

A CypD szabályozza a szépszist és a daganatos sejtek életképességét

PhD tézis

Pribér János Krisztián



Interdiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola

Molekuláris és Celluláris Biokémia Program

Doktori Iskola és Programvezető: Prof. Dr. Sümegi Balázs

Témavezető: Dr. Veres Balázs

Pécsi Tudományegyetem

Általános Orvostudományi Kar

Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet

2017

Pécs

Rövidítések

Akt/ PKB; protein kinase B; **ANT**; adenine nucleotide translocase; **Bak**; BCL2-antagonist/killer; **Bax**; BCL2-associated X protein; **COX-2**; cyclooxygenase-2; **CsA**; cyclosporine A; **CypD**; cyclophilin D; **ECSIT**; evolutionarily conserved signalling intermediate in Toll pathways; **ERK**; extracellular signal-regulated kinase; **FOXO**; forkhead box gene group; **IFN- γ** ; interferon- γ ; **IL**; interleukin; **IK11**; 2,4-Dimethoxyphenyl-E-4-arylidene-3-isochromanone; **iNOS**; inducible NO-synthase; **JNK**; c-Jun N terminal kinase; **LBP**; lipopolysaccharide binding protein; **LPS**; lipopolysaccharide; **MAPK**; mitogen-activated; protein kinase; **MKP**; MAP kinase phosphatase; **MD-2**; myeloid differentiation protein-2; **MyD88**; myeloid differentiation primary response gene 88; **NF- κ B**; nuclear transcription factor-kappa B; **ROS**; reactive oxygen species; **SOD**; superoxide dismutase; **TLR**; **TBK1**; TRIF/TANK-binding kinase 1; **TLR**; Toll-like receptor; **TRIF**; TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β ; **TNF- α** ; tumor necrosis factor- α ; **VDAC**, voltage dependent anion channel.

Bevezetés

A szepszis

A szepszis egy kétfázisú szisztémás gyulladással járó válaszreakció, amit különböző mikroorganizmusok (baktériumok, gombák, vírusok) váltanak ki. A szepszis első hiperinflammatorikus szakasza erőteljes szisztémás gyulladással, és túlzott immunműködéssel, míg a második hipoinflammatorikus szakasza, mely az első szakaszt kompenzálja, jelentősen lecsökkent immunműködéssel, valamint a gyulladás gátlásával jár. Hosszú évtizedekre visszanyúló kutatások ellenére a szepszist ma is a halálozások egyik leggyakoribb okának tekintik. A szepszisben szenvedő betegeket jelenleg az intenzív osztályos ellátás során antibiotikummal kezelik, de a mortalitása még így is 10%-os a fiatal és 38%-os a 85 évnél idősebb populációban az Amerikai Egyesült Államokban. Ezeknek a betegeknek a halála az adekvát kórházi beavatkozásnak köszönhetően már többségében nem a hiperinflammatorikus szakaszban, hanem a hipoinflammatorikus szakaszban következik be a jelentősen lecsökkent immunműködésnek köszönhetően kialakuló másodlagos fertőzések hatására. Ebben az esetben az egyének halálához hozzájárulnak még a hiperinflammatorikus szakaszban megjelent belső szervi működési elégtelenségek. A szepszis megfelelő gyógymódjának megtalálása azért is válik olyan fontossá, mivel az antibiotikum kezelés a

multi-rezisztens baktériumok megjelenése miatt már nem nyújthat sokáig védelmet a szepszissel szemben.

Az LPS jelátvittele

A szepszist a Gram-negatív baktériumok LPS vegyülete is kiváltja a különböző szervek és immunsejtek sejtfelszíni TLR4 receptorához kapcsolódva. A szervezetbe, pontosabban a véráramba jutó LPS a veleszületett immunválaszt kialakító monocitákat vagy a szövetekben lévő makrofágokat egyaránt klasszikus módon aktiválja. Az oldott állapotban lévő LPS először az LPS kötő fehérjéhez (LBP) kötődik, majd az így kialakult komplex először a CD14 fehérjéhez, majd végül a TLR4/MD2 sejtfelszíni receptor komplexhez kapcsolódik. A TLR4 receptor aktivációját követően a makrofágokban a MyD88-függő és a MyD-88 független jelátviteli útvonalon egyaránt foszforilációval aktiválódnak a MAP kinázok (ERK1/2, JNK1/2, p38) és az NF- κ B (p50/p65) transzkripciós faktor. Az NF- κ B aktivációjához a foszforilációja mellett szükség van a fehérje acetilációjára is. A foszforilált MAP kinázok különböző transzkripciós faktorokat foszforilálnak, melyek az NF- κ B (p50/p65) transzkripciós faktoral együtt a gyulladást kialakító gének (IL-1 β , IL-6, IL-12, TNF- α , iNOS, COX-2) átírásáért felelősek. Az LPS az MKP-1, azaz a MAP kinázokat defoszforiláló fehérje transzkripciójának és a fehérje szintjének növekedésén keresztül gátolja az ERK1/2, JNK1/2 és a p38 foszforilációját, aktivációját a makrofágokban. Az MKP1, a JNK1/2 és a p38 kinázokat nagyobb mértékben defoszforilálja, mint az ERK1/2 fehérjét. Az LPS (100/200 ng/ml) kezelést követően a makrofág (RAW264,7) sejtekben az MKP1 fehérje szintjének a növekedése késve követi a MAP kinázok aktivációjának a növekedését. Míg a MAP kinázok aktivációja már a 15. percben eléri maximális értékét, addig az MKP1 esetében ez csak a 60. percben látható. A MAP kinázok aktivációja ezt követően a 120. percben szinte a kontroll értékére csökken, amit ugyan kis késéssel, de az MKP1 fehérje szintjének a csökkenése is követ. Az MAP kinázokat aktivációját az MKP1 mellett az LPS kezelés hatására a PI3K/Akt és a TRIF/TBK1 útvonalon foszforilációval aktiválódó Akt1 fehérje is korlátozza. Az Akt1 emellett gátolja még az NF- κ B (p50/p65) aktivációját is. Az LPS (100/200 ng/ml) kezelést követően az Akt1 fehérje aktivációjának változása, eltér attól, amit a MAP kinázok és az MKP1 esetében láttuk, mivel foszforilációja még 120. percben tovább növekszik a (RAW264,7) sejtekben. Az Akt1 aktivációjának késői növekedése pedig elengedhetetlen a makrofágok fenotípus váltásában. Azaz lehetővé teszi, hogy olyan makrofágok jelenjenek meg, melyek a gyulladást csökkentik az antiinflammatorikus citokin (IL-10) szekréciójukkal, és szövetek regenerálódásához járulnak hozzá az extracelluláris mátrixot felépítő fibronectin,

és mátrixhoz kapcsolódó fehérjéket (β IG-H3) szekréciójával. Az aktív Akt1 ezen feladatai mellett képes foszforilációval inaktiválja a FoxO1 és a FoxO-3a transzkripciós faktorokat, melyek vagy csökkentik az oxidatív sérülés mértékét, vagy a túlzott oxidatív károsodás esetén kiváltják a makrofág sejtek apoptózisát.

Az LPS és a CypD hatása a mitokondrium pórusnyílásaira és a ROS termelésére

A CypD fehérjét a sejtmagban található Ppif gén kódolja és a mitokondrium mátrixába jutását a fehérje N-terminálisán lévő célszekvencia biztosítja, mely a mitokondriumba lépést követően leválik. A mátrixában lévő CypD fehérje közvetlenül kapcsolódik a belső membránban lévő F_0F_1 ATP szintáz dimerekhez, az ANT és a PiC fehérjékhez és kiváltja a mitokondrium belső membránjában lévő pórusok megjelenését. A CypD valószínűleg a fehérjék peptidil-prolil kötéseinek cisz-transz izomerizációján keresztül váltja ki a fehérjék pórusformálását. A CypD emellett csökkenti az F_0F_1 ATP szintáz szintetikus és hidrolitikus aktivitását is, mely a belső pórusnyílást követően gátolja a membránpotenciál helyreállítását és az ATP szintézisét is. A CypD hiánya és gátlása azonban nemcsak a belső pórusnyílást szabályozza, amit a mitokondriális hálózat duzzadása, vagy éppen depolarizációja jelez, hanem kiváltja a külső pórusok nyílását is, és az intermembrán térben lévő proapoptotikus faktorok kiszabadulását. Utóbbival találkozhatunk iszkémia-reperfúziót követően a szívizomszövetben, az oxidatív stressz indukcióját követően az idegszövetben vagy az LPS kezelést követően a májszövetben is. A külső membránban a Bax és/vagy Bak homooligomerek vagy heterooligomerek, vagy a VDAC és a Bax vagy Bak heterooligomerek formálhatnak pórust. A CypD belső és külső pórusokat nyitó hatása bonyolult szabályzás alatt áll. Abban az esetben, ha a CypD fehérjét az Akt2 vagy a GSK-3 β foszforilálja, akkor az gátolja a CypD kapcsolódását a PiC és az ANT fehérjékhez, valamint F_0F_1 ATP szintáz dimerekhez, aminek következtében a belső pórusok nem nyílnak ki. A belső pórusok nyílásához pedig arra van szükség, hogy a Siert3 ne deacetilálja a CypD fehérjét, illetve arra is, hogy a PPAR α közvetlenül kapcsolódjon a CypD fehérjéhez. Abban az esetben, ha a CypD kiváltja a mitokondrium belső pórusainak nyílását, folyadék és ionok jutnak a sejtplazmából és az intrakrisztális térből a mátrixba, és ennek hatására lecsökken a membránpotenciál. A belső pórusok nyílása és a membránpotenciál csökkenése pedig kiváltja NADH dehidrogenázról az elektronok nagymértékű leválását, azaz mitokondrium ROS termelését. Az LPS kezelést követően az ubiquitinációval aktiválódott ECSIT fehérje is ki tudja váltani a NADH dehidrogenáz szuperoxid gyök termelését. Ugyanakkor az irodalomban azt találjuk, hogy a mitokondrium által termelt reaktív oxigén származékok felelősek főként

az oxidatív stressz megjelenéséért. Az oxidatív stressz pedig elengedhetetlen az NF- κ B (p50/p65) transzkripciós faktor aktivációjához, valamint hozzájárul az Akt1 az ERK1/2 és p38 aktivációjához, miközben a JNK1/2 aktivációját csökkenti a makrofágokban. Az oxidatív stressz károsító hatásaival szemben a foszforilációval aktiválódott FoxO1 és a FoxO-3a transzkripciós faktorok nyújtanak védelmet, melyek az oxidatív stressz káros hatását csökkentő antioxidáns és DNS-t javító enzimek transzkripcióját biztosítják, illetve a túlzott károsodás esetén a sejtek apoptózisát váltják ki az LPS kezelést követően.

A CypD gátlása ciklosporin Az antibiotikummal és polifenolokkal vagy PARP gátlásán keresztül

Az irodalomban a CypD specifikus gátlószerének tartott CsA antibiotikumról már több esetben leírták, hogy a CypD fehérjéhez kapcsolódva meggátolja a fehérje kapcsolódását a belső pórusokat kialakító fehérjékhez. Ebből adódóan a CsA intakt mitokondriumok esetében gátolta a belső pórusok nyílását és a mitokondriumok duzzadását. A CsA emellett gátolta még az Alzheimer kór esetén az idegsejtek mitokondriumainak ROS termelését, szepszis során a májsejtek és iszkémia-reperfúziót követően a szívizomsejtek mitokondriumainak külső pórusainak nyílását és ennek köszönhetően az apoptózist is. A CsA azonban a calcineurin gátlásán keresztül gátolja a MAP kinázokat defoszforiláló MKP-1 fehérje expresszióját is, és ezáltal fokozza a MAP kinázok aktivációját, és a gyulladást. A CsA emellett gátolja még a ciklofilin A, B és C fehérjéket is. A ciklofilin A gátlásával immunszuppresszáns hatását fejtí ki, miközben a ciklofilin A és B gátlásával a proinflammatorikus citokinek szekrécióját szabályozza. A CsA így nem tekinthető a CypD specifikus gátlószerének.

Az irodalomban olvashatjuk, hogy a polifenolok közé tartozó rezveratrol és a ferulsav is egyaránt gátolja az LPS indukálta gyulladást a makrofágokban egyrészt a MAP kinázok, másrészt az NF- κ B aktivációjának gátlását. A rezveratrol emellett gátolja még a membránok depolarizációját, az ATP szintézisét, és a belső pórusok nyílását is. Ez utóbbi hatását annak is köszönheti, hogy például iszkémia-reperfúziót követően fokozza GSK-3 β (ser9) foszforilációját, és a mitokondriumba jutását. A foszforilált GSK-3 β a mitokondriumban pedig közvetlenül kapcsolódik a CypD fehérjéhez és képes gátolni a belső pórus nyílását. A rezveratrol és a ferulsav valószínűleg a szerkezeti azonosságaiuknak köszönhetően gátolta azonos módon az LPS indukálta gyulladást. Így valószínűsíthető, hogy a ferulsavtól csak egy amino-csoportban különböző ferulaldehid, is hatással lesz a mitokondrium belső pórusainak a nyílására.

A poli (ADP-ribóz) polimeráz (PARP) enzimnek 17 izomformája van. A PARP1 és 2 az egyszálú DNS törések poli-ADP-ribózilációjával jelzi a DNS-t javító rendszereknek a törés helyet. A PARP1 pedig az önmaga poli-ADP-ribózilációját követően képes megkötni a DNS-metiltranszferázt, ezzel gátolva az imprintinget. A PARP enzimeket számos stimulus aktiválhatja, mint például az oxidatív stressz során megjelenő egyszálú DNS törések vagy maga az LPS is. A PARP1 aktivációja elengedhetetlen az LPS indukálta gyulladás folyamatok kialakításában, ugyanis a PARP-1 génkiütött egerek 90%-a élte túl a normális esetben halálos koncentrációjú LPS (40 mg/tskg, ip.) kezelést, valamint a PARP1-/- peritoneális makrofágokban az LPS (1 µg/ml) kezelést követően szignifikánsan kisebb volt az NF-κB aktivációja, és az NF-κB-függő gének génexpressziója is. A PARP-1 ez utóbbi esetben az NF-κB koaktivátoraként fokozta a gyulladásos gének expresszióját, más szóval a hiszton fehérjék poli-ADP-ribózilációjával és ebből adódóan a kromoszómák dekonzenzációjával tette lehetővé a gyulladásos gének átírását. Az aktivált NF-κB az Egr1 és számos transzkripciós faktor mellett pedig ki tudja váltani a PARP-1 génjének az expresszióját is.

A PARP-1 fehérjéről általánosságban elmondhatjuk, hogy kisebb mértékű aktivációja képes fokozni a gyulladást, ugyanakkor a túlzott aktivációja kiváltja a sejthalált. Ez utóbbi esetben az aktivált PARP1 kiváltja az mPTP nyílását. Ezt bizonyítják azok az eredmények, melyek arról számolnak be, hogy a PARP1 gátlók a PI3K/Akt útvonalon az Akt1 (Ser473) és a GSK-3β (Ser9) foszforilációjának fokozásán keresztül gátolják a mitokondrium belső pórusnyílását jelző depolarizációját, valamint a mitokondrium ROS és ATP termelését. A GSK-3β (Ser9) pedig feltehetően a CypD fehérje foszforilációjával gátolja az mPTP nyílását. A PARP túlzott aktivációja során képződő poli-ADP-ribóz (PAR) pedig képes kiváltani a mitokondrium külső pórusainak nyílását is és az intermembrán térben lévő proapoptotikus faktorok kiszabadulását és a sejthalált. A sejthalálhoz természetesen hozzájárul az is, hogy a PARP túlzott aktivációja során az ATP és NAD⁺ raktárak kimerülnek, mivel a PARP a poli(ADP-ribóz) (PAR) előállításához szubsztrátként NAD⁺-ot használ. A NAD⁺ pedig számos ATP-t termelő biokémiai folyamathoz (glükolízis, aminosavak lebontása, β-oxidáció) szükséges. A PARP-1 az ATP szintet csökkentő hatásához az is hozzájárul, hogy a glükolízis egyik enzimét a hexokinázt gátolja. A PARP1 aktivációja, az mPTP nyíláshoz, a poli(ADP-ribóz) reakcióhoz és a hexokináz csökkent aktivációjához kapcsolódó ATP szint csökkenéséhez és a NAD⁺ raktárak kimerüléséhez, végül az mTPT nyíláshoz kapcsolódó apoptózishoz, vagy nekrozishoz vezet.

Célkitűzések

1. Első sorban azt akartuk megtudni, hogy a vad típusú peritoneális makrofág sejtekben az LPS kezelés hatására a CypD kiváltja-e az mPTP nyílását és ebből adódóan a mitokondriumok depolarizációját. Emellett arra is fényt szerettünk volna deríteni, hogy a CypD hiánya ezt milyen mértékben gátolja.

2. Meg akartuk vizsgálni azt is, hogy az LPS stimulust követően a CypD az MPTP kinyitásával milyen mértékben járul hozzá a mitokondrium ROS termeléséhez az ECSIT fehérjének a hatása mellett. Ugyanakkor azt is tudni akartuk, hogy a mitokondrium ROS termelése hogyan hat a teljes sejt ROS termelésére.

3. Célunk volt az is, hogy kiderítsük, hogy az LPS-el kezelt peritoneális makrofágokban a CypD hiánya a ROS termelés csökkenésén keresztül gátolja-e a gyulladás kialakításában elengedhetetlen NF- κ B aktivációját, és az NF- κ B indukálta gének (TNF- α , iNOS) átírását. Emellett azt is meg akartuk tudni, hogy az oxidatív stresszel szemben védelmet nyújtó a FoxO1 és a FoxO-3a transzkripció faktorok inaktivációja fokozódik-e a teljes sejt ROS szintjének csökkenésével, és hogy az Akt1 fehérje biztosítja-e ezeknek a fehérjéknek az inaktivációját.

5. Arra is fényt akartunk deríteni, hogy a RAW264,7 szekunder makrofág sejtekben a ferulaldehid milyen mértékben gátolja az LPS kezelést követően az mPTP nyílását jelző depolarizációját. Emellett azt is meg akartuk tudni, hogy az LPS kezelést követően a ferulaldehid a teljes sejt ROS termelését az antioxidáns vagy az mTPT nyílást gátló hatásának köszönhetően csökkenti.

6. Kíváncsiak voltunk arra is, hogy a ferulaldehid főként a ROS gátlásán keresztül gátolja-e a MAP kinázok, az Akt1 és az NF- κ B aktivációját, és az iNOS-t kódoló gén expresszióját. Ugyanakkor arra is kíváncsiak voltunk, hogy az Akt1 és a Gsk-3 β foszforilációján keresztül hathat-e CypD fehérje foszforilációjára, és a mitokondrium belső pórusainak a nyílására.

7. Ki akartuk vizsgálni azt is, hogy az IK11 kezelés kiváltja-e a rákos HepG2 máj sejtek mitokondriumainak mPTP nyílását, és ebből adódóan a mitokondriális hálózat, pontosabban a teljes sejt ROS termelését és a sejtek apoptózisát, nekrozisát. Emellett arra is kíváncsiak voltunk, hogy az IK11 kezelést követően aktiválódott PARP1 és PARP2 az mPTP kinyitásával szabályozhatja-e a sejthalált. Ugyanakkor azt is tudni szerettük volna, hogy PARP1 és PARP2 aktiválódása milyen jelátviteli folyamatokon keresztül hathat a sejthalálra.

Anyag és módszer

Reagensek

Minden vegyszert, sejtenyészítő oldatot, az *Escherichia coli* lipopoliszacharidot (LPS) (0127: B8), a proteáz és foszfatáz inhibitor koktélt, a calcein-acetomethoxy (AM) származékot, A23187 kalcium ionofórt, a dihidrorodamin 123 fluoreszcens festéket és a peroxidáz enzimmel összekapcsolt anti-egér IgG másodlagos antitestet a Sigma-Aldrich-től (Budapest, Magyarország) vásároltuk. A torma peroxidáz konjugált anti-nyúl IgG szekunder antitestet, az anti-foszfo-forkhead box O (FOXO)-1 és FOXO-3a elsődleges antitesteket a BIO-RAD Magyarország Ltd.-től rendeltük (Budapest, Magyarország). Az elsődleges anti-foszfo-Akt1 (Ser473), az anti-foszfo-NF- κ B p65 (Ser536), anti-foszfo-44/42-MAPK (Thr202/Tyr204), anti-foszfo-p38-MAPK (Thr180/Tyr182), anti-foszfo-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) a Cell Signalling Technology-től (Danvers, MA, USA) vásároltuk. A HepG2 sejteknél használt anti-foszfo-JNK (Thr183/Tyr185) antitestet az R&D cégtől rendeltük. Az MKP-1 (C-19) elsődleges antitestet a Santa Cruz Biotechnology-től (Santa Cruz, CA, USA) vásároltuk. Anti-gliceraldehid 3-foszfát-dehidrogenázt (GAPDH) és anti-hisztin H1 primer antitesteket a Millipore Merck Ltd.-től (Budapest, Magyarország) és az Abcamtól (Cambridge, Egyesült Királyság) rendeltük. A Co (II) klorid-6-hidrátot a Reanal (Budapest, Magyarország), az 5,5',6,6'-tetraklór-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolo-carbocyanine jodidot (JC-1), és 5-(és-6)-karboxi-2',7'-dichlorodihydro-fluorescein-diacetátot (C-400) a Molecular Probes cégtől (Csertex Kft, Budapest, Magyarország) vásároltuk. Az LY294002 a PI3K, az Akt gátlószer IV az Akt és az SP600125 a JNK aktivációjának gátlószere. Ezeket a termékeket a Calbiochemtől vásároltuk. A PJ34 PARP gátlószert és a transz-rezveratrolt a Sigma-Aldrich-től vettük. Az IK11-et mi szintetizáltuk (296) és dimetil-szulfoxidban (DMSO) oldottuk fel, miközben ezerszeresére hígítottuk. A HO3089 (297) és a L2286 (298) PARP gátlókat és a ferulaldehidet professor Hideg Kálmán professor úrtól kaptuk (PTE ÁOK Szerves és Gyógyszerkémiai Intézet, Magyarország, Pécs).

Egerek

A hím homozigóta Ppif $-/-$ ciklofilin D knock-out és a vad típusú C57BL/6 egereket Prof. Dr. Tretter Lászlótól kaptuk (Simmelweis Egyetem, Budapest, Magyarország). A CypD $-/-$ és a vad típusú C57BL/6 állatokat standard körülmények között tartottuk, csap vizet és tápot adtunk nekik a kísérlet teljes időtartama alatt. Az egereket az US NIH által megfogalmazott laboratóriumi állatok tartására és használatára vonatkozó szabályzatnak megfelelően tartottuk.

Sejtkultúrák

Elsődleges peritoneális makrofágokat a Zhang és a munkatársai által leírt protokollnak megfelelően izoláltuk a CypD^{-/-} és vad típusú 16-20 hetes egerekből, melyek testsúlya 22-35 g testtömeg között mozgott. A peritoneális makrofágokat és a RAW264,7 sejteket endotoxinra tesztelt DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) tenyésztő oldatban tartottuk, amely tartalmazott még 8 mM koncentrációban L-glutamin, 10%-ban magzati borjú szérumot és a peritoneális makrofágok esetében még 0,1%-ban penicillin-sztreptomicint is. A termosztát 5% CO₂ és 37 °C értékekre lett beállítva.

HepG2 humán máj daganatos sejtvonalat, melyet az European Collection of Cell Cultures cégtől vettünk, DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) médiumban tartottunk fent, mely 10%-ban tartalmazott magzati borjú szérumot is tartalmazott. A termosztátot 5% CO₂ és 37° C értékekre állítottuk be. Az életképességi vizsgálatnál a 96 lyukú sejtenyésztő lemezek lyukaiban 2×10^4 , míg a ROS mérés esetén 2×10^6 HepG2 sejt volt.

Immunoblot

A CypD^{-/-} és vad típusú peritoneális makrofág sejteket (1 µg/ml) LPS-el kezeltük 90 percig. A sejteket ezt követően felvettük 100 µl sejteltávolító pufferben (50 mM 4-(2-hidroxi-etil)-piperazin-1-etán-szulfonsav (HEPES), 150 mM NaCl, 1 mM etilén-diamin-tetraecetsav (EDTA), 2,5 mM etilén-glikol-tetraecetsav (EGTA), 0,1% polioxietilén (20) szorbitán-monolaurát (Tween-20), 10% glicerin, 0,1 mM Na₃VO₄, 10 mM 1, 4-ditiotreitol (DTT), proteáz és foszfatáz inhibitor koktél). A RAW264,7 sejteket (100 ng/ml) LPS-el és/vagy (50 µM) ferulaldehiddel kezeltük 10 vagy 30 percig. A ferulaldehidet minden esetben 5 perccel az LPS kezelés előtt adtuk a sejtekhez. A HepG2 sejteket ezerszeres hígításban DMSO-val (oldószeres kontroll) vagy az ezerszeres hígítású DMSO-ban feloldott 10 µM koncentrációjú IK11-el és/vagy 10 µM PJ34 PARP gátlóval kezeltük. A PARP gátlót 1 órával az IK11 kezelés előtt adtuk a sejtekhez, majd az IK11 kezelést követően 6 órán keresztül inkubáltuk. A RAW264,7 és HepG2 sejteket ezt követően feltártuk lízis pufferben (0,5 mM nátrium-metavanadát, 1mM EDTA, proteáz és foszfatáz gátló keverék PBS-ben feloldva). A HepG2 sejtek lízisét követően az oldatokban lévő fehérjéket triklór-ecetsavval kicsaptuk, majd háromszor átmoszuk -20 °C-os acetonnal. Az üledéket ezt követően felvettük 1x Laemmli mintapufferben. Az intraperitoneális makrofágokat, a HepG2 és a RAW264,7 sejtek esetében 20 µg fehérjét tartalmazó mintapuffert nátrium-dodecil-szulfát gélen elválasztottuk és nitrocellulóz membránra blottoltuk. A membránokat zsírmentes tejpor 5%-os oldatával 1 órán át szobahőmérsékleten blokkoltuk, és egy éjszakán át 4 ° C-on inkubáltuk a membrán

csíkokat az elsődleges antitestek jelenlétében. Az elsődleges antitestekhez kötött másodlagos antitestek tormagyökér-peroxidáz enzimjének aktivitását az ECL rendszer (AP Hungary Ltd, Budapest, Hungary) segítségével mutattuk ki röntgen filmen.

Az NF- κ B aktivációjának vizsgálata oligonukleotiddal

A CypD^{-/-} és a vad típusú peritoneális makrofág sejteket (1 μ g/ml) LPS-el kezeltük 90 percig és a sejteket ebben az esetben hipotóniás A pufferben A vettük fel (10 mM 4-(2-hidroxi-etil) -1-piperazin-etánszulfonsav (HEPES), 10 mM KCl, 1 mM ditiotritol (DTT), 0,1 mM EDTA, és 0,5 mM fenil-metil-szulfonil-fluorid, pH=7,6), majd 12000 g fordulaton 20 másodpercig centrifugáltuk. Az üledékben lévő sejtmaghoz hipotóniás C puffert (20 mM HEPES, 0,4 M NaCl, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 0,5 mM fenil-metil-fluorid és 25% glicerin, pH=7,6) adtunk, majd egy részét 12000 g fordulaton 20 percig centrifugáltuk, és a sejtmag fehérjéit tartalmazó felülúszót ezt követően – 70 °C-on tároltuk. Másik részéhez a szonikálást követően az oldatban lévő NF- κ B fehérjékhez a rágcsálók NF- κ B kötő konszenzus DNA szekvenciájához kapcsolódó biotinilált kettős szálú oligonukleotidokat (biotin-CCTTGAAGGGATTTCCCTCC, Invitrogen) kapcsoltunk, amit sztreptavidinnel bevont mágneses mikrogöngyökkel (Sigma - Aldrich) hoztunk össze. A göngyöket mágnes segítségével lehúztuk, és merkaptotetanolt nem tartalmazó 2x Laemmli minta puffer segítségével leválasztottuk az NF- κ B fehérjéket. Majd immunblot segítségével meghatároztuk a korábban félretett felülúszóban a hiszton H1 mennyiségét, valamint a később kifogott NF- κ B mennyiségét is.

Az NF- κ B vizsgálata a luciferáz aktivitása alapján

A RAW264,7 makrofág sejteket kotranszfektáltunk NF- κ B luciferáz (Panomics, Santa Clara, CA, USA) és SV40- β -galaktozidáz (Promega Corp., Madison, WI, USA) vagy kontrol (Panomics, Santa Clara, CA, USA) és SV40- β -galaktozidáz plazmidokkal. A transzfekecióhoz Lipofectamine 2000 reagenst használtunk a gyártó utasításai szerint. Huszonnégy órával a transzfekeálás után a sejteket 5 vagy 50 ng/ml LPS-el és/vagy 50 μ M ferulaldehiddel kezeltünk 24 órán át. Ezt követően a sejtlizátumban meghatároztuk a luciferáz és a β -galaktozidáz aktivitást, a gyártó utasításai szerint (Promega Corp., Luciferase Assay System Technical Bulletin TB281). A luciferáz és a β -galaktozidáz aktivitásának aránya teszi lehetővé, hogy a luciferáz aktivitást normalizáljuk, ugyanakkor így figyelembe tudjuk venni a transzfekeció hatékonyságát is.

TNF- α mérés

A 90 percig tartó 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS kezelést követően a CypD-/- és vad típusú peritoneális makrofág sejtek médiumában Quantikine M TNF- α szendvics ELISA kit segítségével (R & D Systems, Abingdon, UK) 550 nm megmértük a TNF- α mennyiségét jelző színreakció abszorpciójának mértékét.

A PARP elcsendesítése siRNS technikával HepG2 sejtekben

A poli(ADP-ribóz) polimeráz1 (PARP1) reakciót katalizáló fehérje elcsendesítésére használt siRNS-t egy céggel terveztettük meg (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). A HepG2 sejtekbe az siRNS-t tranziensen Lipofektaminnal 2000-el transzfektáltuk egy meghatározott médiumban (Opti-MEM I Reduced Serum Medium), melyet az Invitrogen cégtől rendeltünk. Ahhoz, hogy biztosítsuk a PARP1 fehérjék siRNS történő gátlását, 48 órán belül háromszor transzfektáltuk a HepG2 sejteket siRNS-el. Az utolsó transzfekciót követően, 40 óra múlva végeztük el a kísérletet.

A HepG2 sejtek életképességi vizsgálata

A HepG2 sejtek esetében a 96 lyukú tenyésztőlemez lyukaiban 2×10^4 sejtet helyeztünk, majd egy éjszakán át inkubáltuk. Másnap a médiumot kicseréltük egy friss médiumra, és a sejteket ezerszeres hígításban DMSO-val vagy ezerszeres hígítású DMSO-ban feloldott 0,1-10 μM koncentrációjú IK11-el és/vagy 2 mM N-acetil-ciszteinnel, 50 μM transzverzetrattal, 10 μM koncentrációjú PJ34 PARP gátlóval, 10 μM koncentrációban SP-600125-el (JNK gátlószer), 32.54 μM koncentrációban LY294002-el (PI3K gátlószer), 5 μM koncentrációban Akt-gátlószer IV.-el (specifikus Akt gátlószer) kezeltük 24 órán át. A PARP gátlót egy órával az IK11 kezelés előtt adtuk a sejtekhez. Emellett siRNS-el transzfektált HepG2 sejteket is kezeltük DMSO-ban feloldott 10 μM koncentrációjú IK11-el 24 órán át. A kezeléseket követően a médiumokat kicseréltük, friss MTT-t 0,5%-ban tartalmazó DMEM médiumra, és további három órán át inkubáltuk a sejteket. Majd a formazánná redukált MTT-t, 0,4%-ban HCl-t tartalmazó izopropanol segítségével detektáltuk. A nem vízdékony formazán festék koncentrációja alapján határoztuk meg az élő sejtek számát. Miután a vízben nem oldódó formazánt savanyított izopropanolban feloldottuk, megmértük az abszorpciót Anthos Labtech 2010 plate-reader segítségével 550 nm hullámhosszon. Három független kísérlet során hat párhuzamos mérést végeztünk.

Nitrit koncentráció meghatározása

A CypD^{-/-} és vad típusú intraperitoneális makrofágokat (1 µg/ml) LPS-el kezeltük, vagy nem kezeltük. A RAW264,7 sejteket (100 ng/ml) LPS-el és/vagy (1-100 µM) ferulaldehiddel vagy csak (100 µM) ferulaldehiddel kezeltük. A ferulaldehydet minden esetben 5 perccel az LPS kezelés előtt adtuk a médiumba. Az LPS kezelést követően 24 órán múlva megmértük a nitrit termelést jelző színreakciót 50µl médiumban 50µl Griess-reagens (1% sulphanilamide, 0.1% naphthylethylenediamide in 5% phosphoric acid) segítségével 550 nanométeren Glomax Multi+ multimódú olvasóval.

A teljes sejt ROS termelésének meghatározása RAW264,7, HepG2 és a peritoneális makrofág sejtekben

A CypD^{-/-} és vad típusú peritoneális makrofágokat vagy kezeltük, vagy nem kezeltük (1 µg/ml) lipopoliszachariddal. A RAW264,7 sejteket 100 ng/ml LPS-el és/vagy (1-100 µM) ferulaldehiddel vagy csak (100 µM) ferulaldehiddel kezeltük. A ferulaldehydet 5 perccel az LPS kezelés előtt adtuk a sejtek médiumába. Az LPS kezelést követően a RAW264,7 és peritoneális sejteket 22 órán át inkubáltuk. Majd a sejtek médiumába (2 mg/l) C400 festéket adtunk, és további 2 órán át inkubáltuk. A fluoreszcenciát 485 nm gerjesztési és 555 nm emissziós hullámhosszon vizsgáltuk Glomax Multi+ (Promega, Mannheim, Németország) multimódú olvasóval.

A HepG2 sejtek esetében a 96 lyukú tenyésztőlemez lyukaiba 2×10^6 sejtet helyeztünk, majd egy éjszakán át inkubáltuk. Másnap a médiumot kicseréltük egy friss médiumra, és a sejteket ezerszeres hígításban DMSO-val (oldószeres kontroll) vagy ezerszeres hígítású DMSO-ban feloldott 0,1-10 µM koncentrációjú IK11-el és/vagy 10 µM koncentrációjú PJ34 PARP gátlóval vagy 2 mM koncentrációjú N-acetil-ciszteinnel (NAC) kezeltük 24 órán át. Az N-acetil-ciszteint 5 perccel, a PARP gátlót egy órával az IK11 kezelés előtt adtuk a sejtekhez, az siRNS-el pedig 40 órával az IK11 kezelést megelőzően három szakaszban transzfektáltuk a sejteket. A kezelések utolsó két órájában a médiumba 2 mg/l-es végső koncentrációban C400-at adtunk, majd 485 nm gerjesztési és 555 nm emissziós hullámhosszon Glomax Multi+ (Promega, Mannheim, Németország) multimódú olvasóval megmértük a C400 fluoreszcenciájának változását. A HepG2 sejtek esetében három független kísérletet végeztünk, és minden egyes kísérlet során 6 párhuzamos vizsgálatot végeztünk.

A mitokondriális ROS termelés meghatározása

A CypD^{-/-} és a vad típusú peritoneális makrofág sejteket kezeltük, vagy nem kezeltük (1 µg/ml) LPS-el 2, 10 és 22 órán át. Majd (2 µM) dihidrorodamin 123 jelenlétében további 2 órán át inkubáltuk a sejteket. A rodamin 123 oxidált alaknak a fluoreszcenciáját 485 nm gerjesztési és 520 nm emissziós hullámhosszon mértük meg Glomax Multi+ (Promega, Mannheim, Németország) multimódú olvasóval.

A mitokondriális membránpotenciál ($\Delta\Psi_m$) meghatározása

A CypD^{-/-} és vad típusú peritoneális makrofágok sejteket 90 percen át kezeltük (1 µg/ml) LPS-el, míg a RAW264,7 sejteket 5, 10, 30 vagy 60 percig kezeltük (100 ng/ml) lipopoliszachariddal és/vagy (50 µM) ferulaldehiddel. A ferulaldehidet 5 perccel az LPS kezelés előtt adtuk a sejtekhez. A HepG2 sejteket 10 µM koncentrációban kezeltük vagy nem kezeltük IK11-el 24 órán át. Majd a peritoneális, a RAW 264,7 és a HepG2 sejteket (2 µM) JC-1 és/vagy (100 nM) feszültségfüggő tetrametil-rodamin-metil-észter (TMRM) fluoreszcens festékkel festettük, és BD FACS Calibur áramlási citométerrel (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) vizsgáltuk. A JC-1 esetében a fluoreszcens festék intenzitása vörösről (~590nm) zöldre (~529nm) vált a depolarizáció során 488 nm-es gerjesztő fény esetén, míg a TMRM feszültségfüggő fény fluoreszcens intenzitása (~585 nm) növekszik, 543 nm-es gerjesztés mellett.

A fedőlemezekon lévő RAW264,7 sejteket 30 percig (100 ng/ml) LPS-el és/vagy (50 µM) ferulaldehiddel (FA) kezeltük, majd tárgylemezre helyeztük, és 488 nm-en gerjesztettünk és a zöld és a piros fluoreszcens fény kibocsátását, majd ProgRes C12 Plus kamerával rendelkező Zeiss Axiovert 25 fluoreszcens mikroszkóppal 63x nagyítású objektívet használva fényképeket készítettünk. A fényképezésnél kapott két különböző színű képet egyesítettük.

RNS extrakció és kvantitatív reverz transzkriptáz polimeráz láncreakció (Q-RT-PCR)

A fedőlemezekon lévő RAW264,7 sejtet (100 ng/ml) LPS-el és/vagy (50 µM) ferulaldehiddel (FA) kezeltük. A ferulaldehidet minden esetben 5 perccel az LPS kezelés előtt adtuk a sejtekhez. Az LPS és/vagy ferulaldehid kezelést követően 10 vagy 30 perc múlva Trizol reagenssel vontuk ki teljes sejt RNS tartalmát (Sigma Aldrich Co., Budapest, Magyarország). Ezt követően a ribonukleinsavat Moloney egér leukémia vírus reverz transzkriptázt használva átírtuk cDNS-é (M-MuLV RT, RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit) (Fermentas, Burlington, Ontario, Kanada), amit valós idejű PCR (Corbett Rotor-gén 3000 PCR) mérés során a GAPDH és az MKP1 mennyiségének a meghatározására

használtunk fel. A célgének relatív expressziójának statisztikai analízisét a Ct érték alapján a Relative Expression Software Tool szoftver (Corbett Research, Germantown, MD, USA) segítségével végeztük el, miközben a GAPDH háztartási génre normalizáltunk.

A mitokondrium belső pórusnyílásának meghatározása

A CypD^{-/-} és a vad típusú peritoneális makrofágokat 30 és 60 percig kezeltük (1 µg/ml) LPS-el. Az LPS kezelés utolsó fél órájában vagy az LPS-el nem kezelt sejtekhez (1 µM) calcein-AM festéket adtunk. Majd a lemezeken lévő sejtek DMEM médiumát friss Ca²⁺- és Mg²⁺-ion mentes HBSS oldatra cseréltük, amihez 250 nM A23187 ionofort, 90 µM Co(II)-kloridot, 1 g/L glükózt és 1 µg/ml LPS-t adtunk, és a sejteket további 30 percig inkubáltuk. A sejteket egy SPOT RT3 CCD kamerával rendelkező Nikon Eclipse Ti fluoreszcens mikroszkóppal fényképeztük 40×objektív nagyítás, valamint vagy epifluoreszcens vagy fáziskontraszt megvilágítás mellett.

Statisztikai analízis

Az átlag ± SEM értékeket Tukey-féle post-hoc kétutas varianciaanalízissel határoztuk meg. A különbségeket akkor tekintettük szignifikánsnak, ha a $p < 0,05$.

Eredmények

1. A kísérleteink során először megvizsgáltuk, hogy az LPS kiváltja-e a makrofágokban az mPTP nyílását, és hogy a CypD - mely az irodalom alapján egyértelműen szabályozza az mPTP nyílását - vajon a két membránon átívelő pórus kinyitására keresztül indukálja-e a mitokondriumok depolarizációját. Az eredményeink azt mutatták, hogy az (1 µg/ml) LPS kezelést követően a 60. percben a CypD^{+/+} peritoneális makrofágokban mikroszkóppal is detektálható pórusnyílás jelent meg, ami a 90. percben tovább fokozódott. A 90 perccel az LPS kezelést követően az mPTP nyíláshoz jelentős mértékű depolarizáció is társult, ami azonban a CypD^{-/-} sejtekben az mPTP nyílásával együtt elmaradt. Így egyértelművé vált, hogy az LPS kezelést követően az mPTP nyílását a CypD váltotta ki a CypD^{+/+} sejtekben. A CypD hiánya a CypD^{-/-} kontroll sejtekben is fokozta is a membránpotenciált a pórus nyílásának a gátlásával a vad típusú kontroll sejtekhez képest. Az mPTP megjelenését a primer makrofágokban végzett kísérlet előtt szintén 90 perccel az LPS (1 µg/ml) kezelést követően a RAW264,7 sejtekben is láttuk. Ezen a sejtvonalon végzett kísérleteink során arról is meggyőződhattunk, hogy a mikroszkóppal, a calcein-kobalt festéssel is kimutatható mPTP nyílását megelőzi a mitokondrium JC-1 festéssel kimutatott depolarizációja. Ugyanis

mitokondriumok membránját már a kisebb koncentrációban alkalmazott LPS (100 ng/ml) is az már 5. percben depolarizálta, és ez a membránpotenciál csökkenés a 30. percben el is érte maximális értékét. Az eredményeink alapján egyértelműen kijelenthetjük, hogy az LPS a CypD fehérjére gyakorolt hatásán keresztül váltotta ki az mPTP kinyitásával a mitokondriális hálózat depolarizációját. Emellett azt is láttuk, hogy a membrán JC-1 festéssel kimutatott teljes mértékű depolarizációja időben jóval a calcein-kobalt festéssel kimutatható pórusnyílás előtt jelent meg, tehát a teljes mértékű depolarizációhoz kisebb mértékű mPTP nyílás elegendő volt.

Az irodalomban olvashatunk egyrészt arról, hogy a mitokondrium belső pórusainak a nyílása és a mitokondrium depolarizációja együtt jár a mitokondrium fokozott ROS termelésével, és a mitokondrium ROS termeléséért főként a NADH dehidrogenázról leváló elektronok felelősek. Másrészt azt is megtaláljuk, hogy az LPS kezelés hatására ubiquitinálódott ECSIT fehérje szintén ki tudja váltani a mitokondrium I-es komplexéről az elektronok leválását. Ebből adódóan mi megvizsgáltuk egyrészt, hogy a CypD főként az mPTP kinyitásán keresztül váltja-e ki a mitokondrium ROS termelését, másrészt hogy a mitokondrium ROS termelése hogyan hat a teljes sejt ROS termelésére. Az eredményeink azt mutatták, hogy az (1 µg/ml) LPS kezelést követően a 4. órában a CypD^{+/+} sejtek mitokondriumainak ROS termelése közel kétszerese volt a CypD^{-/-} sejtek mitokondriumainak ROS termelésének. Ez a különbség az LPS stimulust követően a 12. és a 14. órájában egyre jobban lecsökkent, miközben a CypD^{+/+} sejtek teljes sejtet érintő ROS termelése az LPS kezelést követően a 24 órában továbbra is olyan mértékű növekedést mutatott, mint amit a vad típusú mitokondriumok 4. órában tapasztalt ROS termelésénél láttuk. Így a CypD^{+/+} sejtekben a teljes sejt ROS termelését 24 órával az LPS kezelést követően már nemcsak mitokondrium biztosította, hanem bizonyosan megjelent egy mitokondriumon kívüli, extramitokondriális ROS termelés is, talán az oxidatív károsodott, sérült enzimatis funkciókból adódóan. A CypD^{+/+} mitokondriumok LPS indukálta ROS termelésének a csökkenése a légzési lánc tagjainak az oxidatív sérüléséből adódhatott. Ezzel ellentétben az LPS-el kezelt CypD^{-/-} sejtekben a mitokondriumok kis mértékben, de szignifikánsan megnövekedett ROS termelése minden időpontban azonos volt, és ugyanolyan mértékű növekedést mutatott a CypD^{-/-} kontroll sejtekhez képest, mint a teljes sejt ROS termelése az LPS kezelést követő 24. órában. Tehát a CypD hiányos sejtekben a mitokondriális ROS termelés gátlása meggátolta az extramitokondriális ROS termelését is, ami az enzimatis funkciók oxidatív sérüléséből adódhatott. A CypD hiánya emellett megakadályozhatta a légzési lánc oxidatív sérülését is. A CypD^{-/-} hiányos sejtekben megjelenő ROS termelésért

valószínűleg az aktivált ECSIT fehérje lehetett felelős. Egyértelművé vált az azonban az, hogy a CypD^{+/+} sejtekben főként az mPTP nyílás tehető felelőssé a mitokondriumok ROS termeléséért. Ugyanis az LPS-el kezelt vad típusú sejtek mitokondriumainak ROS termelése kétszer nagyobb volt, mint CypD^{+/+} sejtek mitokondriumainak ROS termelése. Miközben a CypD^{-/-} LPS-el kezelt mitokondriumoké pedig csak alig nőtt meg a kontroll CypD^{+/+} sejtek mitokondriumainak ROS termeléséhez képest.

Az irodalomban azt olvashatjuk, hogy a kivételesen jó antioxidáns, az N-acetil-cisztein (NAC) az oxidatív stressz csökkentésével jelentősen lecsökkenti az NF- κ B aktivációját a gyulladt tüdőben. Tehát az NF- κ B teljes aktivációjához szükség lesz az LPS kezelést követően a jelátviteli folyamatok mellett a mitokondriumok ROS termelésére is. Ebből adódóan megvizsgáltuk, hogy a CypD hiánya a mitokondriumok ROS termelésének a gátlásával csökkenti-e az NF- κ B aktivációját, sejtmagba helyeződését és az NF- κ B-függő gének (TNF- α , iNOS) termékeinek a megjelenését. Emellett megnéztük azt is, hogy a CypD hiánya miatt a lecsökkent oxidatív stresszre hogyan reagálnak a sejtek egyéb jelátviteli komponensei is. Az eredményeink azt mutatták, hogy a CypD hiánya azonos mértékben gátolta az LPS kezelést követően a teljes sejt ROS termelését, mint az NF- κ B aktivációját, sejtmagba helyeződését és az NF- κ B indukált géneknek (TNF- α , iNOS) termékeinek a TNF- α citokinnek és nitrogén-monoxidnak, pontosabban a tovább oxidált alakjának, a nitritnek a megjelenését. Az LPS kezelést követően a CypD^{-/-} primer makrofág sejtekben azt láttuk, hogy a sejt ROS szintjének a csökkenésével együtt fokozódott a FoxO1 és FoxO3a transzkripciós faktoroknak inaktivációja az LPS-el kezelt CypD^{+/+} sejtekhez képest. Ugyanis ezeket a fehérjéket a megnövekedett aktivációjú Akt1 foszforilációval inaktíválta. Az Akt1 aktivációja azonban az LPS-el kezelt és nem kezelt CypD^{-/-} sejtekben is egyaránt szignifikánsan nagyobb volt, mint a megfelelő vad típusú sejtekben. Az eredményeiket összefoglalva elmondhatjuk, hogy az LPS kezelést követően CypD hiánya az oxidatív stressz csökkenésével gátolta a gyulladást kialakító NF- κ B, és az oxidatív stresszt károsító hatásait csökkentő, vagy éppen az apoptózist kiváltó FoxO1 és FoxO3a transzkripciós faktorok aktivációját, miközben Akt1 aktivációját fokozta. Azt Akt1 pedig a makrofágokban felelős a MAP kinázok és az NF- κ B aktivációjának csökkentésért, és ebből adódóan a makrofágok klasszikus aktivációjának a megszűnéséért és a sejtek proinflammatorikus ctiokin szekréciójának a leállításáért.

2. A kutatásunk során a figyelmünk később a ferulaldehidre irányult, mely ugyanúgy a polifenolok közé tartozik, mint a transz-rezveratrol és a ferulsav, és velük megegyező térbeli helyzetű és azonos szerkezeti elemei is vannak. A transz-rezveratrolról már korábban leírták,

hogy csökkenti a szívizomszövet károsodását az iszkémia-reperfúziót követően. Ezt a hatását úgy éri el, hogy foszforilálja GSK-3 β fehérjét, mely a mitokondriumban foszforilálja a CypD fehérjét, és így gátolja az mPTP nyílását. Ebből adódóan mi kíváncsiak voltunk, hogy a ferulaldehid az mPTP nyíláson keresztül gátolhatja-e az LPS stimulust követően megjelenő ROS termelést, és ennek következtében, hogy módosítja a jelátvitelt a RAW264,7 makrofág sejtekben. Az eredményeink azt mutatták, hogy a ferulaldehid csak kis mértékben gátolta meg a mitokondrium belső pórusainak nyílását jelző depolarizációját, miközben teljes mértékben meggátolta a teljes sejt ROS termelést az LPS-el kezelést követően. A ferulaldehid tehát főként az irodalomban is megemlített rendkívül jó szabadgyökfogyó képességének köszönhetően távolította el a reaktív oxigén fajtákat. Az eredményeink azt is mutatták még, hogy a ferulaldehid szintén azonos módon gátolta a mitokondrium ROS termelését, az NF- κ B aktivációját és egy NF- κ B függő gén, az iNOS expresszióját az LPS-el kezelt RAW264,7 sejtekben. Emellett a MAP kinázok közé tartozó JNK1/2 és a p38 aktivációját jóval nagyobb mértékben gátolta, mint azt tette az ERK1/2 esetében. Ez utóbbi esetben a ferulaldehid hatása különbözik a jó antioxidánsnak tartott NAC hatásától, mely az irodalom szerint a ROS gátlásával az ERK1/2 és a p38 aktivációját gátolta, miközben a JNK aktivációját fokozta a makrofágokban. Ez utóbbi eredményből adódó bizonyos, hogy a MAP kinázok aktivációjára a ferulaldehid láthatóan nemcsak a ROS termelésének gátlásával hatott. Ezt igazolta az az eredményünk is, melyben a ferulaldehid fokozta az LPS kezelést követően az MKP1 foszfatáz aktivációját, mely főként p-JNK1/2 és a p-p38 defoszforilációjáért, inaktivációjáért felelős. A MAP kinázok mellett a ferulaldehid 30 perccel az LPS-el kezelést követően az Akt1 aktivációját szignifikánsan lecsökkentette, miközben a CypD fehérjéhez közvetlenül kapcsolódó és a belső pórusnyílást szabályozó GSK-3 β (Ser9) foszforilációját teljes mértékben meggátolta. Az LPS hatására aktiválódott Akt1 foszforilációját a ferulaldehid ugyanúgy gátolta, mint azt az irodalom alapján tette a rendkívül jó antioxidáns, a NAC. Az eredményeinket összefoglalva elmondhatjuk, hogy a ferulaldehid főként az antioxidáns hatásának köszönhetően csökkentette le a teljes sejt ROS termelését, és ennek köszönhetően gátolhatta az Akt1, valamint az NF- κ B aktivációját. A MAP kinázok aktivációjára azonban a jelátvitelen, pontosabban az MKP1 fehérje szintjének növelésén keresztül is hatott.

3. A későbbi vizsgálatnak a fentiekől eltérő kísérleti modellben történtek, melyben azt vizsgáltuk, hogy az IK11 az mPTP nyíláson keresztül szabályozza-e a HepG2 rákos sejtek apoptózisát, nekrozisát, és erre a folyamatra a PARP(1,2) aktivációja mekkora hatással van. A kísérletünket azokra az irodalmi eredményekre alapoztuk, melyek arról számoltak be egyrészt, hogy az IK11 kiváltja az A431 rákos sejtvonal sejtjeinek PARP függő apoptózisát,

másrészt, hogy a gyulladásoz modallben a PARP1 gátlása a PI3K/Akt1/GSK3 β útvonalon gátolja az mPTP nyílását jelző depolarizációt, ROS termelést és a mitokondrium proapoptotikus faktorainak a kiszabadulását. A vizsgálataink során először megpróbáltuk azt az IK11 koncentrációt megtalálni, mely biztosan lecsökkenti a HepG2 sejtek életképességét és kiváltja a sejtek apoptózist, nekrozist. Ugyanis a legnagyobb koncentrációt alkalmazva bizonyosan be kell következni az mPTP nyílásának, és ennek köszönhetően mitokondriális és extramitokondriális ROS termelésnek, az mitokondrium intermembrán teréből az apoptózist kiváltó proapoptotikus faktorok kiszabadulásának és talán még a mitokondriális hálózat feldarabolódásának is. A vizsgálataink során a választásunk a 10 μ M-os koncentrációban alkalmazott IK11 kezelésre esett, ugyanis az IK11 már 1 μ M-os koncentrációban is gátolta a sejtek osztódását, és 5 μ M-nál nagyobb koncentrációban a sejtek életképességét tovább nem csökkentette. A 10 μ M-os koncentrációban IK11 a kezelést a 24 órában a sejtek apoptózist a kontroll sejteken mért 4,41%-ról 26,34%-ra, a nekrozist pedig 3,00 %-ról 21,44 %-ra növelte. Ugyanakkor ezek az érték a 25 μ M koncentrációban alkalmazott IK11 esetében sem nőttek tovább. A 10 μ M-os IK11 kezelés követően a 30. percben azt is láttuk, hogy a mitokondriumok membránja jelentősen depolarizálódott, miközben a 24. órában a teljes sejt a ROS termelése elérte maximális értékét. Az eredményeink alapján meggyőződhattünk arról, az IK11 bizonyosan kiváltotta az mPTP nyílását, és az mPTP nyílásán keresztül szabályozta az apoptózist és nekrozist. Ezt erősítik meg azok az irodalmi eredmények is melyek arról számolnak be, hogy ha az mPTP rövidebb ideig van nyitva akkor apoptózist, ha hosszabb ideig van nyitva nekrozist vált ki. A további kísérleteink során azt láttuk, hogy ha az IK11 (10 μ M) kezelést követően a reaktív oxigén fajtákat NAC antioxidáns kezeléssel teljesen eltávolítottuk, akkor nem növekedett sejtek életképessége. Azonban ha a szintén antioxidáns sajátossággal is rendelkező transz-rezveratrollal gátoltuk az IK11 hatását, abban az esetben a sejtek életképessége helyreállt. Az irodalom olvashatunk arról, hogy a transz-rezveratrol a foszforilált GSK3 β fehérjével foszforilálja a mitokondriumban a CypD fehérjét, és így gátolja az mPTP nyílását. Ezt az irodalmi ténytet és az eredményeinket figyelembe véve azt mondhatjuk, hogy a transz-rezveratrol valószínűleg a jelátviteli folyamatokra, és ezeknek köszönhetően az mPTP nyílás gátlására gyakorolt hatásával állította helyre a sejtek életképességét. Ugyanakkor azt is megállapíthatjuk, hogy az IK11 olyan erőteljes sejthalálhoz vezető jelátviteli folyamatokat indított el, melyekre az oxidatív stressz csak nagyon kis mértékben hatott.

A későbbiekben megvizsgáltuk, hogy az IK11 (10 μ M) hogyan hat a PARP(1,2) aktivációjára, mivel ez a fehérje az irodalomban megtalálható eredmények alapján az oxidatív

stressz következményeként megjelenő DNS hibák javítása mellett, jelentősen hozzájárul a sejthalálhoz a hexokináz gátlásával, az ATP és NAD⁺ raktárak kimerítésével, az mPTP kinyitásával, az ATP szintézis csökkentésével, a mitokondrium depolarizációjával és a mitokondriális proapoptotikus faktorok kiszabadításával. Az IK11 kezelést követően a PARP fehérje aktivációját egyrészt PJ34 PARP gátlóval vizsgáltuk, mely az irodalom szerint a PARP1 mellett a PARP2 fehérjéket is gátolja, másrészt siRNS-t használtuk, mely egyértelműen csak a PARP1 fehérje megjelenését gátolta. Az eredményeink azt mutatták, hogy a PARP1 és/vagy a PARP2 aktivációjának a gátlása gátlószerrel (PJ34) és siRNS-el a HepG2 sejtek mPTP nyílását jelző ROS termelését szinte teljesen meggátolta, miközben a sejtek életképességét csaknem teljesen helyreállította. Az eredményeinket vizsgálva még azt is láthattuk, hogy a PARP(1,2) gátlása az IK11 stimulust követően a JNK2 megnövekedett aktivációjának a csökkentését és az Akt1 csökkent aktivációjának a további csökkentését okozta. Abban az esetben, amikor IK11 kezelést követően az Akt1 (Ser473) fehérjének a foszforilációját két gátlószerrel gátoltuk, melyek közül az LY294002 a PI3K fehérje, az Akt-gátlószer IV az Akt1 foszforilációját gátolta, azt láttuk, hogy az Akt1 aktivációjának gátlása mindkét esetben csak nagyon kis mértékben gátolta az IK11 életképességet csökkentő hatását. Tehát patológiás körülmények között az Akt1 csak kis mértékben járult hozzá a sejthalálhoz. Az irodalom azt találjuk, hogy az Akt1 nem patológiás körülmények szükséges a HepG2 sejtek osztódását. Az eredményeinket vizsgálva azt láttuk, hogy a PJ34 a kezelt HepG2 sejtekben is gátolta az Akt1 aktivációját, ezért megvizsgáltuk, hogy a PJ34 önmagában is gátolja-e a HepG2 sejtek osztódását. A vizsgálataink során azt tapasztaltuk, hogy a PJ34 meggátolta, hogy a sejtek belépjenek S fázisból a G2 fázisba, majd a mitózisba. Abban az esetben, amikor a letális IK11 kezelés során a JNK-2 aktivációját gátoltuk SP600125 gátlószerrel, a sejtek életképessége szignifikánsan megnövekedett. Ezek az eredmények azt bizonyítják, hogy az IK11 kezelt HEPG2 sejtekben a PJ34 PARP(1,2) gátló főként a JNK2 fehérje foszforilációjának gátlásán keresztül fokozta sejtek életképességét, miközben az Akt1 aktivációjának gátlásán keresztül főként a sejtek osztódását gátolja.

Konklúzió

A CypD génkiütése során azt láttuk, hogy a peritoneális makrofág sejtekben a CypD hiánya az LPS kezelést követően megjelenő mPTP nyílás gátlásán keresztül gátolta a mitokondriális és az extramitokondriális ROS termelést, azaz a teljes sejt ROS termelését, és ebből adódóan gátolta az NF- κ B aktivációját, és fokozta az oxidatív stressz káros hatásait megszüntető FOXO-1 és FOXO-3a transzkripciós faktorok inaktivációját. Az Akt1 esetében a

CypD hiányának hatása azonban teljesen eltért a NAC és a ferulaldehid hatásától, mivel az Akt1 szintje nem csökkent, hanem tovább emelkedett az LPS kezelés hatására. Ugyanakkor hatása megegyezik a transz-rezveratrol, a 4-hidroxiquinazolin és a PJ34 PARP(1,2) gátló hatásával, melyek az LPS kezelést követően a makrofágokban fokozzák az Akt1 aktivációját, miközben a MAP kinázok és az NF-kappaB aktivációját csökkentik. A CypD hiányos sejtekben azonban nem minden esetben magyarázható a jelátvitel változása az oxidatív jelátvitellel, ugyanis a CypD^{-/-} kontroll sejtekben az Akt1 aktivációja a vad típusú kontroll sejtekhez képest is magasabb volt, miközben ezekben a sejtekben a ROS szintje szinte nem változott. Nem ismert még, hogy mi áll ennek a folyamatnak a hátterében, de az irodalomban már olvashatunk arról, hogy az F ATP szintáz az mPTP kinyitásával önmagában is kiváltja a jelátvitel változását. Ugyanakkor avval, hogy az LPS kezelést követően a CypD hiánya tovább fokozta az Akt1 aktivációját a makrofágokban, elősegítette az M2 fenotípus megjelenését. Tehát a CypD hiánya biztosította, hogy a makrofágok Th1 típusú sejtes adaptív immunfolyamatokat kiváltó klasszikus aktivációja, és gyulladásoos citokinjeinek a szekréciója ne váljon túlzottá. Itt meg kell említenem azt is, hogy a proinflammatorikus citokinek szekréciója a CypD deficiens LPS-el kezelt tüdőben is szignifikánsan lecsökkent. Tehát a CypD hiánya így biztosította egy részt, hogy a szepszis hiperinflammatorikus szakaszában a gyulladást kialakító proinflammatorikus citokin termelése nem váljon túlzottá. Ez azért is fontos, mivel a hiperinflammatorikus szakaszban - melyet a proinflammatorikus citokinek váltanak ki - megjelenő túlzott immunreakciót és gyulladást kompenzálja a szervezet a hipoinflammatorikus, immunhiányos szakasszal, amely később a beteg halálát okozhatja. Ennek köszönhetően élhette túl a normális esetben letális (40mg/kg) LPS kezelést a CypD hiányos egerek 75%-a.

A ferulaldehid kezelés során azt láttuk, hogy a ferulaldehid csak kis mértékben gátolta meg az LPS (100 ng/ml) kezelést követően a 30. és 60. percben mitokondrium pórusnyílását jelző depolarizációját a RAW264,7 sejtekben. Ebből adódóan a ferulaldehid főként a rendkívül jó antioxidáns hatásának köszönhető, hogy az LPS kezelést követően a 24. órában is a kontroll sejtekben mért érték alá csökkentette a teljes sejt ROS termelését. A ferulaldehid a reaktív oxigén fajták eltávolításán keresztül gátolhatta meg az NF- κ B és az Akt1 aktivációját is. Ez az eredmény teljes mértékben azonos a NAC (10 mM) hatásával, mely szintén a RAW264,7 sejtekben az LPS (100ng/ml) kezelést követően csaknem teljes mértékben eltávolította a reaktív oxigén fajtákat, és ezzel gátolta az Akt1 és az NF- κ B aktivációját és az iNOS kifejeződését. Ugyanakkor a ferulaldehid az Akt1 aktivációjára is jelátviteli útvonalakon keresztül is hatott, mivel önmagában alkalmazva megnövelte az Akt1

aktivációját. A ferulaldehid a MAP kinázok aktivációjának a csökkenését szintén nemcsak az oxidatív stresszre gyakorolt hatásán keresztül érte el, mivel az LPS kezelést követően megnövelte a kinázokat defoszforiláló MKP1 fehérje mennyiségét. Az irodalomban olvashatunk arról, hogy a foszforilált GSK-3 β (Ser9) és a PI3K/Akt útvonalon aktiválódó Akt2 képes a CypD fehérjét foszforilálni, és ezzel gátolni az mPTP nyílását. A ferulaldehid azonban az LPS kezelést követően a 30. percben teljes mértékben meggátolta a GSK-3 β (Ser9) foszforilációját, így az nem vehetett részt az mPTP nyílásának a gátlásában. Ugyanakkor ebben az időpontban az Akt1(S473) aktivált volt, így előfordulhat, hogy az Akt2 fehérjéhez hasonlóan az Akt1 foszforilálta a CypD fehérjét és így gátolta a pórusnyílást. A ferulaldehid avval, hogy gátolta az Akt1 aktivációját negatív hatással is volt a szepszis hiperinflammatorikus szakaszát kialakító makrofágok klasszikus aktivációjára, mivel az Akt1 felelős a szepszis során a MAP kinázok, az NF- κ B aktivációjának gátlásáért, és a gyulladást csökkentő M2 makrofágok megjelenésért. Egyrészt ez is magyarázza azt az általunk korábban látott jelenséget is, miszerint a ferulaldehid az egerekben az LPS-el indukált szepszisre csak a gyulladás kezdeti szakaszában volt hatással.

A HepG2 sejtekben végzett kísérleteink során megbizonyosodhattunk arról, hogy a letális IK11 kezelést követően megjelenő mPTP nyílás feltétlenül szükséges a sejtek apoptotikus, nekrotikus sejthalálához, az mPTP nyílásához pedig elengedhetetlen a PARP(1,2) aktivációja. Az eredményeink emellett azt is mutatták, hogy a PARP(1,2) gátlása az IK11 kezelést követően a sejtosztódást biztosító az Akt1 inaktivációját tovább fokozta, miközben a sejthalált kiváltó a JNK2 aktivációján lecsökkentette. A PARP gátlása így bizonyosan nem a PI3K/Akt1/GSK3 β /CypD útvonalon keresztül akadályozta meg az mPTP kinyílását. Azonban előfordulhat, hogy a JNK2 aktivációjának a csökkentésével gátolta a külső pórusok nyílását és az apoptózist. Ezt a feltételezésemet azokra a korábbi megfigyelésekre alapozom, melyek arról számolnak be, hogy a JNK1 fehérje foszforilációval ki tudja váltani a külső pórusok nyílását. Az eredményeink alapján azt is kijelenthetjük, hogy a PARP(1,2) gátlása a meggátolta rákos sejtek fokozott sejtosztódásához és egyéb életfolyamataihoz szükséges ATP raktárak kimerülését. A PARP gátlása ezt avval érte el, hogy gátolta a poli (ADP-ribóz) reakcióhoz szükséges NAD⁺ és ATP a raktárak kimerülését, biztosította a glükolízist a hexokináz gátlásának gátlásával, akadályozta az mPTP nyílásból adódóan a sejt oxidatív károsodását, és lehetővé tette elektrontranszportlánc stabil működését és az ATP szintézist. A PARP(1,2) gátlása során látott eredmények emellett bizonyosan avval is magyarázhatók, hogy a PJ34 és a siRNS akadályozta, hogy a PARP1 poli-ADP-riboszilálja a hiszton fehérjéket,

mely a kromoszómák dekondenzációját, és így a gének átírását tette lehetővé, és így olyan géntírást követő jelátviteli folyamatokat gátolt, melyek az mPTP kinyíláshoz vezettek.

A korábbi egérkísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy a ferulaldehid a gyulladást az egerekben csak a kórfolyamat korai szakaszában csökkentette, és hosszú távon nem biztosította az egerek túlélését. A PARP1 génkiütése ezzel szemben az egerek 90%-ának a túlélését biztosította. A PARP1 aktivációjáról pedig megtudtuk, hogy hogy kiváltja a mPTP nyílását HepG2 sejtekben IK11 kezelést követően. A PARP gátlószerek azonban eddig csak egerekben bizonyultak hatásosabbnak. Így a CypD izomeráz funkcióját gátló szer kifejlesztése bizonyítottan jobb megoldást nyújthat a szepszis kezelésében. Erre azért is van szükség egyre nagyobb szükség, mivel egyre gyakrabban jelennek meg szepszist kiváltó multirezisztens mikroorganizmusok. A szepszisre kezelésére jelenleg csak antibiotikum terápia létezik. Emellett egy ilyen gátlószer minden olyan betegségnek a kezelésében is megoldást jelenthetnek, melyek gyulladással, fokozott oxidatív stresszel és a mitokondrium által szabályozott sejthalállal járnak (Alzheimer, Parkinson, Huntington, iszkémia-reperfúzió követően a szívmusclek halála).

Publikációk

Cikkek:

1. **Priber J**, Fonai F, Jakus PB, Racz B, Chinopoulos C, Tretter L, Gallyas F Jr, Sumegi B, Veres B.: Cyclophilin D disruption attenuates lipopolysaccharide-induced inflammatory response in primary mouse macrophages. *Biochem Cell Biol.* 2015 Jan 23:1-10.
2. Tucsek Z, Radnai B, Racz B, Debreceni B, **Priber JK**, Dolowschiak T, Palkovics T, Gallyas F Jr, Sumegi B, Veres B.: Suppressing LPS-induced early signal transduction in macrophages by a polyphenol degradation product: a critical role of MKP-1. *J Leukoc Biol.* 2011 Jan; 89 (1):105-11.
3. Radnai B, Antus C, Racz B, Engelmann P, **Priber JK**, Tucsek Z, Veres B, Turi Z, Lorand T, Sumegi B, Gallyas F Jr.: Protective effect of the poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor PJ34 on mitochondrial depolarization-mediated cell death in hepatocellular carcinoma cells involves attenuation of c-Jun N-terminal kinase-2 and protein kinase B/Akt activation. *Mol Cancer.* 2012 May 14; 11:34.

4. Fonai F, **Priber JK**, Jakus PB, Kalman N1, Antus C, Pollak E, Karsai G, Tretter L, Sumegi B, Veres B. Lack of cyclophilin D protects against the development of acute lung injury in endotoxemia. *Biochim Biophys Acta*. 2015 Sep 15;1852 (12):2563-2573.

Poszterek:

Tucsek Zsuzsanna, Radnai Balázs, Veres Balázs, Dolowschiák Tamás, Woth Gábor László, **Pribér János**, Schoenber Markus és ifj. Gallyas Ferenc: A ferulaldehid hatása az LPS-indukálta gyulladási folyamatokra egérben. 37. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2007. május 22-25.

Pribér János Krisztián, Radnai Balázs, Tucsek Zsuzsanna, Bognár Zita, Antus Csenge, Márk László, Berente Zoltán, Ifj. Gallyas Ferenc, Sümegi Balázs, Veres Balázs: A ferulaldehid - egy polifenol degradációs termék - hatása LPS indukálta makrofág sejtvonalon. 39. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2009. május 19-22.

Bence Nagy-Miklós, Csenge Antus, Nikolett Kálmán, **János Krisztián Pribér**, Péter Jakus, Fruzsina Fónai, Zsuzsanna Tucsek, Balázs Radnai, Balázs Veres: Inhibition of TLR4- és TRAF6 NF- κ B pathway with resveratrol in murine macrophages. 41. Membrán Transzport Konferencia, Sümeg, 2011. május 17-20.

Antus Csenge, Radnai Balázs, Rácz Boglárka, **Pribér János**, Tucsek Zsuzsanna, Veres Balázs, ifj. Gallyas Ferenc, Sümegi Balázs: Egy új rezveratrol analóg, az SZV1361 antiproliferációs és citotoxikus hatása humán hepatocelluláris karcinoma sejtvonalon. 41. Membrán Transzport Konferencia, Sümeg, 2011. május 17-20.

Pribér János Krisztián, Nagy Miklós Bence, Fónai Fruzsina, Radnai Balázs, Tucsek Zsuzsanna, Kálmán Nikolett, Jakus Péter, Sümegi Balázs, Veres Balázs: Mitochondriális permeabilitás tranzíció szerepe az LPS-indukálta gyulladási folyamatokban. 41. Membrán Transzport Konferencia, Sümeg, 2011. május 17-20.

Pribér János Krisztián, Fónai Fruzsina, Kálmán Nikolett, Gyöngy Mónika, Radnai Balázs, Jakus Péter, Tucsek Zsuzsanna, Sümegi Balázs, Veres Balázs: Mitochondriális permeabilitás tranzíció szerepe az LPS-indukálta gyulladási folyamatokban. 42. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2012. május 15-18.

Felső Péter, **Pribér János Krisztián**, Barkó Szilvia, Kilár Ferenc, Kovács Béla: A celluláris invazivitás és a külső membránfehérje (OMP) profil vizsgálata a különböző hőmérsékleten

tenyésztett *Pseudomonas* törzseken. Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése, 2012. október 24-26.

Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani dr. Radnai Balázsnak és dr. Tucsek Zsuzsannának, akiktől nagyon sokat tanulhattam, és bármikor fordulhattam hozzájuk segítségért. Külön köszönet illeti dr. Fónai Fruzsínát, akivel különösen jó volt együtt dolgozni, és aki nélkül nem tudtam volna azt a sok kísérletet elvégezni. Köszönet illeti még dr. Szabó Alízt, Girán Lászlót és Bertalan Pétert is, akiket figyelve elsajátíthattam a kutatás apró trükkjeit is.

Szeretném megköszönni ezen felül dr. Gallyas Ferencnek, hogy segített megírni a cikkemet, és dr. Sümegi Balázsnak hogy helyet, és lehetőséget biztosított a kutatáshoz.