivitás. Ezen felül kimutatták, hogy az osteoblast sejtek nagy része elpusztul a végső differenciációs állapot elérése előtt. Mivel a PARP-1-nek többféle sejthalál útvonalban bizonyították a szerepét, szeretnénk volna megvizsgálni, hogy van-e szabályozó funkciója a csontirányú differenciációban.

2. CÉLKITŰZÉSEK

2.1. Célkitűzések I.

A dohányzás által okozott károsodások alapvetően az oxidatív stresszre, illetve az oxidán-antioxidáns egyensúly felborulására vezethetők vissza. A cigarettafüstben jelen lévő illetve a sejtválasz során keletkező ROS/RNS vegyületeknek a DNS-re és egyéb sejtalkotókra tett káros hatásait számos vizsgálatban leírták, de a DNS károsodás érzékelése és a hibajavító mechanizmusok kevés figyelmet kaptak. A PARP-1 kulcsfontosságú szerepet játszik a DNS-törések érzékelésében és a hibajavító mechanizmusok elindításában, valamint a sejthalál folyamatok szabályozásában. Vizsgálataink során az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

1. Aktiválódik-e a PARP-1 CSE kezelés hatására A549 sejtekben?
2. Mi a szerepe a PARP-1-nek a CSE által kiváltott sejthalál szabályozásában?

2.2. Célkitűzések II.

A mesenchymalis őssejtek és a SAOS-2 sejtek csont irányú differenciációjához számos gén szabályozott expressziója szükséges. A PARP-1 kulcsszerepet játszik a genom integritásának fenntartásában, a kromatinszerkezet és a transzkripció szabályozásában. Vizsgálataink során az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

1. Van-e az oxidatív stressznek szerepe az MSC sejtek csontirányú differenciációjában?
2. Hogyan befolyásolja a PARP-1 az osteogén differenciációs folyamatokat?

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Sejtenyésztés

Az A549 tüdőepithel sejteket RPMI 1640 médiumban tenyésztettük, melyet 10% FBS-sel (fötális borjúsérum), 2 mM L-glutaminnal, 100 U/ml penicillinnel és 100 µg/ml streptomycinnel egészítettünk ki. A humán cMSC sejtek tenyésztéséhez 1 g/l glükóz tartalmú DMEM médiumot használtunk, melyet szintén 10% FBS-sel, 2 mM L-glutaminnal, 100 U/ml penicillinnel és 100 µg/ml streptomycinnel egészítettünk ki. A sejteket 37 °C-on, 5% CO₂ tartalom mellett tartottuk.

3.2. Cigarettafüst kivonat (CSE) készítése

1 szál 100 mm hosszúságú, filter nélküli cigarettát (10 mg kátrány, 0,8 mg nikotin, 10 mg szén-monoxid) meggyújtottunk, és vákuum segítségével 5 perc alatt a füstjét átbuborékolattuk 6 ml sérumentes tenyésztőmédiumon. A füstkivonatot átszűrtük 0,22 µm-es szűrőn, majd 10% FBS hozzáadásával kaptuk a 100%-osnak nevezett cigarettafüst kivonatot. Ezt a kivonatot sejtenyésztő médiummal hígítva kaptuk a kezeléshez használt különböző koncentrációjú (v/v%) oldatokat. A cigarettafüst kivonatot minden kísérlet előtt frissen készítettük.

3.3. May-Grünwald-Giemsa festés

A sejteket kezelést követően PBS pufferrel mostuk, majd metanollal fixáltuk 20 percig -20 °C-on. Desztillált vízzel történő mosást követően 30 percig inkubáltuk az előzőleg frissen készített May-Grünwald-Giemsa oldattal. A festés után a fedőlemezeket háromszor mostuk desztillált vízzel, majd Zeiss Axiolab mikroszkóp illetve Zeiss AxioCam digitális kamera segítségével készítettünk fotókat a mintákról.

3.4. Kolóniaképző képesség meghatározása

Tripszin-EDTA-val való emésztést követően a sejtekből 10⁴/ml sejtuszpenziót készítettünk, majd különböző koncentrációjú füstkivonattal kezeltük 30 percig 37 °C-on. A füstkivonat eltávolítása és friss sejtenyésztő médium hozzáadása után a sejteket 6 lyukú tenyésztőedénybe raktuk 1x10² illetve 2,5x10³/lyuk sejt számban. 10 napos tenyésztést követően a sejteket PBS-sel mostuk, 4%-os formaldehiddel 15 percig szobahőmérsékleten fixáltuk, majd hematoxilinnel festettük 10 percig. Alapos csapvizes mosás és szárítás után megszámloltuk a sejt kolóniákat, a klonogén aktivitást %-ban kifejezve adtuk meg a $T/C \times 100$ képlet segítségével, ahol a T illetve C érték a kezelt illetve a kontroll sejt populációk kolóniáinak száma.

3.5. Viabilitási assay (MTT redukciós assay)

. A kezelést követően MTT oldatot adtunk a sejtekhez 0,5 mg/ml végkoncentrációban és 1 órán keresztül inkubáltuk őket. A felülúszó leszívása után a formazán kristályokat DMSO-ban oldottuk. Az abszorbanciát Multiskan MS Plate Reader segítségével 590 nm-en mértük. A viabilitást a kontroll %-ában adtuk meg $A_t/A_c \times 100$ képlet segítségével, ahol A_t illetve A_c a kezelt illetve a kontroll minták abszorbanciája.

3.6. LDH aktivitás mérése

Az LDH aktivitás mérést Cytotoxicity Detection Kit (Roche Applied Science, Budaörs, Magyarország) segítségével végeztük, a gyártó javaslatait követve. Az egyes kezelések esetén a citotoxicitás értékét a maximális LDH aktivitás százalékában adtuk meg.

3.7. Mitokondriális membránpotenciál mérése

A mitokondriális membrán depolarizáció mértékét JC-1 fluoreszcens festékkel mértük. A kezelés után kétszer mostuk a sejteket HBSS pufferrel, majd 30 percig inkubáltuk 1 μ M JC-1 oldattal. A vörös fluoreszcenciát 530_{Ex}/590_{Em} nm-en, a zöld fluoreszcenciát 485_{Ex}/538_{Em} nm hullámhosszon mértük Fluoroskan Ascent FL Plate Reader segítségével.

3.8. Sejtproliferáció mérése - ECIS (Electric Cell-substrate Impedance Sensing)

Az ECIS (Applied Biosystems Inc., Troy, NY, USA) készülékkel történő sejtproliferáció mérés alapja az, hogy az elektródok felszínén növesztett sejtek növelik az ellenállást, így a mért ellenállás arányos a sejtszámmal. A sejteket 8W10E+ elektródák felszínén növesztettük 3×10^4 sejt/lyuk sejtszámban, majd a kezelés ideje alatt 2 percenként 4000 Hz frekvencián mértük az ellenállást. A rezisztencia értékeket a kezdeti időpontra normalizálva tüntettük fel.

3.9. PAR és AIF kimutatása immunfluoreszcens festéssel

Kezelést követően a sejteket PBS pufferrel mostuk, majd metanollal -20 °C-on 20 percig (PAR) vagy 4% formalinnal szobahőmérsékleten 15 percig (AIF) fixáltuk. PBS-sel végzett mosás után a sejteket BSA-val blokkoltuk (1% BSA, PBS Triton X-100-ban oldva), majd 2 órán át a blokkoló oldatban hígított primer ellenanyaggal inkubáltuk. Az anti-AIF ellenanyagot 1:200, az anti-PAR ellenanyagot 1:500 hígításban használtuk. PBS-Triton X-100 oldattal történő mosások után a fedőlemezeket 1 óráig szekunder ellenanyaggal inkubáltuk 1:500 hígításban (AIF esetén anti-nyúl IgG - Alexa Fluor 488 konjugátum, PAR esetén biotinnal konjugált anti-egér IgG). Ezt követően a fedőlemezeket PBS-sel mostuk, majd PAR

esetén Streptavidin-Alexa Fluor 488 konjugátumot adtunk a sejtekhez 30 percre 1:500 hígításban. A magokat PAR esetén 2 µg/ml DAPI-val, AIF esetén 5 µM propidium-jodiddal festettük. PAR festésnél Zeiss Axiolab mikroszkóp illetve Zeiss AxioCam digitális kamera segítségével készítettünk fotókat a mintákról. AIF festésnél a fotókat Olympus FluoView 1000 konfokális mikroszkóppal készítettük.

3.10. Western blot

A kezelések után háromszor mostuk a sejteket hideg PBS pufferrel, majd 100 µl hideg lízis pufferben kapartuk fel őket. Szonikálás, centrifugálás és forralás után minden mintából 25 µg fehérjét vittünk fel 8% SDS-poliakrilamid géltre. Elektroforézist követően a mintákat nitrocellulóz membránra transzferáltuk. A membrán aspecifikus kötőhelyeit 5% zsírszegény tejpor oldattal blokkoltuk. PBSTw oldattal történő mosást követően a membránt primer ellenanyaggal inkubáltuk 2 órán keresztül, az ellenanyagot 1% tejporthoz tartalmazó PBSTw-ben oldottuk. Újabb mosás után 1 óráig inkubáltuk a membránt a torna-peroxidázzal jelölt második antitesttel, majd kemilumineszcens szubsztrát hozzáadása után a kemilumineszcens jelet FluorChem FC2 Imager készülék segítségével detektáltuk.

3.11. Comet assay

Maratott felszínű tárgylemezre 1% normál olvadáspontú agarózt rétegeztünk. A sejteket 30 percig kezeltük különböző koncentrációjú cigarettafüst kivonattal. A DNS hibajavítás hatékonyságának vizsgálatához a sejteket kezelés után 1 óráig friss médiummal inkubáltuk. Ezt követően a sejteket 0,5% alacsony olvadáspontú agarózba kevertük és a tárgylemezre rétegeztük (10^5 sejt/lemez). A sejtek lízise után az elektroforézist alkalikus oldatban végeztük. Ezt követően a tárgylemezeket 10 percig ekvilibráltuk 0,4 M Tris pufferben (pH 7,4), majd a sejtmagokat 10 µg/ml etidium-bromiddal festettük. A képek kvantitatív kiértékelését CometScore software segítségével végeztük.

3.12. Intracelluláris szuperoxid ($O_2^{\cdot-}$) detektálása és mérése

A kezelést követően a sejteket kétszer mostuk HBSS pufferrel, majd 5 µM MitoSOX Red illetve 20 µM dihidroetidium oldattal inkubáltuk 30 percig. A fluoreszcenciát 530_{Ex}/590_{Em} nm hullámhosszon mértük Fluoroskan Ascent FL Plate Reader segítségével. A mitokondriális szuperoxid termelődését MitoSOX Red-et használva vitális festéssel is ki tudtuk mutatni. Ennek során a kezelést követően kétszer mostuk a sejteket HBSS pufferrel, majd 5 µM MitoSOX Red oldattal 30 percig inkubáltuk. A fluoreszcens jelet Zeiss Axiolab mikroszkóp illetve Zeiss AxioCam digitális kamera segítségével detektáltuk.

3.13. Hidrogén-peroxid (H₂O₂) detektálása

Az intracellulárisan termelődő hidrogén-peroxidot Amplex Red fluoreszcens próba segítségével mértük. A kezelést követően a sejteket kétszer mostuk HBSS-sel, majd 50 µM Amplex Ultra Red és 0,1 U/ml tormaperoxidáz oldattal (HBSS-ben oldva) inkubáltuk 30 percig. A fluoreszcenciát 530_{Ex}/590_{Em} nm hullámhosszon mértük Fluoroskan Ascent FL Plate Reader segítségével. A koncentráció értékeket H₂O₂ kalibrációs görbe segítségével számoltuk és fehérjetartalomra normáltuk.

3.14. PARP-1 és PARG stabil csendesítése SAOS-2 osteosarcoma sejtvonalonban

A PARP-1 és a PARG stabil csendesítése SAOS-2 sejtekben lentivírus alapú módszerrel történt. A csendesítéshez PARP-1 illetve PARG specifikus short hairpin RNS-t (shRNS-t) tartalmazó pLKO.1-puro plazmidot használtunk (TRCN0000007929 illetve TRCN0000051307 Sigma Mission shRNS konstruktok). A kontroll sejtvonalon esetén a plazmid nem tartalmazott gátló szekvenciát. A SAOS-2 sejteket a megfelelő plazmidot hordozó lentivírusokkal fertőztük 24 órán keresztül, a fertőzéshez alkalmazott vírustiter 10 MOI volt. A fertőzött sejtek szelekciójához 5 µg/ml puromicint használtunk 48 órán keresztül.

3.15. Humán chorion eredetű mesenchymalis őssejtek (cMSC sejtek) izolálása

A humán mesenchymalis őssejtek izolálását etikai engedéllyel végeztük (engedély száma: DEOEC-RKEB-2946-2009). A császármetszésből származó placentákat a Debreceni Egyetem Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikájáról kaptuk. A placentákat HBSS pufferrel mostuk, hogy a vér nagy részét eltávolítsuk. Az amnion és a köldökzsinór eltávolítása után a cotyledonokat apró darabokra vágtuk, majd 270 U/ml II. típusú kollagenáz jelenlétében emésztettük. Szűrés, majd a Ficoll sűrűséggradiens centrifugálás után a sejteket sejttenyésztő médiumban szuszpendáltuk, majd 37 °C-on, 5% CO₂ tartalom mellett tenyésztettük.

3.16. cMSC sejtek fenotipizálása és funkcionális jellemzése

A placentából izolált sejtek fenotipizálását az ISCT (International Society for Cellular Therapy) ajánlása alapján végeztük.

cMSC sejtek jellemzése felszíni markereik alapján

A mesenchymalis őssejtekre jellemző sejtfelszíni antigének vizsgálatát FACS analízis segítségével végeztük. A sejteket tripszin-EDTA-val történő emésztés után HBSS pufferrel mostuk, majd 30 percig jégen inkubáltuk az általunk vizsgált felszíni antigének (CD34, CD45, CD73, CD90, CD105, vWF, HLA-G) ellen termeltetett primer ellenanyaggal (10 µg/ml).

Minden mérésnél használtunk izotípus kontrollokat (IgG1 és IgG2b). HBSS pufferrel történő mosás után a sejteket másodlagos ellenanyaggal (anti mouse IgG-Alexa 546, 1:500 hígításban) inkubáltuk 25 percig jégen, majd 1% formalin oldattal fixáltuk. A fluoreszcencia intenzitást BD FACS Calibur áramlási citométeren mértük FL2 csatornán, az adatokat BD Multiset software segítségével értékeltük.

A differenciációs képesség ellenőrzése – osteogén differenciáció

Osteogén irányú differenciáció esetén a differenciáló médium összetétele: 1 g/l glükóztartalmú DMEM, 10% FBS, 2 mM L-glutamin, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 0,1 µM dexametazon, 50 µg/ml aszkorbinsav-2-foszfát, 10 mM β-glicerol-foszfát, 50 nM D3 vitamin. Csont irányú differenciáció során a Ca²⁺ tartalmú extracelluláris mátrixot kimutatására Alizarin vörös festést alkalmaztunk a differenciáció 7., 14. és 21. napján. A sejteket PBS-sel mostuk, metanollal fixáltuk, majd Alizarin Red S oldattal festettük.

A differenciációs képesség ellenőrzése – chondrogén differenciáció

A chondrogén irányú differenciációs képesség ellenőrzése dimetil-metilénkék (DMMB) festéssel történt. A differenciáló médium összetétele: 4,5 g/l glükóztartalmú DMEM, 2 mM L-glutamin, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 1 mM Na-piruvát, 10 ng/ml TGF-β1, ITS premix, 0,1 µM dexametazon, 50 µg/ml aszkorbinsav-2-foszfát, 40 µg/ml prolin. A sejteket tripszin-EDTA-val történő emésztés után differenciációs médiumban szuszpendáltuk, majd 2,5x10⁵ sejt/lyuk sejtszámban V-aljú 96 lyukú tenyésztőedénybe helyeztük, és centrifugálással (10 perc, 800g) a tenyésztőedény aljára gyűjtöttük. A sejtek a differenciálódás során apró gömb alakú képződményt alakítottak ki. A differenciáció 7., 14. és 21. napján a gömböket PBS-sel történő mosás után 4% formalinban fixáltuk, majd paraffinba beágyazva metszettük. A metszeteket a paraffin kioldása után 30 percig szobahőmérsékleten 0,1% dimetil-metilénkékkel festettük, majd Zeiss AxioLab mikroszkóp illetve Zeiss AxioCam digitális kamera segítségével készítettünk fotókat a mintákról.

A differenciációs képesség ellenőrzése – adipogén differenciáció

Az adipogén irányú differenciációs képesség kimutatására Oil Red O festést alkalmaztunk. A differenciáló médium összetétele: 4,5 g/l glükóztartalmú DMEM, 10% FBS, 2 mM L-glutamin, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 1 mM Na-piruvát, 1 µM dexametazon, 200 µM indometacin, 500 µM IBMX (3-izobutil-1-metilxantin), 10 µM inzulin. A sejteket PBS-sel mostuk, majd 4% formalinnal 15 percig szobahőmérsékleten fixáltuk,

desztillált vízzel mostuk, ezt követően Oil Red O oldattal inkubáltuk. Desztillált vízzel történő mosás után Zeiss Axiolab mikroszkóp illetve Zeiss AxioCam digitális kamera segítségével készítettünk fotókat a mintákról.

3.17. Real-time PCR

A relatív génexpresszió mértékének meghatározását real-time PCR segítségével végeztük. Az RNS izolálást TRI reagens segítségével végeztük. Reverz transzkripcióval 2 µg RNS-t írtunk át cDNS-sé High Capacity cDNA reverse transcription kit felhasználásával. A real-time kvantitatív PCR-t TaqMan assay-vel végeztük 7500 Fast Real-Time PCR készüléken (Applied Biosystems). A vizsgált gének relatív expressziójának meghatározásához GAPDH-t (gliceraldehid-3- foszfát dehidrogenáz) választottunk háztartási génként.

3.18. Statisztikai kiértékelés

A statisztikai kiértékelést a dohányfüst hatásait vizsgáló kísérletek esetén egyutas Anova-val végeztük. Az osteogén differenciációval kapcsolatos eredmények kiértékelésénél t-próbát használtunk.

4. EREDMÉNYEK

4.1. A poli-ADP-ribóziláció mint túlélési mechanizmus a dohányfüst által kiváltott sejthalálban

4.1.1. A cigarettafüst kivonat toxikus hatásai A549 sejtekre

Az A549 sejtek életképessége cigarettafüst kivonat (CSE) kezelés hatására idő- és koncentrációfüggő módon csökkent. A sejtek pusztulása során fokozott LDH aktivitást tudunk mérni a felülúszóban, azaz sérült a plazmamembrán integritása, ami a nekrozis egyik jele. Az ECIS (Electric Cell-substrate Impedance Sensing) mérések során a CSE kezelés jelentősen csökkentette a sejtek proliferációs képességét is. Mitokondriális membrán depolarizációt csupán a legmagasabb alkalmazott koncentrációk esetén tudunk kimutatni. Jelentős AIF transzlokációt a legmagasabb koncentrációknál sem tapasztaltunk, az AIF nagyrészt sejtmagon kívüli lokalizációt mutatott.

4.1.2. CSE kezelés hatása a PAR akkumulációra

Ahhoz, hogy a PARP-1 mint elsődleges PAR szintetizáló enzim, valamint a PARG mint elsődleges PAR lebontó enzim szerepét tisztázzuk a CSE által kiváltott sejthalálban, olyan A549 sejteket használtunk, melyekben lentivirális rendszerrel stabilan csendesítettük ezen enzimeket (shPARP-1 illetve shPARG sejtvonalak). A kontroll vektort tartalmazó A549 sejtekben CSE hatására kismértékű PAR akkumuláció mutatható ki immunfluoreszcenciával, míg a PARP-1 csendesített sejtekben - a várakozásnak megfelelően - PAR nem detektálható. PARG csendesítés esetén erőteljesebb a PAR akkumuláció, és kisebb CSE koncentráció esetén is detektálható. Western blot technikával is megerősítettük az immunfluoreszcenciával kapott eredményeket, bár ez utóbbi módszer esetén (a módszer érzékenyebb voltának köszönhetően) kismértékű PAR szignál a PARP-1 csendesített sejtekben is jelen volt, jelezve, hogy a csendesítés hatékonysága nem 100%. Az immunfestés és a Western blot eredményeiből levonható egyik fontos következtetés az, hogy a cigarettafüst kezelés a sejtekben aktiválja a PARP-1-et, ezáltal PAR képződést indukál, valamint hogy az A549 sejtekben megfelelően működik a PARG általi polimer lebontás.

4.1.3. PARP-1 és PARG csendesítés hatásának vizsgálata a CSE által indukált sejthalálban

Ezt követően az a kérdés vetődött fel, hogy a PARP-1 és a PARG szabályozza-e a CSE által kiváltott sejthalált. A CSE kezelés hatására bekövetkező morfológiai változásokat May-Grünwald-Giemsa festéssel vizsgáltuk. Alacsonyabb CSE koncentráció (5%) esetén az elsőként megfigyelhető morfológiai változás a sejtek megduzzadása és a citoplazma halvány

festődése, ami a nekrozis egyik jellemzője. Nagy CSE koncentráció esetén (20%) a sejtek zöme felvált, a fedőlemezen letapadva maradók pedig kompakt morfológiát mutattak, de nem volt jele a sejtmag fragmentálódásának. Mindezen változások a PARP-1 és a PARG csendesítés esetén alacsonyabb CSE koncentrációnál mutatkoztak, azaz a csendesített sejtvonalak a kontroll sejtvonalhoz képest fokozott érzékenységet mutattak a kezelés során. Ezzel összhangban az életképesség mérés során is azt tapasztaltuk, hogy a PJ34 előkezelés, a PARP-1 és PARG csendesítés is fokozta a CSE sejtekre gyakorolt hatását. A felülúszóban mért LDH aktivitás szintén szignifikánsan magasabb volt mind az shPARP-1, mind az shPARG sejtvonalban, azaz nagyobb mértékben sérült a plazmamembrán.

Következő lépésben azt kívántuk megvizsgálni, hogy a sejthalál fentebb leírt morfológiai és biokémiai jellemzői mellett a sejtek hosszú távú proliferációs kapacitása is csökken-e. A klonogén assay eredményei szerint a CSE kezelés csökkentette a sejtek proliferációs képességét, és ez tovább csökkent a PARP-1 és a PARG csendesítéssel.

4.1.4. A PARP-1 és a PARG szerepe a CSE által kiváltott DNS károsodás javításában

A PARiláció egyszálú DNS törések javításában betöltött központi szerepének ismeretében kézenfekvőnek tűnt azt feltételezni, hogy a PARP-1 és a PARG csendesítés érzékenyítő hatása a sejthalálban és a proliferáció gátlásban a DNS hibajavítás csökkent hatékonysága miatt tapasztalható. Hipotézisünket alkalikus comet assay segítségével igazoltuk. A CSE kezelés hatására keletkező DNS törések hatékonyan és viszonylag gyorsan javítódtak a kontroll A549 sejtvonalban, míg a PARP-1 és a PARG csendesített sejtekben a javítás hatékonysága szignifikánsan csökkent.

4.1.5. CSE kezelés hatására intracellulárisan képződő ROS mérése

Felvetődött a kérdés, hogy a füst kivonat mely komponense indukál PAR képződést. A füst kivonat számos reaktív gyököt és nem gyök természetű alkotót tartalmaz, melyek DNS törést és PARP aktivációt okozhatnak. Ezen felül a CSE károsító hatására adott sejtválasz folyamán, intracellulárisan is képződhetnek reaktív oxigén gyökök. A sejtekben termelődő szuperoxidot szuperoxid-érzékeny fluoreszcens festékekkel, dihidroetidiummal illetve MitoSOX Red-del detektáltuk. A mérések szerint a CSE-vel kezelt sejtekben idő-és koncentrációfüggő módon nőtt az intracellulárisan termelődő szuperoxid mennyisége. A MitoSOX Red vitális festésre is alkalmas, így mikroszkópos technikával is tudtuk igazolni a szuperoxid termelődést. A festékek hozzáadása előtt a sejtekről eltávolítottuk a CSE-t, így a festékek oxidációját és a fluoreszcens jelet teljes mértékben a sejtekben, valószínűleg

mitokondriálisan termelődő szuperoxid váltotta ki, nem pedig a füst kivonatban jelen lévő szuperoxid.

4.1.6. Szuperoxid és hidrogén-peroxid szerepének vizsgálata a CSE által kiváltott PARP aktivációban és sejthalálban

A füst kivonatban jelen lévő, illetve a sejtek által termelt ROS vegyületek közül valószínűleg a hidrogén-peroxidnak van központi szerepe a DNS törésben és a PARP-1 aktiválásában. Western blot analízissel kimutattuk, hogy a CSE által indukált PARP-1 akkumulációt jelentős mértékben fokozta a szuperoxid dizmutáz, még kifejezettebb mértékben a sejtpermeábilis (PEG-gel konjugált) SOD. A kataláz jelenléte - akár natív, akár PEG-gel konjugált formában - viszont visszaszorította a PAR szintézist. A kataláz SOD jelenlétében is hatékonyan gátolta a SOD által okozott fokozott PAR szintézist. A szuperoxid-dizmutáz jelenlétében tapasztalható PARP-1 aktivációt tehát a hidrogén-peroxid képződése okozza. Az életképességi vizsgálatok hasonló eredményt mutattak. A PARP inhibitor PJ34 és a SOD (különösen a PEG-gel konjugált forma) érzékenyítette a sejteket a CSE kezelés során, jelenlétükben szignifikánsan csökkent a sejtek viabilitása. Ezzel szemben a kataláz jelenléte védelmet nyújtott a CSE toxikus hatásával szemben.

4.2. Hidrogén-peroxid által indukált poli-ADP-riboziláció szabályozó szerepe az osteogén differenciáció során bekövetkező sejthalálban

4.2.1. Chorionális mesenchymalis őssejtek (cMSC) fenotipizálása és funkcionális jellemzése

A placentából izolált sejtek fenotipizálását az ISCT (International Society for Cellular Therapy) ajánlása alapján végeztük. A mesenchymalis őssejtekre jellemző sejt felszíni antigén mintázatot FACS analízis segítségével határoztuk meg. Az izolált cMSC sejtek felszínén jelen van az őssejtekre jellemző CD73, CD90 és CD105, és nem hordoznak felszínükön vércépző őse- és elődsejtekre jellemző felszíni markert, endothel felszíni markert és trophoblaszt markert (CD45-, CD34-, vWF- és HLA-G-negatívak)..

A cMSC sejtek osteogén irányú differenciációs képességét az extracelluláris kalcium depozíciót kimutató Alizarin Red S festéssel ellenőriztük. A sejteket osteogén differenciáló médiumban inkubálva már 7 nap után detektálható az extracelluláris kalcium kiválasztás. Az adipogén irányú differenciációt Oil Red O festéssel vizsgáltuk. A sejtek a harmadik naptól kezdve egyre nagyobb mennyiségben lipidcseppeket halmoztak fel a citoplazmában. A porc irányú differenciációt speciális V aljú tenyésztőedényekben, differenciáló médium jelenlétében végeztük. A sejtek már a differenciáció első napján gömb alakú struktúrát

alakítottak ki. A differenciáció ellenőrzésére a porcgömbökből készített metszeteken DMMB (dimetil-metilénkék) festéssel mutattuk ki a chondrogenézis során szintetizálódott szulfatált glükózamino-glikánokat.

4.2.2. Reaktív oxigén vegyületek (ROS) keletkezése szükséges a SAOS-2 sejtek csontirányú differenciációjához

A SAOS-2 sejtek a differenciáló médium hatására osteogén irányba differenciálódtak, melyet igazol az osteogén differenciációban szerepet játszó gének (Runx2, osterix, BMP2, osteopontin) expressziós szintjének emelkedése, a Ca^{2+} felhalmozódás az extracelluláris mátrixban, valamint az alkalikus foszfatáz aktivitásának emelkedése. Az osteogén differenciációnak egyik érdekes velejárója volt a sejtek redox egyensúlyának változása. A differenciáció első két napján a sejtekben termelődő hidrogén-peroxid mennyisége kis mértékben, de szignifikánsan csökkent, a differenciáció későbbi időszakában pedig emelkedett. Hasonló tendenciát figyelhettünk meg a lipidperoxidáció mértékének változása során is. A gyökfogók jelenlétében végzett kísérletek azt mutatják, hogy ezen redox egyensúlybeli változásoknak funkcionális jelentőségük van a differenciáció során, és szabályozzák a differenciációt. Redukált glutation vagy kataláz jelenléte szignifikánsan csökkentette az extracelluláris Ca^{2+} mennyiségét. A kataláz koncentrációfüggő módon gátolta a differenciációt, mind az extracelluláris kalcium depozíciót, mind az alkalikus foszfatáz aktivitását jelentős mértékben csökkentette. Ezen kívül a csontirányú differenciációban szereplő marker gének expresszióját is csökkentette vagy késleltette az expresszió növekedését.

4.2.3. Az osteogén differenciáció során a PAR akkumuláció korrelációt mutat a ROS képződéssel

A reaktív oxigén intermedierek DNS károsító hatásuk révén aktiválhatják a PARP-1 enzimet. A PAR szintje a differenciáció első két napján csökkent, ezt követően emelkedést mutatott. A PAR szint változásának tendenciája hasonló volt a hidrogén-peroxid termelődésben megfigyelt változásokhoz, lineáris regressziós analízis alapján korreláció mutatható ki a PAR és a hidrogén-peroxid termelődés ($R=0,78$), valamint a PAR és a TBARS értékek ($R=0,76$) között. Kataláz jelenlétében a PAR szint emelkedése időben eltolódott, a differenciáció során csak később volt kimutatható nagyobb mennyiségben.

4.2.4. A differenciáció során keletkező hidrogén-peroxidnak szerepe van a sejthalálban

A differenciáció során jelentős mértékű sejtpusztulás figyelhető meg, mely a differenciáció második napján kezdődik és mértéke fokozatosan nő a differenciáció hatodik napjáig. Hoechst/propidium-jodid festéssel kromatin kondenzáció, Annexin V/propidium-jodid festéssel foszfadilil-szerin externalizáció mutatható ki, mely alapján a sejthalál formája leginkább apoptózis. Az apoptotikus sejtek mellett a propidium-jodid felvételt mutató nekrotikus sejtek száma is jelentős mértékben nőtt a differenciáció előrehaladtával. Apoptózis során a PARP-1-et a kaszpáz-3 vagy -7 hasítja, a hasított PARP megjelenését is detektálni tudtuk Western blottal. Az általános kaszpázgátló (z-VAD-fmk) csak részben csökkentette a sejthalál mértékét, jelenlétében a sejthalál formája inkább a nekrozis felé tolódott el. A redukált glutation és a kataláz szignifikánsan növelte a sejtek életképességét a differenciáció során, csökkentették mind az apoptózis, mind a nekrozis mértékét, kataláz jelenlétében pedig minimális mennyiségű hasított PARP volt csak detektálható.

4.2.5. A PARP-1 és a PARG stabil csendesítése SAOS-2 sejtekben

Eddigi megfigyelésünk alapján a hidrogén-peroxid termelődésnek és a redox egyensúlynak fontos szerepe van az osteogén differenciációban. Ismert továbbá, hogy a PARP-1 enzim és a PARiláció központi szerepet játszik különböző sejthalál folyamatokban. Így feltételezhető, hogy a PARP-1 enzimnek szabályozó szerepe lehet a differenciáció során bekövetkező sejthalálban. Ennek vizsgálatára a PARP-1 és PARG enzimeket stabilan csendesítettük SAOS-2 sejtvonalban. Az így létrehozott shPARP-1, shPARG valamint kontroll (CTL, csendesítő szekvenciát nem hordozó) sejtvonalakban a PARP-1 illetve a PARG mRNS szintjét real-time PCR módszerrel határoztuk meg. A kontroll (CTL) sejtekben a PARP-1 és a PARG expressziója nem különbözött a SAOS-2 sejtvonalban mért értékektől. A PARP-1 mRNS mennyisége az shPARP-1 sejtvonalban a kontroll sejtek értékéhez viszonyítva a felére csökkent. A csendesítés hatékonyságának növelésére tett próbálkozásaink során a sejtek életképessége drasztikusan csökkent, a PARP-1 enzim jelenléte SAOS-2 sejtekben nélkülözhetetlen az életképességhez. A PARG csendesítés esetén nagyobb hatékonyságot sikerült elérnünk, a sejtek proliferációs képességének megtartása mellett. A PARP-1 csendesítés hatékonyságát Western blottal is ellenőriztük. A sejtek funkcionális jellemzéséhez 10 perc hidrogén-peroxid kezelést, majd 30 perc regenerációt követően PARP-1 akkumulációt detektáltunk immuncitokémiával és Western blot technikával. A PARP-1 csendesített sejtekben hidrogén-peroxid kezelés hatására szignifikánsan kevesebb PAR

detektálható immunfestéssel és Western blottal is. A PARG csendesített sejtekben a polimerek lebontása szenved zavart, 30 perc után is jelentős mennyiségű polimer detektálható.

4.2.6. A PARP-1 és a PARG szabályozza a SAOS-2 sejtek csontirányú differenciációját

A PARP-1 és a PARG csendesítés hatására módosult a PAR akkumuláció mintázata a SAOS-2 sejtek csontirányú differenciációja során. Mindhárom sejtvonalba megfigyelhető volt az extracelluláris kalcium depozíció, az ALP aktivitás fokozódása, de a változások különböző mértékben és más kinetikával zajlottak le. A kontroll sejtvonálhoz képest a PARP-1 csendesített sejtekben később indul meg a mineralizáció, kisebb a kalcium depozíció mértéke. Az ALP aktivitás mindkét csendesített vonalban kisebb, mint a kontroll sejtvonalba mért értékek. A PARP-1 és a PARG csendesítés az osteogén differenciáció markergénjeinek expresszióját is befolyásolta. A szabályozó szerepet betöltő Runx2 és az osterix mRNS szintje a csendesített vonalakban nem mutatott jelentős eltérést a kontroll sejtvonálhoz képest. A BMP2 és az osteopontin expressziója viszont a PARP-1 és a PARG csendesített sejtekben is fokozódott.

4.2.7. A poli-ADP-riboziláció szabályozza a csontirányú differenciáció során bekövetkező sejthalált SAOS-2 sejtekben és mesenchymalis őssejtekben

A PARP-1 és PARG csendesítés SAOS-2 sejtekben a differenciáció során bekövetkező sejthalálra is hatással volt. A PARP-1 csendesített sejtek életképessége szignifikánsan nagyobb volt a differenciáció során, mint a kontroll sejteké, azaz a PARP-1 hiányában csökkent a differenciáció és az ehhez kapcsolt sejthalál (apoptózis és nekrosis) mértéke. A PARG csendesítés ezzel ellentétben csökkentette az életképességet a differenciáció alatt, emellett a sejthalál formáját a nekrosis felé tolta. A géncsendesítés apoptózisra tett fent leírt hatását a hasított PARP megjelenésének mintázata is alátámasztja. A PARP-1 csendesített sejtekben csak a differenciáció hatodik napján jelent meg a hasított PARP detektálható mennyiségben. A PARG csendesített sejtek esetén bár a harmadik napon nagyobb volt a mennyisége, mint a kontroll sejtekben, de a kontroll sejtektől eltérően a differenciáció előrehaladtával fokozatosan csökkenő tendenciát mutatott. Humán chorionális mesenchymalis őssejteken (cMSC) szintén vizsgáltuk a hidrogén-peroxid által indukált PARiláció szerepét a csontirányú differenciáció során bekövetkező sejthalálban. A SAOS-2 sejtekhez hasonlóan a cMSC sejtek viabilitása is csökken a differenciáció során, apoptotikus és nekrotikus sejtek megjelenése mutatható ki. Ezen sejtek esetén szintén katalázal gátolható, hidrogén-peroxid függő sejthalálról beszélhetünk. A kataláz, valamint az 5 μ M PJ34 specifikus PARP-1 inhibitor csökkent mértékű kalcium depozíció mutatható ki. A SAOS-2

sejtektől eltérően azonban az őssejtekben a PJ34 jelenlétében fokozódott az apoptózis mértéke.

5. DISZKUSSZIÓ

5.1. A poli-ADP-riboziláció szabályozó szerepe a cigarettafüst által kiváltott sejthalálban

A dohányzás általános oxidatív stresszt kiváltó hatása révén szinte az egész szervezet működésére hat. Legtöbb közlemény a cigarettafüst által okozott sejthalált, a gyulladással járó folyamatokat, a DNS károsodást és az oxidatív stresszt vizsgálja, melyek együttesen vezetnek a dohányzás által okozott különböző betegségek kialakulásához. Nem tisztázott azonban, hogy a károsodott sejtekben milyen szabályozó folyamatok zajlanak le a sejtek túlélése vagy a sejthalál során.

Vizsgálataink során igazoltuk a cigarettafüst kivonat toxikus hatásait A549 tüdő epithel sejteken. A sejtek életképességét és proliferációs kapacitását a CSE kivonat idő- és koncentrációfüggő módon csökkentette. A sejthalál azonban szokatlan formában zajlik le, apoptotikus és nekrotikus jellegű megfigyelhetők. Alacsonyabb CSE koncentráció esetén (1,25-5%) a citoplazma duzzadása figyelhető meg, nekrotikus morfológiára emlékeztetve. Nagyobb CSE koncentrációk esetén a letapadva maradó sejtek kompakt, zsugorodott morfológiát mutatnak, de nem tapasztalható jelentős mértékű kromatin fragmentáció, és a tipikusan apoptózisra utaló kaszpáz aktivitás értéke sem nő. Ellentmond az apoptotikus sejthalálnak az is, hogy magasabb CSE koncentráció jelentős sejtmembrán sérülést és LDH felszabadulást okoz. Az irodalomban is ellentmondásos eredményeket találunk a cigarettafüst által kiváltott sejthalál formáját tekintve, de mások is beszámoltak a cigarettafüst által okozott DNS károsodásról az apoptózis tipikus jelei nélkül. Felmerült az apoptózis indukáló faktor (AIF) szerepe a CSE által okozott sejthalálban és a parthanatos mint lehetséges sejthalál forma. Jelentős mértékű AIF transzlokációt a vizsgált kezelési idők esetén nem tudtunk kimutatni, így az AIF szerepe ebben a modellben kérdéses. A PARP-1 szerepét kevesen vizsgálták a CSE hatásainak tanulmányozása során, bár néhányan mutattak ki PARP aktivációt cigarettafüst kezelés hatására. A mi modellünkben szintén PARP-1 akkumulációt tudtunk detektálni, mely a PARP-1 aktiválódására utal (PARP-1 csendesített sejteken és PJ34 specifikus gátlószert jelenlétében a CSE nem indukál polimer szintézist). A PARP-1 szerepet tölthet be a sejthalál folyamatok szabályozásában. Kismértékű DNS károsodás esetén elősegíti a DNS javítást és ezzel a sejt túlélését, nagymértékű károsodás esetén viszont NAD⁺/ATP depléció révén nekrotizál, vagy AIF transzlokáció kiváltása révén parthanatos formát vesz fel. A CSE által okozott sejtkárosodásban a PARP-1 inaktiválását segítő szerepe igazolódott, mind a PARP-1, mind a PARG csendesítés érzékenyítette a sejteket a cigarettafüst toxikus hatásaira. A CSE még a legmagasabb koncentrációban sem okozott

olyan mértékű javíthatatlan károsodást, mely a PARP-1 túlzott aktivációjához vezetett volna. Ezek alapján A549 sejtekben a cigarettafüst hatására bekövetkező sejthalálban a parthanatos valószínűleg nem játszik fontos szerepet.

A PARiláció megfelelő egyensúlyának túlélést segítő szerepét mutatja, hogy a PARP-1 és a PARG csendesített sejtek esetén a kontroll sejtekhez képest kisebb az életképesség, a proliferációs kapacitás és a DNS hibajavítás hatékonysága. Látszólag ellentmondásos módon a PAR szintézisét és lebontását végző két enzim csendesítése hasonló hatást eredményezett, mely összhangban van más kutatócsoportok megfigyeléseivel. A hatékony DNS hibajavításhoz ugyanis nemcsak a PAR szintézise, hanem annak lebontása, ezek megfelelő dinamikája, a PARP és a PARG összehangolt működése szükséges.

A PARP-1 leginkább egyszálú DNS törések hatására aktiválódik, az egyszálú DNS töréseket pedig főleg ROS/RNS vegyületek és alkiláló ágensek okozzák. A cigarettafüst számos DNS károsító vegyületet tartalmaz. Más kutatási eredményekkel összhangban a mi eredményeink is a ROS, különösen a szuperoxid és hidrogén-peroxid kiemelt szerepét mutatják a CSE által okozott sejtkárosító hatásokban. Maga a cigarettafüst is tartalmaz ROS vegyületeket, de egyéb oxidatív vegyületekkel történő kezeléstől eltérően a PAR akkumuláció csak hosszabb kezelési idő után (30-60 perc) volt detektálható. Ez arra utal, hogy a ROS termelés része a sejt stresszválaszának CSE kezelést követően. A mitokondriális membrán depolarizáció és a MitoSOX Red mitokondriális szuperoxid indikátorral kapott eredmények is a mitokondriális szuperoxid termelődést támasztják alá. Intracelluláris hidrogén-peroxid termelődés is kimutatható volt CSE kezelés hatására. CAT jelenléte gátolta a PAR akkumulációt és fokozta a CSE kezelt sejtek életképességét, ezzel ellentétben SOD jelenlétében jelentős mértékben fokozódott a PAR akkumuláció és drasztikusan csökkent a viabilitás. Ez arra utal, hogy a szuperoxid átalakulása hidrogén-peroxiddá fokozza a DNS törést és ez által a PARP aktivációt. Habár a fluoreszcens ROS próbák megbízhatósága megkérdőjelezhető, a SOD és CAT kezelés hatásai egyértelműen azt mutatják, hogy a szuperoxidnak és hidrogén-peroxidnak kulcsszerepe van a cigarettafüst által okozott DNS károsodásban és citotoxicitásban.

5.2. Hidrogén-peroxid által indukált poli-ADP-ribóziláció szabályozó szerepe az osteogén differenciáció során bekövetkező sejthalálban

A regeneratív orvoslásban előtérbe került az őssejtek szerepe, melyek multipotens jellegüknel fogva megfelelő stimulusok hatására különféle sejtekké képesek differenciálódni, elősegítve ezzel a szöveti regenerálódást. Felhasználásukhoz azonban elengedhetetlen a

differenciációs folyamatok szabályozásának ismerete. Az osteogén differenciáció folyamatának és szabályozásának tanulmányozására megfelelő modellt nyújtanak a SAOS-2 osteosarcoma sejtek, melyek differenciáló stimulusok hatására szintén képesek mineralizált extracelluláris mátrix struktúrák kialakítására.

A SAOS-2 sejtekben differenciáló médium hatására nőtt az osteogén differenciációban szerepet játszó gének (Runx2, osterix, BMP2, osteopontin) expressziós szintje és az alkalikus foszfatáz aktivitása, valamint a Ca^{2+} felhalmozódás mutatható ki az extracelluláris mátrixban. A differenciáció során a sejtekben hidrogén-peroxid képződését detektáltuk, melynek funkcionális jelentőségét az mutatja, hogy kataláz jelenlétében szignifikánsan csökkent az extracelluláris kalcium depozíció és az alkalikus foszfatáz aktivitás. A kataláz a csontirányú differenciációban szereplő marker gének expresszióját is csökkentette vagy késleltette az expresszió növekedését. A ROS osteogén differenciációban betöltött szerepét tekintve az ellentmondásos eredményeket találunk az irodalomban. Több munkacsoport a ROS vegyületek gátló hatását mutatta ki. Más vizsgálatok szerint a differenciáció során képződő ROS vegyületeknek pozitív szabályozó szerepük van a folyamatban. Kimutatták, hogy a NOX4 által termelt szuperoxid szabályozza a BMP2 expressziót és elősegíti a differenciációt. A szuperoxid fokozta a kalcifikációt vaszkuláris simaizom sejtek osteogén differenciációja során. Periodontális ligamentum eredetű fibroblasztokban a hidrogén-peroxid növelte a differenciációs kapacitást a csontspecifikus transzkripciós faktorok expressziójának fokozása révén. Az osteogén differenciáció során a ROS szintjének megemelkedése valószínűleg a NADPH oxidázok, főként a NOX4 és NOX2 működésével hozható összefüggésbe. Chondrogén és adipogén differenciáció kapcsán szintén leírták a reaktív oxigénvegyületek szabályozó szerepét, a redox szabályozás tehát többféle differenciálódási útvonalban szerepet kap. A redox szabályozás mibenlétéről azonban nem áll rendelkezésre információ, így feltételeztük és megvizsgáltuk a PARiláció lehetséges szerepét.

SAOS-2 sejtek osteogén differenciációja során PAR akkumulációt detektálható és korreláció mutatható ki a PAR akkumuláció és a hidrogén-peroxid termelődés között. Kataláz jelenlétében a PAR szint emelkedése időben eltolódott, így a PARP aktivitást nagyrészt a differenciáció során a képződő hidrogén-peroxid váltotta ki.

Az osteogén differenciáció során a sejtek jelentős része elpusztul, amit mi is megfigyeltünk SAOS-2 és MSC kultúrákban. A sejthalál formája döntően apoptózis, de megjelentek nekrotikus sejtek is. Redukált glutation és kataláz jelenlétében nőtt a sejtek viabilitása, a sejthalált tehát feltehetőleg a hidrogén-peroxid indukálta. Mivel a hidrogén-peroxid termelődés és a PARiláció között közvetlen kapcsolat áll fenn, szerettük volna

megvizsgálni a PARiláció szerepét az osteogén differenciációban. Ennek érdekében a PARP-1 és PARG enzimeket stabilan csendesítettük SAOS-2 sejtvonalban. A hatékony PARP-1 csendesítés a sejtek életképességének drasztikus csökkenésével járt, így csak részleges, 50%-os hatékonyságú csendesítést sikerült elérnünk. A PARP-1 és a PARG csendesítése befolyásolta az extracelluláris kalcium depozíció mértékét, és az ALP aktivitást. Az shPARP-1 sejtekben később mutatható ki a mineralizáció a kontroll sejtvonalhoz képest, és csökken az ALP aktivitás is. A szabályozó szerepet betöltő Runx2 és az osterix mRNS szintje a csendesített vonalakban nem mutatott jelentős eltérést a kontroll sejtvonalhoz képest. A BMP2 és az osteopontin expressziója fokozódott a PARG és kismértékben a PARP-1 csendesített sejtekben is. A PARP-1 illetve a PARiláció szerepét leírták több transzkripció faktor szabályozása esetén, de a Runx2 és az osteogén differenciációban szereplő egyéb transzkripció faktorok esetén még nem vizsgálták a hatását.

A PARP-1 és a PARG sejthalálban betöltött szerepe alapján feltételezhető, hogy befolyásolja a csontirányú differenciáció során bekövetkező sejthalált is. Az shPARP-1 sejtekben csökkent a differenciáció és az ehhez kapcsolt sejthalál (apoptózis és nekrozis) mértéke. A PARG csendesítés ezzel ellentétben csökkentette az életképességet a differenciáció alatt, emellett a sejthalál formáját a nekrozis felé tolta el. Tekintve a PARP-1 túlélést segítő szerepét enyhe oxidatív stressz során, ebben a modellben a kis mennyiségben termelődő hidrogén-peroxid termelés alapján a PARP-1 hiányában fokozott sejtpusztulást feltételeztük. Ezzel szemben a PARP-1 ebben a folyamatban a sejtpusztulást segíti elő. A géncsendesítéssel kapott eredményeknek ellentmond az, hogy a cMSC sejtek esetén a PJ34 specifikus PARP-1 inhibitor hozzáadása csökkentette a túlélést (bár a munkacsoportunk későbbi vizsgálatai során alkalmazott alacsonyabb PJ34 koncentráció nem cáfolta a géncsendesítéssel kapott eredményeket). A PARP-1 csendesítés és gátlás valamint a PARP-1 és PARG csendesítés ellentétes hatása alapján feltételezhető, hogy ebben a folyamatban sokkal összetettebb a szabályozási folyamat, és a PARP aktivitáson kívül szerepet játszhatnak a fehérje-fehérje kölcsönhatások is. Mint ahogyan például az NF- κ B aktiválása esetén sincs szükség a PARP-1 enzimikus aktivitására, a kölcsönhatás fehérje-fehérje interakció révén valósul meg.

A ROS szerepét az osteogén differenciáció során humán chorionális mesenchymalis őssejteken (cMSC) is megerősítettük. Ezekben a sejtekben szintén katalázal gátolható, hidrogén-peroxid függő sejthalált mutattunk ki. Így a hidrogén-peroxid az MSC sejtekben is szerepet játszik a differenciációt kísérő sejthalálban. A SAOS-2 sejtektől eltérően azonban az

őssejtekben a PJ34 jelenlétében fokozódott az apoptózis mértéke, azaz a PARP-1 túlélést segítő hatását tapasztaltuk.

6. KONKLÚZIÓK

A poli-ADP-riboziláció szabályozó szerepe a cigarettafüst által kiváltott sejthalálban

1. A cigarettafüst toxikus hatású az A549 sejtekre.
2. A PARP-1 és a PARG csendesítés is érzékenyíti a sejteket a dohányfüst citotoxikus hatásaira.
3. PARP-1 és PARG hiányában csökken a DNS hibajavítás hatékonysága.
4. A cigarettafüst kezelés A549 sejtekben intracelluláris ROS képződéshez vezet.
5. Az intracelluláris ROS képződésnek kulcsszerepe van a dohányfüst toxikus hatásában.

Hidrogén-peroxid által indukált poli-ADP-riboziláció szabályozó szerepe az osteogén differenciáció során bekövetkező sejthalálban

1. A humán placentából izolált sejtek felszíni markereik alapján összejt jellegűek és képesek osteogén, chondrogén és adipogén irányú differenciációra
2. SAOS-2 sejtek osteogén differenciációja során hidrogén-peroxid termelődik, mely sejthalált indukál
3. A differenciáció során termelődő ROS PARP-1 aktivitást vált ki.
4. A PARilációnak szerepe van az osteogén differenciáció során bekövetkező sejthalál szabályozásában.

7. PUBLIKÁCIÓS LISTA



DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR
PUBLIKÁCIÓK



Iktatószám: DEENKÉTK/322/2014.
Tételszám:
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Kovács Katalin
Neptun kód: IOM6TT
MTMT azonosító: 10034288
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Robaszkievicz, A., Erdélyi, K., **Kovács, K.**, Kovács, I., Bai, P., Rajnavölgyi, É., Virág, L.: Hydrogen peroxide-induced poly(ADP-ribosyl)ation regulates osteogenic differentiation-associated cell death.
Free Radic. Biol. Med. 53 (8), 1552-1564, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.08.567>
IF:5.271
2. **Kovács, K.**, Erdélyi, K., Hegedűs, C., Lakatos, P., Regdon, Z., Bai, P., Haskó, G., Szabó, É., Virág, L.: Poly(ADP-ribosyl)ation is a survival mechanism in cigarette smoke-induced and hydrogen peroxide-mediated cell death.
Free Radic. Biol. Med. 53 (9), 1680-1688, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.08.579>
IF:5.271





További Közlemények

3. El-Hamoly, T., Hegedűs, C., Lakatos, P., **Kovács, K.**, Bai, P., El-Ghazaly, M.A., El-Denshary, E.S., Szabó, É., Virág, L.: Activation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 delays wound healing by regulating keratinocyte migration and production of inflammatory mediators.
Mol. Med. 20, 363-371, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.2119/molmed.2014.00130>
IF:4.824 (2013)
4. Robaszkievicz, A., Valkó, Z., **Kovács, K.**, Hegedűs, C., Bakondi, E., Bai, P., Virág, L.: The role of p38 signaling and poly(ADP-ribosyl)ation-induced metabolic collapse in the osteogenic differentiation-coupled cell death pathway.
Free Radic. Biol. Med. 76C, 69-79, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.07.027>
IF:5.71 (2013)
5. Brunyánszki, A., Hegedűs, C., Szántó, M., Erdélyi, K., **Kovács, K.**, Schreiber, V., Gergely, S., Kiss, B., Szabó, É., Virág, L., Bai, P.: Genetic ablation of PARP-1 protects against oxazolone-induced contact hypersensitivity by modulating oxidative stress.
J. Invest. Dermatol. 130 (11), 2629-2637, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/jid.2010.190>
IF:6.27

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 27,346

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
10,542

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2014.10.02.

