

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**Az oxidatív stressz által kiváltott,
PARiláció-függő sejthalál vizsgálata**

Regdon Zsolt

Témavezető: Prof. Dr. Virág László



DEBRECENI EGYETEM

Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

Debrecen, 2021

Az oxidatív stressz által kiváltott, PARiláció-függő sejthalál vizsgálata

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az elméleti orvostudományok tudományágban

Írta: Regdon Zsolt okleveles molekuláris 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, akadémikus
tagok: Dr. Csont Tamás, PhD
Dr. Szöllősi Attila Gábor, PhD

A doktori szigorlat időpontja (online formátumban): 2021. május 12. 11:00 óra

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Gallyas Ferenc, az MTA doktora
Dr. Koncz Gábor, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Szöllősi János, akadémikus
tagok: Prof. Dr. Gallyas Ferenc, az MTA doktora
Dr. Csont Tamás, PhD
Dr. Koncz Gábor, PhD
Dr. Szöllősi Attila Gábor, PhD

Az értekezés védésének (online formátumban) időpontja: 2021. május 12. 13:00 óra

A nyilvánosságot online módon biztosítjuk. Amennyiben részt kíván venni, úgy jelezze a regdon.zsolt@med.unideb.hu e-mail címre küldött üzenetben a vitát megelőző munkanap (2021. május 11.) 16 óráig. A határidő lejártát követően technikai okok miatt már nincs lehetőség a védéshez kapcsolódni.

Irodalmi áttekintés

A gyulladás folyamata

A gyulladás folyamatát már az ókorban leírták. Hippokratész (i. e. 460 – i. e. 377 körül) megfigyelte, hogy a gyógyulási folyamatok első lépése a gyulladás. Aulus Cornelius Celsus (i. e. 30 - i. u. 45) római író pedig feljegyezte a gyulladás öt tünete közül négyet: vörösség, melegség, duzzanat és fájdalom. Az ötödik tünet leírását, a funkció kiesést Galenosz (i. u. 129 - i. u. 200) nevéhez kötjük.

A gyulladás az immunrendszer válasza a testet érő káros hatásokra, mint a sérülés, a patogének és a toxinok. A gyulladás szerepe a sérülést okozó ágens eliminálása és a gyógyulási folyamatok beindítása. Jellemzői az emelkedett véráramlás, sejtmetabolizmus, vazodilatáció, mediátorok felszabadulása, ödéma és immunsejtek infiltrációja a gyulladt területre.

A gyulladást szabályozó fő folyamatok: a gyulladási mintázat felismerése, szignálútvonalak aktiválódása, ezek szabályozzák a különböző mediátorok és transzkripciós faktorok működését, ezáltal a homeosztázis és a patogének elleni védelem szabályozói is egyben, valamint a gyulladással kapcsolatos markerek megjelenése. A sérülés helyére elsőként neutrofil granulociták és makrofágok vándorolnak. Ezt követik a monociták és a limfociták (NK-, T- és B-sejtek) valamint a hízósejtek. Az akut gyulladás a szervezet védekezése szempontjából egy hasznos folyamat, addig krónikussá válása betegségek kialakulásához vezethet. Ezért a gyulladás megszűnésének szabályozása kiemelten fontos.

Makrofág polarizáció és a ROS kapcsolata

A makrofágok a veleszületett és az adaptív immunrendszer nélkülözhetetlen fagocita és antigén prezentáló sejtjei. A makrofágokat polarizációjuk alapján több csoportba lehet sorolni, az egyszerűség kedvéért itt csak két csoportot fogunk említeni. Gyulladásos makrofágok (M1) általában valamilyen fertőzés, vagy sérülés során alakulnak ki. A polarizációt indukálhatja bakteriális lipopoliszacharid, interferon gamma stb. Gyulladásos citokineket és kemokineket termelnek valamint ennek a polarizációnak a markere az indukálható nitrogén-monoxid szintáz (iNOS) amely nitrogén-monoxidot (NO) termel. Funkciójukat tekintve baktericid, tumoricid és fagocita feladatokat látnak el, azonban olyan krónikus betegségekkel is összefüggésbe

hozták, mint az obezitás, metabolikus szindróma vagy a diabétesz. Az alternatíván aktiválódott (M2) makrofágok amelyek polarizációját interleukin-4 (IL-4) illetve interleukin-10 (IL-10) is kiválthatja immunszuppresszív, angiogenetikus hatásuk van, valamint a sebgyógyulást is szabályozzák. Patológiás folyamatokban is részt vehetnek, mint például a tumor promóció, dermatitis vagy az asztma melynek során fő forrásai a reaktív oxigén és nitrogéntartalmú intermediereknek (ROS és RNS). A ROS és RNS fiziológiás körülmények között szignálmolekulákként működnek, túltermelődésük azonban patológiás folyamatokhoz, illetve sejthalálhoz vezetnek. Amikor a reaktív intermedierek és az antioxidáns rendszer közötti egyensúly a ROS/RNS javára felborul, akkor oxidatív stresszről beszélünk. A ROS/RNS képesek a sejtek biomolekuláit (DNS, fehérje, lipid) károsítani, és ez által sejt és szövet diszfunkciót előidézni. A makrofágok nem csak termelők a magas ROS/RNS koncentrációjú miliónek, de elszenvedők is az oxidatív stressznek.

ROS által indukált sejthalál folyamatok

Az oxidatív stressz lehetséges kimenetelei között szerepel a sejthalál, amely gyulladásos és szervi diszfunkcióhoz vezet. Az apoptózis egy jól karakterizált programozott sejthalál forma. A sejt zsugorodását az apoptotikus testek keletkezése követi, majd a sejtmag zsugorodik és fragmentálódik, végül a sejt apoptotikus testekké esik szét. Az apoptotikus testek bekebelezését a fagocita sejtek végzik. Az apoptózist külső, illetve belső stimulusok is indukálhatják, ilyenek például a halál ligandumok (külső), DNS károsítás, ER stressz és a mitokondriális útvonal (belső). A sejthalál kivitelezésében az effektor fehérjék, a kaszpázok vesznek részt, a kaszpázok aszpartil proteáz fehérjék. Megkülönböztetünk iniciátor (kaspáz-2, 8, 9, 10) illetve effektor (kaspáz-3, 6, 7) kaszpázokat. A kaszpázok egy másik csoportjába a kaszpáz-1, 4, 5, 11, 12 tartozik, amelyek a gyulladás szabályozásában vesznek részt.

A nekrozist eredetileg egy véletlenszerű és szabályozatlan sejthalál formaként írták le, amely extrém külső tényezők hatására következik be. A programozott és véletlenszerű sejthalálon kívül még egy sor egyéb sejthalál forma létezik. Ezeket a sejthalál útvonalakat általában szabályozott sejthalál formáknak nevezzük, mivel valamilyen szignálútvonal irányítja a lefolyásukat.

A nekroptózis egy szabályozott sejthalál forma, amely fenotípusosan inkább a nekrozisra hasonlít. A receptor mediált szignáltranszdukciót a RIPK és MLKL kinázok

közvetítik. Nekroptózis során kaszpáz-8 aktivációt figyelhetünk meg azonban az effektor kaszpáz (kaspáz-3) hasítása nem történik meg.

Ferroptózis sejthalál során letális mennyiségű lipid hidroxiperoxidok szaporodnak fel a sejtben, ami egy nem-apoptotikus fenotípusú sejthalálhoz vezet. Oxidatív stressz során szabad vas jelenlétében Fenton reakción keresztül hidroxil gyök keletkezik, amely az egyik legreaktívabb szabadgyök, így károsíthatja a sejt DNS, fehérje és lipid molekuláit.

A makrofágoknak kiemelt szerepük van a ROS és RNS termelésben valamint a patogének eliminálásában. Az oxidatív stressz a sejthalál különböző formáit indíthatja el, ezek a makrofágokban is végbemennek. Ennek elkerülése érdekében különböző védekezési mechanizmusokat fejlesztettek ki, amelyeket a bevezetés későbbi szakaszában, illetve a kutatási eredményeim felhasználásával szeretnék bemutatni.

A poli-ADP-riboziláció

A fehérjék mono- és poli-ADP-ribozilációja egy reverzibilis poszttranszlációs módosítás, amely különböző biológiai folyamatok szabályozásában vesz részt. Ezek közül kiemelendő a genom stabilitásának megőrzése, a transzkripció szabályozása, az energia metabolizmus és a sejthalál. A folyamatot végző enzimeknek emberben 17 tagját ismerjük jelenleg. Az aktivált PARP a nikotinamid-adenin-dinukleotidot (NAD⁺) hasítja nikotinamidra és ADP-ribózra, majd az ADP-ribóz monomerekből elágazó láncú polimereket szintetizál az akceptor fehérjéken.

A PARP család legintenzívebben tanulmányozott tagja a 116kDa molekulatömegű PARP-1 (ismert még, mint poli(ADP-ribóz) szintetáz és poli(ADP-ribóz) transzferáz), ami egy eukariótákban általánosan előforduló sejtmagi fehérje. A molekula három fő domént tartalmaz: N-terminálisan elhelyezkedő DNS kötő domén, auto modifikációs domén, C-terminálisan elhelyezkedő katalitikus domén. Ezen kívül még tartalmaz egy nukleáris lokalizációs szignált (NLS) ami tartalmazza a kaszpáz-3 hasító szekvenciáját is, illetve a fehérjével való kölcsönhatás kialakításában részt vevő BRCT motívumot is. A fehérje erősen konzervált, 92%-os homológiát mutat az emberi és az egér aminosav szekvenciában. A legnagyobb egyezést a katalitikus doménben találjuk, a különböző gerinces fajok között 100%-os egyezést mutat az 50 aminosav hosszúságú PARPss (PARP signature sequence). A PARP-1 képes kölcsönhatás kialakítására más PARP enzimekkel is (PARP-1, PARP-2), a DNS hibajavítást végző

enzimekkel (XRCC1, DNS polimeráz- β , DNS-ligáz III) valamint más sejtmagi fehérjékkel is, mint például: hisztonok és telomer. Nick szenzorként funkcionál, azonban nemcsak a DNS törés, illetve a DNS következményes meghajlása vezethet PARP-1 aktivációhoz. Patkány primer neuronokon inozitol-1,4,5-trifoszfát (IP_3) indukált Ca^{2+} felszabadulás során PARP aktivációt figyeltek meg. A PARP-1 aktivitása expressziós szinten is szabályozódik az Sp1 és Sp3 transzkripciós faktorok révén.

A PARP-1 a NAD^+ -ot nikotinamidra és ADP-ribózra hasítja, majd az ADP-ribóz egységeket kovalensen kapcsolja az akceptor proteinek glutamát, szerin oldalláncaira. PAR polimerek eltávolításáért főleg a poli(ADP-ribóz) glikohidroláz (PARG) enzim a felelős. A fehérjéhez kapcsolódó ADP-ribóz monomert az ADP-ribosil protein liáz távolítja el.

PARP-1 KO sejtekben azt tapasztalták, hogy a short patch repair polimerizációs határfoka mintegy felére csökkent míg a long patch repair szinte teljesen hatástalan volt. A PARP-1 kölcsönhat az XRCC1 enzimmel, amely esszenciális az SSB-k javításában. A PARP-1-nek nincs DNS javító funkciója azonban a BER más esszenciális enzimjeivel is kölcsönhat, mint például a DNS ligáz III α -val és a DNS polimeráz β -val. A kettős szálú DNS törések (Double Strand Break, DSB) javításának két mechanizmusa van emlős sejtekben, a homológ rekombináció (HDR) és a nem homológ DNS-vég összekapcsolás (NHEJ). A PARP-1 az XRCC1 és DNS ligáz III komplexszel együttműködve kapcsolódik a DNS-hez amikor az NHEJ komponensei nem állnak rendelkezésre, és egy alternatív útvonalat létrehozva szerepelnek a hibajavításban. A PARP-1 komponense a replikációs komplexnek, szerepét úgy képzelhetjük el, mint egy "szenzort", ami jelzi a DNS károsodást. Elősegíti a replikációs villa lassulását, és lehetővé teszi a hibajavítás megkezdését.

A PARP-1-nek kiemelt szerepe van a sejthalálban is. Az apoptózis végbemeneteléhez az ATP mennyisége nem csökkenhet egy bizonyos szint alá. PARP enzimek szubsztrátja a NAD^+ - ami az ATP szintézis nélkülözhetetlen molekulája, a PARP-1 éppen ezért molekuláris kapcsolóként funkcionál a sejthalál során. Apoptózis során a kaszpáz-3 proteolitikusan hasítja a fehérjéket, és egyik szubsztrátja a PARP-1. A PARP-1 túlaktivációja azonban káros a sejt túlélése szempontjából, a NAD^+ felhasználásával ATP deplációhoz vezet, valamint mitokondriális diszfunkciót eredményez, ezáltal egy nekrozisra hasonlító sejthalált indukál. Látható, hogy a PARP-

1 aktivációja nélkülözhetetlen a sejt túléléséhez genotoxicitás indukálta sejthalál során, azonban PCD során az inaktiválódására van szükség, hogy a sejt elkerülje a súlyosabb sejthalál formát. A PARP-1 által közvetített sejthalál talán legérdekesebb formája a parthanatos. A nevét is az enzim által katalizált reakcióról kapta. (A PAR a poli(ADP-ribóz) polimerre, Thanatos pedig a halál Istenére utal a görög mitológiából.) A programozott sejthalálformák közé soroljuk, tehát megkülönböztetjük a nekroptózistól elsősorban a szabályozás szempontjából. Parthanatos során a sejthalált a PARP-1 aktivációja váltja ki, a termelődött PAR kötődik az AIF-hoz, és annak a transzlokációját indukálja a mitokondriumból a sejtmagba. Az AIF transzlokációja azonban nem magyarázta a sejtmagban bekövetkező fragmentációt, a DNS hasításáért a MIF nukleáz a felelős. Láthatjuk, hogy a PARP-1-nek fontos szerepe van a sejthalál szabályozásában.

Célkitűzés

A PARP-1 enzimnek jelentős szerepe jut a DNS hibajavításban, a transzkripció szabályozásában és a sejthalál folyamatában egyaránt. Mindezek mellett a PARP-1-nek központi szerepe van az immunsejtek gyulladásos folyamatainak szabályozásában. Míg a DNS javításának mechanizmusa, és a PARP-1 mediált sejthalál területén az irodalmi ismereteink igen széleskörűek, addig a PARP-1 szerepéről a makrofágok oxidatív stresszel szembeni rezisztenciájának kialakulásáról keveset tudunk. Ezért munkánk során célul tűztük ki az alábbiakat:

- 1) A különböző polarizáltságú makrofágok H₂O₂-al szembeni érzékenységének vizsgálata.
- 2) H₂O₂ rezisztens M1 makrofágok génexpressziós paneljének vizsgálata.
- 3) A PARP-1 szerepének vizsgálata M1 makrofágok H₂O₂ rezisztenciájának kialakulásában.
- 4) M1 makrofágok metabolikus jellemzése oxidatív stressz során.

A gyógyszerkutatásban nagy jelentősége van a már gyógyszerként forgalomba helyezett szerek új betegségekben való alkalmazásának. A PARP-1 fontos szerepet tölt be a sejthalál szabályozásában ezért olyan molekulák felderítését tűztük ki célul, amelyeknek szerepük lehet a parthanatos csökkentésében:

- 1) Citoprotektív molekulák azonosítására alkalmas HCS módszer beállítása.
- 2) Szűrés elvégzése egy kis molekulakönyvtáron (<800) és a “hit” vegyületek validálása.
- 3) PARP gátlószer azonosítása.
- 4) A gátlás mechanizmusának jellemzése.

Anyagok és módszerek

Anyagok

A 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid (MTT), alacsony olvadáspontú agaróz (LM agaróz), antimycin, apomorfin, ciklopirox, Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), főtális szarvasmarha szérum (FBS), H₂O₂, interleukin-4 (IL-4) karbonil-cianid-4-(trifluor-metoxi)-fenil-hidrazon (FCCP), lipopoliszacharid (LPS), NAD/NADH Quantitation Kit, oligomycin, propídium jodid (PI), proteáz inhibitor koktél (PIC), RPMI-1640 medium a Sigma-Aldrich Kft-től (Budapest, Magyarország) volt beszerezve. Az L-glutain és a penicillin/streptomycin a Lonza Group AG-től származik (Bázel, Svájc). A Seahorse kísérletekhez használt DMEM médiumot az Agilent-től vettük (Santa Clara, CA, USA). A FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I-et a BD Pharmingen-től (San Jose, CA, USA) vásároltuk. Az alábbi antitesteket: anti-AIF antitest, anti-PARP-1 antitest, HRP-vel konjugált anti-egér IgG, HRP-vel konjugált anti-nyúl IgG a Cell Signaling Technologies-től (Danvers, MA, USA), a peroxidáz konjugált anti- β -aktin antitestet pedig a Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA) vásároltuk. Az anti-foszfo-H2AX antitestet a Trevigen (Minneapolis, MN, USA) cégtől vettük. A monoklonális anti-PAR antitest a Debreceni Egyetem Orvosi Vegytani Intézetében készült 10 H hibridóma sejtek felülúszójából telített ammónium-szulfát oldattal történő tisztítással. A membránok blokkolásához használt sovány tejpor kereskedelmi forgalomból származott. A Biontex Laboratories-től (München, Németország) vettük a K4 transzfekciós rendszert. A PARP1-mCherry OmicsLink expressziós plazmid a GeneCopoeia (Rockville, MD, USA) cégtől származik. Az ATP A Screen-Well® FDA Approved Drug Library V2 molekula könyvtár az Enzo Life Sciences Inc.-től (Farmingdale, NY, USA) vásároltuk. A 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), a Hoechst 33342 és a Sytox Green az Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) cégtől származik. A qPCR-hez szükséges reagenseket az alábbi cégektől szereztük be: a Trizol reagenst a Molecular Research Center-től (Cincinnati, OH, USA) vettük. A High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit-et az Applied Biosystems-től (Foster City, CA, USA), míg a 2X qPCR BIO Sygreen Mix Lo-ROX reagenst a PCR Biosystems-től (London, Egyesült Királyság) vásároltuk. A rekombináns egér makrofág kolonia stimuláló faktort (M-CSF) az R&D System-től (Minneapolis, MN, USA) vásároltuk. Az ATP Bioluminescence Assay Kit II termék a Roche Diagnostics cégtől (Penzberg, Németország) van. A Hank's Balanced sóoldat

(HBSS), a Lipofectamine 3000 és a SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate a Thermo Fisher Scientific-től (Vantaa, Finnország) származik. Az alábbi reagenszeket a VWR International Kft-től (Debrecen, Magyarország) vásároltuk: dimetil-szulfoxidot (DMSO), fenilmetilszulfonil-fluoridot (PMSF), glicerint, merkapto-etanol, nátrium-dodecil-szulfátot (SDS), nátrium-hidroxid, Na₂EDTA, TrisHCl, Triton X-100

Módszerek

A csontvelőből származó makrofágok (BMDM) izolálása, differenciálása és polarizációja

A C57 egér (Debreceni Egyetem Élettudományi Épület Kísérleti Állatház) csontvelő sejteket a Pineda-Torra és mtsai. publikációban leírtak szerint izoláltuk (I Pineda-Torra és mtsi., 2015). Az egér csontvelő makrofágok gyűjtésének protokollja összhangban volt a Helsinkai Nyilatkozattal, és a Regionális Kutatási Etikai Bizottság jóváhagyta (15/2016/DEMÁB). A BMDM sejteket 10% hőinaktivált FBS-sel, 1% L-glutaminnal, 1% penicillin-sztreptomicinnel és 25 ng/ml egér M-CSF-sel kiegészítve DMEM-ben inkubáltuk (differenciáló médium). A sejteket 37 °C-on és 5% CO₂-ot tartalmazó atmoszférában tartottuk. A sejtenyészethez a 3. és az 5. napon friss differenciáló médiumot adtunk. A 6. napon a sejteket teljesen differenciált csontvelőből származó makrofágoknak tekintettük. A sejteket 10 ng/ml LPS-sel vagy 5 ng/ml IL-4-gyel kezeltük, hogy M1 vagy M2 polarizációt indukáljunk.

HaCat sejtkultúra

A HaCat sejteket (American Type Culture Collection (ATCC) Manassas, VA, USA) 10% FBS-sel, 1% L-glutaminnal és 50 E/ml / 50 µg/ml penicillin / sztreptomicin oldattal kiegészített RPMI 1640-ben tenyésztettük 37 °C-on, 5% CO₂-ot tartalmazó atmoszférában.

Sejt életképesség vizsgálata (MTT esszé)

A sejtek életképességét MTT vizsgálattal mértük. A sejtekhez 0,5 mg/ml MTT-oldatot adtunk, és 30 percig inkubáltuk. A médiumot leszívtuk, és a formazán-kristályokat 100 µl DMSO-ban oldottuk fel. Az abszorbanciát 590 nm-en mértük Tecan Spark fotometriás készüléken (Tecan Group Ltd., Männedorf, Svájc). Az életképességet kiszámítottuk és a kontroll százalékában fejeztük ki.

A sejtkonfluencia és a propidium-jodid felvétel értékelése

A sejteket az Eredmények c. fejezetben található ábrákon leírtak szerint kezeltük, mértük a konfluenciát és reprezentatív képeket készítettünk a Tecan Spark plate olvasó készülék képalkotó funkciójával. A PI felvételi vizsgálatokhoz a sejteket 15 percig 5 µg/ml PI-dal inkubáltuk. A fluoreszcencia intenzitást 560 ex/620 em értéken mértük Tecan Spark plate olvasóval.

A sejthalál „high content” analízise (HCA)

Az összes HCA kísérlethez a sejteket CellCarrier Ultra platek-en (Perkin Elmer, Ealtham, MA, USA) tenyésztettük. Festés után a képeket Opera Phenix HCS (Perkin Elmer, Ealtham, MA, USA) berendezéssel készítettük, és az adatokat Harmony szoftverrel (Perkin Elmer, Ealtham, MA, USA) elemeztük.

Annexin V-propidium-jodid kettős festés

A kezelés után a sejteket PBS-sel mostuk és vitálisan festettük Hoechst-tel és FITC Annexin V Apoptózis Detection Kit I-gyel a gyártó utasításainak megfelelően. A képeket 10x-es levegős objektívvel készítettük. A nukleáris és a citoplazmatikus régiókat Hoechst intenzitás alapján szegmentáltuk. Az átlagos fluoreszcencia intenzitást (MFI) kiszámítottuk a FITC sejterületén és a PI esetében a sejtmag területén. Az MFI alapján három sejt alcsoportot azonosítottunk: élő (kettős negatív), apoptotikus (Annexin V - FITC pozitív és PI negatív) és nekrotikus (PI pozitív) sejtek.

RNS izolálás, reverz transzkripció és kvantitatív valós idejű PCR

A teljes RNS izolálást Trizol módszerrel végeztük. 2 µg RNS-t használtunk a reverz transzkripcióhoz az átírást nagy kapacitású High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit-tel végeztük a gyártó utasításainak megfelelően. A valós idejű kvantitatív PCR-t a 2X qPCRBIO Sygreen Mix Lo-ROX és a Roche Lightcycler 480II (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Németország) készülék alkalmazásával végeztük.

SDS-PAGE és Western blot

A fehérjék méret szerinti elválasztása érdekében a hideg lízispufferben (62,5 mM Tris-HCl (pH 6,8), 2% SDS, 10% glicerin, 715 mM 2-merkapto-etanol, 1 mM PMSF (fenilmetilszulfonil-fluorid), proteáz inhibitor koktél) feltárt teljes-fehérjékből azonos

menntiséget vittünk fel 8%-os SDS-poliakrilamid géltre, majd 100 V-on 90 percig poliakrilamid elektroforézist (PAGE) végeztünk. A fehérjéket nitrocellulóz membránra transzferáltuk 400 mA áramerősséggel 90 percig. A membránok blokkolását 5%-os sovány tejpor 1X PBST pufferben oldott oldatával végeztük 1 órán át szobahőmérsékleten. A membránokat PAR (10H klón), PARP-1 és β -aktin elleni antitestekkel inkubáltuk egy éjszakán át 4 °C-on. A következő napon a membránokat – az elsődleges antitesteknek megfelelően – HRP-vel konjugált szekunder antitestekben inkubáltuk 2 órán át szobahőmérsékleten. Az egyes lépések között a membránt 1X PBST-vel mostuk két alkalommal 5 percig, majd 1X PBS pufferben 5 percig. Az antitestek kötődését kemilumineszcenciás módszerrel detektáltuk Chemidoc Touch gél dokumentációs rendszerrel (Bio-Rad Laboratories Irvine, CA, USA) SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent reagens felhasználásával.

NAD⁺ és ATP esszé

A relatív NAD⁺ tartalmat NAD/NADH Quantitation Kit-tel határoztuk meg a gyártó utasításainak megfelelően. Az abszorbanciát a fehérjetartalomra normalizáltuk. A relatív ATP-tartalmat ATP Bioluminescence Assay Kit II-vel határoztuk meg a gyártó utasításai szerint. Az ATP-tartalmat normalizáltuk a fehérjetartalomra. A méréseket Tecan Spark plate olvasón mértük (Tecan, Männedorf, Svájc).

Az extracelluláris acidifikáció és az oxigén fogyasztási ráta mérése

Az egér csontvelői sejteket Seahorse XF96 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) sejttenyésztő plate-en differenciáltattuk, majd az Eredmények c. fejezetben található ábra alapján az ott leírtak szerint kezeltük. A médium leszívását követően, a sejteket 1 órán át inkubáltuk XF assay táptalaj-módosított DMEM-ben (pH 7,4), 4,5 g/l glükózzal kiegészítve. Az oxigénfogyasztási sebességet (OCR) és az extracelluláris savanyodási sebességet (ECAR) XF96 extracelluláris fluxus analizátorral (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) határoztuk meg. Mitokondriális stressz tesztet hajtottunk végre oligomycin (2 μ M), FCCP (4 μ M) és antimycin (10 μ M) szekvenciális hozzáadásával. Minden egyes vegyület hozzáadása után négyszer mértük az OCR-t (5 perc/mérés). A másodlagos metabolikus paramétereket (ATP-hez kötött légzés, maximális légzési kapacitás, légzési tartalék kapacitás) a Dranka és mtsi. publikációban leírtak szerint számítottuk ki (B P Dranka és mtsi., 2011).

A timocita sejthalál elemzése áramlási citometriával

A timocita izolálást a Hegedűs és mtsi. publikációban leírtak szerint hajtottuk végre (C Hegedűs és mtsi., 2008). A C57 / B16 egereket (Debreceni Egyetem Élettudományi Épület Kísérleti Állatház) 4-6 hetes korukban termináltuk, majd a timuszokat aseptikusan boncoltuk, jéghideg RPMI 1640 médiumba helyeztük, és rozsdamentes acél dróthálón, 100 µm-es nejlon szűrőn átszűrtük egysejtű szuszpenzió előállítására céljából. A timocitákat 2x10⁶/ml sűrűségűre hígítottuk RPMI 1640 médiummal, ezt követően 100 µl-t 96 lyukú plate-re helyeztünk. Kezelést követően a sejteket 5 percig 1,25 µg/ml PI-dal festettük, és a sejthalált Acea NovoCyte (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) áramlási citométerrel mértük.

PARP1-mCherry transzfekciója HaCat sejtekbe

A transzfekcióhoz a PARP1-mCherry OmicsLink expressziós plazmidot használtuk. A HaCat-sejteket az előző nap ibidi 8-lyukú µ-kamrákba (ibidi GmbH, Gräfelfing, Németország) helyeztük. Két órával a transzfekció előtt a sejteket a K4 transzfekciós rendszer K4-szorzó reagensével kezeltük majd Lipofectamine 3000-rel 1:1 µg/µl arányban kevert plazmid DNS-sel (300 ng/well) inkubáltuk. A médiumot 5 órával később normál, 1/200 K4-szorzót tartalmazó táptalajra cseréltük. A sejteket mikroirradiációs kísérlethez használtuk 36-48 órával később.

Mikroirradiáció és képelemzés

A lézeres mikroirradiációt (IR) Leica TCS SP8 konfokális mikroszkóppal (Leica Microsystems, Wetzlar, Németország) végeztük a LAS X szoftver FRAP moduljának felhasználásával. A HaCat sejteket 10 µg/ml Hoechst 33342-vel együtt inkubáltuk, majd a médiumot FluoroBright-ra cseréltük, amely a vizsgált vegyületeket tartalmazta, Hoechst nélkül. A képeket Leica HC PL Apo CS 40x / NA 0,85 száraz objektívvel készítettük 99,94 µm átmérőjű lyukon 1,6 µm optikai szeletvastagsággal. A zoom tényezőt 2x-re állítottuk, és a képkockákat 400 Hz kétirányú szkenneléssel, 1024x256 px digitális felbontással készítettük. Az mCherry gerjesztésére 552 nm-es OPSL lézert használtunk. A PARP1-mCherry transzfektált sejtek mikroirradiációjához a 0,4 mW 405 nm-es dióda lézert 3,5%-os teljesítményre állítottuk, és a LAS X PointBleach funkciója segítségével 2 másodpercig sugaraztuk be a mag egy pontján. Negyven előbesugárzási képet gyűjtöttünk 328 ms-onként. Az IR után 200 képet készítettünk a besugárzás előtti időszakban használt beállításokkal.

Immunfluoreszcens festés és fluoreszcens mikroszkópia

A sejteket Cell Carrier Ultra plate-ekben (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) tenyésztettük. A sejteket az ábrákon látható módon kezeltük, majd PBS pufferrel történő mosást követően metanollal 20 percig $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on fixáltuk PAR polimer (10H klón) és PARP-1 antitestek használata esetében, vagy 4% PFA-ban fixáltuk szobahőmérsékleten 15 percig AIF és γH2AX festéshez. A sejteket ezután háromszor mostuk PBS-sel, majd 0,5% Triton-X-et tartalmazó PBS-ben permeabilizáltuk 5 percig, és 60 percig 1% BSA-t tartalmazó PBS-sel blokkoltuk. A sejteket blokkoló oldatban hígított primer antitestekkel inkubáltuk egy éjszakán át $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on, enyhe rázatás mellett. Háromszor végzett PBS-ses mosás után a sejteket 45 percig inkubáltuk a szekunder antitesttel és DAPI-val ($2\text{ }\mu\text{g/ml}$) PBS-ben. A sejteket háromszor PBS-sel mostuk, és PBS-ben tartottuk a fluoreszcens mikroszkópiáig. A képalkotást Opera Phenix rendszerrel (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) végeztük. Az összes képelemzést a Harmony szoftverrel (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) végeztük.

Comet esszé

Az alkalikus comet esszét Trevigen FLARETM (Trevigen, Gaithersburg, MD, USA) tárgylemezek felhasználásával végeztük, a gyártó utasításainak és a Kovács és mtsi. publikációban leírtaknak megfelelően (K Kovács és mtsi., 2012), néhány módosítással az alábbiak szerint: a tripszines kezeléskövetően 105 HaCat sejtet előkezeltünk DMSO-val (vivőanyag), apomorfinnal ($10\text{ }\mu\text{M}$) vagy ciklopiroxszal ($10\text{ }\mu\text{M}$) 1 órán át. H_2O_2 -dal kezeltük a sejtekhez $200\text{ }\mu\text{M}$ végkoncentrációban 10 percig. Ezután a sejteket $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on centrifugáltuk és 1 ml jéghideg PBS-ben szuszpendáltuk. A sejtszuszpenzióhoz ($40\text{ }\mu\text{l}$) $400\text{ }\mu\text{l}$ olvadt LM agarózt (1%, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$) adtunk, majd a sejtszuszpenzió-agaróz keverékből $40\text{ }\mu\text{l}$ -t azonnal egy Trevigen FLARETM tárgylemezre pipettáztuk. A tárgylemezeket $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on sötétben tartottuk 30 percig, majd hideg Lysis Solution oldatba (Trevigen, Gaithersburg, MD, USA) merítettük. Egy éjszakán át tartó lízis után a tárgylemezeket 3 x 30 percig szobahőmérsékleten elektroforézis pufferben ($0,03\text{ M NaOH}$, $2\text{ mM Na}_2\text{EDTA}$, $\text{pH} \sim 12,3$) inkubáltuk. Az elektroforézist $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on, 30 percig, 20 V -on végeztük. Miután a tárgylemezt desztillált vízben leöblítettük és semlegesítettük, a sejtmagokat $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ PI oldattal 30 percig festettük. Desztillált vízzel végzett mosást követően a tárgylemezeket szobahőmérsékleten szárítottuk, hogy a sejtek ugyanarra a síkra kerüljenek. Az elemzés

előtt egy vékony réteg olvadt 1% LM agarózt pipettáztunk a tárgylemezre a háttér fluoreszcencia csökkentése érdekében. A képeket a Leica SP8 Confocal mikroszkóppal készítettük. A képeket Open Comet szoftverrel elemeztük.

PARP1 kromatinkötési vizsgálat (PARP1 csapdázási vizsgálat)

A HaCat sejteket Cell Carrier Ultra lemezekre (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) tenyésztettük. A sejteket az ábrákban leírtak szerint kezeltük. Ezután a sejteket 0,2% Triton X-100-ban 2 percig jégen extraháltuk, metanollal -20 °C-on fixáltuk és PARP1 antitesttel festettük, a Michalena és mtsi. publikációban leírtak szerint (J Michalena és mtsi. 2018).

Kalcein dequenching esszé (intracelluláris vas-kelátképződés kimutatása)

A HaCat sejteket 250 nM kalcein-AM-mel inkubáltuk egy órán át. A sejteket kétszer mostuk 0,4 mM kalciumot és magnéziumot tartalmazó HBSS-sel, és 30 percig inkubáltuk, hogy a hasítatlan kalcein-AM diffundáljon a sejtekből. A médiumot HBSS-re cseréltük, amely 2,5 µg/ml PI-ot tartalmazott, majd a sejteket további 30 percig inkubáltuk, hogy a PI kiegyensúlyozódjon a tápközeg és a sejt belseje között. Mind a kalcein, mind a PI fluoreszcenciát kinetikailag rögzítettük. A felvétel három szakaszból állt. A kezdeti 15 perces kiegyenlítési periódus után 10 µM ciklopiroxot vagy apomorfint injektáltunk a kijelölt lyukakba a műszer injektor szivattyújával. Ezt követően a kalcein fluoreszcencia csökkentését 30 percig követtük. Végül egy harmadik fázist, amelyben 200 µM H₂O₂-t injektáltunk a kijelölt lyukakba, és annak az intracelluláris labilis vaskészletre gyakorolt hatását a kalcein fluoreszcencia változásaként figyeltük meg 45 percig.

Statisztikai analízis

Az elsődleges adatokat átlagként 3-5 független kísérlet szórásával adtuk meg. A statisztikai elemzést a GraphPad Prism 8 alkalmazásával végeztük, amint az az Eredmények c. fejezet ábra aláírásaiban szerepel. A 0,05 alatti P értékeket szignifikánsnak tekintettük.

Eredmények

A PARP-1 szerepe a polarizált makrofágok oxidatív stresszel szembeni rezisztencia kialakításában

Az M1 polarizált makrofágok fokozott rezisztenciát mutatnak H₂O₂ kezeléssel szemben

Első lépésként meghatároztuk a sejthalált kiváltó H₂O₂ koncentrációt. A makrofágok nagyfokú rezisztenciát mutattak, az 1 mM koncentrációjú H₂O₂ váltott ki szignifikáns viabilitás csökkenést az MTT esszé alapján. Ezt a koncentrációt használtuk a továbbiakban. Annak eldöntésére, hogy a különböző polarizáltságú makrofágok H₂O₂ érzékenységében van-e különbség BMDM sejteket előkezeltünk LPS-dal és IL-4-gyel 24 órán át. Ezután a sejteket H₂O₂-dal kezeltük és életképességet mértünk. Az M1 makrofágok rezisztensek voltak H₂O₂-dal szemben. Az LPS okozta védelmet a sejtporomeabilitási esszé (PI felvétel) is igazolta, valamint a sejt kondenzáció is látható volt a H₂O₂-dal kezelt sejteken, amit az LPS kezelés gátolt. A kísérletet Annexin V és PI kettős festéssel is elvégeztük, ahol nem tapasztaltunk Annexin- V egyszeresen pozitív festődést, valamint a PI felvétel már a korai órákban megtörtént, ezért az apoptotikus sejthalált kizártuk.

Sejthalált szabályozó és antioxidáns gének expressziós változása M1 polarizáció során

Az LPS antinekrotikus hatásának felderítésére qPCR mérést terveztünk, amivel sejthalál és antioxidáns gének expresszióját vizsgáltuk. Az apoptózis markerek közül BCL2-antagonist/killer 1-et (Bak1) és a kaszpáz-1-at (Casp3) vizsgáltuk melyek nem változtak, míg a parthanatos markerei (Parp1 és Aif) szignifikánsan csökkentek. A Parp-1 expressziója fehérje szinten is csökkent, amit Western blot kísérlettel igazoltunk. A H₂O₂-ot közvetlenül katalizáló kataláz mellett a NADH/GSH-kapcsolt enzimek közül a thiredoxin-reduktáz-1 (Txnred-1), peroxiredoxin (Prxd1), glutation reduktáz (Gsr) is, illetve a szekunder szuperoxid eltávolítását végző szuperoxid-dizmutázok (Sod1 és Sod2) vizsgálatát is elvégeztük. A kataláz enzim expressziója az LPS kezelés hatására csökkent, ugyanez volt elmondható a Sod1-ről is. A Txnrd1, Prxd1 és Gsr expressziója szignifikánsan emelkedett LPS kezelés hatására, a legnagyobb emelkedést a Sod2 expressziójában tapasztaltuk.

Csökkent PARiláció és megtartott NAD⁺ szint M1 makrofágokban

A PARP-1 aktivitását a PAR polimer detektálásával végeztük. PARP-1 KO BMDM sejteken H₂O₂ kezelés hatására nem volt detektálható a polimer, így igazoltuk, hogy a PARilációért a PARP-1 a felelős. M1 makrofágokban pedig csökkent PARP aktivitást detektáltunk H₂O₂ kezelés során. PARP túlaktiváció során a sejtek NAD⁺ készlete teljesen kimerül. Az intracelluláris NAD⁺ szint a H₂O₂ kezelés hatására szinte nullára csökkent míg PARP-1 KO és LPS előkezelt sejtekben szignifikánsan magasabb volt a szintje. Annak igazolására, hogy a PARP-1 mediálja a sejthalált PI esszét végeztünk. A PARP-1 KO sejtekben késleltetve jelent meg a nekrotikus populáció. Az LPS előkezelt sejtek azonban rezisztensek voltak a H₂O₂-ra, így feltételeztük, hogy más mechanizmusok is részt vehetnek a rezisztencia kialakulásában.

AIF-től független parthanatos gátlása M1 makrofágokban

A parthanatos egyik markere a sejtmagi kondenzáció. Fluoreszcens mikroszkópiával H₂O₂ kezelés hatására megfigyelhető volt, amit az LPS és PJ34 előkezelés is gátolt. A parthanatos másik kanonikus markere az AIF transzlokációja a mitokondriumból a sejtmagba. Konfokális mikroszkópiával nem sikerült az AIF magi jelenlétét igazolnunk így egy AIF-től független parthanatosról beszélhetünk.

M1 makrofágok metabolizmusa az aerob glikolízis irányába tolódik, közben a mitokondriális aktivitás csökken az ATP szint megtartásával

H₂O₂ kezelés hatására mitokondriális diszfunkció következik be és így nem képes az ATP szintézisére. A sejtek metabolikus állapotának mérésére Seahorse analízist végeztünk. A bazális respiráció H₂O₂ kezelés hatására szignifikánsan csökkent, amit nem befolyásol az LPS és a PJ34 előkezelés. Ugyanez mondható el az ATP-kapcsolt mitokondriális aktivitásról is. Legdrasztikusabb csökkenést a H₂O₂ kezelés után a maximális respirációs és a tartalék kapacitásban mértük, amellyel szemben a PJ34 előkezelés védett. Az LPS előkezelés már a kontroll mintákban is drasztikusan csökkentette ezeket a paramétereket így értelemszerűen a H₂O₂ kezelés hatását nem tudta ellensúlyozni úgy, mint a PARP gátlás. Az LPS előkezelés azonban szignifikánsan emelte a glikolízist és a proton produkciós rátát is. A sejtek intracelluláris ATP szintjének mérésére ATP esszét használtunk. Az LPS és a PJ34

előkezelt sejtekben szignifikánsan magasabb volt az ATP szint a H₂O₂-dal kezelt mintákhoz képest.

Citoprotektív molekulák azonosítása HCS módszerrel

Citoprotektív molekulák szűrésére alkalmas HCS módszer beállítása

A szűréshez a HaCat sejtvonalat választottuk modellnek, mivel a PARP-1 által közvetített sejthalál jól jellemzett ezen a sejtvonalon, és citoprotektivitás szempontjából is releváns modell. A sejthalál detektálására a sejtmembrán permeabilitás mérésére alkalmas Sytox Green festéket választottuk. A mérést Opera Phenix High Content Screening System készüléken végeztük a képanalízis pedig Harmony szoftverrel történt. A kísérleti körülmények beállításához több H₂O₂ koncentrációt és időpontot is kipróbáltunk. A szűréshez a legmegfelelőbbnek a 200 µM H₂O₂ kezelést találtuk 8 órán át. A beállított esszével leszűrtünk egy az FDA által jóváhagyott 10 plate-ből álló molekulakönyvtárat. A Z-faktor minden plate esetében nagyobb volt, mint 0,5, ami HCS-nél kiváló értéknek számít. Az 50 % fölötti citoprotektivitást elérő molekulákat mint "hit" vegyületek definiáltuk. "Hit" vegyületnek 20 molekula felelt meg, amiből az irodalmi áttekintés után 7-et tartottunk meg további vizsgálatra. A validálást a HCS körülményeinek megfelelően végeztük, de már 3 ismétlésben. Mind a 7 molekula citoprotektívnek bizonyult.

A ciclopirox és az apomorfin PARP gátló molekulák

A hét molekula közül szerettük volna kiválasztani a PARP gátlókat, ezért PAR immunfluoreszcenciát végeztünk. A 7 szer közül mindössze a ciclopirox és az apomorfin gátolták a PARilációt 10 perces H₂O₂ kezelést követően.

Annak kiderítésére, hogy ezek a szerek a PARP-1 enzimet gátolják-e, esetleg a PARP-1 DNS-sel való kölcsönhatását befolyásolják-e, vagy attól proximálisan hatnak, PARP-1 kromatin kötés esszét végeztünk. Bizonyos PARP gátlószerek, például az olaparib csapdába ejtik a PARP-1-et a DNS törés helyén és PARP-1-DNS komplexet hoznak létre. HaCat sejteket előkezeltünk olaparibbal és PJ34-gyel (nem okoz PARP-1 csapdázást), illetve ciclopirox-szal és apomorfinnal. 60 perces H₂O₂ kezelést követően a PARP-1 kromatin kötése emelkedett, amit a ciclopirox és az apomorfin is csökkentettek. Az olaparib tovább fokozta a PARP-1 DNS kötődését H₂O₂ kezelést követően, amit a két szer ugyancsak csökkentett. A PJ34 nem befolyásolta a PARP-1

kromatin kötődését. Annak eldöntésére, hogy a szerek a PARP-1 kromatinhoz való kötődését befolyásolják-e vagy más mechanizmussal gátolnak lézeres mikroirradiációs kísérletet végeztünk. A PARP-1 megjelenését időben követtük a mikroirradiáció területén, a szerek nem befolyásolták a PARP-1 megjelenését a besugárzott területen, tehát nem a PARP-1 és a DNS közötti kölcsönhatást befolyásolják, hanem a ROS által indukált DNS károsodást.

A ciclopirox és az apomorfin gátolják a H₂O₂ által indukált genotoxicitást

A ciclopirox és az apomorfin is csökkentette a 10 perces H₂O₂ kezelés által indukált DNS törést (comet esszé). H₂O₂ kezelés hatására a korai szakaszban a sérült populáció magas arányban volt jelen, és az idő előrehaladtával az erősen sérült populáció is megjelent. A ciclopirox és az apomorfin szignifikánsan csökkentette a sérült és erősen sérült populáció arányát. A comet esszé és a mikroszkópos felvételek alapján elmondhatjuk, hogy ez a két szer véd a H₂O₂ genotoxicitása ellen.

A ciclopirox és apomorfin Fe²⁺ kelátorokként hatnak

Mindkét szert jól tudtuk jellemezni a sejthalál fenotipizálásával és a PARP-1 függő nekrozis mechanizmusának vizsgálatán keresztül. A H₂O₂ által indukált sejthalál fontos lépése a hidroxil gyök képződése Fenton reakcióval. Az így keletkezett hidroxil gyökök nagymértékben képesek károsítani a DNS-t, így felmerült a kérdés, hogy ezek a szerek a Fenton reakció gátlásán keresztül fejtik ki a H₂O₂ által indukált genotoxicitás elleni védelmüket. Ennek tisztázására calcein "dequenching" esszét végeztünk. A H₂O₂ kezelés hatására a fluoreszcencia rohamosan csökkent, amit a szerek képesek voltak dequenchelni.

Diszkusszió

A PARP-1 szerepe a polarizált makrofágok oxidatív stresszel szembeni rezisztenciájának kialakulásában

Az aktivált makrofágok a szervezet egyik fő ROS/RNS termelői. Túlélésükhöz szükségesek azok a mechanizmusok, amelyek megvédik őket. Munkánk során azt vizsgáltuk, hogy polarizációjuk során milyen változásokon mennek át, amelyek a túlélésüket szolgálják. Az M1 makrofágok rezisztensek voltak H₂O₂-dal szemben, míg M2 társaik nem. A sejtmembrán permeabilizálódása azt mutatta, hogy a sejthalál nekrosis volt. A polarizáció során a parthanatos két kulcs molekulájának (PARP-1 és AIF) a csökkenését figyeltük meg mRNS szinten. A PARP-1 fehérje szinten is szignifikáns csökkenést mutatott LPS kezelés hatására. A PARP-1 fehérje szintjének csökkenését leírták konfluens sejt kultúrában és differenciálódó izom sejtekben is. A PARP-1 expressziójának csökkenése korrelál az oxidatív stressz elleni rezisztencia növekedésével ezekben a modellekben is. Több antioxidáns gén (Txnrd1, Prxd1, Gsr) mRNS szintje is szignifikánsan emelkedett valamint legnagyobb mértékben a Sod2 is, amely a mitokondriális izoformája az enzimnek. M1 makrofágokban H₂O₂ kezelés hatására csökkent PARilációt és megtartott NAD⁺ szintet mértünk. PARP-1 KO sejteken is elvégeztük a kísérletet, ami igazolta, hogy a PARilációért és a NAD⁺ felhasználásáért a PARP-1 a felelős. Sejthalál esszéivel igazoltuk a PARP-1 szabályozó szerepét H₂O₂ kezelést követően, azonban míg a PARP-1 KO sejtek egy lassabb kinetikával haltak meg, az LPS előkezelt sejtek rezisztensek voltak H₂O₂-dal szemben. Ebből arra következtettünk, hogy a PARP-1 csökkenésén kívül más mechanizmusok is részt vesznek a rezisztencia kialakulásában például a fentebb említett antioxidáns gének emelkedett expressziója. A parthanatos másik fontos résztvevője az AIF ami transzlokálódik a mitokondriumból a sejtmagba. Modellünkben nem sikerült magi AIF jelenlétet igazolni. A sejtmag kondenzációja megtörtént H₂O₂ kezelés hatására, amit az LPS előkezelés meggátolt. A mitokondrium központi szerepet tölt be a sejt életében. Az anyagcserében betöltött központi szerepe révén képes a sejtek érzékenységét szabályozni különböző stressz helyzetekben. Az oxidatív foszforiláció csökkenését és az aerob glikolízis növekedését tapasztaltuk LPS kezelt makrofágokban. Tumor sejtek kemorezisztenciáját növeli a mitokondriális aktivitás csökkenése és a glikolízis emelkedése (Warburg hatás). Ez a metabolikus váltás segítheti a makrofágok túlélését

az oxidatív stresszel szemben, mivel a csökkent mitokondriális aktivitás csökkenti a szekunder ROS termelés lehetőségét.

Összességében elmondhatjuk, hogy az M1 makrofágok H_2O_2 -dal szembeni rezisztenciájának kialakulását egy több lépcsős folyamattal magyarázhatjuk. A PARP-1 expressziójának és aktiválódásának csökkenése, az antioxidáns enzimek szintjének emelkedése és a mitokondriális aktivitás csökkenése egyaránt hozzájárulnak a védelem kialakulásához.

Citoprotektív molekulák azonosítása HCS módszerrel

A PARP inhibitorok nem csak a tumorok elleni küzdelemben, de az oxidatív stressz által kiváltott sejthalálban is potenciális gyógyszerjelöltek lehetnek. Munkánk során beállítottunk egy citoprotektív molekulák szűrésére alkalmas HCS módszert. A szűrést egy FDA által jóváhagyott molekulakönyvtáron végeztük, amiben 774 molekulát vizsgáltunk. Két molekula (ciklopirox és apomorfin) bizonyult PARP gátlónak, ezért ezt a két molekulát vizsgáltuk tovább. Mindkét molekula gátolta a PARP-1 DNS-hez való kötődését H_2O_2 kezelés hatására, azonban nem befolyásolta a mikroirradiáció és az MNNG által kiváltott DNS törés indukálta PARP-1 kötődést. Ebből arra következtettünk, hogy a ROS indukálta DNS károsodás keletkezését gátolják ezek a szerek. Az egyszálú és kétszálú DNS törések mértékét csökkentették a vegyületek így bizonyosságot nyertünk, hogy a PARP-1 aktivációjától proximálisan hatnak. A ciklopirox és apomorfin vas keláló képességét vizsgálva azt találtuk, hogy mindkét szer képes volt megkötni az intracelluláris szabad Fe^{2+} molekulákat.

Elmondhatjuk, hogy sikeresen beállítottunk egy citoprotektív molekulák szűrésére alkalmas HCS módszert és a szűrés eredményeként több potenciális gyógyszermolekulát azonosítottunk. Két molekula, a ciklopirox és az apomorfin védő mechanizmusát jellemeztük, mégpedig, hogy a Fenton reakció gátlásával már a PARP aktivációtól proximálisan fejtik ki védő hatásukat. Érdeemes lehet elgondolkodni ennek a két szernek az oxidatív stressz elleni felhasználásán a jövőben.

Konklúziók

A PARP-1 szerepe a polarizált makrofágok oxidatív stresszel szembeni rezisztenciájának kialakulásában

- 1) LPS-sel előkezelt makrofágok rezisztensek H₂O₂-dal szemben.
- 2) Antioxidáns és sejthalál gének expressziójának változása LPS-sel kezelt makrofágokban.
- 3) Csökkent PARP aktivitás és megtartott NAD⁺ szint M1 makrofágokban H₂O₂ kezelés során.
- 4) AIF-től független parthanatos H₂O₂ kezelés során.
- 5) M1 makrofágok aerob glikolízisből nyerik az energiát és csökkent mitokondriális aktivitást mutatnak.

Citoprotektív molekulák azonosítása HCS módszerrel

- 1) Beállítottunk egy citoprotektív molekulák szűrésére alkalmas HCS módszert.
- 2) A 20 “hit” vegyületből 7 volt eddig még ismeretlen citoprotektív molekula, amelyeket sikerült validálnunk.
- 3) A 7 vizsgált molekulából a ciclopirox és az apomorfín PARP gátlók.
- 4) A ciclopirox és apomorfín gátolják a H₂O₂ által okozott genotoxicitást.
- 5) A ciclopirox és apomorfín Fe²⁺ kelátorok, így gátolják a Fenton reakció által kiváltott gyöktermelést.

Összefoglalás

A poli-ADP-ribozilációnak központi szerepe van az oxidatív stressz által kiváltott sejthalál szabályozásában. Oxidatív stressz során gyulladás és szöveti károsodás és szerv diszfunkció lép fel. Ezen folyamatok jobb megértése segíthet minket az olyan betegségek hatékonyabb kezelésében, mint a diabétesz, atherosclerosis vagy az iszkémia/reperfúzió.

Az oxidatív stresszt okozó ROS és RNS molekulák fő forrásai a makrofágok. Túlélésükhöz adaptálódniuk kell a magas ROS tartalmú környezethez. Munkánk során felderítettük, hogy a gyulladásos makrofágok milyen molekuláris mechanizmusokat fejlesztettek ki ennek érdekében. LPS előkezelt makrofágok rezisztensek voltak H_2O_2 kezelésre. A védelem kialakulásáért három fő mechanizmus a felelős. PARP-1 expressziójának és aktivációjának csökkenésével képesek elkerülni a NAD^+ szint drasztikus csökkenését és a metabolikus katasztrófát H_2O_2 kezelés során. A védelem egy másik mechanizmusa az antioxidáns gének emelkedett expressziója. Végül a sejtek egy metabolikus változással is alkalmazkodnak az oxidatív stresszhez ahol a mitokondriális aktivitás csökken, és emelkedik az aerob glikolízis (Warburg hatás).

A gyógyszerfejlesztés különösen fontos a modern orvostudományban. Célul tűztük ki olyan sejtvédő molekulák azonosítását, amelyek képesek a PARP-1 által szabályozott nekrozis csökkentésére. Az FDA által jóváhagyott molekulakönyvtárban 7 citoprotektív molekulát azonosítottunk és validáltunk HCS módszerrel. A ciclopiroxot és az apomorfint azonosítottuk, mint PARP gátlókat. Az említett két szer nem közvetlenül a PARP-1 enzimet gátolták, hanem attól proximálisan már a DNS károsodás kialakulását akadályozták meg. Mind a két szer kelátorként funkcionál, és a Fe^{2+} által katalizált Fenton reakció gátlásával védi a sejteket.

Összegzésként elmondható, hogy a PARP-1 központi szerepet tölt be oxidatív stressz által kiváltott betegségekben. Gátlásával elkerülhető a sejthalál, ezért fontos a PARP-1 szabályzó szerepének jobb megismerése és olyan molekulák fejlesztése, amelyek képesek az enzim által szabályozott útvonalat gátolni. A PARP gátlók fejlesztése ígéretes megoldásnak tűnik nem csak a tumorok elleni küzdelemben, hanem egyéb patológias folyamatok kezelésében is.

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/82/2021.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Regdon Zsolt
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Regdon, Z.**, Demény, M. Á., Kovács, K., Hajnádý, Z., Nagy-Pénzes, M., Bakondi, E., Kiss, A., Hegedűs, C., Virág, L.: High-Content Screening identifies inhibitors of oxidative stress-induced parthanatos: cytoprotective and anti-inflammatory effects of ciclopirox. *Br. J. Pharmacol.* 2021, 1-19, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/bph.15344>
IF: 7.73 (2019)
2. **Regdon, Z.**, Robaszkiewicz, A., Kovács, K., Rygielska, Ż., Hegedűs, C., Bodoor, K., Szabó, É., Virág, L.: LPS protects macrophages from AIF-independent parthanatos by downregulation of PARP1 expression, induction of SOD2 expression, and a metabolic shift to aerobic glycolysis. *Free Radic. Biol. Med.* 131, 184-196, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.11.034>
IF: 6.17

További közlemények

3. Douida, A., Batista, F., Botó, P., **Regdon, Z.**, Robaszkiewicz, A., Tar, K.: Cells Lacking PA200 Adapt to Mitochondrial Dysfunction by Enhancing Glycolysis via Distinct Opa1 Processing. *Int. J. Mol. Sci.* 22 (4), 1-22, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms22041629>
IF: 4.556 (2019)
4. Kiss, A., Ráduly, A. P., **Regdon, Z.**, Polgár, Z., Tarapcsák, S., Sturniolo, I., El-Hamoly, T., Virág, L., Hegedűs, C.: Targeting nuclear NAD⁺ synthesis inhibits DNA repair, impairs metabolic adaptation increases chemosensitivity of U-2OS osteosarcoma cells. *Cancers (Basel)*. 12 (5), 1-27, 2020.
IF: 6.126 (2019)





5. Aladdin, A., Király, R., Botó, P., **Regdon, Z.**, Tar, K.: Juvenile Huntington's disease skin fibroblasts respond with elevated parkin level and increased proteasome activity as a potential mechanism to counterbalance the pathological consequences of mutant huntingtin protein. *Int. J. Mol. Sci.* 20 (5338), 1-39, 2019.
IF: 4.556
6. Tokarz, P., Poszaj, T., **Regdon, Z.**, Virág, L., Robaszkievicz, A.: PARP1-LSD1 functional interplay controls transcription of SOD2 that protects human pro-inflammatory macrophages from death under an oxidative condition. *Free Radic. Biol. Med.* 131, 218-224, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.12.004>
IF: 6.17
7. Virág, L., Jaén, R. I., **Regdon, Z.**, Boscá, L., Prieto, P.: Self-defense of macrophages against oxidative injury: fighting for their own survival. *Redox Biol.* 26, 1-9, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2019.101261>
IF: 9.986
8. Bakondi, E., Singh, S. B., Hajnádý, Z., Nagy-Pénzes, M., **Regdon, Z.**, Kovács, K., Hegedűs, C., Madácsy, T., Maléth, J., Hegyi, P., Demény, M. Á., Nagy, T., Kéki, S., Szabó, É., Virág, L.: Spilanthol Inhibits Inflammatory Transcription Factors and iNOS Expression in Macrophages and Exerts Anti-inflammatory Effects in Dermatitis and Pancreatitis. *Int. J. Mol. Sci.* 20 (17), 1-18, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms20174308>
IF: 4.556
9. Robaszkievicz, A., Wisnik, E., **Regdon, Z.**, Chmielewska, K., Virág, L.: PARP1 facilitates EP300 recruitment to the promoters of the subset of RBL2-dependent genes. *Biochim. Biophys. Acta. Gene Regul. Mech.* 1861 (1), 41-53, 2018.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2017.12.001>
IF: 4.599
10. Hegedűs, C., Kovács, K., Polgár, Z., **Regdon, Z.**, Szabó, É., Robaszkievicz, A., Forman, H. J., Martner, A., Virág, L.: Redox control of cancer cell destruction. *Redox Biol.* 16, 59-74, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2018.01.015>
IF: 7.793
11. Bodnár, E., Bakondi, E., Kovács, K., Hegedűs, C., Lakatos, P., Robaszkievicz, A., **Regdon, Z.**, Virág, L., Szabó, É.: Redox Profiling Reveals Clear Differences between Molecular Patterns of Wound Fluids from Acute and Chronic Wounds. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2018, 1-12, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2018/5286785>
IF: 4.868





12. Kovács, K., Erdélyi, K., Hegedűs, C., Lakatos, P., **Regdon, Z.**, Bai, P., Haskó, G., Szabó, É.,
Virág, L.: Poly(ADP-ribose)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

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 72,381

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapján szolgáló közleményekre):
13,9**

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, 2021.03.08.



A munkát a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal, a GINOP-2.3.2-15-2016-00020 TUMORDNS, a GINOP-2.3.2-15-2016-00048-STAYALIVE, valamint az OTKA K132193 pályázatok támogatták.