

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

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

Regdon Zsolt

Témavezető: Prof. Dr. Virág László



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2021

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke.....	5
Bevezetés.....	9
Irodalmi áttekintés.....	10
A gyulladás.....	10
A gyulladásos válasz folyamata	10
A gyulladás mintázat felismerése.....	11
A gyulladás szenzorai és szignálútvonalai	11
Gyulladásos markerek	12
A gyulladásban résztvevő sejttípusok	12
A gyulladás megszűnése.....	13
Makrofág polarizáció	13
Az oxidatív stress és a makrofágok szerepe a gyöktermelésben	14
Az oxidatív stress által kiváltott sejthalál és lehetséges mechanizmusai	16
A poli-ADP-riboziláció	19
A poli(ADP-ribóz) polimeráz 1 enzim.....	19
A poli-ADP-riboziláció metabolizmusa	20
A PARP-1 szerepe a DNS hibajavításban	21
A PARP-1 szerepe a sejthalálban.....	22
Célkitűzés.....	24
Anyagok és módszerek.....	25
Anyagok	25
Módszerek	26
A csontvelőből származó makrofágok (BMDM) izolálása, differenciálása és polarizációja.....	26
HaCaT sejtkultúra.....	26
Sejt életképesség vizsgálata (MTT esszé)	26
A sejtkonfluencia és a propidium-jodid felvétel értékelése.....	27
A sejthalál „high content” analízise (HCA)	27
Annexin V-propidium-jodid kettős festés	27

RNS izolálás, reverz transzkripció és kvantitatív valós idejű PCR	27
SDS-PAGE és Western blot	28
NAD ⁺ és ATP esszé.....	29
Az extracelluláris acidifikáció és az oxigén fogyasztási ráta mérése	29
A timocita sejthalál elemzése áramlási citometriával.....	29
PARP1-mCherry transzfekciója HaCaT sejtekbe.....	30
Mikroirradiáció és képelemzés.....	30
Immunfluoreszcens festés és fluoreszcens mikroszkópia	31
Comet esszé.....	31
PARP1 kromatinkötési vizsgálat (PARP1 csapdázási vizsgálat)	32
Kalcein dequenching esszé (intracelluláris vas-kelátképződés kimutatása).....	32
Statisztikai analízis	32
Eredmények.....	33
A PARP-1 szerepe a polarizált makrofágok oxidatív stresszel szembeni rezisztencia kialakításában	33
.....	33
Az M1 polarizált makrofágok fokozott rezisztenciát mutatnak H ₂ O ₂ kezeléssel szemben	33
Sejthalált szabályozó és antioxidáns gének expressziós változása M1 polarizáció során.....	37
Csökkentett PARiláció és megtartott NAD ⁺ szint M1 makrofágokban	39
AIF független parthanatos gátlása M1 makrofágokban	42
M1 makrofágok metabolizmusa az aerob glikolízis irányába tolódik, közben a mitokondriális aktivitás csökken az ATP szint megtartásával.....	44
Citoprotektív molekulák azonosítása HCS módszerrel	47
Citoprotektív molekulák szűrésére alkalmas HCS módszer beállítása.....	47
A HCS eredménye.....	49
“Hit” vegyületek validálása.....	50
A ciclopirox és az apomorfin PARP gátló molekulák.....	51
A ciclopirox és az apomorfin citoprotektív hatásának farmakokinetikai vizsgálata HaCaT sejteken és egér timocitákon.....	53
A ciclopirox és az apomorfin gátolják a ROS által indukált PARP-1 kromatin kötődést.....	55
A ciclopirox és az apomorfin gátolják a H ₂ O ₂ indukálta genotoxicitást	58

A ciclopirox és az apomorfin Fe ²⁺ kelátorok.....	59
Diszkusszió.....	61
A PARP-1 szerepe a polarizált makrofágok oxidatív stresszel szembeni rezisztenciájának kialakulásában	61
Citoprotektív molekulák azonosítása HCS módszerrel	65
Összefoglalás.....	68
Summary	69
Tárgyszavak / Key words	70
Köszönetnyilvánítás	71
Irodalomjegyzék	72
Publikációs lista.....	88
Függelék	91

Rövidítések jegyzéke

·OH	hidroxil gyök
AIF	apoptózis indukáló faktor
AM	acetoximetil
ANOVA	varianciaanalízis (<i>analysis of variance</i>)
ARH3	ADP-ribozilhidroláz 3
BER	bázis excíziós repair
BMDM	csontvelőből differenciált makrofágok (<i>bone marrow derived macrophages</i>)
BRCT	BRCA1 C terminus
BSA	szarvasmarha szérum albumin (<i>bovine serum albumin</i>)
CAT	kataláz (<i>catalase</i>)
CD206	mannóz receptor
COPD	krónikus obstruktív tüdőbetegség (<i>chronic obstructive pulmonary disease</i>)
COX-2	ciklooxygenáz-2
CRP	c-reaktív protein
DAMPs	sérülés asszociált molekuláris mintázatok (<i>damage-associated molecular pattern</i>)
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol (<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>)
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	dimetil-szulfoxid
DSB	kettősszálú DNS törés (<i>double stranded DNA break</i>)
ECAR	extracelluláris savanyodási sebesség (<i>extracellular acidification rate</i>)
ER	endoplazmás retikulum
FBS	fötális szarvasmarha szérum (<i>fetal bovine serum</i>)

FCCP	karbonil-cianid-4-(trifluor-metoxi)-fenil-hidrazon (<i>carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone</i>)
FDA	Élelmiszer- és Gyógyszerfelügyelet (<i>Food and Drug Administration</i>)
FITC	fluoreszcein-izotiocianát (<i>fluorescein isothiocyanate</i>)
GR	glutation reduktáz
HBSS	Hank's Balanced sóoldat (<i>Hank's Balanced Salt solution</i>)
HCA	„high content” analízis (<i>high-content analysis</i>)
HCS	„high content” szűrés (<i>high-content screening</i>)
HDR	homológ rekombináció (<i>homology directed repair</i>)
HMGB-1	„High mobility group box 1”
IFN γ	interferon γ
IL	interleukin
iNOS	indukálható nitrogén oxid szintáz
IP ₃	inozitol-1,4,5-trifoszfát
IR	lézeres mikroirradiáció (<i>laser microirradiation</i>)
JAK	membrán asszociált Janus kináz (<i>Janus kinase</i>)
KO	„knockout”
LM agaróz	alacsony olvadáspontú agaróz (<i>low melting point agarose</i>)
LPS	lipopoliszacharid
MAPK	mitogén aktivált fehérje kináz (<i>mitogen-activated protein kinase</i>)
M-CSF	makrofág kolonia stimuláló faktor (<i>macrophage stimulating factor</i>)
MFI	átlagos fluoreszcencia intenzitás (<i>high mean fluorescence intensity</i>)
MHC	fő hisztokompatibilitási komplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
MIF	migrációt gátló faktor (<i>migration inhibitory factor</i>)

MLKL	vegyes vonal-kináz doménszerű fehérje (<i>mixed lineage kinase domain like pseudokinase</i>)
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid
NADPH	nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát
NF- κ B	nukleáris-faktor kappa B
NHEJ	nem homológ DNS-vég összekapcsolás (<i>non-homologous end joining</i>)
NLS	nukleáris lokalizációs szignál
O ₂ ⁻	szuperoxid anion
OCR	oxigénfogyasztási sebesség (<i>oxygen consumption rate</i>)
ONOO ⁻	peroxinitrit
PAMPs	patogén asszociált molekuláris mintázatok (<i>pathogen-associated molecular pattern</i>)
PAR	poli-ADP-ribóz
PARG	poli(ADP-ribóz) glikohidroláz
PARP	poli(ADP-ribóz) polimeráz
PBS	foszfáttal pufferelt sóoldat (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	polimeráz-lánreakció (<i>polymerase chain reaction</i>)
PFA	paraformaldehid
PI	propidium-jodid (<i>propidium iodide</i>)
PMSF	fenilmetilszulfonil-fluorid (<i>phenylmethylsulfonyl fluoride</i>)
PPR	proton produkciós ráta
PRR	mintázat felismerő receptor (<i>pattern recognition receptors</i>)
qPCR	kvantitatív polimeráz-lánreakció (<i>quantitative polymerase chain reaction</i>)
RIPK	receptor-kölcsönhatásban lévő szerin/teonin protein kináz (<i>receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1</i>)

RNS	reaktív nitrogén intermedier (<i>reactive nitrogen species</i>)
ROS	reaktív oxigén intermedier (<i>reactive oxygen species</i>)
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute 1640 médium
SDS-PAGE	nátrium-dodecil-szulfát-poliakrilamid gélelektroforézis (<i>sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
SOD	szuperoxid dizmutáz
SSB	egyszálú DNS törés (<i>single-stranded break</i>)
STAT	szignál transzducer és transzkripció aktivátor (<i>signal transducer and activator of transcription</i>)
TBST	Tris-sel pufferelt sóoldat TWEEN [®] -20-szal kiegészítve (<i>Tris-buffered saline with TWEEN[®]-20 detergent</i>)
TLR	toll like receptor
TNFR	tumor nekrosis faktor receptor
TNF α	tumor nekrosis faktor α
WT	vad típus (<i>wilde type</i>)
XRCC1	„X-ray repair cross-complementing protein 1”

Bevezetés

A gyulladás a test válasza a sejtet vagy szövetet ért sérlülésre, amely lehet valamilyen toxin, patogén, vagy fizikai sérlülés. Az akut gyulladás egy rövid folyamat, amely során a sérlült szövet begyógyul. A krónikus gyulladás ezzel szemben egy hosszú, regulálatlan folyamat, amely szöveti sérlüléshez vezethet. A krónikus gyulladást összefüggésbe hozták olyan betegségekkel, mint például az allergia, atheroszklerózis, rák, vagy az autoimmun betegségek (Weiss, 2018). A gyulladás okozhat oxidatív stresszt az immunsejtek aktiválódása révén (Hardbower és mtsai., 2013), ahogy oxidatív stressz is okozhat gyulladást (Biswas, 2016). Gyulladás során az immunsejtek aktiválódásának következménye lehet a sejthalál (apoptózis, nekroptózis) (Peltzer és Walczak, 2019).

A poli-ADP-riboziláció (PARiláció) a sejt válasza a DNS károsodásra, amely a poli(ADP-ribóz) polimerázok (PARP) által katalizált reakció. A PARP-1 kötődik a DNS károsodás helyére és PAR polimert hoz létre, amely szignálmolekulaként funkcionál a DNS hibajavító enzimek számára. Erős DNS károsodás hatására a PARP-1 túlaktivációja következik be, amely a nikotinamid adenin dinukleotid (NAD⁺) és ATP depléciójához vezet (Henning és mtsai., 2018). Oxidatív stressz során a termelődött reaktív oxigén gyökök (ROS) képesek aktiválni a PARP-1-et, majd egy nekrotikus szerű sejthalált indukálni (Cuzzocrea, 2005).

A makrofágok a velszületett és adaptív immunrendszer fagocita és antigén prezentáló sejtjei, aktivációjuk során képesek ROS termelésére és ez által a patogén eliminálására (Li és mtsai., 2015). A makrofágok magas rezisztenciát mutatnak a ROS-sal szemben, azonban halálukat leírták olyan betegségekben mint a vírusfertőzés, tuberkulózis vagy a szepszis (Robinson és tmsai., 2019).

A PARP-1-nek fontos szerepe a DNS javításában, a sejthalál és a gyulladás szabályozásában. PARP inhibitorokat sikeresen alkalmaztak daganatos megbetegedések kezelésére, továbbá túlzott PARP aktivációt összefüggésbe hoztak olyan gyulladáso megbetegedésekkel, mint az atheroszklerózis, neurodegeneratív betegségek vagy az asztma (Pazzaglia és Pioli, 2019). Láthatjuk, hogy a PARilációnak központi szerepe van a sejthalál és a gyulladás szabályozásában, ezért fontos ennek a biológiai folyamatnak a minél jobb megismerése. PARP gátlószereket már sikeresen alkalmaztak daganatterápiában ezért más betegségmodellekben való megsimerésük új terápiás lehetőségeket nyithatnak meg. Ebben az értekezésben is a PARP-1 által indukált sejthalál szerepét vizsgáltam oxidatív stressz során.

Irodalmi áttekintés

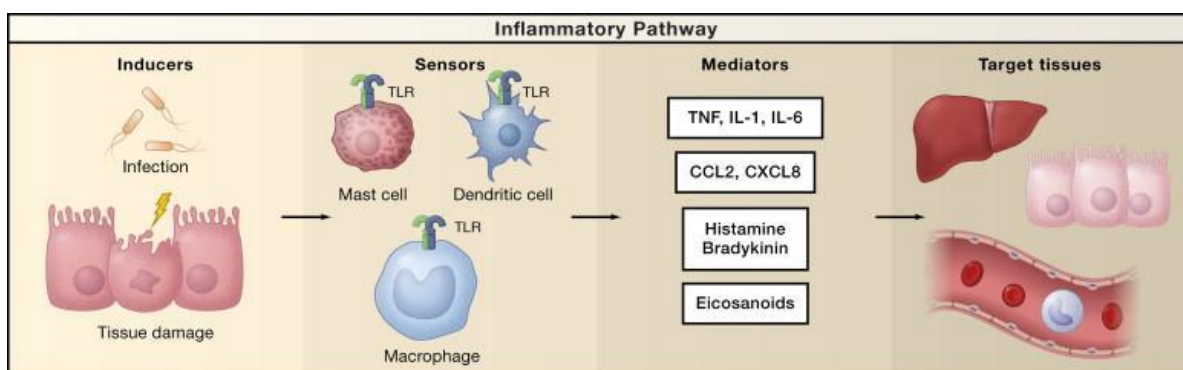
A gyulladás

A gyulladás folyamatát már az ókori egyiptomiak és görögök is leírták. Hippokratész (i. e. 460 – i. e. 377 körül) az időszámításunk előtti 5. században felismerte, hogy a gyulladás a sérülés utáni gyógyulás első jele. Aulus Cornelius Celsus (i. e. 30 - i. u. 45) római író feljegyezte a gyulladás négy jelét: vörösség, melegség, duzzanat és fájdalom. Az ötödik tünet felismerését, a funkció kiesését Galenosz (i. u. 129 - i. u. 200), római orvos nevéhez köthetjük (Granger és Senchenkova, 2010).

Jelenlegi ismereteink szerint a gyulladás az immunrendszer válasza a testet ért káros hatásokra, amelyek lehetnek patogének, sejsérülés, toxinok hatása vagy éppen valamilyen sugárzás. A gyulladás feladata a sérülést okozó ágens eliminálása és a gyógyulási folyamatok beindítása. A gyulladás egy szigorúan szabályozott folyamat, ugyanakkor a kontrollálatlan akut gyulladás krónikussá is alakulhat, és szerv diszfunkcióhoz vezethet (Chen és mtsai, 2018). A fő folyamatok, amelyekkel a gyulladás jellemezhető: emelkedett véráramlás, sejtmetabolizmus, vazodilatáció, mediátorok felszabadulása, ödéma és immunsejtek infiltrációja a gyulladt területre (Ferrero-Miliani és mtsai, 2007).

A gyulladással kapcsolatos válasz folyamata

Egy tipikus gyulladási folyamat négy összetevőből áll (1. ábra): gyulladáskiváltó stimulusok, az ezek detektálására alkalmas szenzorok, a gyulladást közvetítő mediátorok és ezek célpontjává szolgáló sejtek és szövetek (Medzhitov és mtsai., 2010).



1. ábra: A gyulladással résztvevő komponensek. A gyulladással kapcsolatos folyamat lépései: az inducerek, amely lehet fertőzés vagy szövetkárosodás, ezt követi a gyulladást érzékelő sejtek

aktivációja (szenzorok). A gyulladást jelet a mediátorok közvetítik, melyeknek célpontjai a különböző szövetek és sejtek (Lon és mtsai., 2012).

A gyulladási mintázat felismerése

A gyulladási mintázatokat két típusba tudjuk sorolni, az egyik a patogén asszociált molekuláris mintázatok (PAMPs) (Leavy, 2015), a másik a sérülés asszociált molekuláris mintázat (DAMPs). Ezeket a mintázat felismerő receptorok (PRR) ismerik fel és indítanak el egy szignálútvonalat, aminek következtében a szervezet válaszol a patogénre illetve a sérülésre (Roh és Sohn, 2018).

A gyulladás szenzorai és szignálútvonalai

A PRR-ek által elindított szignálútvonalak szabályozzák a különböző mediátorok és transzkripciós faktorok működését, ezáltal a homeosztázis és a patogének elleni védelem szabályozói is egyben (Heilmann és Allenspach, 2017). Ezek a szignálútvonalak három főbb csoportba sorolhatók:

NF- κ B útvonal: a nukleáris-faktor kappá B transzkripciós faktor az immunrendszer szabályozásának egyik legfontosabb résztvevője. Aktiválódása során transzlokálódik a sejtmagba, ahol transzkripciós faktorként funkcionál és gének expresszióját szabályozza. Ezek közé tartoznak a gyulladást citokinek, kemokinek, adhéziós fehérjék, enzimek, valamint a specifikus immunválaszhoz szükséges elemek, mint például a fő hisztokompatibilitási komplex (MHC) (Moynagh, 2005).

MAPK útvonal: a mitogén aktivált fehérje kinázok (MAPK) egy foszforilációs kaskádöt indítanak el, amelynek végén olyan folyamatokat szabályoznak, mint a sejt differenciáció, proliferáció és a sejt halál (Pearson és mtsai., 2001).

JAK/STAT útvonal: a membrán asszociált Janus kináz (JAK) a megfelelő receptor intracelluláris oldalán aktiválódik a receptor telítődést követően majd a szignál transzducer és transzkripció aktivátor (STAT) fehérjék foszforilálásával azok a sejtmagba jutnak, ahol transzkripciós faktorokként működnek. Célpont génjeik között szerepelnek interferonok és citokinek is, így fontos szabályozói a gyulladást folyamatoknak (O'Shea és mtsai., 2015).

A fent említett útvonalak finomhangolása kritikus a szervezet normális működése szempontjából. Diszregulációjuk során krónikus gyulladás, kardiovaszkuláris

megbetegedések és rák alakulhatnak ki (Yamamoto és Gaynor, 2015, Boengler és mtsai, 2008).

Gyulladásos markerek

A normál és kóros állapot elkülönítésére biológiai markereket szoktunk alkalmazni, melyek szintjéből betegségek jelenlétére tudunk következtetni. A gyulladásos markerek mérésével olyan betegségeket diagnosztizálhatunk, mint például a veseelégtelenség (Carrero és mtsai., 2008, Pecoits-Filho és mtsai., 2003), a krónikus obstruktív tüdőbetegség (COPD), (Bhowmik és mtsai., 2000) vagy kardiovaszkuláris megbetegedések (Pai és mtsai., 2004).

Citokinek: gyulladást fokozó és gyulladást csökkentő citokineket főleg az immunsejtek szekretálnak (makrofágok, monociták, T limfociták stb.) (Salmiheimo és mtsai., 2016). Fő szerepük az immunsejtek toborzása a sérülés helyére (Turner és mtsai., 2014) és aktivitásuk fokozása. Azonban a gyulladásos citokinek túltermelése szöveti és szervkárosodást okozhat (Czaja, 2014).

Fehérjék és enzimek: emelkedett szintjük a vérben gyulladásos markerként funkcionál. Ilyen például a c-reaktív protein (CRP) amely fertőzés során jelenik meg, és a komplement rendszer szabályozásával segíti a szervezet védekezését a patogének ellen (Sproston és Ashworth, 2018). Azonban a gyulladásához köthető fehérjék pl.: high-mobility group protein 1 (HMGB-1), ciklooxygenáz-2 (COX-2) és az indukálható nitrogén oxid szintáz (iNOS) abnormálisan magas illetve hosszú ideig tartó jelenléte krónikus betegségek kialakulásához vezetnek (Hernandez és mtsai., 2019, Mathew, 2011, Sonar és Lal, 2019).

Egyéb markerek: gyulladás során oxidatív stressz is keletkezik, illetve oxidatív stressz is válthat ki gyulladást, ezért ennek a folyamatnak a markerei (glutation reduktáz (GR), kataláz (CAT), szuperoxid dizmutáz (SOD), stb.) is megjelennek krónikus betegségek során (Park és mtsai., 2015, Siddiqui és mtsai., 2019).

A gyulladásban résztvevő sejtípusok

A gyulladásban résztvevő sejtek egy bonyolult hálózatot alkotnak. Teljes körű áttekintésük bőven meghaladná ennek a disszertációnak a terjedelmét, ezért csak érintőlegesen említem őket. A sérülés helyén lévő immunsejtek (makrofágok és hízósejtek) majd az endotél sejtek mediátorokat termelnek. Ezen mediátorok szabályozzák az immunsejtek infiltrációját. Elsőként neutrofil granulociták és makrofágok vándorolnak, ezt

követik a monociták és a limfociták (NK-, T- és B-sejtek) valamint a hízósejtek (Linthout és mtsai., 2014). Szerepük a veleszületett és az adaptív immunválasz szabályozása, a gyulladás megszüntetése (Fujiwara és Kobayashi, 2005).

A gyulladás megszűnése

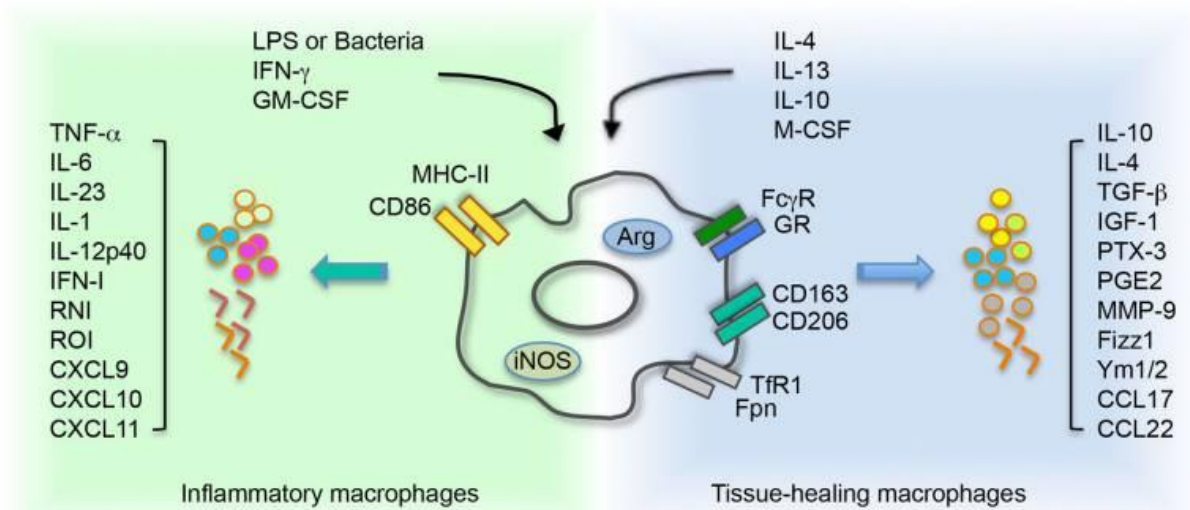
Látható, hogy míg az akut gyulladás a szervezet védekezése szempontjából egy hasznos folyamat, addig krónikussá válása betegségek kialakulásához vezethet. Ezért a gyulladás megszűnésének szabályozása kiemelten fontos. Lipid, protein és peptid mediátorok segítségével a szervezet képes a gyulladás kontrollálására. Csökken a leukocita infiltráció, megindul a neutrofilek apoptózisa és a makrofágok efferocitózisa. Továbbá, a makrofágok fenotípusváltása is megtörténik így indukálva a sebgyógyulást és az angiogenezist (Headland és Norling, 2015).

Makrofág polarizáció

A makrofágok a veleszületett és az adaptív immunrendszer nélkülözhetetlen fagocita és antigén prezentáló sejtjei. Magas plaszticitásuknak köszönhetően gyorsan képesek a fenotípusuk változtatására a környezet szignáljai függvényében (Murray és Wynn, 2012). Eredetük alapján két csoportba sorolhatjuk őket: a szöveti makrofágok mint például a májban a Kupffer sejtek, az agyban a mikroglia vagy a tüdőben az alveoláris makrofágok az embrionális fejlődés során kialakuló progenitorokból származnak (Epelman és mtsai., 2014), ugyanakkor a vérben keringő monociták is képesek a sérülés helyére migrálni és ott makrofágokká differenciálódni (Yang és mtsai., 2014).

A makrofágokat polarizációjuk alapján két csoportra szokták osztani: M1 és M2 makrofágok. Noha fenotipizálásuk ennél sokkal bonyolultabb és ez a rendszerezés csak egy széles spektrum két végletét reprezentálja, jó alapja lehet, hogy megértsük ezt a funkciójában igen változatos sejtípust. Gyulladásos makrofágok (M1) általában valamilyen fertőzés, vagy sérülés során alakulnak ki, a stimulus lehet valamilyen toll like receptor (TLR) ligand vagy interferon γ (IFN γ). A szignáltranszdukciót gyakran NF- κ B (Liu és mtsai., 2017), illetve STAT-1 (Iwata és mtsai., 2016) közvetíti. A markerek között szerepel tumor nekrosis faktor α (TNF α), interleukin-6 (IL-6) és iNOS (Lu és mtsai., 2015), funkciójukat tekintve baktericid, tumoricid és fagocita feladatokat látnak el, azonban olyan krónikus betegségekkel is összefüggésbe hozták, mint az obezitás, metabolikus szindróma vagy a diabétesz (Sica és Mantovani, 2012). Az alternatívan aktiválódott (M2) makrofágok polarizációját IL-4/IL-13

citokinek indukálják az IL-4 receptoron keresztül, és a jelátvitel fő regulátora a STAT-6 (Ohmori és Hamilton, 1998). Markerek között szerepel például az argináz-1, CD206 (mannóz receptor) és a Fizz-1. Funkciójukat tekintve immunszuppresszív, angiogenetikus hatásuk van, valamint a sebgyógyulást is szabályozzák (Campbell és mtsai., 2013). Patológias folyamatokban is részt vehetnek, mint például a tumor promóció, dermatitis vagy az asztma (Bosurgi és mtsai., 2010) (2 ábra).



2. ábra: Makrofág polarizáció összefoglalása. A makrofág polarizációt gyakran két fenotípussal szokták jellemezni. Az M1 (gyulladásos) makrofágok kialakulásáért felelős szignálok például az LPS vagy interferon γ . Markerei között szerepelnek a különböző citokinek (IL-6, TNF- α) illetve kemokinek (CXCL9, CXCL10) valamint az iNOS. M2 (immunszuppresszív) fenotípus legismertebb stimulusa az IL-4, illetve IL-10 és IL-13. Markerei között szerepel az argináz-1 és mannóz receptor - 1 (CD206), valamint mátrix metalloproteinázok (Bosurgi és mtsai., 2010).

Az oxidatív stressz és a makrofágok szerepe a gyökterelésben

Reaktív oxigén intermedierek (ROS) illetve reaktív nitrogén intermedierek (RNS) termelődése a normális sejtfunkció része. Fiziológias körülmények között szignálmolekulákként működnek, túltermelődésük azonban patológias folyamatokhoz, illetve sejthalálhoz vezetnek (Valko és mtsai., 2007). Amikor a keletkező gyökök és az antioxidáns rendszer közötti egyensúly a ROS/RNS javára felborul, akkor oxidatív stresszről beszélünk (Birben és mtsai., 2012).

Az oxidatív stresszt elsőként Helmut Sies német kutató fogalmazta meg az 1985-ben megjelent *Oxidative stress* című könyvében (Sies, 1985). A három legjelentősebb ROS a

szervezetben a szuperoxid anion (O_2^-), hidroxil gyök ($\cdot OH$) és a hidrogén peroxid (H_2O_2). A szuperoxid termelésért jelentős mértékben a mitokondrium a felelős. Az oxidatív foszforiláció során az elektronokat a molekuláris oxigén veszi fel, és proton jelenlétében így víz keletkezik. Kis mennyiségben azonban szuperoxid anion is keletkezik a folyamat során (Dröse és Brandt, 2012). H_2O_2 keletkezhet a NADPH oxidáz enzimek működése közben (Dupuy és mtsai., 1991), illetve a szuperoxid diszmutáz (SOD) által katalizált reakció alkalmával is (Juarez és mtsai., 2008). A legreaktívabb ROS a hidroxil gyök, mely leginkább H_2O_2 -ből keletkezik Fenton reakció révén (Puppo és Halliwell, 1988). Az oxigén tartalmú gyökök mellett nitrogén tartalmúak is keletkeznek a sejtben. Egyik ilyen a peroxinitrit ($ONOO^-$), amely szuperoxidból és NO-ból keletkezik (Valez és mtsai., 2013). Ezek a reaktív molekulák képesek a sejtek biomolekuláit (DNS, fehérje, lipid) károsítani, és ez által sejt és szövet diszfunkciót előidézni (Afonso és mtsai., 2007). Az aerob élőlények antioxidáns rendszereket fejlesztettek ki a keletkező ROS közömbösítésére. A mitokondrium a ROS fő forrása, a keletkező szuperoxid az elsődleges ROS ami ebben a sejtorganelumban képződik. A szuperoxid H_2O_2 -dá alakítását a szuperoxid diszmutázok végzik (Holley és mtsai., 2012). A SOD által létrehozott H_2O_2 -ot többek között a kataláz semlegesíti. A kataláz egy hem-tartalmú enzim, amely a H_2O_2 -ot molekuláris oxigénné és vízre bontja gyökképződés nélkül (Goyal és Basak, 2010). A glutation (GSH) magas szinten expresszálódik, képes a H_2O_2 detoxifikálására glutation peroxidáz-1 (GPx1) függő módon (Quintana-Cabrera és Bolaños, 2013). A peroxiredoxin/tioredoxin rendszerek is képesek a H_2O_2 eltávolítására, tioredoxin, tioredoxin reduktáz és NADPH kapcsolt enzimreakció révén. A tioredoxin rendszer a glutation rendszerrel is képes együttműködni, egymás elektronakceptoraként működve (Lu és Holmgren, 2014). A tioredoxin rendszer az elsődleges antioxidáns rendszer olyan sejtekben ahol a kataláz vagy a glutation rendszer alacsony szinten expresszálódik, például hasnyámirigy β -sejtjei (Stancill és mtsai., 2019).

Polarizációjuk során az M1 makrofágok bakteriális stimulusra nagy mennyiségű NO-t termelnek (Xue és mtsai., 2018). Ennek köszönhetően képesek fenntartani a gyulladással közömbösített és megküzdeni a patogénekkal. A makrofágok nem csak termelői a magas ROS/RNS koncentrációjú miliónek, de elszennvedői is az oxidatív stressznek. Mivel nem csak a patogén eliminálásában van szerepük, hanem a fiziológiai környezet helyreállításában is, ezért képesnek kell lenniük elviselni az általuk létrehozott ROS-ban és RNS-ben gazdag környezetet.

Az oxidatív stressz által kiváltott sejthalál és lehetséges mechanizmusai

Az oxidatív stressz lehetséges kimenetelei között szerepel a sejthalál, amely gyulladáshoz és szervi diszfunkcióhoz vezet. Az oxidatív stressz a mértékétől és a sejtípustól függően a sejthalál különböző formái indukálódhatnak (3. ábra):

Apoptózis: programozott sejthalál forma, amely évtizedek óta a kutatók figyelmének középpontjában áll. Folyamata jól karakterizált, a sejt zsugorodását az apoptotikus testek keletkezése követi, majd a sejtmag zsugorodik és fragmentálódik, végül a sejt apoptotikus testekké esik szét. Ezeket az apoptotikus testeket fagocita sejtek kebelezik be így minimalizálva a sejt környezetének károsodását (Kerr és mtsai., 1972). Az apoptózist külső, illetve belső stimulusok is indukálhatják, ilyenek például a halál ligandumok (külső), DNS károsodás, ER stressz és a mitokondriális útvonal (belső) (Ferri és Kroemer, 2001). A sejthalál kivitelezésében az effektor fehérjék, a kaszpázok vesznek részt. A kaszpázok aszpartil proteáz fehérjék. Funkciójukat és célpont fehérjéiket tekintve megkülönböztetünk iniciátor (kaspáz-2, 8, 9, 10) illetve effektor (kaspáz-3, 6, 7) kaszpázokat amelyek az apoptózis végrehajtásában vesznek részt. A kaszpázok egy másik csoportjába a kaszpáz-1, 4, 5, 11, 12 tartozik, amelyek a gyulladás szabályozásában vesznek részt (Shalini és mtsai., 2015).

H₂O₂ kezelés hatására például p53 mediált apoptózist figyeltek meg glióma sejtekben (Datta és mtsai., 2002). A p53 nukleáris transzlokációja volt megfigyelhető DNS károsodás hatására, amely egy sor más proapoptotikus gén expressziójának emelkedésével jár (PUMA, NOXA) (Uberti és mtsai., 1999). A mitokondrium külső membránjának permeabilitása révén citokróm c, AIF és Smac/Diablo proapoptotikus fehérjék felszabadulása következik be (Circu és Aw, 2010). Az endoplazmás retikulum (ER) különösen érzékeny a redox homeosztázis változására. Oxidatív stressz során az ER diszfunkciója miatt a fehérje folding nem tud tökéletesen végbemenni (van der Vlies és mtsai., 2003), illetve az ER-ből felszabaduló Ca²⁺ elindíthatja a mitokondriális sejthalál útvonalat (Orrenius és mtsai., 2015).

Mivel a mitokondrium az egyik fő forrása a ROS-nak ezért a ROS által indukált károsító hatásoknak is az elsődleges célpontja, mitokondriális DNS és fehérjék oxidálása révén. Külső forrásból származó apoptózis indukáló anyagok és a ROS kapcsolatát is leírták. A TNF- α a receptorához kötődve ROS termelődést indukál, amely gyulladáshoz és ezen keresztül TNF- α expresszióhoz vezethet, így egy öngerjesztő

folyamat alakul ki, aminek a vége a sejthalál (Blaser és mtsai., 2016). A felsorolt folyamatok érzékelik a környezetben, illetve a sejtben végbemenő redox változásokat, és iniciálják az apoptózist.

Nekrózis: eredetileg egy véletlenszerű és szabályozatlan sejthalál formaként írták le, amely extrém külső tényezők hatására következik be. A sejt megdagad, a membránintegritás megszűnik és a sejttartalom a környezetbe ürül (Syntichaki és Tavernarakis, 2002). Ma számos szabályozott nekrotikus folyamatot is ismerünk (lásd alább).

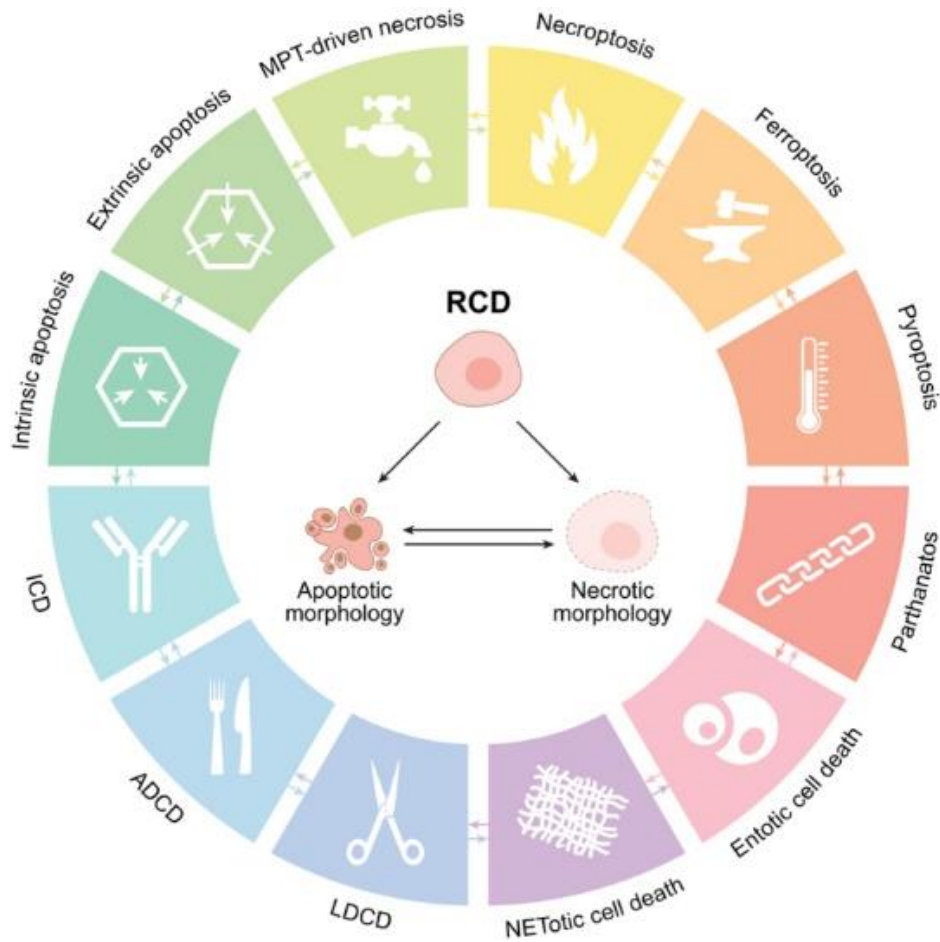
A szervezetben végbemenő sejthalál formákat nem lehet élesen elkülöníteni egymástól. A programozott és véletlenszerű sejthalálon kívül még egy sor egyéb sejthalál forma létezik. Ezeket a sejthalál útvonalakat általában szabályozott sejthalál formáknak nevezzük, mivel valamilyen szignálút vonal irányítja a lefolyásukat, és ezért módosítható is a folyamat kimenetele. A részvevő molekulák és a fenotípusuk szerint átfedhetnek az apoptózissal és a nekrozissal is. Ilyen jól ismert folyamatok például a:

Nekroptózis: egy szabályozott sejthalál forma, amely fenotípusosan inkább a nekrozisra hasonlít, azonban receptorhoz köthető az iniciációja (tumornekrózis faktor receptor (TNFR)) (Vercammen és mtsai., 1997, Kaiser és mtsai., 2013). A receptor mediált szignáltranszdukciót a receptor-kölcsönhatásban lévő szerin/teonin protein kináz (RIPK) és vegyes vonal-kináz doménszerű fehérje (MLKL) kinázok közvetítik. Míg a kaszpáz-8 apoptózis során hasítja az effektor kaszpázokat, nekroptózis során inaktív marad és a kaszpáz-3 hasítása sem történik meg (Yuan és mtsai., 2016).

Ferroptózis: e sejthalál során letális mennyiségű lipid hidroxiperoxidok szaporodnak fel a sejtben (Stockwell és mtsai., 2017), ami egy nem-apoptotikus fenotípusú sejthalálhoz vezet (Dixon és mtsai., 2012). 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 (Zhao, 2019).

Autofágiás sejthalál: a folyamat alkalmával a sejthalált az autofágiás rendszer indítja el, amely alap esetben a sejt egy védekező és túlélő folyamata (Pagotto és mtsai., 2017), működése transzkripciósan és poszttranszlációsan is szigorúan szabályozott (Galluzzi és mtsai., 2017). Az autofágia alapvetően egy túlélési mechanizmus, és az autofágiás sejthalál kifejezést csak később vezették be, mikor kísérletesen is sikerült bizonyítani az autofágiás rendszer szerepét a sejthalál beindításában (Bialik és mtsai., 2018).

Piroptózis: egy kaspáz mediált sejthalál forma, amit először a monocita/makrofág sejtekben írtak le. Azóta kiderült, hogy más sejtípusokban is lejátszódik (Galluzzi és mtsai., 2018). A piroptózisnak szerepe van az intracelluláris baktériumok elleni védekezésben (Jorgensen és Miao, 2015). A piroptózis során kialakuló inflammaszóma fontos szerepet játszik a gyulladásos citokinek felszabadításában, a proteolízist a kaspáz-1 végzi. Az apoptózissal ellentétben gyulladást okoz és sejtlízis következik be (Bergsbaken és mtsai., 2009).



3. ábra: Sejthalál különböző formáinak az összefoglalása. A sejthalált legegyszerűbben két formára oszthatjuk; nekrozis és programozott sejthalál. A programozott sejthalál lehet kaspáz függő amelyet apoptózisnak nevezünk. A kaspáz független programozott sejthalál formáit további alcsoportokra oszthatjuk (apoptózis szerű, nekroptózis és autofágiás)(Galluzzi és mtsai., 2018).

A korábbi bekezdésekben áttekintettük, egyrészt, hogy a makrofágok hogyan vesznek részt a ROS és RNS termelésben, másrészt megismertük a szerepüket a patogének eliminálásában és a gyulladásban. Azt is megbeszéltük, hogy a keletkezett oxidatív stressz milyen sejthalál típusokat indukálhat. Ezek a sejthalál folyamatok természetesen a

makrofágokban is végbemehetnek (Robinson és mtsai., 2019). Ennek elkerülése érdekében különböző védekezési mechanizmusokat fejlesztettek ki, amelyeket az *Irodalmi áttekintés c.* fejezet későbbi szakaszában, illetve a kutatási eredményeim bemutatásával szeretnék ismertetni.

A poli-ADP-riboziláció

A poli(ADP-ribóz) polimeráz 1 enzim

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 metabolismus és a sejthalál. A folyamatot végző enzimeknek emberben 17 tagját ismerjük jelenleg (Hottiger, 2010.). Az aktivált Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) a nikotinamid-adenin-dinukleotidot (NAD⁺) hasítja nikotinamidra és ADP-ribózra, majd az ADP-ribóz monomerekből elágazó láncú polimereket szintetizál az akceptor fehérjéken (Rack és mtsai., 2020.).

A PARP család legintenzívebben tanulmányozott tagja a 116 kDa molekulatömegű PARP-1 (ismert még, mint poli(ADP-ribóz) szintetáz és poli(ADP-ribóz) transzferáz), ami egy eukariótákban általánosan előforduló sejtmagi fehérje (Virág és Szabó, 2002.). Működése mára már jól ismert. A molekula három fő domént tartalmaz (4. ábra). Az első, az N-terminálisan elhelyezkedő DNS kötő domén, amely két cink-ujj motívumot tartalmaz (Petrucco, 2003.). A harmadik cink-ujj teszi lehetővé a PARP-1 homodimer létrejöttét (Langelier és mtsai, 2007.). A második domén az auto modifikációs domén ami a PARP-1 auto-PARilációját végzi és a DNS kötő motívumtól C-terminálisan helyezkedik el. A harmadik a C-terminálisan elhelyezkedő katalitikus domén (de Murcia és Shall, 2000.). Fontos még megemlíteni a nukleáris lokalizációs szignált (NLS) ami tartalmazza a kaszpáz-3 hasító szekvenciáját is (Nguewa és mtsai., 2003), illetve a fehérjével való kölcsönhatás kialakításában részt vevő BRCT (BRCA1 C terminus) motívumot (Loeffler és mtsai., 2011). 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) (Virág és Szabó, 2002). PARP-1 KO egérből származó sejtenyészetben DNS károsító kezelés hatására PARilációt tudtak kimutatni, így feltételezték más PARP enzimek létezését is (Shieh és mtsai., 1988).

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 fehérjék (Amé és mtsai. 2004).

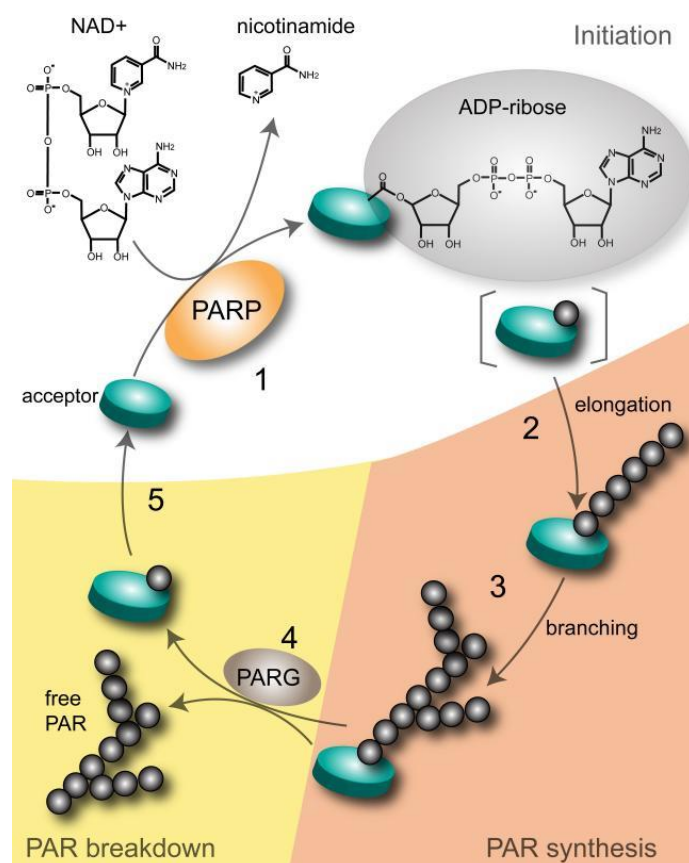


4. ábra: A PARP-1 domén szerkezete. A PARP-1 fehérje három fő doménre osztható: DNS-kötő -, automodifikációs -, és kataliktikus domén (Kamaletdinova és mtsai., 2019).

A PARP-1 aktiválásáért főleg a DNS károsodás a felelős. Nick szenzorként funkcionál, kötődik a DNS-hez és poli(ADP-ribóz) szintézist végez (de Murcia és mtsai., 1997). Nemcsak a DNS törés vezethet PARP-1 aktivációhoz. Aktivációját megfigyelték patkány primer neuronokon inozitol-1,4,5-trifoszfát (IP₃) indukált Ca²⁺ felszabadulás során is (Homburg és mtsai., 2000). A PARP-1 aktivitásának szabályozása expressziós szinten is megvalósul. Szisztémás gyulladáshoz az expressziója megemelkedik (Czapski és mtsai., 2013). A gén promóterében az Sp1 és Sp3 transzkripció faktorok kötődését írták le (Zaniolo és mtsai., 2005).

A poli-ADP-ribolizáció metabolizmusa

A PARP-1 a NAD⁺-ot nikotinamidra és ADP-ribózra hasítja, majd az ADP-ribóz egységeket kovalensen kapcsolja az akceptor proteinek glutamát és szerin oldalláncaira. A polimer hossza néhánytól akár 200 egységig terjedhet, ami igen nagy negatív töltést ad a fehérjének (Virág és Szabó, 2002). A PAR polimerek eltávolításáért főleg a poli(ADP-ribóz) glikohidroláz (PARG) enzim a felelős. Egyetlen gén kódolja, aminek alternatív splice variánsai egy nukleáris és három citoszólikus izoformát hoznak létre. A PAR katabolizmusban még szerepe van az ADP-riboszilhidroláz 3 (ARH 3) enzimnek is, amely a mitokondriális PAR lebontásáért felelős (Niere és mtsai, 2012). A PARG viszonylag kis mennyiségben van jelen a sejtben, de nagy aktivitást mutat a PAR irányába, így képes a PARP-1 által szintetizált polimereket gyorsan lebontani. Nagyobb affinitást mutat a hosszabb polimerek felé így először ezeket bontja endoglikozidáz aktivitása révén. Exoglikozidázként is képes funkcionálni, ilyenkor a kisebb polimerekről egyesével hasítja le az ADP-ribóz egységeket (Virág és Szabó, 2002). A fehérjéhez kapcsolódó ADP-ribóz monomert az ADP-riboszil protein liáz távolítja el. (Oka és mtsai, 1984) (5. ábra).



5. ábra: A poli-ADP-riboziláció folyamata. A NAD⁺ molekulákból ADP-ribóz monomerek összekapcsolásával épül a PAR polimer, amelyek szintéziséért a PARP enzimes család tagjai a felelősek. Az így készült polimereket akceptor fehérjékhez kapcsolják. A polimer lebontásáért a PARG enzim a felelős (David és mtsai., 2009).

A PARP-1 szerepe a DNS hibajavításban

Az egyszálú DNS törés (Single Strand Break, SSB) hibajavításának fő mechanizmusa a BER (bázis excíziós repair), két fő útvonala a “short patch-” és a “long patch repair”. Short patch repair esetén egy bázis helyettesítéséről beszélünk, long patch repair során több egymás utáni nukleotid reszintézise történik. 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 (Dantzer és mtsai., 2000). Ennek az eredménynek ellentmond, hogy röntgensugárzással kezelt PARP-1 KO sejtekben nem találtak abnormalis működést a hibajavításban (Vodenicharov és mtsai., 2000). Újabb eredmények alapján elmondható, hogy a PARP-1 gátlása csökkenti az SSB javítás kapacitását. A PARP-1 kölcsönhat az X-ray repair cross-complementing protein 1 (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 (Caldecott és mtsai., 1996).

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 (Wang és mtsai., 2006). A PARP-1 komponense a replikációs komplexnek, szerepét úgy képzelhetjük el, mint egy “szenzort”, ami jelzi a DNS károsodást (Dantzer és mtsai., 1998). Elősegíti a replikációs villa lassulását, és lehetővé teszi a hibajavítás megkezdését (Sugimura és mtsai., 2008).

A PARP-1 szerepe a sejthalálban

A korábbi fejezetekben részletesen átnéztük a fontosabb sejthalál formákat és ezeknek a szabályozását. Egy régebbi tanulmány szerint, a sejt ATP szintje határozza meg, hogy apoptózis vagy nekrozis lesz a sejthalál formája. Az apoptózis végbemeneteléhez az ATP mennyisége nem csökkenhet egy bizonyos szint alá (Leist és mtsai., 1997). Mivel a PARP enzimek szubsztrátja a NAD⁺ – ami az ATP szintézis nélkülözhetetlen molekulája – a kutatók figyelmét felkeltette ennek az enzimes családnak a szerepe és intenzív kutatás következett a PARP-ok sejthalálban betöltött szerepének a felderítésére. A PARP-1 molekuláris kapcsolóként viselkedik a sejthalál szabályozásában (Los és mtsai., 2002).

Apoptózis során a kaspáz-3 proteolitikusan hasítja a fehérjét, és egyik szubsztrátja a PARP-1 (Jimenez és mtsai., 2002). A TNF- α és anti-FAS ellenanyag által indukált programozott sejthalál lejátsszódásához azonban nincs szükség a PARP-1-re (Wang és mtsai., 1997). A PARP-1 túlaktivációja azonban káros a sejt túlélése szempontjából, a NAD⁺ felhasználásával ATP depléciónhoz vezet (Ha és Snyder, 1999), valamint mitokondriális diszfunkciót eredményez, ezáltal egy nekrozisra hasonlító sejthalált indukál (Virág és mtsai., 1998a). TNF- α által indukált apoptózis nem játszódott le kaspáz rezisztens PARP-1-et expresszáló sejtekben, sőt a sejthalál mértéke fokozódott és nekrotikus fenotípust mutatott (Herceg és Wang, 1999). Látható, hogy a PARP-1 aktivációja nélkülözhetetlen a sejt túléléséhez genotoxicitás indukálta sejthalál során, azonban programozott sejthalál során az inaktiválódására van szükség, hogy a sejt elkerülje a súlyosabb sejthalál formát. Glutamát indukálta nekroptózist még a kezelés után 8 órával is lehetett gátolni PJ34-gyel (PARP inhibitor), a PARP-1 nem a sejthalál iniciálásáért volt felelős, hanem a lefolyásáért. A PARP

aktivációt necrostatin-1-gyel lehetett gátolni, ami igazolta, hogy a PARP-1-től upstream elhelyezkedő szignalizáció felelős a PARP-1 aktiválódásáért (Xu és mtsai., 2010). Később azonosították tumor nekrozis faktor-függő apoptózis indukáló ligand (TRAIL) által szabályzott sejthalál során a PARP-1 RIPK-1 és RIPK-3 függését. Savas közegben a TRAIL programozott nekrozist indukál ahol a RIPK-1 és RIPK-3 kinázok a PARP-1 upstream mediátorai (Jouan-Lanhouet és mtsai., 2012).

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 (Wang és mtsai., 2011). A PAR kijutása a magból kritikus a sejthalál lejátszódása szempontjából, mivel a polimer toxikus a sejtekre (Wang és mtsai., 2009). Az AIF transzlokációja azonban nem magyarázta a sejtmagban bekövetkező fragmentációt, a DNS hasításáért a makrofág migráció inhibitor faktor (MIF) nukleáz a felelős (Wang és mtsai., 2016).

Láthatjuk, hogy a PARP-1-nek fontos szerepe van a sejthalál szabályozásában. A legfontosabb útvonalak, amelyeket szabályozni képes a sejt ATP mennyisége, az AIF mediált Parthanatos és különböző kinázok által szabályozott szignálútvonalak.

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 gyulladási 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 H_2O_2 -dal szembeni érzékenységének vizsgálatát.
- 2) H_2O_2 rezisztens M1 makrofágok génexpressziós paneljének vizsgálatát.
- 3) A PARP-1 szerepének vizsgálatát M1 makrofágok H_2O_2 rezisztenciájának kialakulásában.
- 4) M1 makrofágok metabolikus jellemzését 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. Ehhez az alábbi célkitűzéseket fogalmaztuk meg:

- 1) Citoprotektív molekulák azonosítására alkalmas HCS módszer beállítását.
- 2) Szűrés elvégzését egy kis molekulakönyvtáron (<800) és a "hit" vegyületek validálását.
- 3) PARP gátlók azonosítását.
- 4) A gátlás mechanizmusának jellemzését.

Anyagok és módszerek

Anyagok

A 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid (MTT), az alacsony olvadáspontú agaróz (LM agaróz), az antimycin, az apomorfin, a ciclopirox, a Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), a főtális szarvasmarha szérum (FBS), a H₂O₂, az interleukin-4 (IL-4), a karbonil-cianid-4-(trifluor-metoxi)-fenil-hidrazon (FCCP), a lipopoliszacharid (LPS), a NAD/NADH Quantitation Kit, az oligomycin, a propídium jodid (PI), a proteáz inhibitor koktél (PIC), és az RPMI-1640 médium a Sigma-Aldrich Kft-től (Budapest, Magyarország) szereztük be. Az L-glutamin és a penicillin/streptomycin a Lonza Group AG-től (Bázel, Svájc) származott. 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 anti-AIF antitestet, az anti-PARP-1 antitestet, a HRP-vel konjugált anti-egér IgG-t, a HRP-vel konjugált anti-nyúl IgG-t a Cell Signaling Technologies-től (Danvers, MA, USA), a peroxidáz konjugált anti- β -aktin antitestet pedig a Santa Cruz Biotechnology-től (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 származott. Az ATP A Screen-Well[®] FDA Approved Drug Library V2 molekula könyvtárát az Enzo Life Sciences Inc. cégtől (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), a High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit-et az Applied Biosystems-től (Foster City, CA, USA), míg a 2X qPCRBIO 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) vásároltuk. A Hank's Balanced sóoldat (HBSS), a Lipofectamine 3000 és a

SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate a Thermo Fisher Scientific-től (Vantaa, Finnország) származott. A dimetil-szulfoxidot (DMSO), a fenilmetilszulfonil-fluoridot (PMSF), a glicerint, a merkapto-etanol, a nátrium-dodecil-szulfátot (SDS), a nátrium-hidroxidot, a Na₂EDTA-t, a TrisHCl-t, a Triton X-100-at a VWR International Kft-től (Debrecen, Magyarország) vásároltuk.

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 (Pineda-Torra és mtsi., 2015). Az egér csontvelő makrofágok gyűjtésének protokollja összhangban volt a Helsinki 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 differenciálódott makrofágokat 10 ng/ml LPS-sel vagy 5 ng/ml IL-4-gyel kezeltük, hogy M1 vagy M2 polarizációt indukáljunk.

HaCaT sejt kultúra

A HaCaT sejteket (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 10% FBS-sel, 1% L-glutaminnal és 50 E/ml / 50 µg/ml penicillin / sztreptomicin oldattal kiegészített RPMI 1640 médiumban 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.

BMDM sejteket 24 óráig polarizáltunk 10 ng/mL LPS-sel vagy 5 ng/mL IL-4-gyel. A sejthalált 1 mM H₂O₂-dal indukáltuk újabb 24 órára majd MTT esszét végeztünk.

HaCaT sejteket különböző koncentrációjú apomorfinnal és ciclopirox-szal kezeltünk 60 percig. A sejthalált 200 μ M H₂O₂-dal indukáltuk 8 óráig és MTT esszét végeztünk.

A sejtkonfluencia és a propidium-jodid felvétel értékelése

A BMDM sejteket 24 óráig polarizáltuk 10 ng/mL LPS-sel vagy 5 ng/mL IL-4-gyel majd 1 mM H₂O₂-dal kezeltük őket újabb 24 órára. A konfluenciát és reprezentatív képeket készítettünk a Tecan Spark plate olvasó készülék képalkotó funkciójával. A PI felvételi vizsgálatokhoz a sejteket 15 percig 5 μ g/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 BMDM sejteket 24 óráig előkezeltük 10 ng/mL LPS-sel majd sejthalált indukáltunk 1 mM H₂O₂-dal 0, 4, 8, 24 óráig. 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

BMDM sejteket 0, 4, 8, 24 óráig kezeltük 10 ng/mL LPS-sel majd génexpressziós vizsgálatot végeztünk mRNS szinten qPCR-rel. A teljes RNS izolálást Trizol módszerrel végeztük. 2 μ g 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. A felhasznált primerek szekvenciáját az alábbi táblázat mutatja.

1. táblázat: A qPCR kísérletekhez használt primerek

Gén név	Gén szimbólum	primer	szekvencia (5' - 3')
Kataláz	<i>Cat</i>	Forward	TGCCCCCAACTATTACCCA
		Reverse	TCCGCACCTGAGTGACATTG
Glutation reduktáz	<i>Gsr</i>	Forward	TGGCACTTGCCTGAATGTTG
		Reverse	CGTGCATGAATTCCGAGTGC
Szuperoxid dizmutáz 1	<i>Sod1</i>	Forward	TGTGACTGCTGGAAAGGACG
		Reverse	CATGGACCACCATTGTACGG
Szuperoxid dizmutáz 2	<i>Sod2</i>	Forward	GAGAACCCAAAGGAGAGTTGCT
		Reverse	CTTATTGAAGCCAAGCCAGCC
Tioredoxin reduktáz	<i>Txnrd1</i>	Forward	GCTGGTGGTTTCACCTTCCT
		Reverse	TTTTTGTTCGGCTTCAGGGC
Peroxiredoxin 1	<i>Prdx1</i>	Forward	TGTCCACGGAGATCATTGC
		Reverse	GGGTGTGTTAATCCATGCCAG
Poly (ADP-ribóz) polimeráz	<i>Parp1</i>	Forward	GGAGCTGCTCATCTTCAACC
		Reverse	GCAGTGACATCCCCAGTACA
Apoptózis indukáló faktor	<i>Aif</i>	Forward	AGAAACTGGTGCCCTTGGTG
		Reverse	TGCTGGAACAAGTTGCCTGG
BCL2-antagonist/killer 1	<i>Bak1</i>	Forward	CCAAGATCGCCTCCAGCCTA
		Reverse	CACGCTGGTAGACGTACAGG
Kaspáz 3	<i>Casp3</i>	Forward	GAGCTTGAACGGTACGCTAA
		Reverse	CCCAGAGTCCACTGACTTGC

SDS-PAGE és Western blot

A BMDM sejteket 24 óráig kezeltünk 10 ng/mL LPS-sel, majd a sejteket lizáltuk és a PARP-1 fehérje szintjét Western blot módszerrel detektáltuk. A BMDM sejteket 10 ng/mL LPS-sel előkezeltük 24 órára és PARilációt váltottunk ki 10 perces H₂O₂ (1 mM) kezeléssel. A PARilációt Western blottal detektáltuk. A fehérjék méret szerinti elválasztása érdekében a hideg lízispufferben (62,5 mM Tris-HCl (pH 6,8), 2% SDS, 10% glicerin, 715 mM 2-merkaptó-etanol, 1 mM PMSF (fenilmetilszulfonil-fluorid), proteáz inhibitor koktél) feltárt teljes-fehérjékből azonos mennyiséget 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 BMDM sejteket előkezeltük LPS-sel 24 órára vagy 5 μ M PJ34-gyel 60 percig, majd H₂O₂-dal (1 mM) 120 percre. A relatív NAD⁺ tartalmat NAD/NADH Quantitation Kit-tel határoztuk meg a gyártó utasításainak megfelelően. Az abszorbanciát a fehérjetartalomra normalizáltuk. A BMDM sejteket előkezeltük 10 ng/mL LPS-sel 24 órára, vagy 5 μ M PJ34-gyel 60 percre. H₂O₂-dal (1 mM) 180 percig kezeltük őket. A relatív ATP-tartalmat ATP Bioluminescence Assay Kit II-vel határoztuk meg a gyártó utasításai szerint. A NAD⁺ és 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

A BMDM sejteket Seahorse XF96 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) sejttenyésztő plate-en differenciáltattuk, majd 24 órára 10 ng/mL LPS-sel vagy 5 μ M PJ34-gyel előkezeltük, amit a H₂O₂ (1 mM) kezelés követett 120 percig. 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 oligomicin (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 mtsai. publikációban leírtak szerint számítottuk ki (Dranka és mtsai., 2011).

A timocita sejthalál elemzése áramlási citometriával

A timocita izolálást a Hegedűs és mtsi. publikációban leírtak szerint hajtottuk végre (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 nejlonszűrőn átszűrtük egysejtű szuszpenzió előállítására céljából. A timocitákat 2×10^6 /ml sűrűségűre hígítottuk RPMI 1640 médiummal, ezt követően 100 µl-t 96 lyukú plate-re helyeztünk. Különböző koncentrációjú apomorfinnal és ciclopirox-szal kezeltük a sejteket 60 percig, majd sejthalált indukáltunk 200 µM H₂O₂-dal 4,5 órán át. 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 elő-besugárzási 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. PAR festéshez a HaCaT sejteket különböző ideig kezeltük 200 μM H_2O_2 -dal illetve előkezeltük a „hit” vegyületekkel (10 μM) 60 percig, majd H_2O_2 -dal (200 μM) 10 percig. PARP-1 festéshez a HaCaT sejteket 60 percig kezeltük elő különböző szerekkel, majd újabb 60 percig kezeltük őket 200 μM H_2O_2 -dal a PARP-1 kromatinhoz kötése céljából. γH2AX festéshez a HaCaT sejteket apomorfinnal és ciclopirox-szal (10 μM), valamint PJ34-gyel (5 μM) előkezeltük. A genotoxicitást 200 μM H_2O_2 -dal indukáltuk. AIF festéshez a BMDM sejteket 1 mM H_2O_2 -dal kezeltük 4 órára. A kezelések lejárta után a sejteket 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 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 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 mtsai. publikációban leírtaknak megfelelően (Kovács és mtsai., 2012), néhány módosítással az alábbiak szerint: a tripszines kezelétkövetően 10^5 HaCaT sejtet előkezeltünk DMSO-val (vivőanyag), apomorfinnal (10 μM) vagy ciclopirox-szal (10 μM) 1 órán át. H_2O_2 -dal kezeltük a sejtekhez 200 μM végkoncentrációban 10 percig. Ezután a sejteket $4\text{ }^\circ\text{C}$ -on centrifugáltuk és 1 ml jéghideg PBS-ben szuszpendáltuk. A sejtszuszpenzióhoz (40 μl) 400 μl olvadt LM agarózt (1%, $37\text{ }^\circ\text{C}$) adtunk, majd a sejtszuszpenzió-agaróz keverékből 40 μl -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 M NaOH, 2 mM Na_2EDTA , pH $\sim 12,3$) inkubáltuk. Az

elektroforézist 4 °C-on, 30 percig, 20 V-on végeztük. Miután a tárgylemezt desztillált vízben leöblítettük és semlegesítettük, a sejtmagokat 10 µg/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 tárgylemezekre 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 lemezeken (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 mtsai. publikációban leírtak szerint (Michelena és mtsai. 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 ciclopiroxot 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-ot 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.

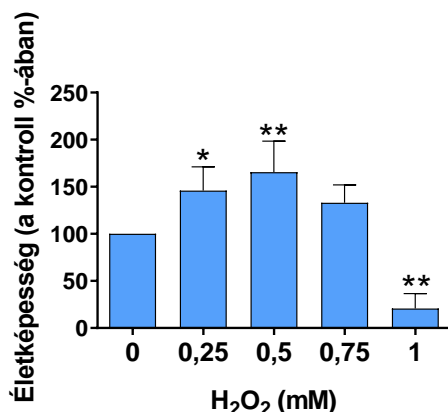
Eredmények

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

A makrofágok, mint a veleszületett immunrendszer első védelmi vonala nem csak termelői, de célpontjai is a magas ROS tartalmú környezetnek. Saját haláluk elkerülésének érdekében adaptálódniuk kell a gyulladásos folyamatok során termelődött stresszhez. Továbbá nemcsak, mint védelmi vonal fontosak, hanem szerepük nélkülözhetetlen a gyulladás csökkentéséhez és a sebgyógyuláshoz is, ezért gyulladásos (M1) polarizációjuk után antiinflammatorikus (M2) fenotípust vesznek fel.

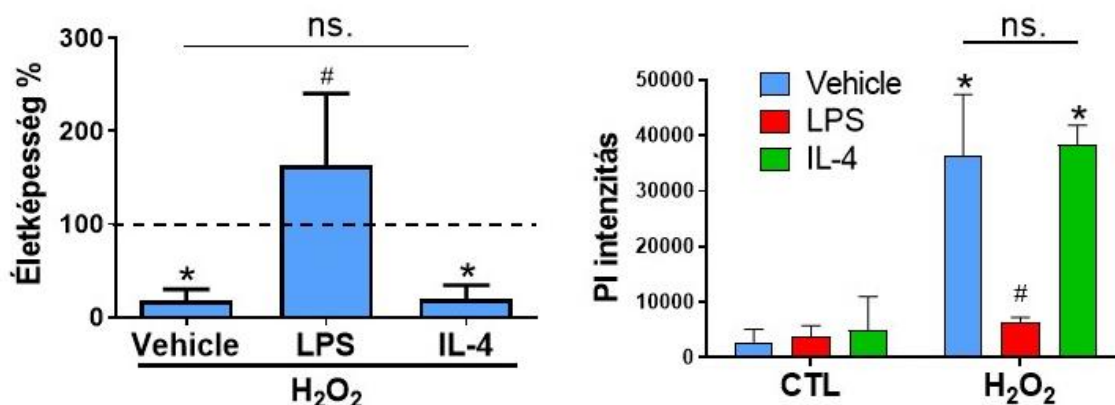
Az M1 polarizált makrofágok fokozott rezisztenciát mutatnak H₂O₂ kezeléssel szemben

Első lépésként azt szeretnénk volna megvizsgálni, hogy a különböző polarizációs fenotípusú makrofágok mennyire rezisztensek a H₂O₂ által kiváltott sejthalállal szemben. Választásunk az MTT esszére esett, amely egy mitokondriális respiráción alapuló életképesség mérés. A megfelelő kísérleti körülmények beállításához először a BMDM sejteket 24 óráig kezeltük különböző koncentrációjú H₂O₂-dal (6. ábra). A 0,25, illetve 0,5 mM H₂O₂ kezelés hatására az MTT esszé által mért életképesség szignifikáns emelkedést mutatott. Ez magyarázható azzal is, hogy oxidatív stresszre a sejtek aktivitása megváltozik, így a mitokondriális respiráció is, de ez valószínűleg nem jelent magasabb viabilitást ebben az esetben. A 0,75 mM H₂O₂ kezelés hatására sem volt még szignifikáns változás, csak a legmagasabb alkalmazott koncentráció (1 mM) okozott csökkenést a sejtek életképességében. Összességében elmondható, hogy a makrofágok polarizáció nélkül is magas fokú rezisztenciát mutatnak H₂O₂-dal szemben. Ezen mérés alapján az 1 mM koncentrációjú H₂O₂-ot választottuk a további mérésekhez.



6. ábra: BMDM sejtek életképességének vizsgálata H₂O₂ kezelést követően. A sejteket különböző koncentrációjú H₂O₂-dal kezeltük 24 órán át, majd az életképességet MTT esszével mértük. Szignifikancia megállapítására egy-utas ANOVA-t használtunk Dunett poszt teszttel. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

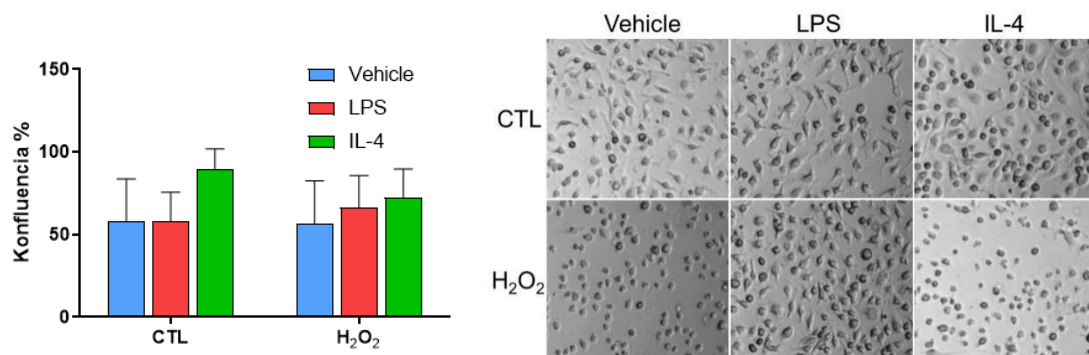
Ezt követően az M1 és M2 makrofágok H₂O₂-dal szembeni érzékenységet teszteltük (7. ábra).



7. ábra: Az M1 makrofágok rezisztensek a H₂O₂ kezelésre. BMDM sejteket 24 óráig előkezeltük 10 ng/mL LPS-sel és 5 ng/mL IL-4-gyel majd 1 mM H₂O₂-dal kezeltük újabb 24 órára. Az életképességet MTT esszével (bal panel) mértük. Szignifikancia megállapítására két-utas ANOVA-t használtunk Sidak poszt teszttel. * $p < 0,001$ a kontrollal szemben (CTL) míg # $p < 0,001$ a H₂O₂ kezelt mintával szemben. A nekrozist PI esszével (jobb panel) mértük és a szignifikancia megállapítása ugyanúgy történt. * $p < 0,001$, # $p < 0,001$.

A sejteket LPS-sel és IL-4-gyel kezeltük 24 órán át, hogy M1, illetve M2 polarizációt váltsunk ki, majd H₂O₂-dal újabb 24 óráig kezeltük a makrofágokat. Az életképességet MTT esszével mértük (7. ábra bal panel). Az M1 makrofágok magas fokú rezisztenciát mutattak, míg az M2 makrofágok H₂O₂ szenzitivitása nem változott a polarizálatlan sejtekhez képest. Az

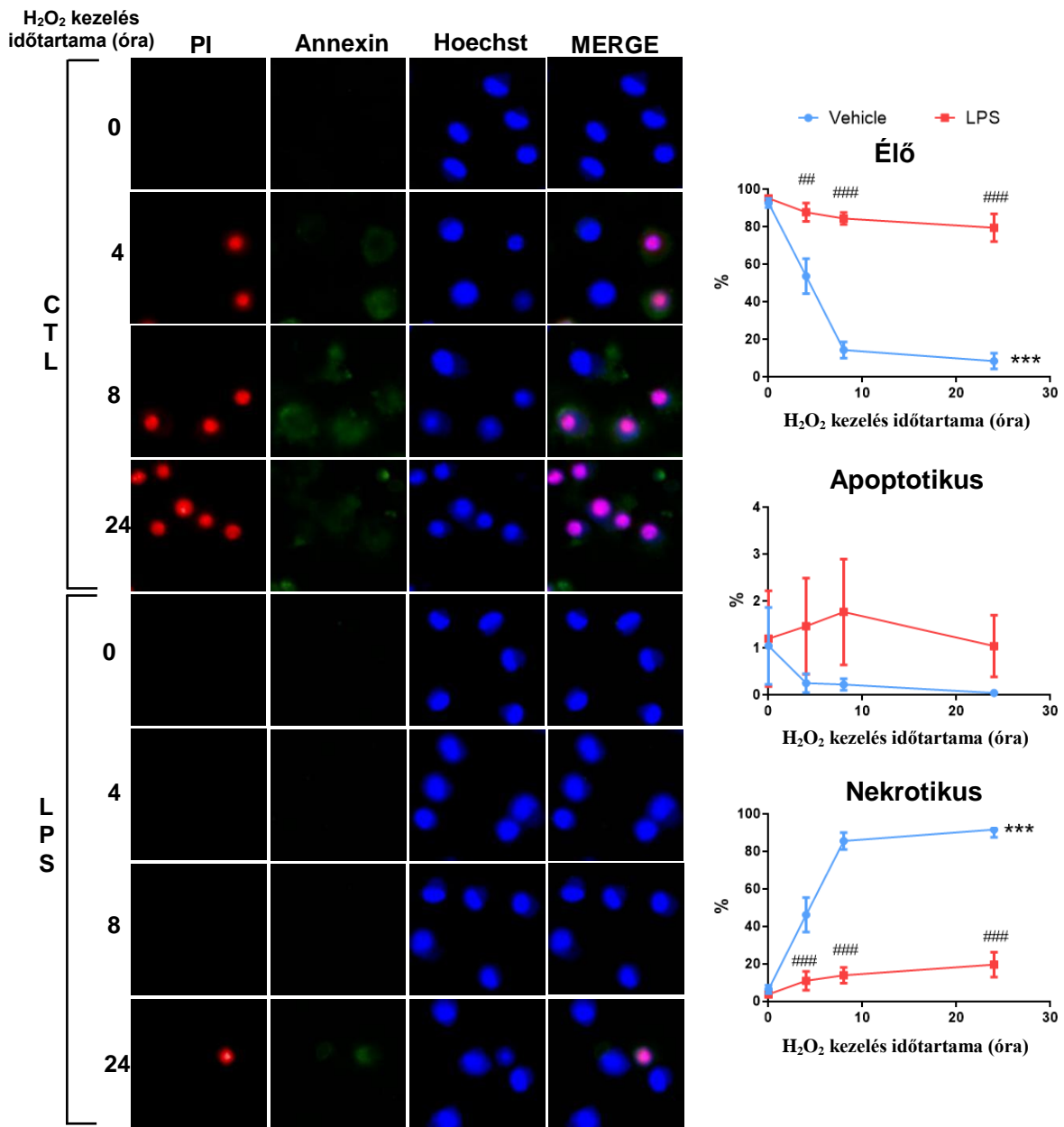
M1 sejtek életképessége szignifikánsan magasabb volt a H₂O₂ kezelés ellenére, mint a kezeletlen kontrollé, ezért feltételeztük, hogy az MTT esszé nem ad pontos eredményt. Ennek a problémának a feloldásához és a sejthalál igazolásához propidium jodid (PI) esszét választottunk, amely a sérült sejtmembrán detektálására alkalmas, így nekrotikus, illetve nekroptotikus paraméterként funkcionál (7. ábra jobb panel). H₂O₂ kezelés hatására sokszoros emelkedést tapasztaltunk a PI intenzitásában. Az M1 makrofágok esetében ez gyakorlatilag nem különbözött a kezeletlen kontrollhoz képest, így mondhatjuk, hogy az M1 makrofágok rezisztensek voltak 1 mM H₂O₂-ra. Az M2 makrofágok ebben a mérésben sem különböztek az M0 társaiktól. A sejthalált szeretnénk volna morfológiailag is igazolni, illetve ismert, hogy masszív sejthalál során a sejtek felválása általános jelenség. Ennek a kérdésnek a megválaszolására konfluencia vizsgálatot végeztünk Tecan Spark plate olvasón (8. ábra). A makrofágok nagyon erősen tapadnak a plate-hez. Morfológiailag a sejtek drasztikus változásokon mentek keresztül (nem kvantitatív) a H₂O₂ kezelés hatására, ahol a sejtek zsugorodását lehetett megfigyelni, azonban az M1 makrofágok fenotípusa a kontrolléhoz volt hasonló. Nem volt szignifikáns konfluencia változás sem a polarizáció során, sem a H₂O₂ kezelés hatására.



8. ábra: Sejtszám és morfológiai változások. BMDM sejteket 24 óráig előkezeltük 10 ng/mL LPS-sel és 5 ng/mL IL-4-gyel majd 1 mM H₂O₂-dal kezeltük újabb 24 órára. A konfluenciát (bal panel) Tecan Spark plate olvasóval mértük, szignifikáns változás nem történt (két-utas ANOVA). A reprezentatív képeket (jobb panel) is Tecan Spark plate olvasóval készítettük, morfometriai és statisztikai analízis nem történt.

A sejthalál fenotípusának további jellemzésére Annexin V és PI kettős festést alkalmaztunk, amelyet automatizált fluoreszcens mikroszkópiával és “high-content image analysis” segítségével (HCA) mértünk (9. ábra). Az alábbi szubpopulációkat tudtuk elkülöníteni: élő (kettős negatív), apoptotikus (Annexin V pozitív és PI negatív) valamint

nekrotikus (kettős pozitív). A H₂O₂ kezelés hatására a detektálható sejtmagok száma nem változott. A kezelés korai szakaszában (4 óra) jelentősen csökkent az élő sejtek száma és emelkedett a nekrotikus populáció (közel 50%). Az idő előrehaladtával a nekrotikus sejtek aránya tovább növekedett, és nem volt detektálható az apoptotikus populáció emelkedése. Az M1 makrofágokban a nekrotikus sejtek növekedése gyakorlatilag elhanyagolható, volt így igazoltnak tekinthetjük, hogy a sejthalál formája nekrozis, amely ellen az M1 polarizáció rezisztenciát biztosít.

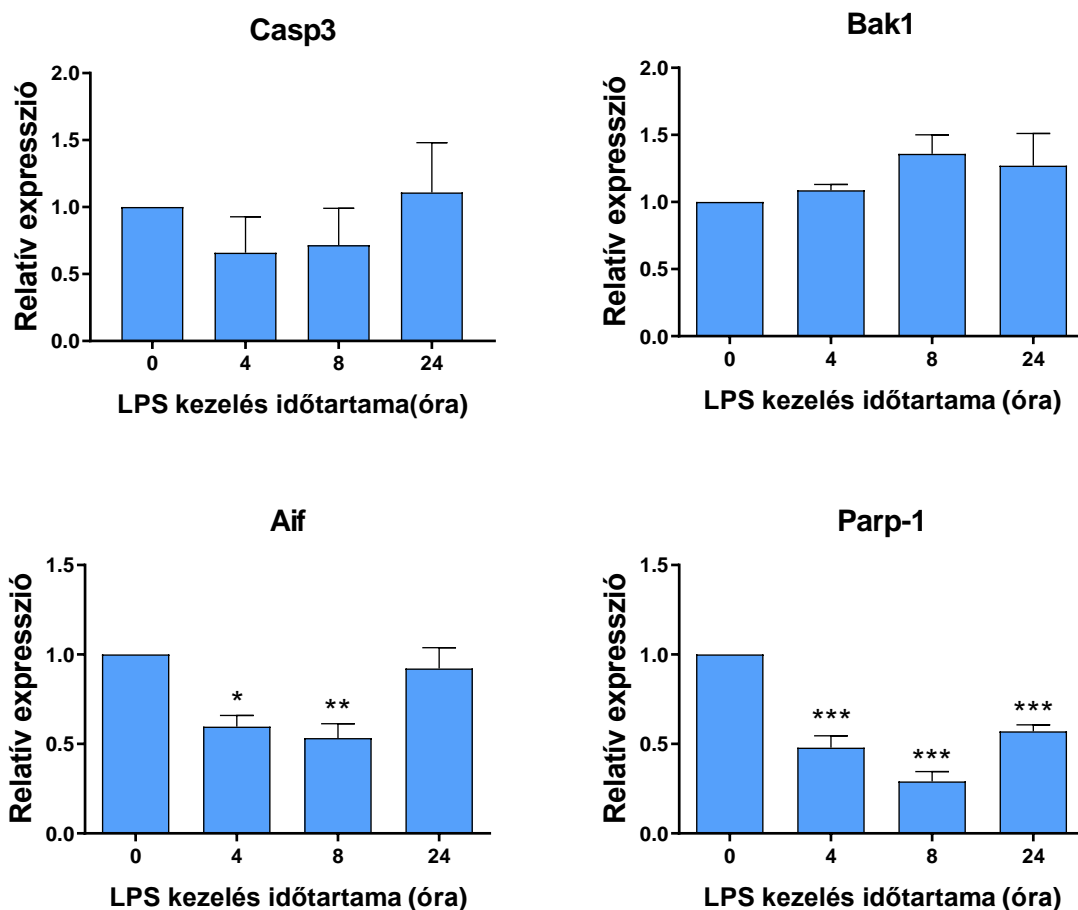


9. ábra: Az M1 makrofágok rezisztenciája a nekrozis gátlásán keresztül valósul meg. BMDM sejteket 10 ng/mL LPS-sel polarizáltunk 24 órára, illetve előkezelés nélkül hagytuk.

Sejthalált 1 mM H₂O₂-dal indukáltunk a jelölt ideig. Sejteket vitálisan festettük Hoechst, Annexin V - FITC és PI festékekkel. A detektálást fluoreszcens mikroszkópiával végeztük és HCA-val elemeztük. Élő sejteknek tekintettük az Annexin V és PI kettős negatív sejteket, apoptotikusnak az Annexin V egyszeresen pozitívakat és nekrotikusnak az Annexin V és PI kettős pozitív sejteket. Szignifikancia megállapítására két-utas ANOVA-t használtunk Sidak poszt teszttel. ****p*<0,001 a nulladik időponttal szemben, míg ##*p*<0,01 és ###*p*<0,001 a vehicle mintával szemben.

Sejthalált szabályozó és antioxidáns gének expressziós változása M1 polarizáció során

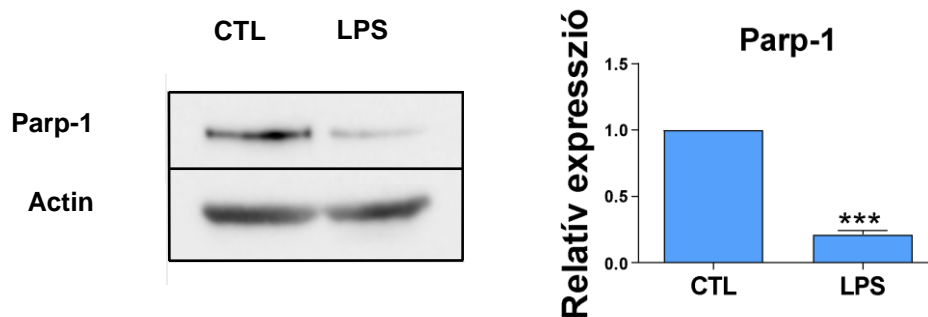
Az M1 polarizáció antinekrotikus hatásának felderítésére egy sor sejthalál és antioxidáns gén expresszióját vizsgáltuk LPS kezelés hatására. A sejthalál gének apoptózis (kaspáz-3 és Bak-1) és parthanatos (Aif és Parp-1) markerek voltak (10. ábra).



10. ábra: Sejthalál asszociált gének expressziós változása M1 polarizáció során. BMDM sejteket 10 ng/mL LPS-sel polarizáltunk a jelölt ideig. A sejthalál gének expresszióját qPCR-

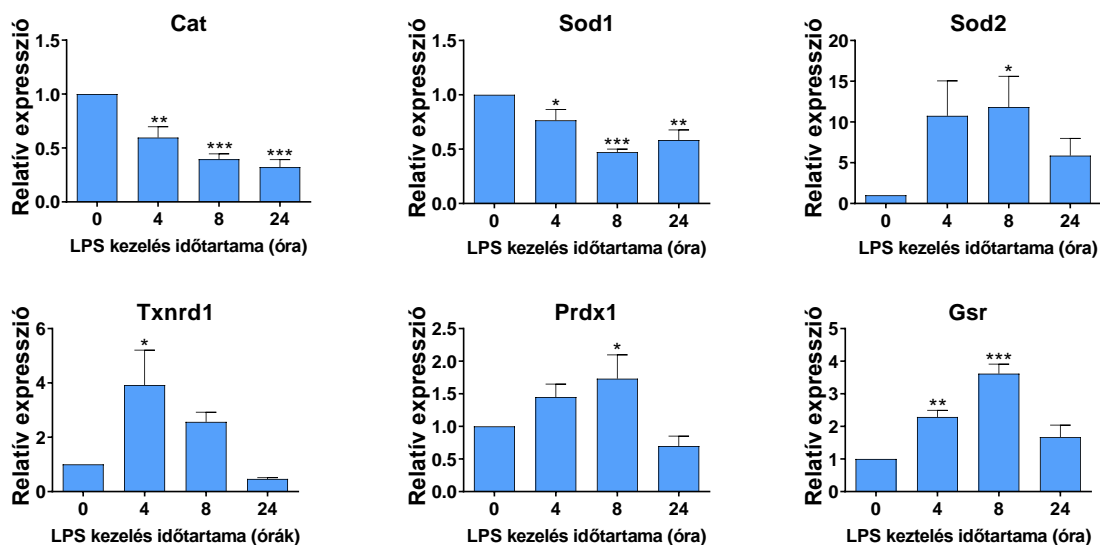
rel vizsgáltuk. A szignifikancia megállapítására egy-utas ANOVA-t használtunk Fischer LSD poszt tesztel. $**p < 0,01$; $***p < 0,001$ a nulladik időponttal szemben.

Az apoptotikus gének expressziójában nem volt megfigyelhető változás, míg az Aif és Parp-1 szignifikáns csökkenését figyelhettük meg mRNA szinten, ami a parthanatos útvonal gátlását feltételezi és jelzi a Parp-1 központi szerepét a sejthalál szabályozásában. Western blot kísérlettel igazoltuk, hogy a Parp-1 expressziójának csökkenése fehérje szinten is megtörténik (11. ábra).



11. ábra: Parp-1 expressziójának csökkenése fehérje szinten. BMDM sejteket 10 ng/mL LPS-sel kezeltünk 24 óráig. A Parp-1 fehérje expresszióját Western blottal vizsgáltuk. Szignifikancia megállapítására t-tesztet végeztünk. $***p < 0,001$.

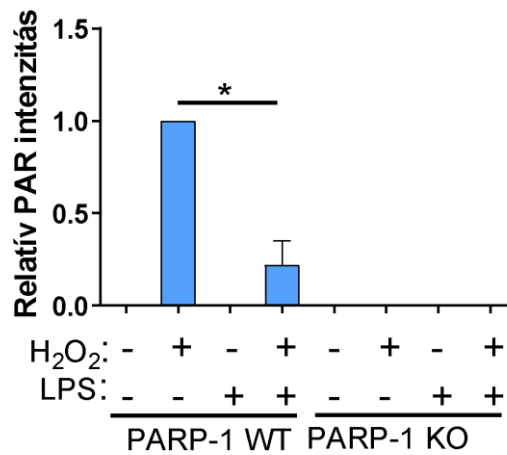
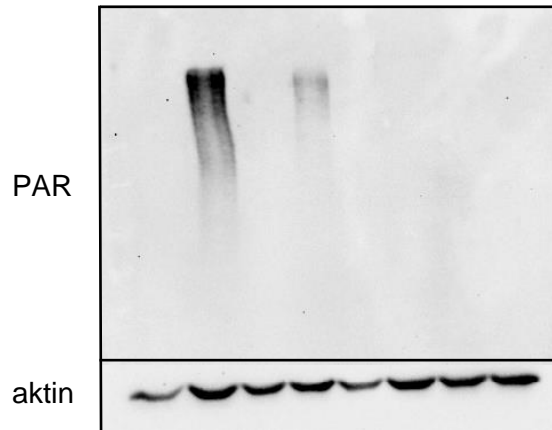
Az oxidatív stressz szabályozásában fontosak a H_2O_2 -ot közvetlenül katalizáló kataláz mellett a NADH/GSH-kapcsolt enzimek (Txnrd1, Prxd1, Gsr) is, illetve a szekunder szuperoxid eltávolítását végző szuperoxid-dizmutázok (Sod1 és Sod2). Meglepetésünkre, a kataláz enzim expressziója az LPS kezelés hatására csökkent, ugyanez volt elmondható a Sod1-ről is, amely a citoplazmatikus izoforma. A thiredoxin-reduktáz-1, peroxiredoxin és glutation reduktáz expressziója szignifikánsan emelkedett LPS kezelés hatására. Legnagyobb emelkedést a mitokondriális Sod2 expressziójában tapasztaltuk (12. ábra).



12. ábra: Antioxidáns gének expressziójának változása M1 polarizáció során. BMDM sejteket 10 ng/mL LPS-sel polarizáltunk a jelölt ideig. Az antioxidáns gének expresszióját qPCR-rel vizsgáltuk. A szignifikancia megállapítására egy-utas ANOVA-t használtunk Fischer LSD poszt teszttel. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ a nulladik időponttal szemben.

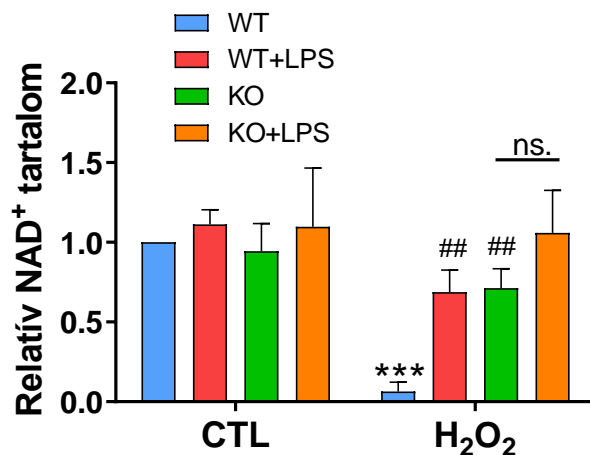
Csökkentett PARiláció és megtartott NAD^+ szint M1 makrofágokban

A PARP-1 expressziós szintjében bekövetkező csökkenés és a citoprotektivitás közötti összefüggés igazolása után a következő lépés a PARP aktiváció mértékének vizsgálata volt. PARP-1 vad típusú és PARP-1 KO egerekből származó csontvelői sejteket differenciáltattunk BMDM sejtekké. A PARP-1 KO sejtekben, H_2O_2 kezelést követően nem volt detektálható a PAR polimer Western blot módszerrel (13. ábra), ami azt bizonyítja, hogy a PARilációért a PARP-1 a felelős. LPS előkezelt vad típusú sejtekben csökkent PARiláció volt megfigyelhető H_2O_2 kezelés hatására.



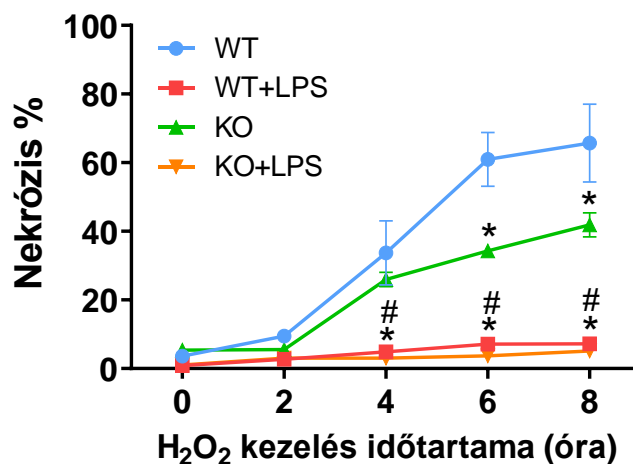
13. ábra: Az M1 makrofágok csökkent PARilációval válaszolnak az oxidatív stresszre. *Parp-1* vad típusú (WT), illetve KO egerekből származó BMDM sejteket kezeletlenül hagytunk, illetve 10 ng/mL LPS-sel kezeltük. A PARilációt 10 perces H₂O₂ (1 mM) kezeléssel indukáltuk. A PAR polimert Western bloton detektáltuk. A szignifikancia meghatározására egy-utas ANOVA-t használtunk Sidak poszt tesztel. * $p < 0,001$

A PARP hiperaktiváció egyik következménye, hogy a sejtek NAD⁺ tartalma kimerül. H₂O₂ kezelés hatására a sejtek NAD⁺ szintje drámaian csökkent, míg a PARP-1 KO sejtekben a változás csekély mértékű volt, amely statisztikailag nem volt szignifikáns, tehát a PARP-1 a fő felhasználója az intracelluláris NAD⁺-nak. LPS előkezelt sejtek is képesek voltak a NAD⁺ szintjüket megtartani, a legmagasabb NAD⁺ szintet az LPS előkezelt KO sejtek mutatták, ez azonban nem volt statisztikailag szignifikáns (14. ábra).



14. ábra: Az M1 makrofágok megőrzik a NAD⁺ tartalmukat. *Parp-1* vad típusú (WT), illetve KO egerekből származó BMDM sejteket kezeletlenül hagytunk, illetve 10 ng/mL LPS-sel kezeltük. PARP aktivációt 1 mM H₂O₂-dal indukáltunk 2 órán át. Meghatároztuk a relatív NAD⁺ mennyiséget. A szignifikancia meghatározására két-utas ANOVA-t használtunk Sidak poszt tesztel. ****p*<0,001 a kontrollal szemben (CTL) és ##*p*<0,01 a vad típussal (WT) szemben.

Annak bizonyítására, hogy a PARP-1 genetikai hiánya nem csak a NAD⁺ szintet tartja meg, de antinekrotikus hatása is, nekrozis essét végeztünk PARP-1 vad típusú és PARP-1 KO sejteken LPS előkezeléssel és anélkül (15. ábra).



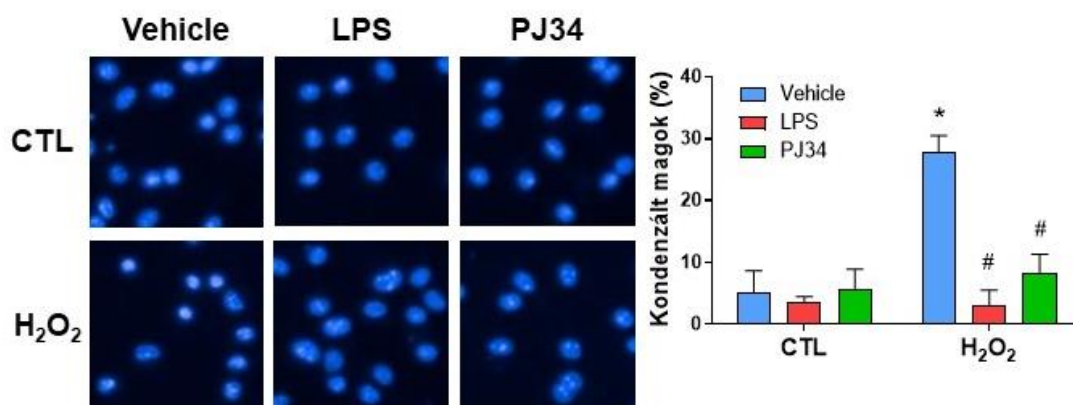
15. ábra: *Parp-1* függő nekrotikus sejthalál BMDM sejtekben. *Parp-1* vad típusú (WT), illetve KO egerekből származó BMDM sejteket kezeletlenül hagytunk, illetve 10 ng/mL LPS-sel kezeltünk. Nekrozist 1 mM H₂O₂-dal indukáltunk az ábrán jelölt időpontokig. A nekrozist

Hoechst és PI vitális festést követően fluoreszcens mikroszkópiával detektáltuk és HCA-val elemeztük. A szignifikancia meghatározására két-utas ANOVA-t használtunk Sidak poszt tesztel. Szignifikancia a vad típusú kontrollal szemben, ahol $*p < 0,001$. Szignifikancia a KO és a KO+LPS kondíciók között, ahol $\#p < 0,001$.

A PARP-1 KO sejtekben késleltetve jelent meg a nekrotikus populáció, ami bizonyítja a PARP-1 depléciónak antinekrotikus hatását. Azonban az LPS előkezelés meggátolta a nekrotikus populáció megjelenését mind a vad típusú, mind a KO sejtekben. Ezért feltételezzük, hogy az LPS hatása csak részben köszönhető a PARP-1 gátlásnak és egyéb mechanizmusok is szerepet játszanak.

AIF független parthanatos gátlása M1 makrofágokban

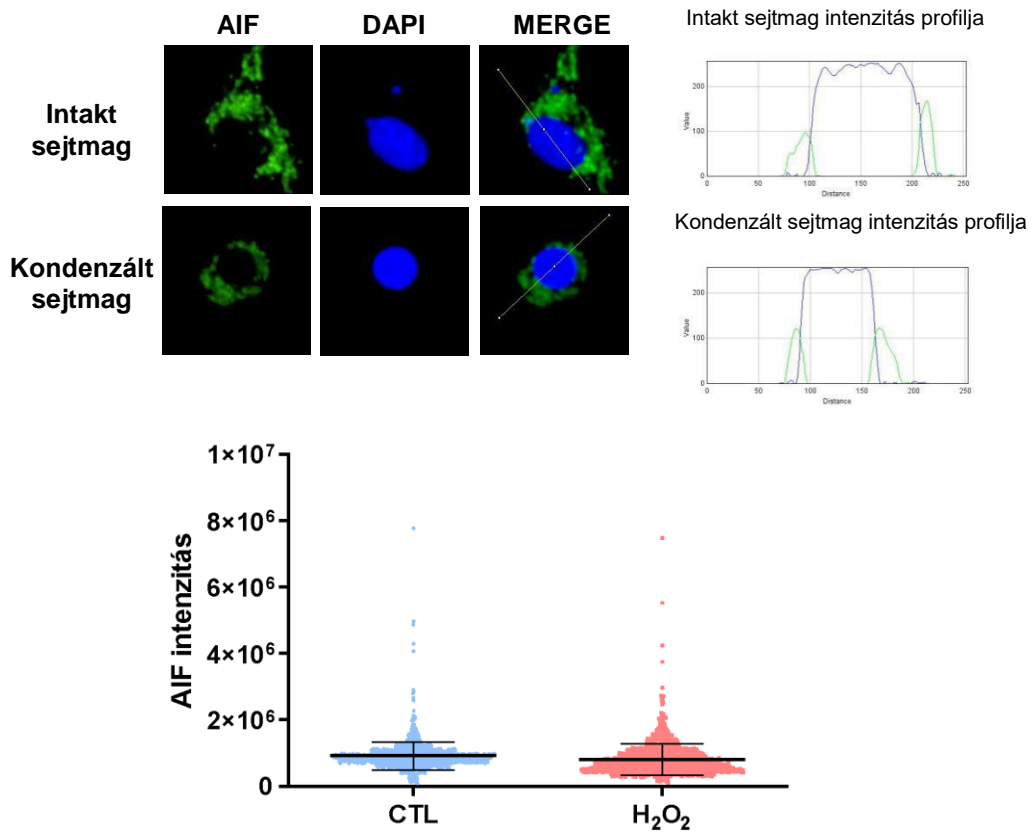
A PARP-1 mediált nekrozisra gyakran hivatkoznak parthanatosként. Egyik markere a sejtmagi morfológia megváltozása. Apoptózis során a sejtmag zsugorodik, majd a sejthalál későbbi szakaszában fragmentálódik. Nekrozis során a sejtmag duzzadása figyelhető meg. A magi morfológia analízisére fluoreszcens mikroszkópiát használtunk, a magokat HCA módszerrel klasszifikáltuk. BMDM sejteket H_2O_2 -dal kezeltünk 4 órára és a sejtmag kondenzálódását figyelhettük meg. A sejtmagi kondenzációt az LPS és a PJ34 (pán-PARP inhibitor) előkezelés teljesen megszüntette (16. ábra).



16. ábra: Parp-1 függő magi kondenzáció M1 makrofágokban. BMDM sejteket kezeletlenül hagytunk, illetve előkezeltünk 10 ng/mL LPS-sel 24 órára vagy 5 μ M PJ34-gyel 60 percre. Sejthalált indukáltunk 1 mM H_2O_2 -dal 4 órára, majd a sejtmagokat fixálás után DAPI-val festettük, és fluoreszcens mikroszkópiával detektáltuk. A sejtek klasszifikációját HCA módszerrel végeztük. A szignifikancia meghatározására két-utas ANOVA-t használtunk Sidak

poszt tesztel. * $p < 0,001$ a kontrollal (CTL) szemben és # $p < 0,001$ a H_2O_2 kezelt mintával szemben.

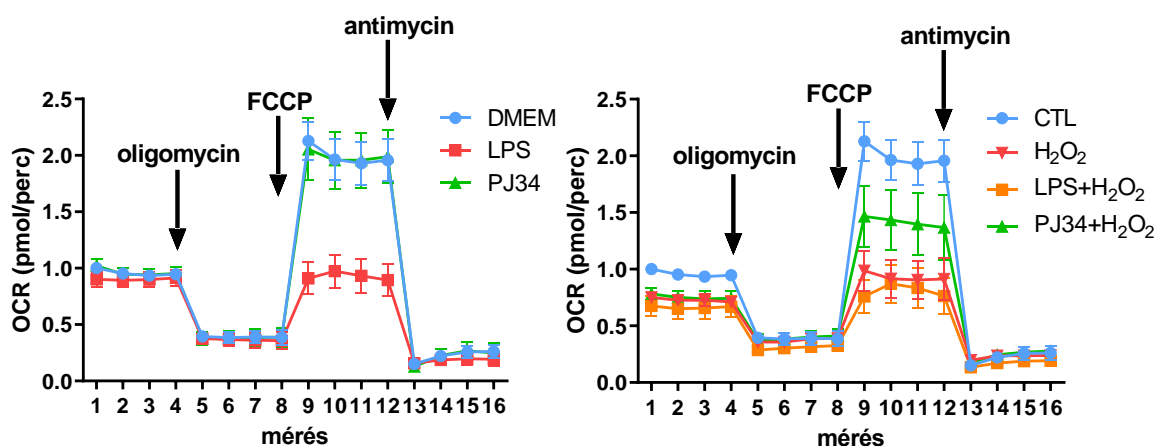
Parthanatos során a PAR polimer citoplazmatikus lokalizációját figyelték meg, ami az AIF transzlokációját indítja el a mitokondriumból a sejtmagba. Az AIF a MIF nukleáz magi lokalizációjáért felel. Ennek a mechanizmusnak a felderítésére konfokális mikroszkópiát alkalmaztunk azonban nem sikerült sejtmagi AIF-et detektálnunk (17. ábra), ezért a mi modellünkben egy AIF-független parthanatosról beszélhetünk.



17. ábra: BMDM sejtekben a Parp-1 által közvetített nekrozis AIF magi transzlokációtól függetlenül zajlik. BMDM sejtekben sejthalált indukáltunk 4 órás 1 mM koncentrációjú H_2O_2 kezeléssel. A sejteket fixáltuk és AIF elleni antitesttel jelöltük, a magokat DAPI-val festettük. A felvételeket konfokális mikroszkópiával készítettük. A kiválasztott magokon az intenzitás profilt ImageJ szoftverrel mértük. A magi AIF intenzitást HCA-val elemeztük, ahol minden egyes pont egy mag AIF intenzitását jelöli (1000 mag/kondíció). Szignifikancia meghatározására t-tesztet végeztünk.

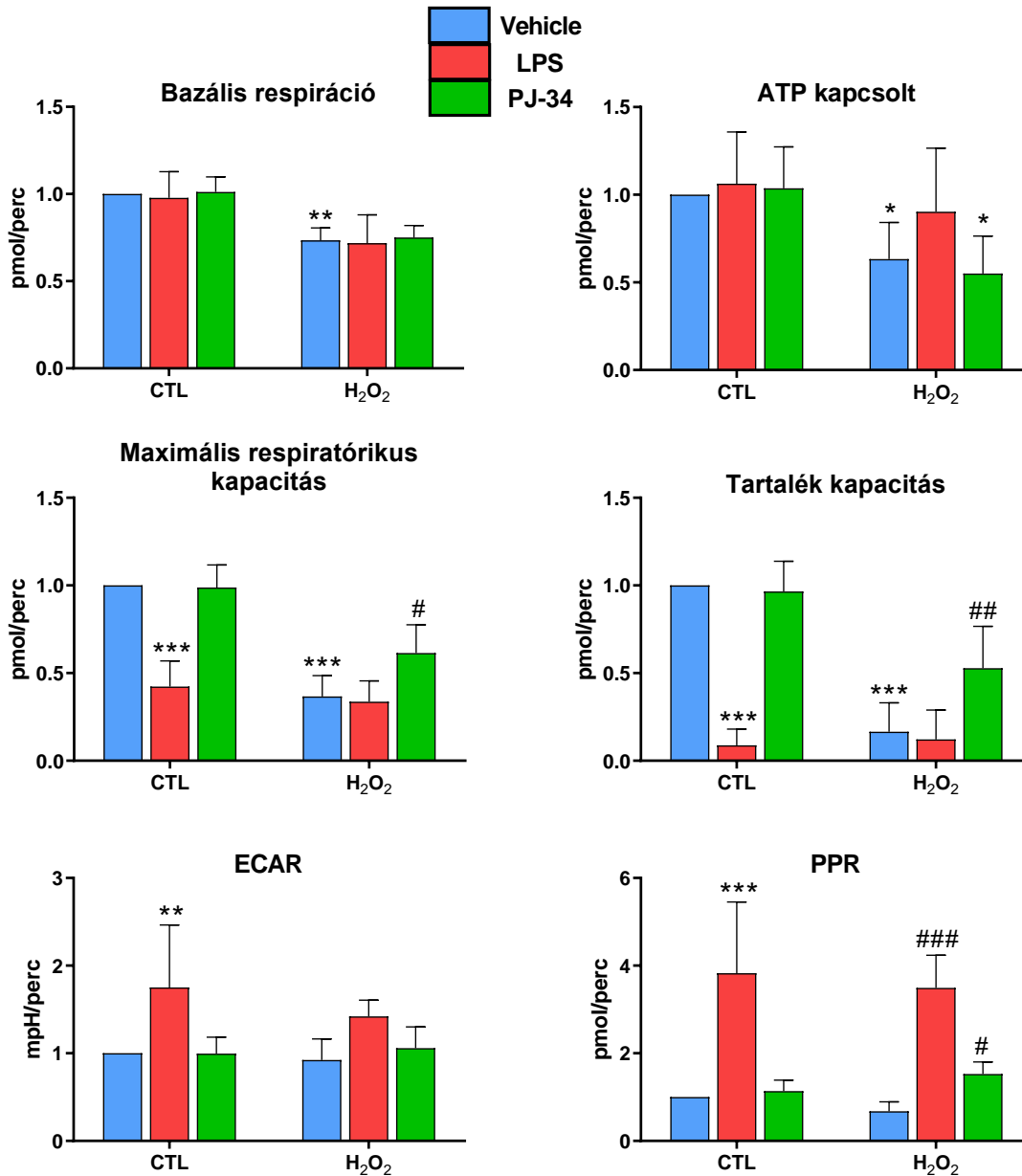
M1 makrofágok metabolizmusa az aerob glikolízis irányába tolódik, közben a mitokondriális aktivitás csökken az ATP szint megtartásával

A H_2O_2 kezelés nemcsak a sejt NAD^+ tartalmát képes depletálni, de az ATP-t is. A metabolikus változások gyakran hatással vannak a sejt citototoxicitás érzékenységére (pl.: Warburg hatás tumorokban). A H_2O_2 kezelés következménye a mitokondriális diszfunkció, amely PARP gátlással csökkenthető, így a mitokondrium képes ATP szintézisére. A metabolikus változások felderítésére és az ATP szint mérésére Seahorse analízist és ATP esszét alkalmaztunk. A Seahorse képes valós időben a glikolízis (ECAR) és a respiráció (OCR) mérésére. Ezen felül még egy respirációs stressztesztet is elvégeztünk, amiből számolható az alap-, maximális-, és a tartalék respiráció is. Az alap respirációt és a stresszteszt eredményeit a 18-as ábra mutatja be, baloldalon az LPS és PJ34 hatása, míg a jobb oldali panelen egy 2 órás H_2O_2 kezelés LPS és PJ34 előkezeléssel és nélküle.



18. ábra: M1 makrofágok Seahorse analízise. BMDM sejteket kezeletlenül hagytunk, illetve előkezeltünk 10 ng/mL LPS-sel 24 órára, vagy 5 μ M PJ34-gyel 60 percre. Oxidatív stresszt 1 mM H_2O_2 -dal indukáltunk 2 órára, majd Seahorse analízist végeztünk. A görbék a stresszteszt során végzett mérési pontokat reprezentálják.

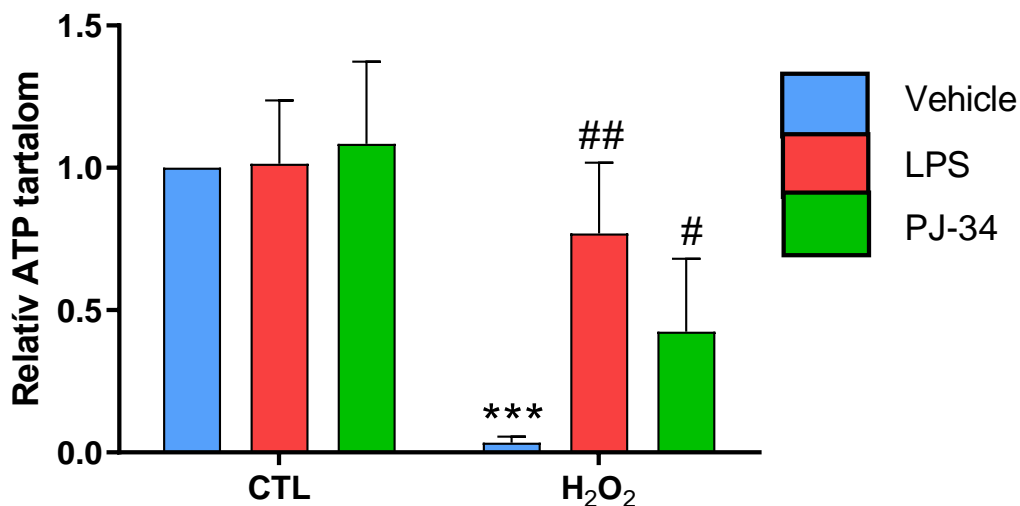
A fehérjetartalomra való normalizálás után a származtatott paramétereket az 19-es ábra mutatja be.



19. ábra: Warburg metabolizmus M1 makrofágokban. BMDM sejteket kezeletlenül hagytunk, illetve előkezeltünk 10 ng/mL LPS-sel 24 órára, vagy 5 μ M PJ34-gyel 60 percre. Oxidatív stresszt 1 mM H₂O₂-dal indukáltunk 2 órára, majd Seahorse analízist végeztünk. A kapott értékeket fehérje mennyiségre normáltuk. A szignifikancia meghatározására két-utas ANOVA-t használtunk Fischer LSD poszt tesztel. Szignifikancia a kezeletlen kontrollhoz képest, ahol * p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001. Szignifikancia a H₂O₂-dal kezelt csoporthoz képest, ahol # p <0,05; ## p <0,01; ### p <0,001.

A bazális respiráció, ami a sejt alap energia igényét mutatja, ami a mitokondriális proton átjárásból származik H₂O₂ kezelés hatására szignifikánsan csökken, 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 (FCCP indukálta maximális mitokondriális aktivitás, ami jelzi, hogy a sejt mitokondriális aktivitása mennyire növekedhet) és a tartalék kapacitásban (megmutatja, hogy a sejt „elméleti maximum” mekkora mitokondriális aktivitásra képes) 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 a glikolízist (ECAR) szignifikánsan megemelte, illetve a proton produkciót (PPR) is, amely folyamatok ATP forrásként működhetnek. A sejtek intracelluláris ATP szintjének mérésére ATP esszét használtunk (20. ábra). A 3 órás H₂O₂ kezelés hatására a sejtek ATP szintje szinte nullára csökkent, amit az LPS és a PJ34 előkezelés is szignifikánsan magasabban tartott.



20. ábra: Az M1 makrofágok megtartott ATP szintet mutatnak H₂O₂ kezelés után. BMDM sejteket kezeletlenül hagytunk, illetve előkezeltünk 10 ng/mL LPS-sel 24 órára vagy 5 μM PJ34-gyel 60 percre. Oxidatív stresszt 1 mM H₂O₂-dal indukáltunk 3 órára majd relatív ATP szintet mértünk, amit fehérje mennyiségre normalizáltunk. A szignifikancia meghatározására két-utas ANOVA-t használtunk Fischer LSD poszt teszttel. Szignifikancia a kezeletlen kontrollhoz képest, ahol ****p*<0,001. Szignifikancia a H₂O₂-dal kezelt csoporthoz képest, ahol #*p*<0,05; ##*p*<0,01.

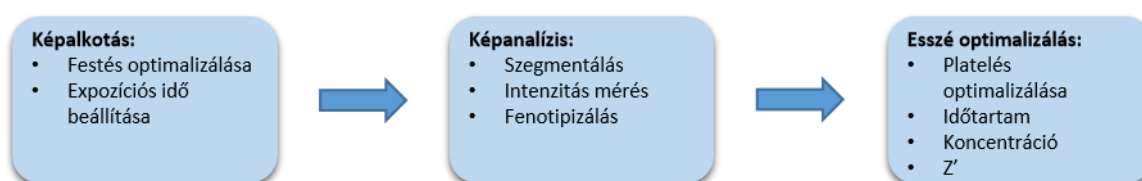
A Seahorse analízis alapján elmondható, hogy a PJ34 a PARP gátlásán keresztül képes a mitokondriális respirációt megtartani oxidatív stressz során, így biztosítja a sejt számára az elegendő ATP mennyiséget. Ezzel szemben az LPS előkezelés egy aerob glikolízist indukál és a mitokondriális funkciókat csökkenti.

Citoprotektív molekulák azonosítása HCS módszerrel

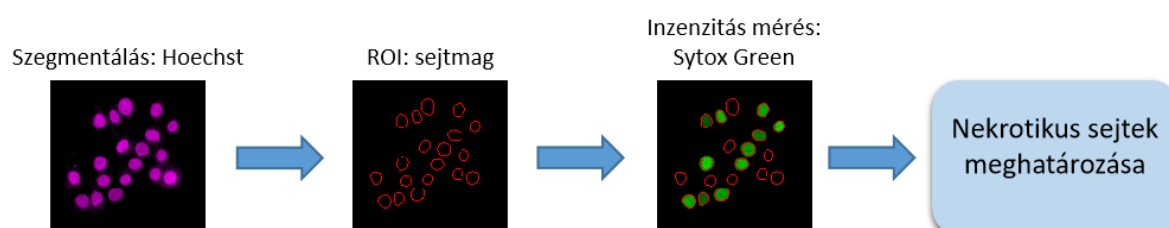
Az automatizált mikroszkópia fejlődésével lehetőség nyílt a nagy áteresztőképességű szűrővizsgálatok és a képanalízis alapú fenotipizálás kombinálására (HCS), ami új dimenziókat nyitott meg a gyógyszerkutatásban. Célunk egy parthanatos szabályozó molekulák szűrésére alkalmas módszer beállítása és egy kisméretű (774 molekulát tartalmazó) könyvtár tesztelése volt.

Citoprotektív molekulák szűrésére alkalmas HCS módszer beállítása

Modellként HaCaT sejtvonalat választottuk mivel a H₂O₂ által indukált PARP-1 függő sejthalál már jól jellemzett ezekben a sejtekben. Általános HCS optimalizálási lépéseket az 21-es ábra mutatja be. Parthanatos markerként a sejtmembrán permeabilitási esszéként használt Sytox Green fluoreszcens festéket választottunk. A festés és képképzés optimalizálása után a képanalízis folyamatát állítottuk be Harmony szoftveren (22. ábra). A képek szegmentálását és az intenzitás mérését követően meghatároztuk a nekrotikus populáció arányát a teljes sejtszámhoz képest és a nekrozis %-ában fejeztük ki.



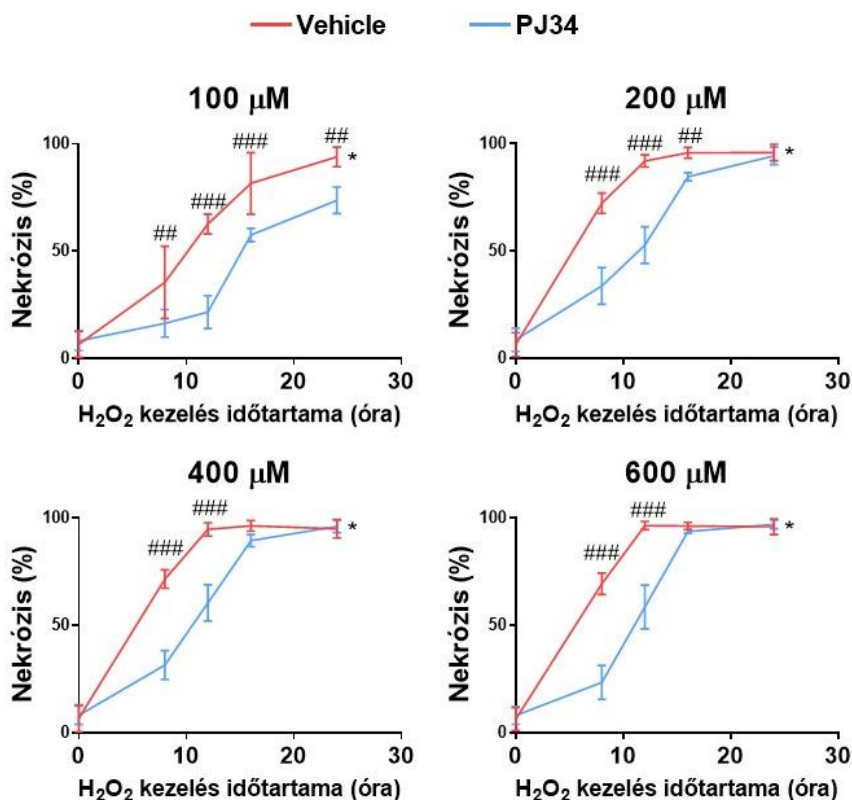
21. ábra: HCS beállításának lépései. Általános folyamatára egy HCS kísérlet beállításához. Első lépésként egy megbízható markert kell keresni, ami a mi kísérleteink esetében a nekrozis mérésére alkalmas Sytox Green felvétel volt. Második lépésként a képanalízis optimalizálását kell elvégezni, majd az esszé kondícióinak optimalizálását. Szükség esetén a lépések ismételvek, míg az esszé megfelelően nagy különbséget mutat a pozitív és negatív kontrollok között.



22. ábra: HCS képanalízis főbb lépései. A képek szegmentálása a Hoechst csatorna alapján történt. Morfológiai és intenzitás paraméterek használatával a hibásan meghatározott sejtmagokat kivettük az analízisből. A nekrozis mértékét a Sytox Green csatorna

intenzitásának meghatározásával végeztük. A teljes kép hisztogramjából meghatároztuk azt az intenzitást, ami fölött nekrotikusnak tekintettünk egy sejtmagot. A nekrozis mértékét az alábbi képlettel számoltuk ki: nekrotikus magok száma/összes sejtmag száma*100.

Az optimalizálás következő lépése a kísérleti körülmények meghatározása volt (23. ábra). Különböző koncentrációjú H₂O₂-dal kezeltük a HaCaT sejteket időfüggő módon.



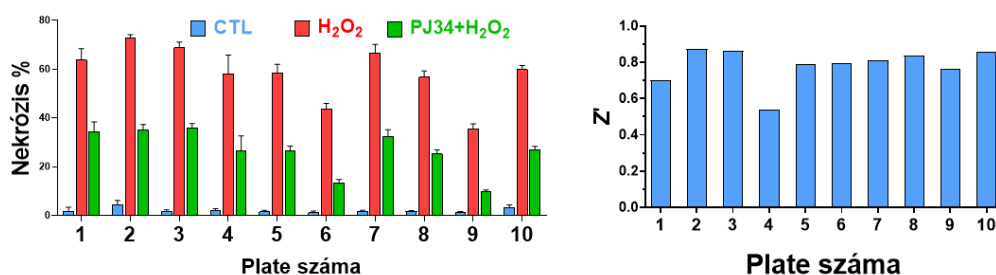
23. ábra: HCS körülményeinek optimalizálása. HaCaT sejteket kezeletlenül hagytunk, illetve 5 μM PJ34-gyel előkezeltünk 60 percig, majd nekrozist indukáltunk H₂O₂-dal a feltüntetett ideig illetve koncentrációban. A nekrozist Sytox Green esszével mértük. Szignifikancia meghatározására két-utas ANOVA-t használtunk. Dunnett's poszt tesztet használtunk a nulladik időponthoz történő szignifikancia meghatározására, ahol *p < 0,001, illetve Bonferroni tesztet a PJ34 és Vehicle csoportok közti összehasonlításához ahol ##p < 0,01 és ###p < 0,001.

A koncentráció növelésével csak a 100 μM és a 200 μM H₂O₂ kezelés között tapasztaltunk kinetikai különbséget, a koncentráció további növelésével nem változott a sejthalál mértéke, ezért a 400 μM-t és 600 μM-t elvetettük. A PARP függés detektálására

PJ34 előkezelést alkalmaztunk. A sejthalál első 12 órájában tapasztaltunk jelentős citoprotektivitást a PJ34 előkezelt sejtekben, míg ez a védelem 16, illetve 24 óránál már elenyésző vagy teljesen el is tűnik. A szűréshez legmegfelelőbbnek a 200 μM H_2O_2 -ot és a 8 órás kezelést választottuk.

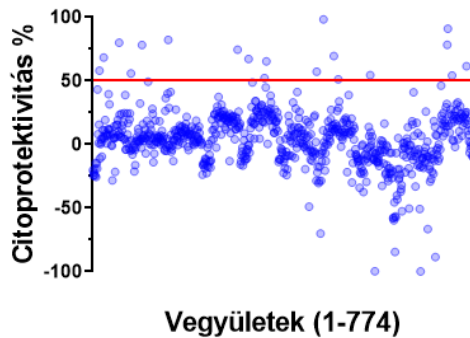
A HCS eredménye

A fentebb beállított esszét alkalmazva leszűrtünk egy FDA által jóváhagyott molekulákat tartalmazó, 10 plateből álló molekulakönyvtárat. Minden plate-re az alábbi kontrollokat helyeztük el, hogy a szűrés minőségét ellenőrizni tudjuk: 4 kezeletlen lyuk (negatív kontroll), 8 H_2O_2 -dal kezelt lyuk (pozitív kontroll) és 4 PJ34+ H_2O_2 -dal kezelt lyuk, ami a sejthalál PARP függésének igazolására szolgált. Mindhárom kontroll jól elkülöníthető volt, amit az 24-es ábra bal panelén láthatunk. Minden plate-re kiszámoltuk a Z-factort (Z') is (24. ábra jobb panel), amit HTS esszéknél vezettek be, hogy eldönthető legyen az esszében bekövetkező változás elég nagy-e ahhoz, hogy a mérés megbízható eredményt adjon. Minden plate esetében a $Z' > 0,5$ értéket kaptunk, ami HCS esszénél kiválónak mondható.



24. ábra: HCS eredmények minőségellenőrzése. Az egyes platek kontrolljainak értéke a nekrózis %-ában kifejezve. Minden platen 4 kezeletlen (negatív kontroll), 8 H_2O_2 -dal kezelt (pozitív kontroll) és 4 PJ34+ H_2O_2 -dal kezelt (PARP függés igazolásához) lyuk volt (bal panel). Az esszé robusztusságának meghatározására a 4 negatív és a 8 pozitív kontroll felhasználásával kiszámoltuk a Z-faktort, amely minden plate esetében nagyobb volt, mint 0,5 (jobb panel).

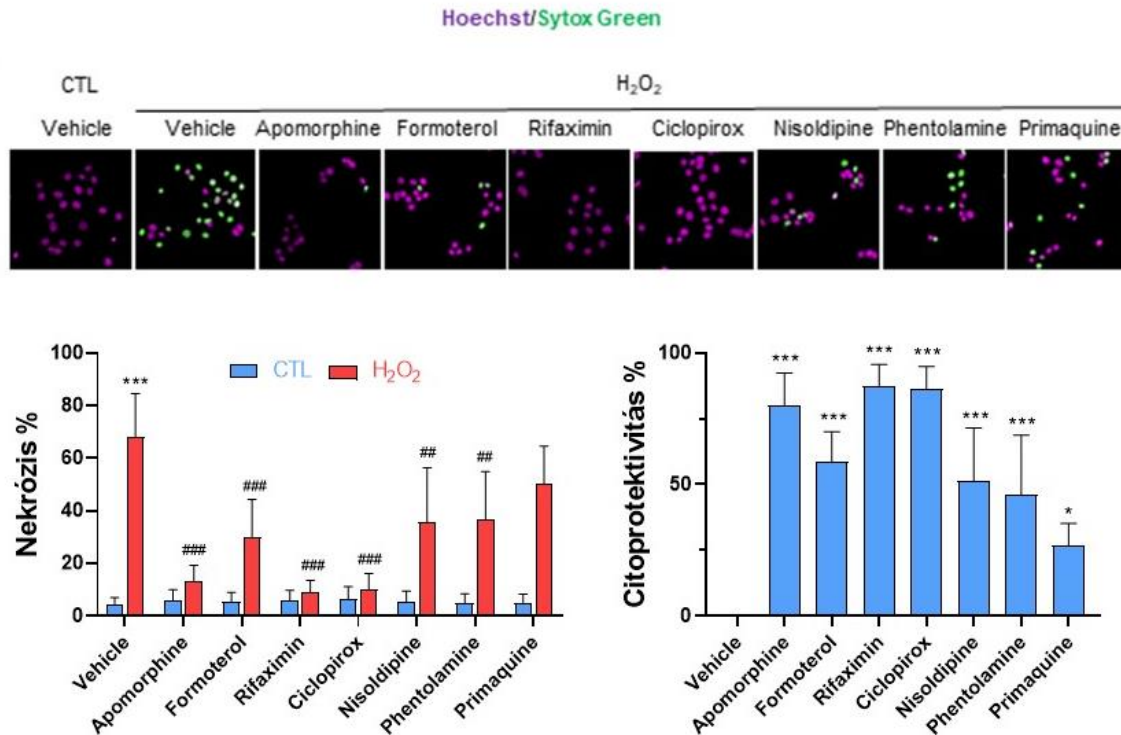
A “hit” vegyületek kiválasztásához a 10 plate eredményeit egy ábrában összesítettük (25. ábra). A plate-ek közötti variancia kiküszöbölésére a nekrózis %-ból citoprotektivitás %-ot számoltunk, és dot plot-on ábrázoltuk. Az 50% fölötti citoprotektivitást mutató molekulákat “hit” vegyületeként definiáltuk. Ennek a kritériumnak 20 molekula felelt meg.



25. ábra: “Hit” vegyületek meghatározása. A dot ploton a szűrésben részt vevő összes molekula látható, nekrozis % helyett citoprotektivitás %-ában kifejezve, hogy kizárjuk a platek közötti varianciából adódó egyenetlenségeket. “Hit” vegyületeként az 50 %-nál nagyobb citoprotektivitást mutató szereket választottuk.

“Hit” vegyületek validálása

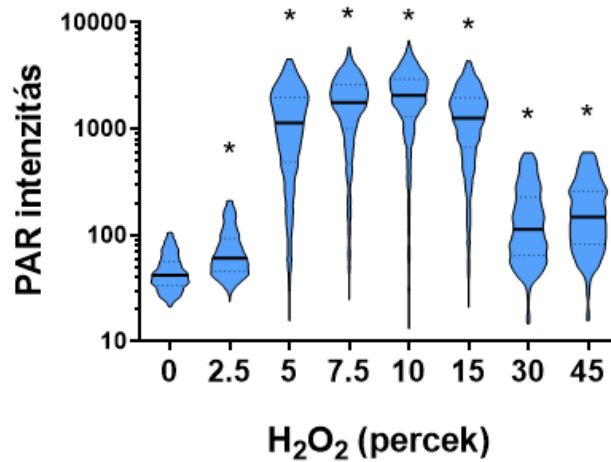
Megvizsgáltuk, hogy potenciálisan melyek azok a vegyületek, amelyek relevánsak lehetnek a további vizsgálatokban, továbbá manuálisan is leellenőriztük a találatokat. Az idarubicin, doxorubicin, mitoxantrone és epirubicin fals pozitívnak mutatkozott, mivel az ezekkel a szerekekkel kezelt sejtek csak nagyon gyenge jelet mutattak Hoechst festésben, ezért a kép szegmentálása sem volt már tökéletes. Mind a négy szer DNS interkalálódó ágens, ezért interferálnak az esszével, ezért a Hoechst és a Sytox Green festékek nukleinsavhoz történő kötődése zavart szenvedett. További vegyületeket szűrtünk ki az irodalom áttekintésével, már publikált citoprotektív hatásuk miatt. Végül hét molekulát tartottunk meg további analízisre. A hét szer bevonásával újra elvégeztük a nekrozis esszét a szűrésben használt 10 μ M-os koncentrációval. Mind a hét molekula citoprotektívnek bizonyult, leghatékonyabbak az apomorfín, ciclopirox és rifaximin voltak (26. ábra).



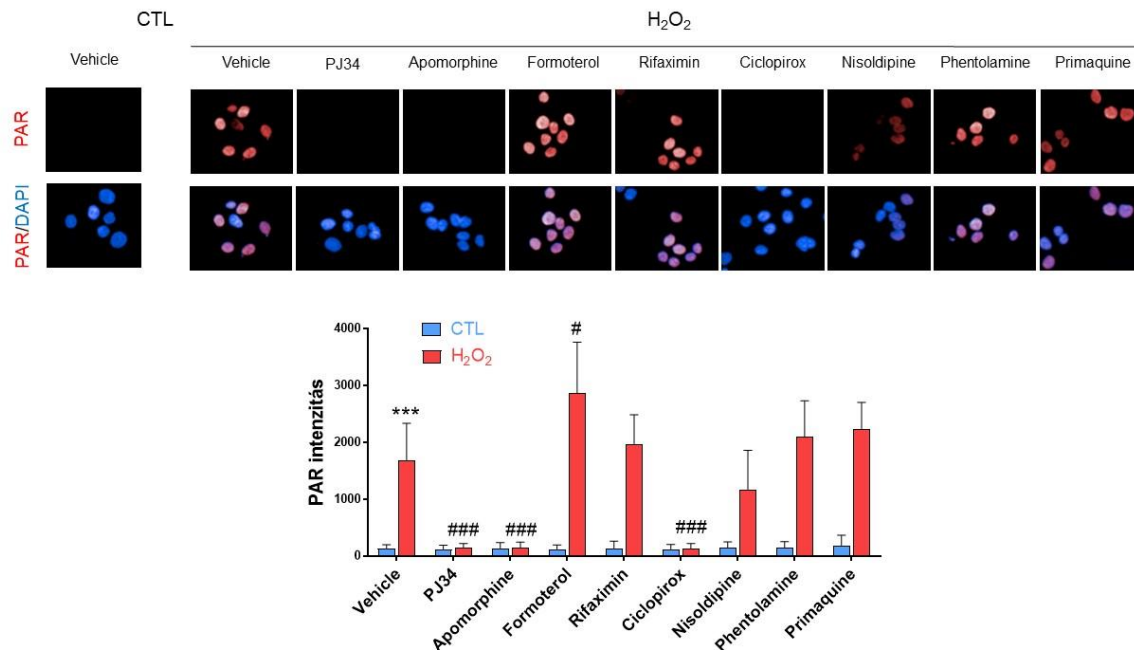
26. ábra: Hit vegyületek validálása. HaCaT sejteket kezeletlenül hagytunk (kontroll) illetve 10 μ M, az ábrán feltüntetett szerrel kezeltük 60 percig, majd sejthalált indukáltunk 200 μ M H₂O₂-dal 8 órán át. A nekrozist Sytox Green esszével detektáltuk és HCA módszerrel kvantáltuk. (A) Reprezentatív képek az esszéből. A sejthalál mértéke nekrozis %-ában kifejezve (bal panel). Szignifikancia meghatározására egy-utas ANOVA-t használtunk Dunnett's poszttesttel ahol *** $p < 0,001$ a kontroll (CTL) mintával szemben és ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ a H₂O₂-dal kezelt mintával szemben. A szerek védő hatásának ábrázolása a citoprotektivitás %-ában kifejezve (jobb panel). Szignifikancia meghatározására egy-utas ANOVA-t használtunk Dunnett's poszt testtel, ahol * $p < 0,05$ és *** $p < 0,001$.

A ciclopirox és az apomorfin PARP gátló molekulák

Következő lépésként azt vizsgáltuk meg, hogy mely szerek hatnak a PARiláció folyamatára. Ezért HaCaT sejteket különböző ideig kezeltünk H₂O₂-dal majd immunfluoreszcens PAR festést végeztünk (27. ábra). A PAR intenzitás növekedése 5 és 15 perc között volt a legjelentősebb, ezért a további vizsgálatokra a legnagyobb intenzitást mutató 10 perces kezelést választottuk, most már a szerek jelenlétében (28. ábra).



27. ábra: A PARiláció időfüggésének vizsgálata. HaCaT sejtekben PARilációt indukáltunk 200 μM H_2O_2 -dal a jelölt ideig. A sejteket fixáltuk, majd a képződött PAR-t antitesttel jelöltük. A detektálást fluoreszcens mikroszkópiával végeztük. Átlag fluoreszcens intenzitást számoltunk sejttagonként (500 sejt/nagyonkondíció), és violin ploton ábrázoltuk az eredményeket. Szignifikancia megállapítására egy-utas ANOVA-t használtunk Dunnett's poszt teszttel, ahol $*p < 0,001$.



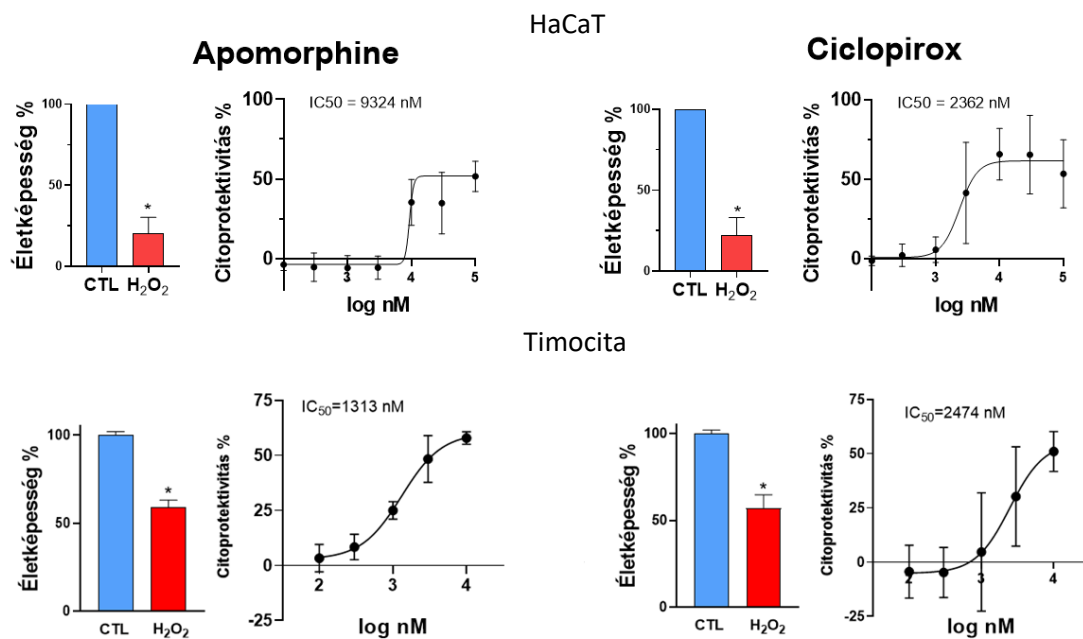
28. ábra: A ciclopirox és az apomorfin gátolják a H_2O_2 által indukált PARilációt. HaCaT sejteket a feltüntetett szerekkel (10 μM) kezeltük 60 percig. A PARilációt 200 μM H_2O_2 -dal indukáltuk 10 percig. A sejteket fixáltuk majd a képződött PAR-t antitesttel jelöltük. A detektálást fluoreszcens mikroszkópiával végeztük (reprezentatív képek a felső panelen). Átlag fluoreszcens intenzitást ábrázoltunk lyukanként (alsó panel). Szignifikancia meghatározására

egy-utas ANOVA-t használtunk, Dunnett's poszt tesztel ahol $***p < 0,01$ a kontrollal (CTL) szemben és $^{\#}p < 0,05$, valamint $^{\#\#\#}p < 0,001$ a H_2O_2 -dal szemben..

A hét molekula közül mindössze az apomorfin és ciclopirox voltak azok, amelyek a PARilációt gátolták, a formoterol kissé emelte, míg a többi szernek nem volt hatása. Mivel az apomorfin és a ciclopirox voltak azok, melyek PARP gátló mechanizmussal védenek, és ezek voltak a leghatékonyabbak a citoprotektivitásban is ezért feltételezhetjük, hogy a korai szignalizációs útvonalakon ható molekulák a leghatékonyabbak. Ezért további vizsgálatokra és a mechanizmus felderítésére ezt a két molekulát választottuk.

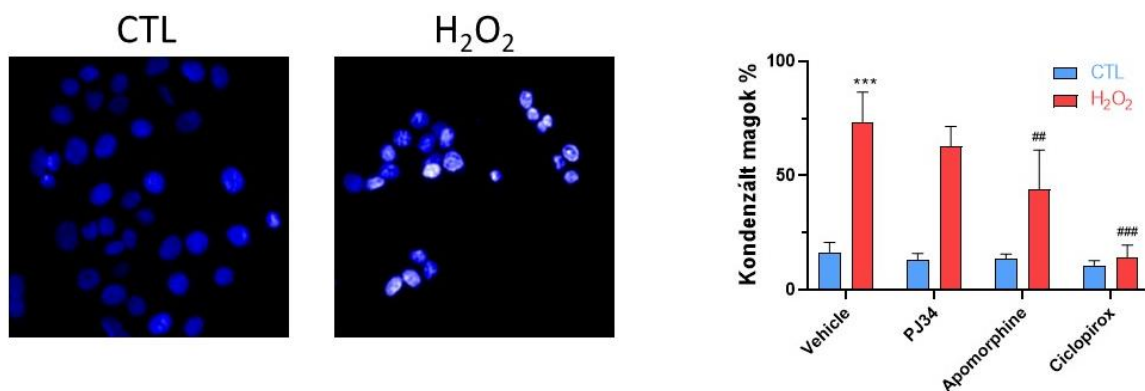
A ciclopirox és az apomorfin citoprotektív hatásának farmakokinetikai vizsgálata HaCaT sejteken és egér timocitákon

Annak érdekében, hogy a citoprotektivitást szélesebb körűen tudjuk jellemezni meghatároztuk a cilopirox és apomorfin IC_{50} értékét (29. ábra). Elvégeztük a mérést HaCaT sejteken, de ezúttal a nekrozis esszét életképesség esszére (MTT) cseréltük. A sejteket különböző koncentrációjú ciclopirox-szal és apomorfinnal kezeltük, majd sejthalált indukáltunk H_2O_2 -dal 8 óráig. Az IC_{50} értékek $1,8 \mu M$, illetve $9,2 \mu M$ voltak ciclopirox-ra és apomorfinra. A citoprotektivitás általános jellegének bizonyítására egér primer timocitákon is elvégeztük a kísérletet. A PARP által közvetített nekrozis jól jellemzett ebben a sejttípusban. Az IC_{50} meghatározására, szuszpenziós sejtek lévén, nem MTT-t, hanem PI esszét alkalmaztunk. A timocitákat ebben az esszében 4,5 óráig kezeltük H_2O_2 -dal. Az IC_{50} értékek ebben a sejttípusban a következőképpen alakultak, $1,2 \mu M$, illetve $0,35 \mu M$ ciclopirox-ra és apomorfin-ra.



29. ábra: A ciclopirox és az apomorfin vizsgálata HaCaT és egér timocita sejteken. HaCaT sejteket (felső panel) az ábrán jelölt koncentrációjú ciclopirox-szal és apomorfinnal előkezeltünk 60 percig, majd sejthalált indukáltunk 200 μ M H₂O₂-dal 8 órára. A sejtek életképességét MTT esszével határoztuk meg. A kontroll (CTL) és a H₂O₂ közötti szignifikancia meghatározására a Welsch's t-tesztet alkalmaztunk, ahol * $p < 0,05$. A citoprotektivitás mértékét a koncentráció függvényében ábrázoltuk. Egér timocita sejteket (alsó panel) a jelölt koncentrációjú ciclopirox-szal és apomorfinnal előkezeltünk 60 percig, majd sejthalált indukáltunk 200 μ M H₂O₂-dal 4,5 órára. A sejthalált propidium jodid festést követően áramlási citometriával vizsgáltuk. A kontroll (CTL) és a H₂O₂ közötti szignifikancia meghatározására Welsch's t-tesztet alkalmaztunk, ahol * $p < 0,001$. A citoprotektivitás mértékét a koncentráció függvényében ábrázoltuk.

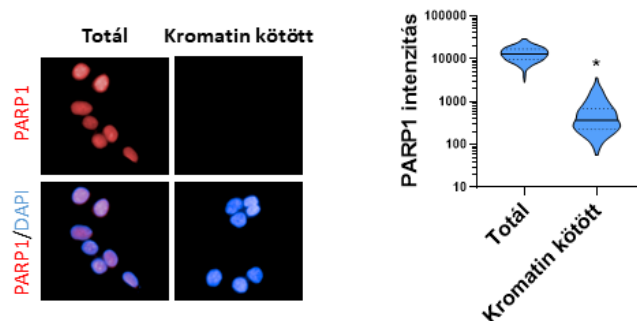
A sejthalál az egyik legszembetűnőbb változást a sejtmag morfológiájában okozza. Parthanatosban leírták a magi kondenzációt, amit mi fluoreszcens mikroszkópiával detektáltunk és HCA módszerrel elemeztünk. A sejteket előkezeltük, majd 8 órás H₂O₂ kezelést követően vitálisan festettük a magokat Hoechst festékekkel (30. ábra). Mind az apomorfin, mind a ciclopirox szignifikánsan csökkentette a kondenzált magok arányát a populációban.



30. ábra: A ciclopirox és az apomorfin véd a H₂O₂ indukálta sejtmagi kondenzáció ellen. HaCaT sejteket kezeletlenül hagytunk vagy 5 μM PJ34-gyel, 10 μM apomorfinnal, illetve ciclopirox-szal előkezeltünk 60 percig, majd sejthalált indukáltunk 200 μM H₂O₂-dal 8 óráig. A sejteket Hoechst-tel festettük és fluoreszcens mikroszkópiával detektáltuk, majd HCA módszerrel elemeztük. A sejtmagokat morfológiájuk alapján normális és kondenzált szubpopulációkra osztottuk. Szignifikancia meghatározására egy-utas ANOVA-t alkalmaztunk. Dunnett'si poszt tesztel ahol *** $p < 0,01$ a kontrollal (CTL) szemben és ## $p < 0,01$ és ### $p < 0,001$ a H₂O₂-dal szemben.

A ciclopirox és az apomorfin gátolják a ROS által indukált PARP-1 kromatin kötődést

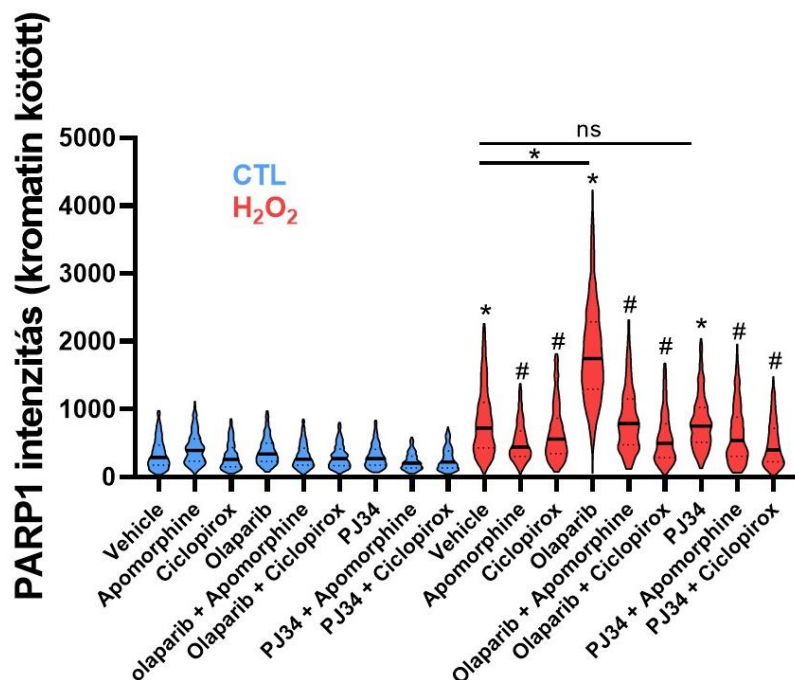
Felvetődött, hogy ezek a szerek a PARP gátlásán keresztül hatnak-e, vagy attól proximálisan, már a DNS károsodást befolyásolják. Első lépésként egy PARP-1 kromatin kötés esszét végeztünk. A sejteket fixálás előtt 0,2 %-os PBS Triton-X-szel mostuk, hogy a kromatinhoz nem kötött PARP-1-et eltávolítsuk, majd PARP-1 immunfluoreszcenciát végeztünk (31. ábra).



31. ábra: PARP1 preextrakció eltávolítja a kromatinhoz nem kötött PARP1 molekulákat. HaCaT sejteket kezeletlenül hagytunk, illetve preextraháltunk 0,2% Triton X-szel, hogy a kromatinhoz nem kötött PARP-1 molekulákat eltávolítsuk. A sejteket fixáltuk, PARP-1-re

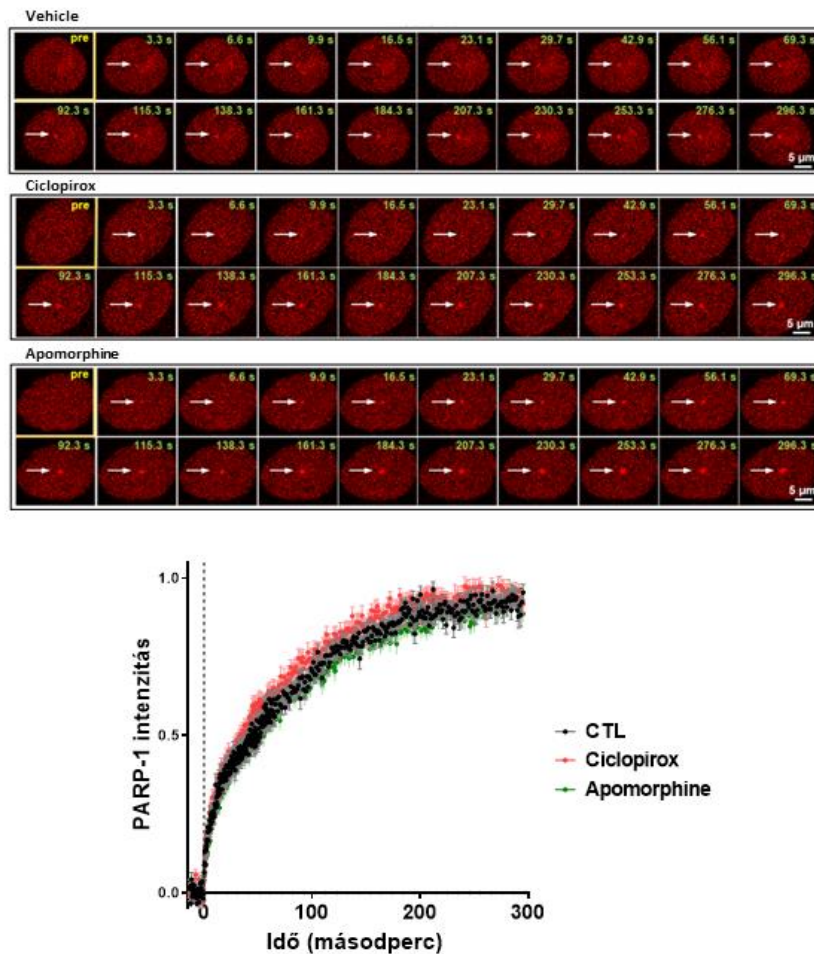
specifikus antitesttel jelöltük, majd fluoreszcens mikroszkópiával detektáltuk. Az átlagos fluoreszcens intenzitást violin ploton ábrázoltuk (1000 sejtmag/kondíció). Szignifikancia meghatározásához Welch's t-tesztet alkalmaztunk, ahol $*p < 0,001$.

A PARP-1 DNS „nick” szenzorként működik, kötődik a DNS-hez és – autoPARilációt követően – le is válik a DNS-ről. Bizonyos PARP inhibitorok, például az olaparib csapdába tudja ejteni a PARP-1-et a DNS törés helyén és PARP-1-DNS komplexet hoz létre. Más szerek, például a PJ34 más mechanizmussal hatnak ezért nem hoznak létre ilyen komplexet. HaCaT sejteket előkezeltünk apomorfinnal és ciclopirox-szal valamint PARP inhibitorokkal (olaparib és PJ34) illetve ezek kombinációjával. 60 perces H_2O_2 kezelés hatására a PARP-1 kromatinhoz való kötődése megemelkedett, amit az apomorfin és a ciclopirox gátoltak. Az olaparib tovább tudta fokozni a PARP-1 kromatin kötését, amit a szerek ugyancsak gátoltak, míg a PJ34-nek nem volt hatása a PARP-1-DNS komplex kialakulására (32. ábra).



32. ábra: A ciclopirox és apomorfin gátolja a H_2O_2 által kiváltott PARP1 kromatin kötést. HaCaT sejteket kezeletlenül hagyunk (vehicle) illetve $10 \mu M$, az ábrán feltüntetett szerrel kezeltük 60 percig. PARP-1 kromatin kötődést indukáltunk $200 \mu M H_2O_2$ -dal 60 percig. A sejteket fixáltuk és PARP-1-re specifikus antitesttel jelöltük, majd fluoreszcens mikroszkópiával detektáltuk. Az átlagos fluoreszcens intenzitást violin ploton ábrázoltuk (1000 sejtmag/kondíció). Szignifikancia meghatározásához Kruskal-Wallis tesztet használtunk Dunn's poszt tesztel, ahol $*p < 0,001$ és $\#p < 0,001$.

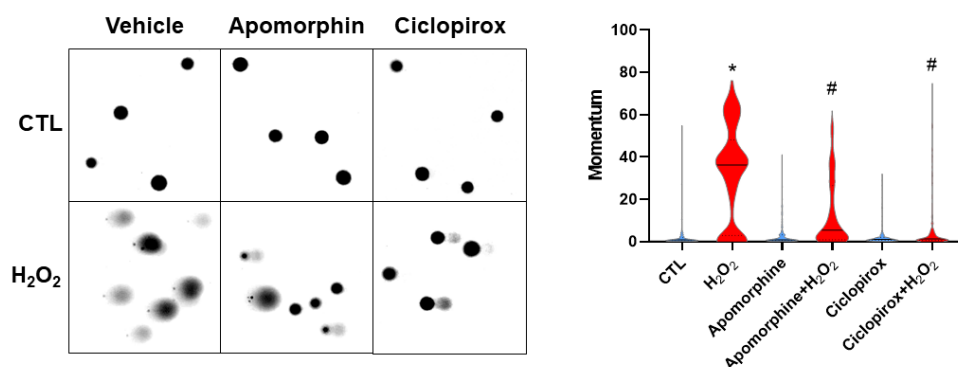
Annak eldöntésére, hogy a szerek a PARP-1 kromatinhoz való kötődését befolyásolják-e vagy más mechanizmussal gátolnak lézeres mikroirradiációs kísérletet végeztünk (33. ábra). mCherry-PARP-1-el transzfektált sejtek sejtmagján UV lézerrel kis ponton DNS károsodást indukáltunk és a PARP-1 kötődését időben követtük a mikroirradiáció területén. A szerek nem befolyásolták a PARP-1 megjelenését az UV-val sugárzott területen, tehát nem a PARP-1-DNS kölcsönhatását befolyásolhatják.



33. ábra: A ciclopirox és az apomorfín nem befolyásolja a PARP-1-DNS kölcsönhatást. HaCaT sejteket mCherry-PARP-1- konstrukttal transzfektáltunk 48 órára. A sejteket 10 μ M ciclopirox-szal illetve apomorfínnal és 10 μ g/mL Hoechst-el kezeltük 30 percig. A fehér nyíllal jelölt ponton mikroirradiációt végeztünk a 405 nm hullámhosszú lézerrel, és a PARP-1 DNS károsodáshoz való kötődését követtük időben (felső panel). A mért fluoreszcens intenzitást a maximumra normálva ábrázoltuk (alsó panel).

A ciclopirox és az apomorfin gátolja a H₂O₂ indukálta genotoxicitást

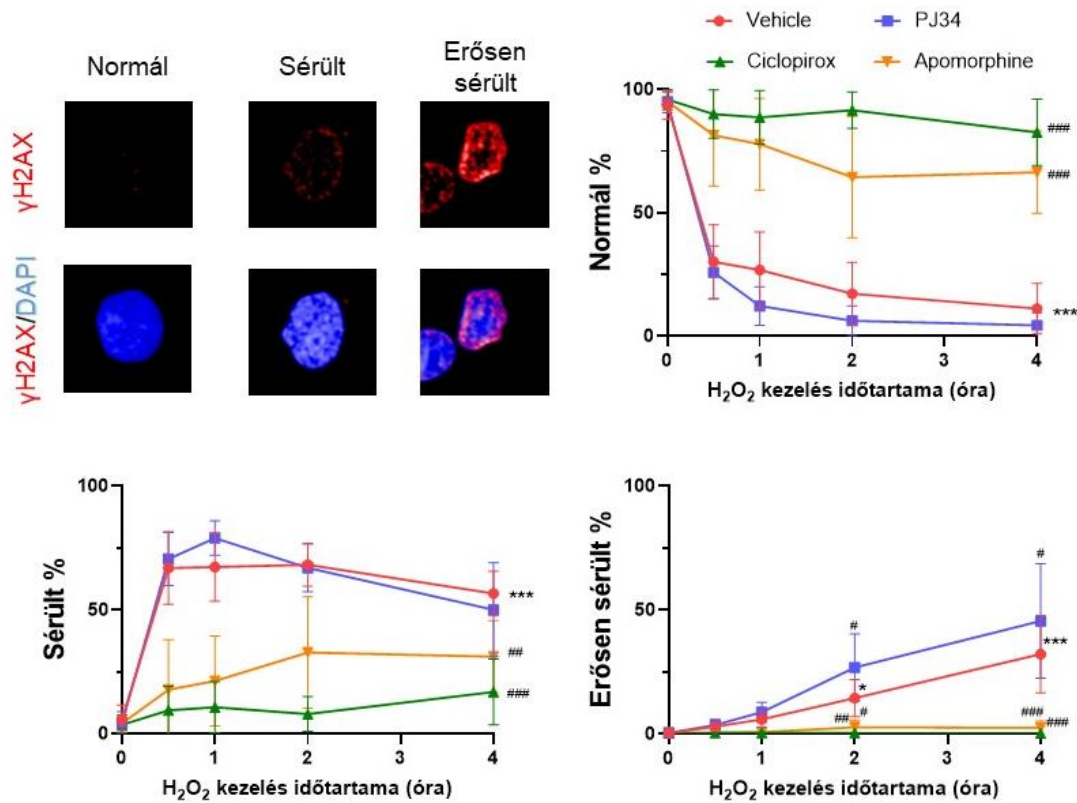
Annak igazolására, hogy már a DNS károsodás szintjén, vagy azt megelőzően hatnak-e a szerek, alkalikus comet esszét végeztünk, amit az egyszálú DNS töréseket mutatja ki (34. ábra).



34. ábra: *A ciclopirox és apomorfin gátolja a H₂O₂ által kiváltott egyszálú DNS törések kialakulását. HaCaT sejteket kezeletlenül hagytunk vagy 10 μ M apomorfinnal illetve ciclopirox-szal előkezeltünk 60 percig. Genotoxicitást indukáltunk 200 μ M H₂O₂-dal 10 percig. Alkalikus comet esszét követően a sejtmagokat propidium jodid-dal festettük és konfokális mikroszkóppal detektáltuk. A képek analízisét OpenComet szoftverrel végeztük. A momentumot (csóva átlag-fej átlag) violin ploton ábrázoltuk (250 sejtmag/kondíció). Szignifikancia meghatározásához Kruskal-Wallis tesztet használtunk Dunn's poszt teszttel, ahol * $p < 0,001$ a kontrollal szemben (CTL) és # $p < 0,001$ a H₂O₂-dal szemben.*

Mind a két szer szignifikánsan csökkentette a 10 perces H₂O₂ kezelés által indukált DNS károsodást. A genotoxicitás további jellemzésére γ H2AX immunfluoreszcenciát végeztünk, ami a dupla szálú DNS törések detektálására alkalmas módszer (35. ábra). A sejteket különböző ideig kezeltük H₂O₂-dal, és követtük a DNS károsodás mértékét. HCA módszerrel három szubpopulációt különítettünk el a jel intenzitásának és a sejtmag morfológiájának elemzésével. Normál sejtmagnak tekintettük azokat a nukleuszokat, melyek nem mutattak γ H2AX festődést, sérült magoknak pedig azokat, melyek γ H2AX intenzitás növekedést jeleztek, azonban nem mentek át morfológiai változáson. Az erősen sérült magok kategóriájába kerültek az erősebben festődött és morfológiai változáson átesett sejtmagok. A kezelés korai szakaszában (1-2 óránál) a sejtek nagy százaléka sérült magi fenotípust mutatott, amelyet az apomorfin és ciclopirox gátoltak. Később (2 óra után) már megjelent az erősen sérült fenotípus is az előkezelést nem kapott, illetve a PJ34-gyel előkezelt sejtekben. Az apomorfinnal és ciclopirox-szal előkezelt sejtekben ez a fenotípus nem volt kimutatható.

Továbbá a PJ34-gyel előkezelte sejtek szignifikánsan magasabb arányban tartalmaztak erősen sérült magokat az elégtelen PARP aktiváció miatt. Ez egy újabb bizonyíték arra, hogy az apomorfin és ciclopirox citoprotektivitása a PARP aktivációtól proximálisan hat.

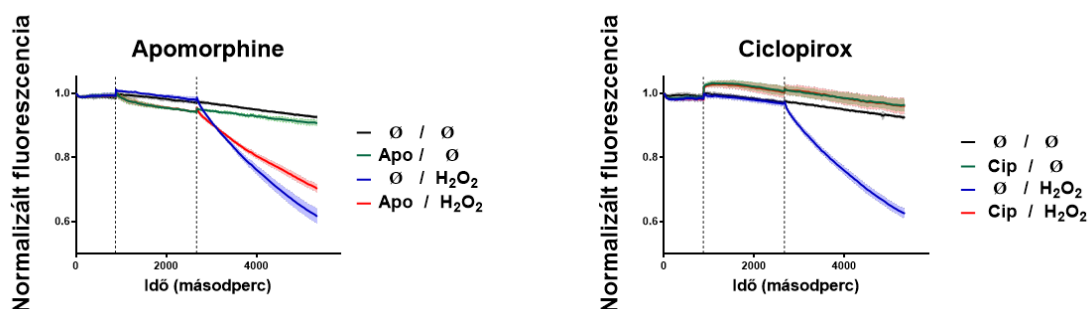


35. ábra: A ciclopirox és az apomorfin gátolja a H₂O₂ által kiváltott duplaszállú DNS törések kialakulását. HaCaT sejteket kezeletlenül hagyunk vagy 10 μM apomorfinnal illetve ciclopirox-szal előkezelünk 60 percig. Genotoxicitást indukáltunk 200 μM H₂O₂-dal a jelölt ideig. A sejteket fixáltuk és γH2AX-re specifikus antitesttel jelöltük, majd konfokális mikroszkópiával detektáltuk. A kiértékelést HCA módszerrel végeztük, ahol 3 szubpopulációt határoztunk meg. Szignifikancia meghatározásához két-utas ANOVA-t használtunk Dunnett's poszt teszttel, ahol *p<0,05 és ***p<0,001 a nulla időponthoz képest, illetve #p<0,05, ##p<0,01 és ###p<0,001 a szerek hatása a H₂O₂ kezelt mintákhoz képest.

A ciclopirox és az apomorfin Fe²⁺ kelátorok

Mindkét szert jól tudtuk jellemezni a sejthalál fenotipizálásával és a PARP-1 függő nekrozis mechanizmusának vizsgálatán keresztül. Ezek a mérések azonban még nem magyarázták meg, hogy ciclopirox és az apomorfin miként gátolhatják a H₂O₂ által indukált

genotoxicitást és ezáltal a PARP-1 függő sejthalált. A H_2O_2 által indukált sejthalál fontos lépése a hidroxil gyök képződése Fenton reakcióval. Az így keletkezett hidroxil gyökök nagyfokú DNS károsító hatással bírnak, ezért logikus a felvetés, hogy a Fenton reakció gátlásával magyarázható-e a szerek genotoxicitás elleni védelme. Ennek tisztázására „kalcein dequenching” esszét végeztünk. A kalcein-AM egy fluoreszcens festék, amelyet a sejtek felvesznek, majd észterázok révén az acetoximetil (AM) csoportot lehasítják, így a szabad kalcein fluorofórként funkcionál. Intracelluláris vas a kalceint fluoreszcenciáját kioltja (quencher), míg vaskelátorok képesek a kioltást megelőzni (dequenching). A sejteket kalcein-AM-mel feltöltöttük, majd egy órát inkubáltuk, hogy az intracelluláris észterázok lehasítsák az AM-et. A nem hasított kalcein-AM-et kimostuk, majd a sejteket apomorfín-nal és ciclopirox-szal kezeltük 30 percig. Ezután H_2O_2 -ot adtunk a sejtekhez és időben követtük a kalcein fluoreszcenciát. A kezelés hatására a fluoreszcencia rohamosan csökkent, amit a szerek képesek voltak dequenchelni, igaz különböző mértékben (36. ábra). Tehát a ciclopirox és az apomorfín valóban a vas kelátorokként működnek.



36. ábra: A ciclopirox és az apomorfín vas kelátorok. HaCaT sejteket 250 nM calcein-AM-mel inkubáltunk 60 percig, majd a sejteket HBSS-sel mostuk kétszer, és 30 percig hagytuk állni, hogy az el nem hasított kalcein-AM kidiffundálhasson. A sejteket újra mostuk, és 30 percig állni hagytuk, majd fluoreszcens plate olvasóba helyeztük, és innentől a kalceint kinetikusán mértük. 15 perces alapvonal felvételét követően 10 μM DMSO-t, ciclopirox-ot illetve apomorfint injektáltunk az adott lyukakba, és további 30 percig folyt a mérés. Ezt követően 200 μM H_2O_2 -ot injektáltunk a lyukakba és 45 percig követtük a kalcein fluoreszcencia intenzitását.

Diszkusszió

A sejthalál több súlyos betegség jellemzője, ezért intenzíven kutatják. Parthanatos során szövetkárosodás történik egy sor betegségben, mint például szívinfarktus, sztrók és iszkémia/reperfúzió. A PARP-1 kettős szerepet játszik a sejthalál szabályozásában. Aktiválódása segíti a DNS károsodás kijavításáért felelős enzimek működését így segítve a sejt túlélését. Gátlásával a DNS károsodás felhalmozódása következtében apoptózis indukálódik, ezért lett a tumorok elleni harc egyik kiemelt új célpontja. Olyan kis molekulákkal, amelyek a PARP-1 és PARP-2 DNS-el való keresztkötését indukálják, sikeresen váltottak ki apoptózist tumorokban (Murai és mtsai., 2012). Magas fokú oxidatív stressz során a parthanatos központi mediátorának, a PARP-1-nek a túlzott aktivációja következik be, meggátolva ezzel az apoptózis lejátszódását (Weaver és Yang, 2013). A PARP inhibitorok (például: olaparib) nem csak a tumorok ellen bizonyultak hatásosnak, hanem egy sor oxidatív stressz által indukált betegségben citoprotektívek voltak, így potenciális gyógyszerjelöltek lehetnek ezekben a patológiás folyamatokban (Berger és mtsai., 2018). Az oxidatív stressz számos patológiás folyamatban megfigyelhető. Ezek közé tartozik például az ateroszklerózis, iszkémia/reperfúzió és az obezitás is (Jomova és Valko, 2011). Oxidatív stressz során felborul az egyensúly a ROS/RNS molekulák termelése és eliminálása között, közben protein, lipid és DNS károsodás következik be (Dizdaroglu és Jaruga, 2012). Amennyiben a stressz meghaladja a sejt védekező kapacitását, sejthalál következik be, amely szöveti diszfunkcióhoz és patológiás folyamatok kialakulásához vezet. A sejthalál formáját az oxidatív stressz mértéke határozza meg. Kisebb mértékű stressz következményei reverzibilisek, míg nagyobb fokú stressz hatására a sejtek apoptotikus, illetve még intenzívebb oxidatív stresszre nekrotikus sejthalállal reagálnak (Higuchi, 2003).

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

Az aktivált makrofágok (M1) termelik a legtöbb ROS/RNS-t a szervezetben. Túlélésük érdekében rendelkezniük kell azokkal a mechanizmusokkal, amelyek megvédik őket az oxidatív stressz indukálta sejthaláltól. Munkánk során azt vizsgáltuk, hogy az aktiváció hatására milyen változásokon mennek át a sejtek, amelyek a túlélésüket szolgálják. M1 stimulus (LPS) hatására a sejtek rezisztenciát mutattak H₂O₂ kezeléssel szemben, M2 (IL-4) polarizáció során nem volt megfigyelhető a rezisztencia kialakulása. Először a sejthalál formájának jellemzését végeztük el. H₂O₂ kezelés hatására a sejtmembrán

permeabilizálódását figyeltük meg, ami nekrotikus fenotípusra utal. A PARP-1 által közvetített nekrozis már jól ismert (Virág és mtsai., 1998b), ezért először a PARP-1 enzim szerepére fókuszáltunk. Sejthalál asszociált gének expressziójának vizsgálatát qPCR-rel végeztük, melynek során a PARP-1 és az AIF, a parthanatos két kulcsmolekulájának csökkent expresszióját figyeltük meg. A PARP-1 csökkenését fehérje szinten is tudtuk igazolni. Mivel a PARP-1 nagy mennyiségben van jelen az eukarióta sejtekben, ezért szabályozásának módja leggyakrabban az enziaktivitás szintjén történik. Például az intracelluláris Ca^{2+} mobilizálásának gátlásával a PARP-1 aktivitása is gátolható volt (Bakondi és mtsai., 2003). Ugyanakkor megfigyelték a PARP-1 expressziójának csökkenését is konfluens sejt kultúrákban (Zaniolo és mtsai., 2005), valamint differenciálódó izom sejtekben is (Oláh és mtsai., 2015). LPS-sel előkezelt makrofágokban H_2O_2 kezelés hatására csökkent PARiláció és nem csökkenő NAD^+ szint volt mérhető. PARP-1 KO makrofágokon is elvégeztük ugyanezeket a kísérleteket, és a PARiláció hiányát, valamint megtartott NAD^+ szintet tapasztaltunk. Sejthalál esszé (PI felvétel) során azonban azt tapasztaltuk, hogy a PARP-1 KO sejtekben is megjelenik a nekrotikus fenotípus, csak jóval később. Az LPS-sel előkezelt sejtekben viszont nem volt detektálható szignifikáns emelkedés a halott sejtek számában. Ezért arra következtettünk, hogy míg a PARP-1 „kiütés” késlelteti a nekrotikus sejthalált a fentebb leírt mechanizmussal, az LPS előkezelés rezisztenssé teszi a sejteket a H_2O_2 -dal szemben, ami más mechanizmusok jelenlétére is utal.

A parthanatos másik kulcsmolekulája az AIF, amely transzlokálódik a mitokondriumból a sejtmagba és DNS fragmentálódást indukál, ezáltal a sejtmag kondenzálódik (Galluzzi és mtsai., 2018). Mivel az AIF nem rendelkezik endonukleáz aktivitással, ezért feltételezték egy másik molekula szerepét is. Később a Migráció Gátló Faktort (MIF; migration inhibitory factor) azonosították AIF függő DN-ázként neuron sejtekben (Wang és mtsai., 2016). Mikroszkópos vizsgálataink során az LPS-sel és PJ-34-gyel előkezelt makrofágokban nem figyeltünk meg sejtmagi kondenzációt H_2O_2 kezelés hatására, azonban az AIF sejtmagba történő transzlokációját sem sikerült detektálnunk, ami nem igazolja a klasszikus parthanatos. Hasonlóképpen más munkacsoportok is beszámoltak olyan PARP1 függő sejthalálról, melyben az AIF nem játszott szerepet. Például retina pigment epitel sejtekben H_2O_2 kezelés hatására PARP-1 függő nekrozist figyeltek meg, azonban az AIF transzlokációját nem tudták igazolni (Jang és mtsai., 2017). Az irodalmat áttekintve a parthanatos általában, mint neuronokban végbemenő sejthalált írták le. Jelenleg nem tisztázott, hogy ez a sejthalálforma neuron specifikus-e, ezért további vizsgálatokra lesz szükség. A mi modellünkben a sejthalál

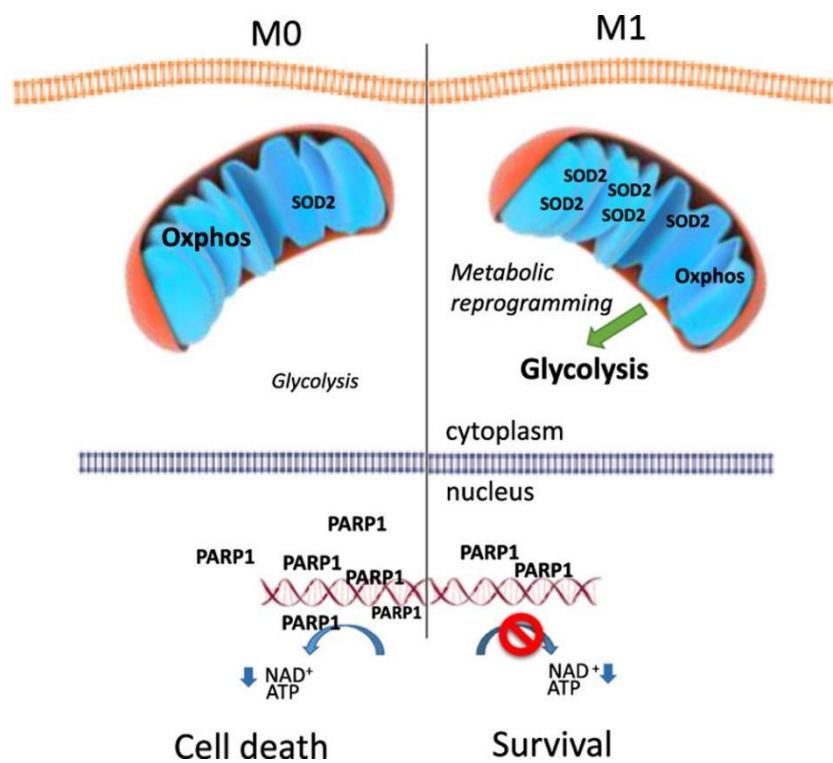
formáját tekinthetjük úgy, mint egy szabályozott nekrozisba sorolható sejthalálforma, amit AIF független parthanatosnak nevezünk (Conrad és mtsai., 2016).

Munkánk során megfigyelhettük több antioxidáns gén (Sod2, Txnrd1, Prdx1, Gsr) expressziójának növekedését LPS kezelés hatására. Mivel LPS-sel aktivált makrofágok maguk is nagy mennyiségben termelnek ROS-t és RNS-t, ezért e gének expressziójának emelkedése értelmezhető úgy, mint az oxidatív stressz elleni védekezés egy mechanizmusa. A Txnrd1, Prdx1 és Gsr enzimek kulcsszerepet játszanak az intracelluláris H₂O₂ eliminálásában és a redox szingalizáció szabályozásában (Ledgerwood és mtsai., 2017, Netto és Antunes, 2016, Arteel és Sies, 2001). A Sod2 a szuperoxid diszmutáz mitokondriális formája. A mitokondrium diszfunkciója során szuperoxid keletkezik, amelyet a Sod2 eliminál, így védve a sejtet (Cui és mtsai., 2016). A PARP-1 jelenlétét leírták a mitokondriumban (Brunyanszki és mtsai., 2016), illetve szerepét a mitokondriális diszfunkció létrejöttében (Wen és mtsai., 2018).

A mitokondrium kulcsszerepét a parthanatosban fentebb tárgyaltuk. Az AIF transzlokációján és a Sod2 antioxidáns szerepén túl egy sor biokémiai folyamatban is részt vesz, amelyek a sejthalál szabályzásának szempontjából kritikusak. Tumorsejtekben megfigyelték a mitokondriális aktivitás csökkenését és ezzel párhuzamosan az aerob glikolízis emelkedését, ami a sejtek kemorezisztenciáját eredményezi (Samudio és mtsai., 2009). Ennek felderítésére meghatároztuk az extracelluláris acidifikációt (ECAR) és az oxigén fogyasztást (OCR), így betekintést nyerhettünk a glikolízis és oxidatív foszforiláció változásába. LPS-sel előkezelt sejtekben a bazális respiráció nem változott, azonban a maximális és tartalék kapacitás drámaian csökkent, ami a mitokondriális aktivitás drasztikus csökkenésére utal, ugyanakkor a glikolitikus aktivitás nagymértékben emelkedett. A metabolizmusban bekövetkezett, glikolízis irányába történő eltolódás csökkentheti a mitokondriális diszfunkcióból eredő másodlagos oxidatív stressz lehetőségét. Hipoxia indukálta glikolitikus emelkedést (Warburg hatás) figyeltek meg amely az ATP szint megtartását eredményezte. Hipoxia indukáló faktor-1 (HIF-1) null sejtek rezisztensek voltak a hipoxia indukálta ROS termelésre és apoptózisra (Kim és mtsai., 2006, Semenza, 2007). Feltételezhetjük, hogy M1 makrofágokban is hasonló szerepe lehet a metabolikus újraprogramozásnak, magyarázhatja az emelkedett ATP szintet illetve a másodlagos gyöktermelés csökkenését.

E munkánk összegzéseként elmondhatjuk, hogy makrofágokban H₂O₂ kezelés hatására AIF-től független parthanatos megy végbe, melynek iniciációjáért a PARP-1 a felelős. Az LPS-sel aktivált makrofágok rezisztensek mutatkoztak ebben a modellben, aminek a

hátterében 3 fő mechanizmust sikerült jellemeznünk: 1.) a PARP-1 expressziójának csökkenése, 2.) antioxidáns gének expressziójának emelkedése és 3.) a metabolizmus glikolitikus irányba történő váltása. A PARP-1 aktivitás csökkenése emelkedett NAD^+ és ATP szintet eredményezett, valamint a mitokondriális diszfunkciót is csökkentette. Az antioxidáns gének emelkedésével a makrofágok képesek az általuk termelt ROS és RNS közömbösítésére. A glikolízis irányába történő váltással ugyancsak a mitokondriumban keletkező gyökök termelését tudják csökkenteni. Fontos megemlítenünk, hogy a rezisztencia kialakulása egy több szinten és sejtszervben lejátszódó folyamat. A sejtmagi, citoplazmatikus és mitokondriális folyamatok együttes szabályozása vezet a rezisztencia kialakulásához (Összefoglaló ábra 1.).



Összefoglaló ábra 1.: Az LPS citoprotektivitásának molekuláris háttere. M1 makrofágok H_2O_2 -dal szembeni rezisztenciájának kialakulásáért három fő mechanizmus a felelős. 1.) Sod2 és más antioxidáns gének expressziójának emelkedése. 2.) Parp-1 expressziójának csökkenése. 3.) Metabolikus változások (Warburg effektus).

Citoprotektív molekulák azonosítása HCS módszerrel

Munkánk során beállítottunk egy HCS módszert parthanatos gátló molekulák azonosítására. A sejthalál detektálására egy sejtmembrán permeabilitási esszé alkalmaztunk. A sejt impermeabilis Sytox Green csak a nekrotikus sejtmagokat festi, míg a Hoechst fluorofór minden sejtmag detektálására alkalmas, és lehetővé teszi a mikroszkópos képek szegmentálását. A két festék kombinációja alkalmas a nekrotikus populáció arányának mérésére. A szűrést egy kis molekulakönyvtáron (774 molekula) végeztük el. Minden plate mérése során a Z' (Z faktor) nagyobb volt, mint 0,5, ami egy kiváló értéknek számít szűrővizsgálatok során, így az esszé alkalmasnak bizonyult citoprotektív molekulák detektálására. A szűrés során 20 molekulát találtunk, amelyeknek a citoprotektivitása magasabb volt, mint 50%. Az irodalom áttekintése után az azonosított vegyületeket biológiai funkciójuk alapján csoportosítottuk, és kiválasztottuk azokat a vegyületeket, amelyeket további vizsgálatoknak vetettük alá.

Az első ilyen csoportba az adrenerg receptorok jelátvitelében résztvevő molekulák kerültek. A prazosin és fentolamin α -adrenerg receptort blokkol, míg a formoterol β 2-receptor agonista. Makrofágokban a HMGB-1 felszabadulás PARiláció függő (Ditsworth és mtsai., 2007), egy másik tanulmány szerint pedig a β -adrenerg receptor a HMGB-1-től upstream helyezkedik el (Liu és mtsai., 2017). Ezek alapján lehetséges, hogy a makrofágok HMGB-1 felszabadulását a receptor agonisták a PARP1 gátlása révén csökkentik. A prazosint leírták, mint p53-függő apoptózist indukáló szert (Yang és mtsai., 2011), valamint a fentolamint is vizsgálták, mint tumor ellenes ágenszt (Ho és mtsai., 2015). A molekulák citoprotektív hatása nem ismert, ezért érdemes lehet őket vizsgálni a jövőben.

Az idarubicint, doxorubicint, epirubicint és mitoxantrone-t, mint DNS láncok közé interkalálódó szereket, kizártuk a további analízisből. A mikroszkópos képek ellenőrzése során azt tapasztaltuk, hogy ezek a szerek interferáltak az esszével. A sejtmagok festődése nem volt megfelelő, feltehetően a szerek interkalálódó tulajdonsága miatt, így nem tették lehetővé a fluorofórok kötődését a DNS-hez.

A rifaximin, rifapentin és primakvin is DNS-hez kötődő molekulák, melyeket antibiotikumként alkalmaznak. Feltételeztük, hogy a DNS és a PARP-1 közötti interakciót is e tulajdonságuk révén tudják gátolni, de egyik szer sem mutatott PARiláció gátlást az immunfluoreszcens vizsgálatok során, ezért feltételezzük, hogy a PARP aktivációtól disztálisan hatnak. Oxidatív stressz során A549 sejtekben a PARG géncsendesítés

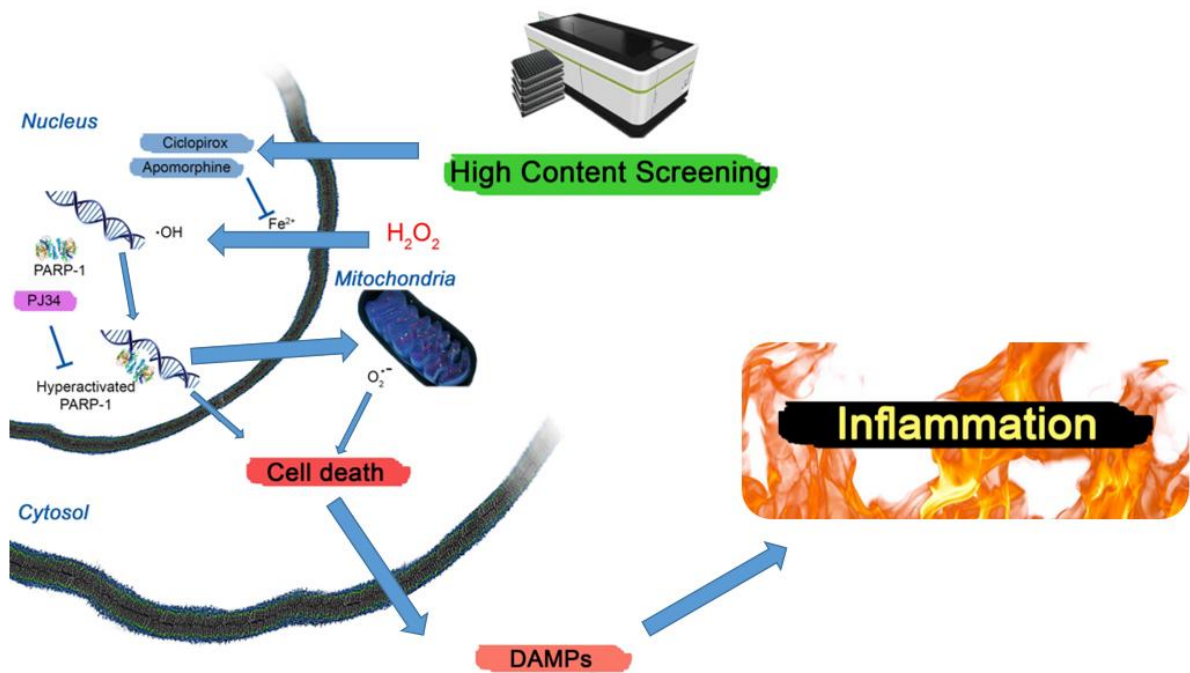
citoprotektív volt (Erdélyi és mtsai., 2009). Lehetséges, hogy a PAR lebomlását vagy a sejtmagból való kiszabadulását gátolják ezek a szerek. A továbbiakban érdemes lehet velük foglalkozni. Két másik antibiotikum is citoprotektívnek bizonyult, hatásmechanizmusukban azonban eltérnek az előbb említettektől. A tigeziklin a transzlációt gátolja, míg a ceftibutén a bakteriális sejtfal szintézisét. Citoprotektív hatásuknak a mechanizmusa ismeretlen.

A nisoldipin és amrinone kalcium csatorna blokkolók. Mivel az oxidatív stressz által kiváltott sejthalálban a kalcium szignalizációra szükség van a PARP-1 aktivációjához (Virág és mtsai., 1999), valamint a PARP-1 aktiváció is okoz intracelluláris kalcium felszabadulást és mitokondriális diszfunkciót (Bürkle és Virág, 2013), ezért nem zárható ki, hogy ennek a két szernek a citoprotektív hatásában is a kalcium jel és a PARP1 kapcsolatának megszakítása érhető tetten. A szertralin és a fluoxetin a szerotonin visszavételét (reuptake) gátolják neuronokban, ami a kalcium homeosztázist is szabályozhatja (Chang és mtsai., 2017), de citoprotektív hatásuk mechanizmusa egyelőre ismeretlen.

A lehetséges hatásmechanizmusokat a ciclopirox és apomorfin esetében vizsgáltuk a legmélyrehatóbban. A PAR immunfestés alapján ez a két szer gátolta a PARP aktivitást. Csökkentették a PARP-1 H₂O₂ által indukált kromatin kötődését, azonban mikroirradiációs kísérletben nem gátolták ezt a folyamatot. Ezért kijelenthetjük, hogy ezek a szerek nem a PARP-1 - DNS komplex kialakulását gátolják, hanem ettől proximálisan hatva, valószínűleg a DNS károsodás létrejöttét előzik meg. Ezért egyszálú és kétszálú DNS törés jelenlétét vizsgáltuk. A szerek jelenlétében nem, vagy csak csökkent mértékben volt detektálható a H₂O₂ genotoxicitása. Az apomorfin egy dopamin agonista, amit Parkinson kór kezelésére használnak (Pessoa és mtsai., 2018). Ismeretes, hogy a dopamin β -adrenoreceptoron keresztül gátolja az LPS által indukált gyulladáscsökkentő citokin (IL-12) termelést makrofágokban (Haskó és mtsai., 2002). Ezek alapján felmerül, hogy a szer citoprotektív hatása is adrenerg receptor jelátviteli szabályozásán keresztül történik.

Oxidatív stressz során Fe²⁺ jelenlétében hidroxil gyök keletkezik. A katekol vegyületek képesek vas kelátorként funkcionálni és gátolni a Fenton reakciót (Sánchez és mtsai., 2005). A tradicionális vas kelátor deferasirox csökkenti az oxidatív stresszt transzfúzió során (Saigo és mtsai., 2013). Mivel a deferasirox is citoprotektívnek bizonyult a szűrésünk során, és a ciclopiroxot is leírták már, mint vas kelátort (Eberhard és mtsai., 2009), ezért a vas keláló képességét vizsgáltuk a továbbiakban. A ciclopirox és az apomorfin is képes volt kalcein „dequenelésre”, így megállapíthatjuk, hogy vas kelátorként működnek a modellünkben. Mivel a hidroxil gyök féléletideje igen rövid, ezért a sejten belül nem képes nagy távolságokat

megtenni (Roots és Okada, 1975). A vas elsősorban a citoplazmában található, azonban leírták jelenlétét a sejtmagban is (Surguladze és mtsai., 2005), ami magyarázhatja e szerek genotoxicitást csökkentő hatását is. Másik fontos vastároló sejt szervecske a mitokondrium (Ward és Cloonan., 2019). Ciclopirox és apomorfin jelenlétében a mitokondriális szuperoxid termelődése csökkent HaCaT sejtekben. Ezt okozhatja, ha ezek a szerek a mitokondriumba is bejutnak, illetve a PARP-1 által indukált mitokondriális diszfunkciót is csökkenthetik a sejtmagi útvonalon keresztül. Munkánk során beállítottunk egy HCS módszert, amely alkalmas parthanatos gátló molekulák azonosítására. Egy relatíve kis molekulakönyvtárból is sikerült néhány szert azonosítanunk. A ciclopirox és az apomorfin bizonyultak a legpotensebb citoprotektív molekuláknak, amelyek a vas kelálása révén képesek gátolni az oxidatív stressz által okozott DNS károsodást (Összefoglaló ábra 2.). A többi molekula által nyújtott védelmi mechanizmusnak a feltárása is ígéretesnek tűnik, azonban e szerek vizsgálata túlmutat jelen tanulmány keretein.



Összefoglaló ábra 2.: Az apomorfin és ciclopirox citoprotektív mechanizmusának összefoglalása. HCS módszerrel azonosítottuk az apomorfin és a ciclopiroxot mint citoprotektív molekulákat. Mindkét molekula PARP gátlónak bizonyultak, hatásukat azonban a PARP-1-től proximálisan fejtik ki. Fe²⁺ kelátorokként gátolják a Fenton reakciót, ezáltal csökkentik a hidroxil gyökök termelődését és a DNS károsodás mértékét.

Összefoglalás

A poli-ADP-ribózilációnak 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, atheroszklerózis 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. Az LPS-sel előkezelt makrofágok rezisztensek voltak H₂O₂ kezelésre. A védelem kialakulásáért három fő mechanizmus a felelős. A PARP-1 expressziójának és aktivációjának csökkenésével képesek elkerülni a NAD⁺ szint drasztikus csökkenését és a metabolikus katasztrófát H₂O₂ 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 ciclopirox-ot 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 Fe²⁺ 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 nemcsak a tumorok elleni küzdelemben, hanem egyéb patológias folyamatok kezelésében is.

Summary

Poly-ADP ribosylation plays a central role in the regulation of oxidative stress-induced cell death. During oxidative stress, inflammation, tissue damage and organ dysfunction occur. A better understanding of these processes may help us to treat diseases such as diabetes, atherosclerosis, or ischemia/reperfusion more effectively.

The main sources of ROS and RNS molecules that cause oxidative stress are macrophages. These cells must adapt to a high ROS environment to survive. We explored molecular mechanisms underlying oxidative stress resistance developed by inflammatory macrophages. LPS pretreated macrophages were resistant to H₂O₂ treatment. Three main mechanisms are responsible for the development of protection. By decreasing PARP-1 expression and activation, macrophages are able to avoid a drastic decrease in NAD⁺ levels and metabolic catastrophe during H₂O₂ treatment. Another mechanism of protection is increased expression of antioxidant genes. Finally, cells also adapt to oxidative stress through a metabolic change where mitochondrial activity decreases and aerobic glycolysis increases (Warburg effect).

Drug development is especially important in modern medicine. We aimed to identify cell protective molecules capable of reducing PARP-1-regulated necrosis. In the FDA-approved molecular library, 7 cytoprotective molecules were identified and validated by the HCS method. Ciclopirox and apomorphine were identified as PARP inhibitors. These two agents did not directly inhibit the PARP-1 enzyme but prevented the development of DNA damage proximal to PARP1. Both agents function as chelators and protect cells by inhibiting the Fe²⁺-catalyzed Fenton reaction.

To sum up, PARP-1 plays a central role in oxidative stress-induced diseases. The development of PARP inhibitors seems to be a promising solution not only in the fight against tumors but also in the treatment of oxidative stress-related pathological processes.

Tárgyszavak / Key words

makrofág / macrophage

sejthalál / cell death

parthanatos / parthanatos

hidrogén peroxid / hydrogen peroxide

lipopoliszacharid / lipopolysaccharide

poli(ADP-ribóz) polimeráz 1 / poly(ADP-ribose) polymerase 1

PARiláció / PARylation

oxidatív stressz / oxidative stress

citoprotektivitás / cytoprotection

gyulladás / inflammation

HCS / HCS

Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani az Orvosi Vegytani Intézet igazgatójának és egyben témavezetőmnek, Prof. Dr. Virág Lászlónak munkámhoz nyújtott segítségéért és támogatásáért.

Hálás vagyok a „Virág labor” minden kutatójának, vendégkutatójának és asszisztensének a kísérletekhez nyújtott segítségükért. Továbbá köszönönetet mondok az Orvosi Vegytani Intézet minden olyan dolgozójának, akik az évek során a segítségemre voltak.

Legnagyobb köszönet Családomat illeti, akik a legnehezebb pillanatokban is támogattak ezen a nem túl könnyű, de kalandos úton.

A PhD értekezésben bemutatott eredmények létrejöttét a GINOP-2.3.2-15-2016-00020 TUMORDNS", a GINOP-2.3.2-15-2016-00048-STAYALIVE, az OTKA K112336 és az OTKA K112336 pályázatok támogatták.

Irodalomjegyzék

Afonso és mtsai. Reactive oxygen species and superoxide dismutases: role in joint diseases. *Joint Bone Spine*. 2007 Jul;74(4):324-9.

Amé és mtsai. The PARP superfamily. *Bioessays*. 2004 Aug;26(8):882-93.

Arteel és Sies. The biochemistry of selenium and the glutathione system. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2001 Sep;10(4):153-8.

Bakondi és mtsai. Role of intracellular calcium mobilization and cell-density-dependent signaling in oxidative-stress-induced cytotoxicity in HaCaT keratinocytes. *J Invest Dermatol*. 2003 Jul;121(1):88-95.

Berger és mtsai. Opportunities for the repurposing of PARP inhibitors for the therapy of non-oncological diseases. *Br J Pharmacol*. 2018 Jan;175(2):192-222.

Bergsbaken és mtsai. Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nat Rev Microbiol*. 2009 Feb;7(2):99-109.

Bhowmik és mtsai. Relation of sputum inflammatory markers to symptoms and lung function changes in COPD exacerbations. *Thorax*. 2000 Feb; 55(2): 114–120.

Bialik és mtsai. Autophagy-dependent cell death - where, how and why a cell eats itself to death. *J Cell Sci*. 2018 Sep 20;131(18):jcs215152.

Birben és mtsai. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J*. 2012 Jan;5(1):9-19.

Biswas. Does the Interdependence between Oxidative Stress and Inflammation Explain the Antioxidant Paradox? *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:5698931.

Blaser és mtsai. TNF and ROS Crosstalk in Inflammation. *Trends Cell Biol.* 2016 Apr;26(4):249-261.

Boengler és mtsai. The myocardial JAK/STAT pathway: from protection to failure. *Pharmacol Ther.* 2008 Nov;120(2):172-85.

Bosurgi és mtsai. Macrophages in Injured Skeletal Muscle: A Perpetuum Mobile Causing and Limiting Fibrosis, Prompting or Restricting Resolution and Regeneration. *Front Immunol.* 2011; 2: 62.

Brunyanszki és mtsai. Mitochondrial poly(ADP-ribose) polymerase: The Wizard of Oz at work. *Free Radic Biol Med.* 2016 Nov;100:257-270.

Bürkle és Virág. Poly(ADP-ribose): PARadigms and PARadoxes. *Mol Aspects Med.* 2013 Dec;34(6):1046-65.

Caldecott és mtsai. XRCC1 polypeptide interacts with DNA polymerase beta and possibly poly (ADP-ribose) polymerase, and DNA ligase III is a novel molecular 'nick-sensor' in vitro. *Nucleic Acids Res.* 1996 Nov 15;24(22):4387-94.

Campbell és mtsai. Local arginase 1 activity is required for cutaneous wound healing. *J Invest Dermatol.* 2013 Oct;133(10):2461-2470.

Carrero és mtsai. Cytokine dysregulation in chronic kidney disease: how can we treat it? *Blood Purif.* 2008;26(3):291-9.

Chang és mtsai. Selective serotonin reuptake inhibitor, fluoxetine, impairs E-cadherin-mediated cell adhesion and alters calcium homeostasis in pancreatic beta cells. *Sci Rep.* 2017 Jun 14;7(1):3515.

Chen és mtsai. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget.* 2017 Dec 14;9(6):7204-7218.

Circu és Aw. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic Biol Med.* 2010 Mar 15;48(6):749-62.

Conrad és mtsai. Regulated necrosis: disease relevance and therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug Discov.* 2016 May;15(5):348-66.

Cui és mtsai. miR-146a Inhibits Proliferation and Enhances Chemosensitivity in Epithelial Ovarian Cancer via Reduction of SOD2. *Oncol Res.* 2016;23(6):275-82.

Cuzzocrea. Shock, inflammation and PARP. *Pharmacol Res.* 2005 Jul;52(1):72-82.

Czaja. Hepatic inflammation and progressive liver fibrosis in chronic liver disease. *World J Gastroenterol.* 2014 Mar 14; 20(10): 2515–2532.

Czapski és mtsai. Expression and activity of PARP family members in the hippocampus during systemic inflammation: their role in the regulation of prooxidative genes. *Neurochem Int.* 2013 Apr;62(5):664-73.

Dantzer és mtsai. Base excision repair is impaired in mammalian cells lacking Poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Biochemistry.* 2000 Jun 27;39(25):7559-69.

Dantzer és mtsai. Functional association of poly(ADP-ribose) polymerase with DNA polymerase alpha-primase complex: a link between DNA strand break detection and DNA replication. *Nucleic Acids Res.* 1998 Apr 15;26(8):1891-8.

Datta és mtsai. p53 dependent apoptosis in glioma cell lines in response to hydrogen peroxide induced oxidative stress. *Int J Biochem Cell Biol.* 2002 Feb;34(2):148-57.

David és mtsai., Parthanatos, a messenger of death. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2009 Jan 1;14:1116-28.

de Murcia és mtsai. Requirement of poly(ADP-ribose) polymerase in recovery from DNA damage in mice and in cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Jul 8;94(14):7303-7.

de Murcia és Shall, editors. 2000. From DNA damage and stress signalling to cell death: poly(ADP-ribosylation) reactions. Oxford: Oxford University Press; 238 p.

Ditsworth és mtsai. Activation of poly(ADP)-ribose polymerase (PARP-1) induces release of the pro-inflammatory mediator HMGB1 from the nucleus. *J Biol Chem*. 2007 Jun 15;282(24):17845-54.

Dixon és mtsai. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell*. 2012 May 25;149(5):1060-72.

Dizdaroglu és Jaruga. Mechanisms of free radical-induced damage to DNA. *Free Radic Res*. 2012 Apr;46(4):382-419.

Dranka és mtsai. Assessing bioenergetic function in response to oxidative stress by metabolic profiling. *Free Radic Biol Med*. 2011 Nov 1;51(9):1621-35.

Dröse és Brandt. Molecular Mechanisms of Superoxide Production by the Mitochondrial Respiratory Chain. *Adv Exp Med Biol*. 2012;748:145-69.

Dupuy és mtsai. Mechanism of hydrogen peroxide formation catalyzed by NADPH oxidase in thyroid plasma membrane. *J Biol Chem*. 1991 Feb 25;266(6):3739-43.

Eberhard és mtsai. Chelation of intracellular iron with the antifungal agent ciclopirox olamine induces cell death in leukemia and myeloma cells. *Blood*. 2009 Oct 1;114(14):3064-73.

Epelman és mtsai. Origin and Functions of Tissue Macrophages. *Immunity*. 2014 Jul 17;41(1): 21–35.

Erdélyi és mtsai. Dual role of poly(ADP-ribose) glycohydrolase in the regulation of cell death in oxidatively stressed A549 cells. *FASEB J.* 2009 Oct;23(10):3553-63.

Ferrero-Miliani és mtsai. Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1 β generation. *Clin Exp Immunol.* 2007 Feb;147(2):227-35.

Ferri és Kroemer. Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nat Cell Biol.* 2001 Nov;3(11):E255-63.

Fujiwara és Kobayashi. Macrophages in inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy.* 2005 Jun;4(3):281-6.

Galluzzi és mtsai. Molecular definitions of autophagy and related processes. *EMBO J.* 2017 Jul 3;36(13):1811-1836.

Galluzzi és mtsai. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.* 2018 Mar;25(3):486-541.

Goyal és Basak. Human catalase: looking for complete identity. *Protein Cell.* 2010 Oct; 1(10): 888–897.

Granger és Senchenkova. *Inflammation and the Microcirculation.* Morgan & Claypool Life Sciences; 2010.

Ha és Snyder. Poly(ADP-ribose) polymerase is a mediator of necrotic cell death by ATP depletion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Nov 23;96(24):13978-82.

Hardbower és mtsai. Chronic inflammation and oxidative stress: the smoking gun for *Helicobacter pylori*-induced gastric cancer? *Gut Microbes.* Nov-Dec 2013;4(6):475-81.

Haskó és mtsai. Dopamine suppresses IL-12 p40 production by lipopolysaccharide-stimulated macrophages via a beta-adrenoceptor-mediated mechanism. *J Neuroimmunol.* 2002 Jan;122(1-2):34-9.

Headland és Norling. The resolution of inflammation: Principles and challenges. *Semin Immunol.* 2015 May;27(3):149-60.

Hegedűs és mtsai. Protein kinase C protects from DNA damage-induced necrotic cell death by inhibiting poly(ADP-ribose) polymerase-1. *FEBS Lett.* 2008 May 28;582(12):1672-8.

Heilmann és Allenspach. Pattern-recognition receptors: signaling pathways and dysregulation in canine chronic enteropathies. *J Vet Diagn Invest.* 2017 Nov;29(6):781-787.

Henning és mtsai. Poly(ADP-ribose) Polymerase (PARP) and PARP Inhibitors: Mechanisms of Action and Role in Cardiovascular Disorders. *Cardiovasc Toxicol.* 2018 Dec;18(6):493-506.

Herceg és Wang. Failure of poly(ADP-ribose) polymerase cleavage by caspases leads to induction of necrosis and enhanced apoptosis. *Mol Cell Biol.* 1999 Jul;19(7):5124-33.

Hernandez és mtsai. HMGB1 links chronic liver injury to progenitor responses and hepatocarcinogenesis. *J Clin Invest.* 2019 Apr 1; 129(4): 1803.

Higuchi. Chromosomal DNA fragmentation in apoptosis and necrosis induced by oxidative stress. *Biochem Pharmacol.* 2003 Oct 15;66(8):1527-35.

Ho és mtsai. Repurposing of phentolamine as a potential anticancer agent against human castration-resistant prostate cancer: A central role on microtubule stabilization and mitochondrial apoptosis pathway. *Prostate.* 2015 Sep;75(13):1454-66.

Holley és mtsai. Manganese superoxide dismutase: beyond life and death. *Amino Acids.* 2012 Jan; 42(1): 139–158.

Homburg és mtsai. A fast signal-induced activation of Poly(ADP-ribose) polymerase: a novel downstream target of phospholipase c. *J Cell Biol.* 2000 Jul 24;150(2):293-307.

Hottiger. Toward a unified nomenclature for mammalian ADP-ribosyltransferases. *Trends Biochem Sci.* 2010 Apr;35(4):208-19.

Iwata és mtsai. PARP9 and PARP14 cross-regulate macrophage activation via STAT1 ADP-ribosylation. *Nat Commun.* 2016 Oct 31;7:12849.

Jang és mtsai. AIF-independent parthanatos in the pathogenesis of dry age-related macular degeneration. *Cell Death Dis.* 2017 Jan 5;8(1):e2526.

Jimenez és mtsai. Activated caspase 3 and cleaved poly(ADP-ribose)polymerase in salivary epithelium suggest a pathogenetic mechanism for Sjögren's syndrome. *Rheumatology (Oxford).* 2002 Mar;41(3):338-42.

Jomova és Valko. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology.* 2011 May 10;283(2-3):65-87.

Jorgensen és Miao. Pyroptotic cell death defends against intracellular pathogens. *Immunol Rev.* 2015 May;265(1):130-42.

Jouan-Lanhouet és mtsai., TRAIL induces necroptosis involving RIPK1/RIPK3-dependent PARP-1 activation. *Cell Death Differ.* 2012 Dec;19(12):2003-14.

Juarez és mtsai. Superoxide dismutase 1 (SOD1) is essential for H₂O₂-mediated oxidation and inactivation of phosphatases in growth factor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A .* 2008 May 20;105(20):7147-52.

Kaiser és mtsai. Toll-like receptor 3-mediated necrosis via TRIF, RIP3, and MLKL. *J Biol Chem.* 2013 Oct 25;288(43):31268-79.

Kamaletdinova és mtsai. The Enigmatic Function of PARP1: From PARylation Activity to PAR Readers. *Cells*. 2019 Dec 12;8(12):1625.

Kerr és mtsai. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972 Aug;26(4):239-57.

Kim és mtsai. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab*. 2006 Mar;3(3):177-85.

Kovács és mtsai. Poly(ADP-ribosyl)ation is a survival mechanism in cigarette smoke-induced and hydrogen peroxide-mediated cell death. *Free Radic Biol Med*. 2012 Nov 1;53(9):1680-8.

Langelier és mtsai. A third zinc-binding domain of human poly(ADP-ribose) polymerase-1 coordinates DNA-dependent enzyme activation. *J Biol Chem*. 2008 Feb 15;283(7):4105-14.

Leavy. New PAMP discovered. *Nat Rev Immunol*. 2015 Jul;15(7):402-3.

Ledgerwood és mtsai. The role of peroxiredoxin 1 in redox sensing and transducing. *Arch Biochem Biophys*. 2017 Mar 1;617:60-67.

Leist és mtsai. Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J Exp Med*. 1997 Apr 21;185(8):1481-6.

Li és mtsai. Protein-tyrosine phosphatase Shp2 positively regulates macrophage oxidative burst. *J Biol Chem*. 2015 Feb 13;290(7):3894-909.

Linthout és mtsai. Crosstalk between fibroblasts and inflammatory cells. *Cardiovascular Research*, Volume 102, Issue 2, 1 May 2014, Pages 258–269.

Liu és mtsai. Inhibition of HMGB1 protects the retina from ischemia-reperfusion, as well as reduces insulin resistance proteins. *PLoS One*. 2017 May 23;12(5):e0178236.

Liu és mtsai. NF- κ B pathways are involved in M1 polarization of RAW 264.7 macrophage by polyporus polysaccharide in the tumor microenvironment. PLoS One. 2017; 12(11).

Loeffler és mtsai. Structural studies of the PARP-1 BRCT domain. BMC Struct Biol. 2011 Oct 3;11:37.

Lon és mtsai. Pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling in inflammation. Crit Rev Biomed Eng. 2012;40(4):295-312.

Los és mtsai. Activation and caspase-mediated inhibition of PARP: a molecular switch between fibroblast necrosis and apoptosis in death receptor signaling. Mol Biol Cell. 2002 Mar;13(3):978-88.

Lu és Holmgren. The thioredoxin antioxidant system. Free Radic Biol Med. 2014 Jan;66:75-87.

Lu és mtsai. Myeloid cell-derived inducible nitric oxide synthase suppresses M1 macrophage polarization. Nat Commun. 2015 Mar 27;6:6676.

Mathew. Efficacy and Safety of COX-2 Inhibitors in the Clinical Management of Arthritis: Mini Review. ISRN Pharmacol. 2011;2011:480291.

Medzhitov. Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame. Cell. 2010 Mar 19;140(6):771-6.

Michelena és mtsai. Analysis of PARP inhibitor toxicity by multidimensional fluorescence microscopy reveals mechanisms of sensitivity and resistance. Nat Commun. 2018 Jul 11;9(1):2678.

Moynagh. The NF-kappaB pathway. J Cell Sci. 2005 Oct 15;118(Pt 20):4589-92.

Murai és mtsai. Trapping of PARP1 and PARP2 by Clinical PARP Inhibitors. *Cancer Res.* 2012 Nov 1;72(21):5588-99.

Murray és Wynn. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol.* 2011 Oct 14; 11(11): 723–737.

Netto és Antunes. The Roles of Peroxiredoxin and Thioredoxin in Hydrogen Peroxide Sensing and in Signal Transduction. *Mol Cells.* 2016 Jan;39(1):65-71.

Nguewa és mtsai. Pharmacological modulation of Poly(ADP-ribose) polymerase-mediated cell death: exploitation in cancer chemotherapy. *Mol Pharmacol.* 2003 Nov;64(5):1007-14.

Niere és mtsai. ADP-ribosylhydrolase 3 (ARH3), not poly(ADP-ribose) glycohydrolase (PARG) isoforms, is responsible for degradation of mitochondrial matrix-associated poly(ADP-ribose). *J Biol Chem.* 2012 May 11;287(20):16088-102.

O’Shea és mtsai. The JAK-STAT Pathway: Impact on Human Disease and Therapeutic Intervention. *Annu Rev Med.* 2015;66:311-28.

Ohmori és Hamilton. STAT6 is required for the anti-inflammatory activity of interleukin-4 in mouse peritoneal macrophages. *J Biol Chem.* 1998 Oct 30;273(44):29202-9.

Oka és mtsai. ADP-ribosyl protein lyase. Purification, properties, and identification of the product. *J Biol Chem.* 1984 Jan 25;259(2):986-95.

Oláh és mtsai. Differentiation-Associated Downregulation of Poly(ADP-Ribose) Polymerase-1 Expression in Myoblasts Serves to Increase Their Resistance to Oxidative Stress. *PLoS One.* 2015 Jul 28;10(7):e0134227.

Orrenius és mtsai. Calcium and mitochondria in the regulation of cell death. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015 Apr 24;460(1):72-81.

Pagotto és mtsai. Autophagy inhibition reduces chemoresistance and tumorigenic potential of human ovarian cancer stem cells. *Cell Death Dis.* 2017 Jul 20;8(7):e2943.

Pai és mtsai. Inflammatory markers and the risk of coronary heart disease in men and women. *N Engl J Med.* 2004 Dec 16;351(25):2599-610.

Park és mtsai. Mitochondrial ROS govern the LPS-induced pro-inflammatory response in microglia cells by regulating MAPK and NF- κ B pathways. *Neurosci Lett.* 2015 Jan 1;584:191-6.

Pazzaglia és Pioli. Multifaceted Role of PARP-1 in DNA Repair and Inflammation: Pathological and Therapeutic Implications in Cancer and Non-Cancer Diseases. *Cells.* 2019 Dec 22;9(1):41.

Pearson és mtsai. Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase Pathways: Regulation and Physiological Functions. *Endocr Rev.* 2001 Apr;22(2):153-83.

Pecoits-Filho és mtsai. Associations between circulating inflammatory markers and residual renal function in CRF patients. *Am J Kidney Dis.* 2003 Jun;41(6):1212-8.

Peltzer és Walczak. Cell Death and Inflammation - A Vital but Dangerous Liaison. *Trends Immunol.* 2019 May;40(5):387-402.

Pessoa és mtsai. Apomorphine in the treatment of Parkinson's disease: a review. *Arq Neuropsiquiatr.* 2018 Dec;76(12):840-848.

Petrucco. 2003. Sensing DNA damage by PARP-like fingers. *NucleicAcids Res* 31:6689–6699.

Pineda-Torra és mtsai. Isolation, Culture, and Polarization of Murine Bone Marrow-Derived and Peritoneal Macrophages. *Methods Mol Biol.* 2015;1339:101-9.

Puppo és Halliwell. Formation of hydroxyl radicals from hydrogen peroxide in the presence of iron. Is haemoglobin a biological Fenton reagent? *Biochem J.* 1988 Jan 1;249(1):185-90.

Quintana-Cabrera és Bolaños. Glutathione and γ -glutamylcysteine in hydrogen peroxide detoxification. *Methods Enzymol.* 2013;527:129-44.

Rack és mtsai. (ADP-ribosyl)hydrolases: structure, function, and biology. *Genes Dev.* 2020 Mar 1;34(5-6):263-284.

Robinson és mtsai. Programmed necrotic cell death of macrophages: Focus on pyroptosis, necroptosis, and parthanatos. *Redox Biol.* 2019 Sep;26:101239.

Roh és Sohn. Damage-Associated Molecular Patterns in Inflammatory Diseases. *Immune Netw.* 2018 Aug 13;18(4):e27.

Roots és Okada. Estimation of life times and diffusion distances of radicals involved in x-ray-induced DNA strand breaks of killing of mammalian cells. *Radiat Res.* 1975 Nov;64(2):306-20.

Saigo és mtsai. Deferasirox reduces oxidative stress in patients with transfusion dependency. *J Clin Med Res.* 2013 Feb;5(1):57-60.

Salmiheimo és mtsai. Increasing the Inflammatory Competence of Macrophages with IL-6 or with Combination of IL-4 and LPS Restrains the Invasiveness of Pancreatic Cancer Cells. *J Cancer.* 2016; 7(1): 42–49.

Samudio és mtsai. Mitochondrial uncoupling and the Warburg effect: molecular basis for the reprogramming of cancer cell metabolism. *Cancer Res.* 2009 Mar 15;69(6):2163-6.

Sánchez és mtsai. Catechol releases iron(III) from ferritin by direct chelation without iron(II) production. *Dalton Trans.* 2005 Feb 21;(4):811-3.

Semenza. HIF-1 mediates the Warburg effect in clear cell renal carcinoma. *J Bioenerg Biomembr.* 2007 Jun;39(3):231-4.

Shalini és mtsai. Old, new and emerging functions of caspases. *Cell Death Differ.* 2015 Apr;22(4):526-39.

Shieh és mtsai. Poly(ADP-ribose) polymerase null mouse cells synthesize ADP-ribose polymers. *J Biol Chem.* 1998 Nov 13;273(46):30069-72.

Sica és Mantovani. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest.* 2012 Mar;122(3):787-95.

Siddiqui és mtsai. Association of oxidative stress and inflammatory markers with chronic stress in patients with newly diagnosed type 2 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev.* 2019 Jul;35(5):e3147.

Sies, *Oxidative Stress*, Academic Press, London, 1985, pp. 1–507.

Sonar és Lal. The iNOS Activity During an Immune Response Controls the CNS Pathology in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Front Immunol.* 2019; 10: 710.

Sproston és Ashworth, *Role of C-Reactive Protein at Sites of Inflammation and Infection.* *Front Immunol.* 2018 Apr 13;9:754.

Stancill és mtsai. Pancreatic β -cells detoxify H_2O_2 through the peroxiredoxin/thioredoxin antioxidant system. *J Biol Chem.* 2019 Mar 29;294(13):4843-4853.

Stockwell és mtsai. Ferroptosis: A Regulated Cell Death Nexus Linking Metabolism, Redox Biology, and Disease. *Cell.* 2017 Oct 5;171(2):273-285.

Sugimura és mtsai. PARP-1 ensures regulation of replication fork progression by homologous recombination on damaged DNA. *J Cell Biol.* 2008 Dec 29;183(7):1203-12.

Surguladze és mtsai. Characterization of nuclear ferritin and mechanism of translocation. *Biochem J.* 2005 Jun 15;388(Pt 3):731-40.

Syntichaki és Tavernarakis. Death by necrosis. Uncontrollable catastrophe, or is there order behind the chaos? *EMBO Rep.* 2002 Jul;3(7):604-9.

Turner és mtsai. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochim Biophys Acta.* 2014 Nov;1843(11):2563-2582.

Uberti és mtsai. Hydrogen peroxide induces nuclear translocation of p53 and apoptosis in cells of oligodendroglia origin. *Brain Res Mol Brain Res.* 1999 Mar 5;65(2):167-75.

Valez és mtsai. Peroxynitrite formation in nitric oxide-exposed submitochondrial particles: detection, oxidative damage and catalytic removal by Mn-porphyrins. *Arch Biochem Biophys.* 2013 Jan 1;529(1):45-54.

Valko és mtsai. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(1):44-84.

van der Vlies és mtsai. Oxidation of ER resident proteins upon oxidative stress: effects of altering cellular redox/antioxidant status and implications for protein maturation. *Antioxid Redox Signal.* 2003 Aug;5(4):381-7.

Vercammen és mtsai. Tumour necrosis factor-induced necrosis versus anti-Fas-induced apoptosis in L929 cells. *Cytokine.* 1997 Nov;9(11):801-8.

Virág és mtsai. Peroxynitrite-induced thymocyte apoptosis: the role of caspases and poly(ADP-ribose) synthetase (PARS) activation. *Immunology.* 1998a Jul;94(3):345-55.

Virág és mtsai. Poly(ADP-ribose) synthetase activation mediates mitochondrial injury during oxidant-induced cell death. *J Immunol.* 1998b Oct 1;161(7):3753-9.

Virág és mtsai. Requirement of intracellular calcium mobilization for peroxynitrite-induced poly(ADP-ribose) synthetase activation and cytotoxicity. *Mol Pharmacol.* 1999 Oct;56(4):824-33.

Virág és Szabó. The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Pharmacol Rev.* 2002 Sep;54(3):375-429.

Vodenicharov és mtsai. Base excision repair is efficient in cells lacking poly(ADP-ribose) polymerase 1. *Nucleic Acids Res.* 2000 Oct 15;28(20):3887-96.

Wang és mtsai. A nuclease that mediates cell death induced by DNA damage and poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Science.* 2016 Oct 7;354(6308):aad6872.

Wang és mtsai. Ataxia telangiectasia mutated and checkpoint kinase 2 regulate BRCA1 to promote the fidelity of DNA end-joining. *Cancer Res.* 2006 Feb 1;66(3):1391-400.

Wang és mtsai. PARP is important for genomic stability but dispensable in apoptosis. *Genes Dev.* 1997 Sep 15;11(18):2347-58.

Wang és mtsai. Poly(ADP-ribose) (PAR) binding to apoptosis-inducing factor is critical for PAR polymerase-1-dependent cell death (parthanatos). *Sci Signal.* 2011 Apr 5;4(167):ra20.

Wang és mtsai. Poly(ADP-ribose) signals to mitochondrial AIF: a key event in parthanatos. *Exp Neurol.* 2009 Aug;218(2):193-202.

Ward és Cloonan. Mitochondrial Iron in Human Health and Disease. *Annu Rev Physiol.* 2019 Feb 10;81:453-482.

Weaver és Yang. Beyond DNA Repair: Additional Functions of PARP-1 in Cancer. *Front Oncol.* 2013 Nov 27;3:290.

Weiss. Inflammation. *Nature.* 2008 Jul 24;454(7203):427.

Wen és mtsai. PARP1 depletion improves mitochondrial and heart function in Chagas disease: Effects on POLG dependent mtDNA maintenance. *PLoS Pathog.* 2018 May 31;14(5):e1007065.

Xu és mtsai. The role of PARP activation in glutamate-induced necroptosis in HT-22 cells. *Brain Res.* 2010 Jul 9;1343:206-12.

Xue és mtsai. Regulation of iNOS on Immune Cells and Its Role in Diseases. *Int J Mol Sci.* 2018 Nov 29;19(12):3805.

Yamamoto és Gaynor. Therapeutic potential of inhibition of the NF- κ B pathway in the treatment of inflammation and cancer. *J Clin Invest.* 2001 Jan;107(2):135-42.

Yang és mtsai. Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. *Biomark Res.* 2014 Jan 7;2(1):1.

Yang és mtsai. Prazosin induces p53-mediated autophagic cell death in H9C2 cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2011 Aug;384(2):209-16.

Yuan és mtsai. Roles of Caspases in Necrotic Cell Death. *Cell.* 2016 Dec 15;167(7):1693-1704.

Zaniolo és mtsai. Regulation of the poly(ADP-ribose) polymerase-1 gene expression by the transcription factors Sp1 and Sp3 is under the influence of cell density in primary cultured cells. *Biochem J.* 2005 Jul 15;389(Pt 2):423-33.

Zhao. Iron and oxidizing species in oxidative stress and Alzheimer's disease. *Aging Med (Milton).* 2019 Jun 20;2(2):82-87.

Publikációs lista



**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., Hajnády, 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

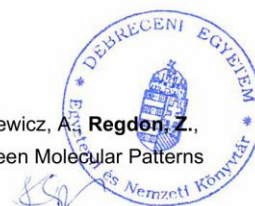
További közlemények

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-Hamply, 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., Robaszkiewicz, 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., Hajnády, 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. Robaszkiewicz, 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., Robaszkiewicz, 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., Robaszkiewicz, 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-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

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 72,381

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául 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.



Függelék

A PhD értekezés alapjául szolgáló *in extenso* közlemények különlenyomata.