

Ph.D. ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

A PARP gátlás hatása cuprizon kiváltotta patológiás elváltozásokra a szklerózis multiplex egy állatmodelljében

Dr. Vető Sára



Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet

Pécs, 2010

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

4HQ: 4-hidroxikinazolin
AIF: apoptózis indukáló faktor
CA II: szénsav anhidráz II
DAB: 3,3'-diamino-benzidin
DAPI: 4',6'-diamidin-2-fenilindol
DN: kettős negatív
DP: kettős pozitív
EpCAM: epitheliális sejt adhéziós molekula
EAE: kísérletes autoimmun encephalomyelitis
ERK1/2: extracelluláris szignál-regulált kináz 1/2
FITC: fluoreszcein izotiocianát
JNK: c-Jun N-terminális kináz
LFB: luxol fast blue
MAPK: mitogén aktivált protein kináz
MBP: mielin bázikus protein
MHC: major histocompatibility complex
MRI: mágneses rezonancia képalkotás
NAD⁺: nikotinamid adenin dinukleotid
p38: p38 mitogén aktivált protein kináz
PAR: poli(ADP-ribóz)
PARP: poli(ADP-ribóz) polimeráz
PBS: foszfát pufferelt sóoldat
PE: fikoeritrin
PFA: paraformaldehid
PI: propídium jodid
PI-3K: foszfatidilinozitol-3 kináz
PKB/Akt: protein kináz B/Akt
ROS: reaktív oxigén gyök
SP: egyszeresen pozitív
TBS: Tris pufferelt sóoldat
TEC: thymus epitheliális sejt

1. BEVEZETÉS

1.1 Szklerózis multiplex

A szklerózis multiplex (SM) egy a központi idegrendszert érintő krónikus betegség, melyre autoimmun gyulladás, fokális demielinizáció, majd axondegeneráció jellemző. A betegség fiatal felnőtteket érint, prevalenciája Magyarországon körülbelül 60-100:100.000. A betegség etiológiájában mind a környezeti hatásoknak, mind a genetikai háttérnek fontos szerepet tulajdonítanak, bár a betegség mechanizmusa mindmáig vitatott.

A SM heterogén kórkép, akár tüneteit, akár lefolyását, akár a demielinizált plakkok kialakulásának hátterében álló mechanizmusokat tekintve. Annak ellenére, hogy minden patológiai típusban jelen van T sejt és makrofág mediálta gyulladásos reakció, az első két típusban elsősorban immun-mediált (T sejt/makrofág, vagy B sejt/komplement) a demielinizáció, ezzel szemben, a III. és IV. típusú korai léziókban degeneratív folyamatokra utaló apoptózisszerű oligodendrocyta pusztulást írtak le. Egy másik, alternatív elmélet szerint minden plakk degeneratív folyamattal, oligodendrocyta pusztulással indul, és az autoimmun gyulladás másodlagos.

A közös gyulladásos patológia kezelésére rendelkezésünkre áll ugyan immunmoduláló terápia, azonban a klinikai tünetekkel leginkább korreláló axonpusztuláshoz vezető demielinizáció ellen védő kezelés nem létezik.

1.2 A cuprizon modell

A nem gyulladásos, elsődlegesen degeneratív demielinizáció egyik modelljében, fiatal felnőtt egereknek rézkelátor cuprizont adva oligodendrocyta apoptózis és multifokális demielinizáció alakul ki az agy bizonyos területein, elsősorban a corpus callosumban. A háttérben mitokondriális patológiát feltételeznek, mivel cuprizon kezelés hatására megamitokondriumok kialakulása figyelhető meg hepatocytákban és oligodendrocytákban. Ezt az elképzelést támasztja alá, hogy cuprizon kezelt oligodendrocytákban a mitokondriális légzési lánc különböző komplexeinek csökkent működését és a reaktív oxigén gyökök (ROS) fokozott termelését mutatták ki. Ezen kívül a cuprizon modellben, ellentétben a mielin epitóppal történő immunizációval kiváltott tisztán autoimmun kísérletes autoimmun encephalomyelitis-szel (EAE), a demielinizált corpus callosumban a T sejt szám elhanyagolható és nem figyelhető meg T sejt aktiváció sem.

Cuprizon kezelés hatására az oligodendrocyta pusztulás és demielinizáció mellett az egerekben hydrocephalus is kialakul és testtömegük is csökken.

1.3 A poli(ADP-ribóz)-polimeráz enzim

A mitokondriális légzési lánc károsodott működése a ROS nagy mennyiségű képződéséhez vezet, ami számos sejtalkotó, köztük a DNS károsodását okozza. A sejtmagi poli(ADP-ribóz)-polimeráz (PARP) enzim DNS károsodást felismerő és jelző molekulaként működik. Az aktivált PARP szubsztrátját, a nikotinamid adenin

dinukleotidot (NAD^+) hasítja és a keletkező ADP-ribózból hosszú láncú polimereket szintetizál számos sejtmagi célfehérjére, többek között önmagára is.

Kiterjedt DNS károsodás a PARP fokozott aktivációját okozza, ami a sejt károsodott működését, majd halálát eredményezi. Általánosan elfogadott elmélet szerint ugyanis a PARP fokozott aktivációja és így a fokozott ADP-riboziláció miatt jelentős mennyiségű NAD^+ használódik el. A NAD^+ vesztes miatt csökken az ATP termelés, ami a sejt energia metabolismusának zavarához, majd sejthalálhoz vezet. Ezen kívül úgy tűnik, hogy a PARP aktivitás a mitokondriális külső membrán permeabilizálásához vezet, ami lehetővé teszi az apoptózis indukáló faktor (AIF) kiszabadulását a mitokondriumból és bejutását a sejtmagba, ami pedig kromatinkondenzációt, DNS fragmentációt és sejthalált indukál.

Valószínű, hogy ez a sejtmagi-mitokondriális kommunikáció különböző kináz jelátviteli kaszkádok aktivitásának PARP-dependens módosításán keresztül történik. A protein kináz B (PKB), más néven Akt, melyet az inzulin/növekedési faktor-foszfatidil-inozitol 3-kináz (PI-3K) kaszkád aktivál, képes a sejt apoptózisát számos mechanizmussal kivédeni, többek között az AIF transzlokációjának megakadályozásán keresztül. Ismert, hogy a PARP aktivitás gátolja a PI-3K-Akt sejtvédő jelátviteli útvonalat. Tudva levő továbbá, hogy a PARP aktivitása a mitogén aktiválta protein-kináz (MAPK) család egyik tagjának, a c-Jun N-terminális kináz (JNK) aktiválását váltja ki, ami pedig mitokondriális depolarizációhoz, AIF transzlokációhoz és sejthalálhoz vezet.

Ezen kívül a PARP a nukleáris faktor (NF)- κ B mediált transzkripció ko-aktivátoraként számos gyulladáskeltő protein (indukálható nitrogén monoxid szintáz, mátrix metalloproteináz-9, stb.) expressziójának szabályozásában részt vesz.

A PARP által mediált gyulladás és sejthalál több neurodegeneratív betegség hátterében felvetődött. A PARP enzim gátlása az EAE tüneteit is csökkentette, jelezve központi szerepét az autoimmun gyulladás mediálásában.

1.4 Immunológiai változások a cuprizon modellben

EAE-ben megfigyelték, hogy amennyiben a cuprizont már egy héttel az immunizálást megelőzően elkezdték adni az egereknek, a cuprizon a tünetek súlyosságát mérsékelte. A betegséget kivédő mechanizmusok összefüggésben állhatnak a T sejt funkció gátlásával, mivel az EAE kialakulásában a T sejt mediálta immunitás aktiválódása központi szerepet játszik.

A T sejtek a B sejtekkel együtt az adaptív immunrendszer központi celluláris szereplői. A T sejtek a csontvelőből származnak, majd a thymusban érési és szelekciós folyamatokon mennek keresztül és kialakul a centrális tolerancia. A legéretlenebb thymocyták sem a CD4, vagy CD8 molekulát nem expresszálják, CD4⁻ CD8⁻ kettős negatívok (DN), majd a CD3/T sejt receptor komplex és a CD4, CD8 markerek megjelenésével kettős pozitív (DP) sejtekké válnak. A thymus kortexében a fő hisztokompatibilitási komplexen (MHC) prezentált saját antigénnel találkoznak, ahol csak azok a thymocyták élnek túl, melyek az MHC/antigén komplexet megfelelő

erősséggel kötik (pozitív szelekció). $CD4^+$ vagy $CD8^+$ egyszeresen pozitívvá (SP) válásuk után a medullában ismét prezentált saját antigénekkal találkoznak, ahol az MHC/antigén komplexet túl erősen kötő sejtek apoptotizálnak (negatív szelekció). Az érett T sejtek a perifériás nyirokszervekbe vándorolnak, ahol effektor sejtekké differenciálódnak. Aktiválódva a citotoxikus T sejtek ($CD8^+$) eliminálják az idegen peptideket prezentáló sejteket, a helper T sejtek ($CD4^+$) pedig citokineket bocsátanak ki, mellyel az immunválaszt elősegítik és regulálják.

A T sejt fejlődéshez a thymus strómája biztosítja a megfelelő környezetet, melyet thymus epitheliális sejtek (TEC), dendritikus sejtek, makrofágok, fibroblasztok és az extracelluláris mátrix komponensei képeznek. A kulcsfontosságú antigén prezentáción kívül, a stróma alkotói indítják el a T sejt érés komplex programját és modulálják a thymocyta differenciációt. A strómasejtek fő komponense a TEC. Az eltérő fenotípus és funkciók alapján megkülönböztetjük a kortikális epitheliális sejteket, melyek felszínükön Ly51 és EpCAM markereket expresszálnak és a kortexben a thymocyták fejlődésében, expansziójában, elköteleződésében és a pozitív szelekció mediálásában játszanak szerepet. A medulláris epitheliális sejtek (EpCAM++, Ly51-), a negatív szelekciót és a SP thymocyták túlélését biztosítják.

Fontos, hogy a thymocyták és a thymus epitheliális sejtek közötti kölcsönhatás kétirányú. A T sejtek nélkülözhetetlenek a TEC fejlődéséhez és a háromdimenziós strómális szerkezet kialakulásához. Ezért a thymocyták és a TEC egy egymástól való kölcsönös függőségben léteznek, ahol a thymocyták károsodása negatívan befolyásolja a strómát és viszont.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Fiatal felnőtt hím egerekben a cuprizon kezelés szelektív oligodendrocyta apoptózis miatt bekövetkező demielinizációt, hydrocephalust és testtömeg-csökkenést okoz. Különböző patológias állapotokban a PARP enzim aktivációjának fontos szerepe van a sejthalál folyamataiban, ráadásul a PARP gátlás számos központi idegrendszeri betegség modelljében sejtvédő hatásúnak bizonyult. Ezért munkánk célja volt megállapítani:

1. Történik-e PARP aktiváció a demielinizálódó corpus callosumban cuprizon kezelés hatására?
2. A PARP enzim gátlása befolyásolja-e a cuprizon kiváltotta demielinizációt, hydrocephalus kialakulást és testtömeg-csökkenést?

Ismert, hogy a cuprizon mitokondriális toxinként károsodott mitokondriális működést, majd oligodendrocyta apoptózist vált ki. A sejthalálhoz vezető molekuláris mechanizmusok azonban még nem tisztázottak. Munkánk következő részének célja ezért az volt, hogy feltárjuk:

3. A demielinizáció és az oligodendrocyta pusztulás hátterében milyen lehetséges mechanizmusok állnak, mely jelátviteli útvonalak vesznek részt annak mediálásában?
4. A PARP gátlás hogyan befolyásolja ezeket?

Korábban leírták, hogy a cuprizon EAE-ben mérsékelte a betegség súlyosságát és megváltoztatta a perifériás T sejt választ. Az azonban nem ismert, hogy a leírt jelenségek hátterében megtalálható-e a thymus valamilyen elváltozása. Ennek megfelelően munkánk utolsó részének célja volt megvizsgálni:

5. Cuprizon kezelés hatására történik-e a thymusban patológias változás?
6. Ha igen, akkor a PARP gátlás képes-e befolyásolni a cuprizon thymusra gyakorolt feltételezett hatását?

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Cuprizon demielinizációs modell. Munkánk során 4, ill. 8 hetes C57BL/6 hím egerek tápjába kevertünk 0,2 m/m% cuprizont 1, 3, 5, illetve 6 hétig. A PARP-gátló 4-hidrokinazolin-t (4HQ, Sigma) 100mg/kg dózisban naponta i.p adtuk az egereknek. A cuprizon hatás követése érdekében az egerek testtömegét hetente megmértük.

Thymocyta preparálás, thymocyta apoptózis detekció. Egy hét kezelés után az állatokat dekapitáltuk, thymusukat tömegét lemértük, majd mechanikusan homogenizáltuk, a szuszpenziót vattán átszűrtük, a sejtszámot tripánkék festék kizárásos teszttel meghatároztuk. Apoptózis detektáláshoz Annexin-kötő pufferben AnnexinV-FITC (BD Pharmingen) és propídiium jodid (PI, Sigma) kettős jelölést majd áramlási citometriás mérést alkalmaztunk.

Thymocyta fluoreszcens jelölés, áramlási citometria. Az anti-CD4, anti-CD8 és az anti-CD3 (BD Pharmingen) jelölést jelölő pufferben 30 percig jégen végeztük. Ezután PBS-sel mostuk a sejteket és FACSFix (1% paraformaldehid PBS-ben) oldatban tartottuk az áramlási citometriás mérésig. Az áramlási citometriás analízist a CellQuest programmal végeztük, 10.000 eseményt rögzítettünk, a törmeléket és az elpusztult sejteket morfológiájuk alapján kizártuk.

Immunfluoreszcencia thymus metszeteken. Egy hét kezelés után az egerek thymusából 7-10 μm vastag metszeteket készítettünk, majd acetonos fixálás és 5% BSA tartalmú PBS pufferrel való telítés után anti-CD4 (FITC), anti-CD8 (Alexa fluor 647), anti-Ly51 (PE) és anti-EpCAM (FITC) (BD Biosciences és Immunológiai és Biotechnológiai Intézet, Pécsi Tudományegyetem) ellenes antitesttel festettük meg őket. A metszeteket Olympus fluoreszcens mikroszkóppal analizáltuk.

Kisállat MRI és kvantitatív neuroimaging. Az egereket hetente diazepammal és ketaminnal altattuk el, majd a méréseket Varian INOVA 400 WB NMR spektrométerrel (Varian Inc.), 9.4T mágnessel végeztük. T_2 -súlyozott többszeletes spin-echo szekvencia alkalmazásával 21 összefüggő, 1 mm vastag coronális síkú szeletet vizsgáltunk. A corpus callosum területének kijelölése után, az abból származó átlagos jelintenzitást egy, az állat mellett elhelyezett víz/glicerin keverékkel töltött kapilláris jelének intenzitása alapján standardizáltuk. A hydrocephalus mértékét a kamrák térfogatának az agy térfogatához való viszonyítással számítottuk ki.

Corpus callosum szövettan és immunhisztokémia. 5 hét kezelés után az egereket transzkardiálisan perfundált 4%-os PFA PBS oldattal megfixáltuk. Az agyakat eltávolítottuk, paraffinba ágyasztuk és 8 μm vastag coronális metszeteket készítettünk belőlük. A corpus callosum mielinizáltságát luxol fast blue (LFB)

festéssel vizsgáltuk meg. Immunhisztokémiára a metszeteket 2% lószérumot tartalmazó PBS-sel blokkoltuk, anti-PAR (Alexis) majd megfelelő másodlagos biotinilált antitesttel (Molecular Probes) inkubáltuk és DAB reakcióval vizualizáltuk, a sejteket hematoxilinnal festettük.

Corpus callosum immunfluoreszcencia és konfokális mikroszkópia. A PARP aktiváció (PAR képződés) és AIF nukleáris transzlokáció megítélésére a fluoreszcens immunhisztokémiát 3 hét kezelés után 8 µm vastag paraffinos metszeteken végeztük el. A metszeteket anti-PAR, anti-AIF (mindkettő Alexis) és anti-CAII (The Bindig Site) ellenanyaggal, fluoreszcensen jelölt megfelelő másodlagos antitestekkel (Molecular Probes, Amersham, Jackson ImmunoResearch), illetve PI vagy DAPI (mindkettő Sigma) magfestéssel jelöltük. A metszeteket Olympus Fluoview konfokális lézer szkenningszkóppal vizsgáltuk.

Immunblot és denzitometria. Az egerekből 3, illetve 5 hét kezelés után a corpus callosumot mikroszkóp alatt finoman kipreparátuk, a szövetmintát proteáz inhibitor és nátrium vanadát (mindkettő Sigma) jelenlétében elhomogenizáltuk. A homogenátumot merkaptóetanolt és SDS-t tartalmazó mintapufferben megfőztük, poliakrilamid gélen elektroforetizáltuk, majd nitrocellulóz membránra blottoltuk. Blokkolás után anti-MBP (Novocastra), anti-PAR (Alexis), anti-AIF (Santa Cruz Biotechnology), anti-foszfo-Akt (R&D Systems), anti-Akt/PKB, anti-foszfo-ERK, anti-foszfo-JNK, anti-caspase-3 (mind Cell Signaling), anti-foszfo-p38-MAPK és anti-aktin (mindkettő Sigma) antitestekkel, majd megfelelő tormagyökér-peroxidázzal konjugált másodlagos antitestekkel (mind Sigma) inkubáltuk a membránt. A vizualizációt erősített kemilumineszcens módszerrel végeztük, a kvantifikáláshoz Image J szoftvert (Bethesda) alkalmaztunk.

Caspase-3-aktivitás mérés. 3 hét kezelés után az egerek finoman kipreparált corpus callosumát proteáz inhibitor tartalmazó lízis pufferben elhomogenizáltuk, majd Fluostar optima plate readerrel fluoreszcensen jelölt a caspase-3 szubsztráttal (Ac-DEVD-AFC, Sigma) fluorometriás mérést végeztünk.

Statisztika. A thymusok tömegét és sejttségét véletlen modell variancia analízissel, az áramlási citometriás eredményeket Student-féle t-teszttel hasonlítottuk össze a különböző kezelési csoportok között. A sorozatos tömeg és relatív kamratérfogatok mérésének kiértékeléséhez lineáris modell, ill. a relatív corpus callosum jelintenzitás csoportok közti összehasonlításához kevert modell variancia analízist alkalmaztunk. Az immunblot jelintenzitásokat a belső kontrollhoz történő normalizálás után Scheffé-féle post hoc ANOVA teszttel elemeztük. A számításokhoz SPSS, illetve R szoftvereket használtunk. Statisztikailag szignifikánsként a $p < 0.05$ értékeket fogadtuk el.

4. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS

4.1 Kísérletes demielinizációban a PARP aktivációját a végtermék poli(ADP-ribóz) (PAR) ellen termeltetett ellenanyaggal vizsgáltuk meg három hét cuprizon kezelés után, amikor az apoptotizáló oligodendrocyták száma a legnagyobb. Anti-PAR immunblottal izolált corpus callosumban jelentősen megnövekedett PARP aktivitást, anti-PAR immunhisztokémiával az apoptotizáló oligodendrocyták fragmentálódó nukleuszában és citoplazmájában erős PAR pozitivitást találtunk. Kettős jelöléssel és konfokális mikroszkópos módszerrel vizsgálva azt találtuk, hogy az erős PAR pozitivitást mutató sejtek expresszálták a CAII oligodendrocyta markert is, azt bizonyítva, hogy a megnövekedett PARP aktivitás a pusztuló oligodendrocytákból származik.

Megállapíthatjuk tehát, hogy a mitokondriális patológia és az apoptózis alapján feltételezett PARP aktiváció valóban bekövetkezik a pusztuló oligodendroglában.

4.2 A PARP gátló 4-hidroxikinazolin (4HQ) hatásosan csökkentette a PARP aktivitását a cuprizon hatására demielinizálódó corpus callosumban, illetve önmagában adva a kontroll állatok corpus callosumában kimutatható alap PARP aktivitást is.

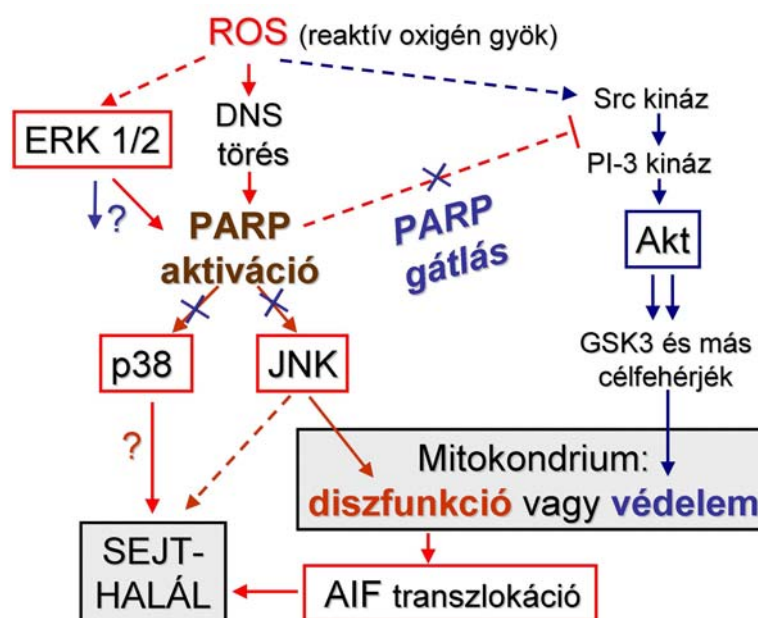
A PARP aktiváció gátlásával párhuzamosan a 4HQ a cuprizon szisztémás hatását, az egerek testtömeg-csökkenését is gátolta. *In vivo* sorozat MRI-vel és annak kvantifikálásával kimutattuk, hogy a 4HQ kezelés megakadályozta a cuprizon hatásra bekövetkező hydrocephalus kialakulását is.

In vivo sorozat MRI-vel kimutattuk azt is, hogy a 4HQ a központi idegrendszeri demielinizációt szintén gátolta. A corpus callosum jelintenzitásának kvantifikálása során megállapítottuk, hogy a cuprizon indukálta demielinizáció 3 és 6 hét kezelés között végig szignifikáns volt, 4 hét kezelés után találtuk a legkifejezettebbnek, majd valószínűleg az irodalomból ismert spontán remielinizáció miatt mértéke csökkent. Ennek megfelelően a 4HQ a legkifejezettebb demielinizáció gátlást a 4. héten érte el, de az összes mérési időpontban szignifikánsan csökkentette a demielinizáció mértékét. A szövettani analízis 5 hét kezelés után a mielint festő LFB-vel igazolta *in vivo* eredményeinket: PARP gátlás hatására a corpus callosum demielinizáció csökkent. A mielin bázikus proteint (MBP) az oligodendrocyták expresszálják és mennyisége jól korrelál a mielinével. 5 hét kezelés után izolált corpus callosumból anti-MBP antitesttel készült immunblot denzitometriás kvantifikálásával kimutattuk, hogy a cuprizon kezelés következtében lecsökkent MBP mennyiség 4HQ kezelés mellett szignifikánsan megnőtt, jelezve a PARP gátlás mielinvédő hatását.

Elmondhatjuk tehát, hogy a PARP aktiválódása kulcsfontosságú az oligodendroglia cuprizon indukálta apoptózisa során, mivel gátlása védett a demielinizáció ellen. Megállapíthatjuk azt is, hogy a PARP gátlás véd a hydrocephalus és a testtömeg-csökkenés kialakulása ellen is. Feltételezzük, hogy mind a hydrocephalust, mind a testtömeg-csökkenést a cuprizon a sejtek energia

háztartásának megzavarásán keresztül váltja ki, így elképzelésünk szerint a PARP gátlás a sejtek energia hiányának mérséklése által véd a cuprizon ezen hatásai ellen.

4.3 Ezt követően megvizsgáltuk, hogy a cuprizon kezelés hatására bekövetkező PARP aktiváció milyen mechanizmussal vált ki kísérletes demielinizációt és oligodendrocyta pusztulást. Ezért három hét kezelés után a demielinizált corpus callosumot izoláltuk és először a caspase kaszkád aktiválásával járó apoptotikus útvonalat vizsgáltuk két módon: fluoreszcens caspase-3 esszével és a pro-caspase-3 hasításának immunblottal történő vizsgálatával. Az eredmények caspase-független apoptotikus mechanizmust sugalltak. Emellett immunhisztokémiai módszerrel kimutattuk, hogy cuprizon kezelés hatására apoptózis indukáló faktor (AIF) nukleáris transzlokáció történt, ráadásul a kezeletlen állatokhoz képest immunblottal az AIF expresszió jelentős megnövekedését is kimutattuk.



1. ábra A cuprizon kiváltotta oligodendrocyta apoptózis és a PARP gátlás védő hatása háttérben álló lehetséges mechanizmusok

Ezután a MAPK és az Akt jelátviteli útvonalakat vizsgáltuk meg a corpus callosumban, melyek aktivitását a PARP aktivitás befolyásolhatja. Három hetes cuprizon kezelés mind a JNK, p38 MAPK és az extracelluláris szignál regulált kináz 1/2 (ERK1/2) MAP kinázok, mind pedig az Akt fokozott foszforilációját (aktivációját) idézte elő. Ismert, hogy a JNK és p38 aktivációja oligodendrocytákban a sejthalál mediálásában vesz részt, ráadásul korábbi megfigyelések azt mutatták, hogy a JNK aktivációja szükséges a PARP kiváltotta AIF transzlokációhoz is. Azt is leírták, hogy maximális PARP aktivációhoz az enzim ERK általi foszforilációja, fokozott ERK aktivitás szükséges. Így elmondhatjuk, hogy a MAP kinázok fokozott aktivitása hozzájárul a PARP mediálta sejthalálhoz (ld. 1. ábra).

Általánosan elfogadott, hogy az Akt a sejtet érő számos noxa esetén aktiválódik és különböző mechanizmusokkal a sejthalál ellen hat. Feltételezzük, hogy ez történik cuprizon hatására is, azonban mindez nem elégséges az oligodendrocyták védelméhez.

4.4 Kíváncsiak voltunk arra is, hogy a demielinizáció ellen védő PARP gátlás mely mechanizmusok befolyásolásával fejti ki hatását és azt találtuk, hogy három hét cuprizon és együttes 4HQ kezelés után sem AIF transzlokáció, sem emelkedett AIF szint nem volt megfigyelhető a corpus callosumban.

A 4HQ-val történő együttes kezelés csökkentette a pro-apoptotikus JNK és a p38 MAPK aktivitását, míg az ERK1/2 aktivitását nem befolyásolta, ami alátámasztja elképzelésünket, miszerint az ERK útvonal upstream helyezkedne el a PARP-hoz képest. Megállapítottuk továbbá, hogy a PARP gátló önmagában nem befolyásolta a MAP kinázok foszforilációját.

A MAP kinázokkal ellentétben a sejtvédő Akt foszforilációs szintjét a cuprizon kezeléshez képest az együttes 4HQ kezelés tovább növelte. Ismert, hogy a PARP aktivitás gátolja a PI-3K-Akt sejtvédő jelátviteli útvonalat, így a PARP gátlás hatására az Akt útvonal felszabadul a gátlás alól, aktivitása fokozódik, hozzájárul a sejtek védelméhez. Mindezt alátámasztja az a megfigyelésünk is, hogy a PARP gátló önmagában is fokozta az Akt foszforilációját (ld. 1. ábra).

4.5 Négyhetes egerekben már egy hét cuprizon kezelés hatására a thymus súlyos atrófiáját észleltük a thymustömeg és az abszolút T sejt szám jelentős lecsökkenésével. A thymocyta Annexin V/ PI kettős jelölése, majd áramlási citometriás mérés után megállapítottuk, hogy a sejtek jelentős része cuprizon kezelés hatására az apoptózis korai, illetve késői fázisában volt, míg az élő sejtek aránya szignifikánsan lecsökkent.

Fluoreszcens mikroszkópiával azt találtuk, hogy a CD4+CD8+ kettős pozitív thymocyta szinte teljesen eltűntek a thymus kortexéből, és hogy az összezsugorodott thymus általánosan nagyon gyenge CD4, illetve CD8 pozitivitást mutatott, ami jól korrelált a jelentősen lecsökkent abszolút thymocyta számmal. CD4, CD8 kettős jelölés és áramlási citometria segítségével kimutattuk, hogy a még ép thymocyta populációinak aránya jelentősen eltolódott. A kontroll állatokban kb. 75%-ot kitevő DP populáció szinte teljesen eltűnt, az összes élő thymocyta 1%-át adta. Ezzel párhuzamosan a többi populáció aránya egymáshoz hasonló mértékben megnőtt, jelezve, hogy bár a teljes sejtszám és így minden populáció sejtszáma jelentősen lecsökkent, a DP populáció reagált a legérzékenyebben a cuprizon kezelésre.

A cuprizon thymus strómára gyakorolt hatását anti-Ly51 és anti-EpCAM antitesttel történő jelölés és fluoreszcens mikroszkópia segítségével vizsgáltuk és azt találtuk, hogy a thymocyta pusztulás mellett jelentős thymus epithel pusztulás is

történt. Mind a kortikális, mind a medulláris epithel sejtek mennyisége kifejezetten lecsökkent, a stróma pedig elveszítette szivacs-szerű szerkezetét.

Megállapíthatjuk tehát, hogy egyhetes cuprizon kezelés hatására súlyos thymus atrófia alakult ki négyhetes egerekben. Hasonlóan számos más patológiás állapothoz most is az apoptózist kiváltó faktorokra legérzékenyebb DP thymocyta populáció volt a legsérülékenyebb. A thymocyta apoptózis mellett kimutattuk a stróma súlyos károsodását is, ami bekövetkezhetett a cuprizon direkt hatása miatt is, bár valószínűbb a thymocyták és a thymus epithel közötti kölcsönös függőségből adódó strómakárosodás. Elmondhatjuk azt is, hogy a thymus cuprizon kiváltotta ilyen változásai legalább részben magyarázhatják a korábban megfigyelt csökkent perifériás T sejt választ EAE-ben.

4.6 Négyhetes egereket cuprizonnal és 4HQ-val együttesen kezelve azt találtuk, hogy sem a thymus tömeg, sem a relatív thymustömeg, és az abszolút sejtszám sem csökkent le olyan mértékben, mint a csak cuprizon kezelt állatoknál.

Bár a háttérben álló mechanizmusok egyelőre teljesen feltáratlanok, megállapíthatjuk, hogy a PARP gátlás véd a cuprizon thymusra gyakorolt hatása ellen is.

5. ÖSSZEFOGLALÁS ÉS KONKLÚZIÓK

Munkánk során egy a szklerózis multiplexre jellemző demielinizációval és oligodendrocyta pusztulással járó állatmodellt tanulmányoztunk. A cuprizon mitokondriális toxinként hatva az oligodendrocyták szelektív apoptózisán kívül hydrocephalus kialakuláshoz és testtömeg-csökkenéshez is vezet fiatal felnőtt, hím C57BL/6 egerekben.

Cuprizon kezelés hatására a corpus callosumban az apoptotizáló oligodendrocytákból származó fokozott PARP aktivitást mutattunk ki.

4HQ, egy potens PARP gátló adása csökkentette a PARP aktivitást és védett a demielinizáció ellen. A PARP gátló kezelés megakadályozta a cuprizon egyéb hatásainak, a hydrocephalusnak és a súlycsökkenésnek a kialakulását is.

Tanulmányoztuk továbbá a cuprizon hatására bekövetkező oligodendrocyta apoptózis hátterében álló molekuláris mechanizmusokat. A fokozott PARP aktivitás mellett megemelkedett AIF expressziót, AIF nukleáris transzlokációt találtunk, de caspase-3 aktivitást nem tudtunk kimutatni. Cuprizon kezelés hatására mind a MAP kinázok (JNK, p38 MAPK, ERK1/2), mind a sejtvédő Akt/PKB nagyobb mértékű foszforilációját figyeltük meg a corpus callosumban. PARP gátlóval történő együttes kezelés esetén ezzel szemben az AIF expresszió alacsonyabb volt, AIF transzlokáció nem volt megfigyelhető, és az általában apoptózis, illetve gyulladás mediálásában részt vevő JNK és p38 foszforilációja alacsonyabb volt. Ezen kívül a PARP gátlás tovább fokozta az Akt foszforilációját, hozzájárulva ezzel a 4HQ sejtvédő hatásához.

Ezek, és az SM III. patológiai típusáról általunk korábban leírtak alapján megállapíthatjuk, hogy cuprizon indukálta demielinizációban és az SM III. patológiai típusában a morfológiai hasonlóságok mellett legalább két kulcsfontosságú molekuláris mechanizmus azonos az oligodendrocyta pusztulásban: a PARP aktiváció és az AIF mediálta caspase-független apoptózis. Mivel a PARP gátlásnak direkt gyulladáscsökkentő hatása is van –csökkentette az EAE tüneteit–, így kísérletes demielinizációban alkalmazott terápiánk az első olyan beavatkozás, mely az SM minden patológiai típusában hatásos lehet: egyaránt véd az autoimmun gyulladás és a degeneratív oligodendrocyta pusztulás ellen.

A cuprizon ismert hatásai mellett most írtuk le először, hogy már egy hét cuprizon kezelés négyhetes egereknél súlyos thymus atrófiát váltott ki. Megmutattuk, hogy a thymocyta apoptózissal pusztultak el, a legérzékenyebbek a CD4+CD8+ kettős pozitív thymocyta voltak és leírtuk a thymus stróma károsodását is.

Megmutattuk továbbá, hogy a PARP gátlás védte az egereket az akut thymus involúció ellen. Az akut thymus involúció és az azt kísérő károsodott perifériás immunválasz számos stressz szituáció, mint a malnutríció, infekció, szepszis kísérője. Mivel az akut thymus atrófia kezelésében egyelőre nem áll hatékony terápia rendelkezésünkre, és a PARP gátlás ígéretesnek bizonyult kivédésében, ezért további tanulmányozása nagy jelentőséggel bíró eredményeket hozhat a jövőben.

6. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenek előtt szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek, ifj. Dr. Gallyas Ferenc és Dr. Sümegi Balázs professzor uraknak, hogy irányították munkámat, mindenben támogattak és hasznos tanácsokkal láttak el. Köszönöm Dr. Berente Zoltán docens úrnak az NMR mérésekben nyújtott nagyszerű segítséget és a PTE ÁOK Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet valamennyi munkatársának a tanácsokat és a segítséget a laboratóriumi munkában.

Hálás vagyok Dr. Illés Zsolt és Dr. Komoly Sámuel professzor uraknak a munkám során nyújtott irányításért, ötletekért és tanácsokért és szeretnék köszönetet mondani Dr. Ács Péternek, aki a szövettani vizsgálatokat végezte a PTE KK Neurológiai Klinikán.

Köszönet illeti Dr. Balogh Péter docens urat hasznos tanácsaiért, Dr. Pálincás Lászlót és Dr. Boldizsár Ferencet az áramlási citometriás mérések elvégzésében nyújtott segítségért és különösen Dr. Talabér Gergelyt a thymusok immunhisztokémiai vizsgálatának elvégzéséért a PTE KK Immunológiai és Biotechnológiai Intézetében.

Hálás vagyok Dr. Borgulya Gábornak a statisztikai elemzéshez nyújtott nagy segítségért.

Végül hadd fejezzem ki legmelegebb köszönetemet és hálámat szüleimnek, férjemnek, gyermekeimnek és az egész családomnak szeretetükért, türelmükért és támogatásukért.

7. PUBLIKÁCIÓK

A tézis alapját képező publikációk:

Veto S*, Acs P*, Bauer J, Lassmann H, Berente Z, Setalo G Jr., Borgulya G, Sumegi B, Komoly S, Gallyas F Jr, Illes Z. Inhibiting poly(ADP-ribose) polymerase: a potential therapy against oligodendrocyte death. *Brain*, 2010, 133:822-834 IF:9.49

**SV and PA contributed equally*

Előkészületben: New aspects of the degenerative demyelination model – acute thymic atrophy induced by cuprizone.

Egyéb publikációk:

Clemens B, Bank J, Piros P, Bessenyei M, Veto S, Toth M, Kondakor I. Three-dimensional localization of abnormal EEG activity in migraine: a low resolution electromagnetic tomography (LORETA) study of migraine patients in the pain-free interval. *Brain Topography*, 2008; 21:36-42 IF:1.179

Szabadalom:

Pharmaceutical combination product for the treatment of degenerative neurological diseases. Completed Hungarian application No.: P0800414, PCT/HU2009/000055 Priority date: 2008. 07. 04.

A tézis alapját képező idézhető absztraktok:

Veto S, Acs P, Bauer J, Lassmann H, Berente Z, Sumegi B, Komoly S, Gallyas F Jr, Illes Z, 2010. Inhibiting poly(ADP-ribose) polymerase: a potential therapy against oligodendrocyte death in multiple sclerosis. *Clinical Immunology* 135: S30-S30. (IF: 3.863)

Veto S, Acs P, Bauer J, Lassmann H, Berente Z, Sumegi B, Komoly S, Gallyas F Jr, Illes Z, 2010. Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) is activated in multiple sclerosis pattern III lesions and its inhibition prevents experimental demyelination and oligodendrocyte death. *Journal of Neuroimmunology* 222:16-16 (IF: 2.841)

Veto S, Acs P, Bauer J, Lassmann H, Berente Z, Sumegi B, Komoly S, Gallyas F Jr, Illes Z, 2009. Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) is activated in multiple sclerosis pattern III lesions and its inhibition prevents experimental demyelination and oligodendrocyte death. *Journal of the Neurological Sciences* 285: S105-S106 Suppl. 1 (IF: 2.324)

Veto S, Acs P, Bauer J, Lassmann H, Berente Z, Sumegi B, Komoly S, Gallyas F Jr, Illes Z, 2009. Poly(ADP-ribose) polymerase is activated in multiple sclerosis pattern III lesions and its inhibition prevents experimental demyelination and oligodendrocyte death. *Multiple Sclerosis* 15: S88-S88 (IF: 3.312)

Veto S, Acs P, Tapodi A, Lendvai Z, Komoly S, Illes Z, Gallyas F, 2008. Poly(ADP)ribose polymerase inhibitor modifies the activities of various kinase cascades in the cuprizone-induced demyelination model. *Multiple Sclerosis* 14: S81-S81 (IF: 3.312)

Veto S, Acs P, Dolowschiak T, Doppler H, Kanizsai A, Berente Z, ifj Gallyas F, 2007. Cuprizone hatása a mitogén aktiválta protein kináz (MAPK) rendszerekre a corpus callosumban. Folia Hepatologica 11: S40-S40

Veto S, Acs P, Dolowschiak T, Lendvai Z, Gallyas F, Komoly S, Berente Z, 2007. In vivo MRI follow-up of cuprizone-induced CNS changes. Multiple Sclerosis 13: S255-S255 (IF: 3.260)

Veto S, Acs P, Berente Z, Szabo A, ifj. Gallyas F, Komoly S, 2006. 4-hydroxiquinazoline hatása a cuprizone indukálta központi idegrendszeri elváltozásokra. Biokémia 30:80-81

A tézis alapját képező előadások:

Veto S, Acs P, Berente Z, Lendvai Z, Komoly S, Sumegi B, Illes Z, Gallyas F Jr. Új terápiás lehetőség a szklerózis multiplex kezelésében? - a PARP-gátlás védő hatása szklerózis multiplex egy degeneratív állatmodelljében.

Magyar Biológiai Társaság Pécsi Csoportja 232. szakülése, October 21, 2010 Pecs, Hungary

Ifj. Gallyas F, Berente Z, Veto S, Acs P, Komoly S, Sumegi B, Illes Z. Non-invazív MRI módszer használata sclerosis multiplex degeneratív állatmodelljében: PARP gátlás, mint új terápiás lehetőség?

MBKE Gyógyszerbiokémiai Szakosztály munkaértekezlete, May 17-19, 2010 Balatonőszöd, Hungary

Veto S, Acs P, Berente Z, Lendvai Z, Komoly S, Sumegi B, Illes Z, Gallyas F Jr. Inhibition of poly(ADP)ribose polymerase prevents cuprizone-induced experimental demyelination in a degenerative murine model of multiple sclerosis.

Biológus doktoranduszok konferenciája, November 12-13, 2009, Pecs, Hungary **3. díj**

Veto S, Acs P, Bauer J, Lassmann H, Berente Z, Sumegi B, Komoly S, Gallyas F Jr, Illes Z. Poly(ADP)ribose polymerase (PARP) is activated in multiple sclerosis pattern III lesions and its inhibition prevents experimental demyelination.

19th World Congress of Neurology, October 24-30, 2009, Bangkok, Thailand

Veto S, Acs P, Berente Z, Lendvai Z, Komoly S, Illes Z, ifj. Gallyas F. A poli(ADP-ribóz)-polimeráz enzim gátlása a mitokondrium integritásának megőrzésén keresztül véd a cuprizone indukálta demyelinizáció ellen a sclerosis multiplex egy állatmodelljében.

Magyar Élettani Társaság LXXIII. Vándorgyűlése, August 27-29, 2009, Budapest, Hungary, **Merck díj**

Illes Z, Veto S, Acs P, Lassmann H, Sumegi B, Komoly S, ifj. Gallyas F. PARP gátlás védő hatása a sclerosis multiplex (III. típus) állatmodelljében.

39. Membrán-Transzport Konferencia, May 19-22, 2009, Sümeg, Hungary

Veto S, Acs P, Dolowschiak T, Doppler H, Kanizsai A, Berente Z, ifj. Gallyas F. Cuprizone hatása a mitogén aktiválta protein kináz (MAPK) rendszerekre a corpus callosumban

Magyar Szabadgyök Kutató Társaság IV. Konferenciája, October 11-13, 2007, Pécs, Hungary

A tézis alapját képező poszterek:

Veto S, Acs P, Bauer J, Lassmann H, Berente Z, Setalo G Jr, Sümegi B, Komoly S, Gallyas F Jr, Illes Z. Poli(ADP-ribóz) polimeráz (PARP) gátlás: az oligodendrocyta pusztulás és a demyelinisatio potenciális terápiája.

Magyar Immunológiai Társaság 39. Vándorgyűlése, November 3-5, 2010, Szeged, Hungary

Veto S, Acs P, Bauer J, Lassmann H, Berente Z, Setalo G Jr, Sumegi B, Komoly S, Gallyas F Jr, Illes Z. Inhibiting poly(ADP-ribose) polymerase (PARP): a potential therapy against oligodendrocyte death and demyelination in multiple sclerosis.

14th Congress of the European Federation of Neurological Societies, September 25-28, 2010, Geneva, Switzerland

Veto S, Palinkas L, Fonai F, Lendvai Z, Balogh P, Illes Z, Gallyas F Jr. Cuprizone induces acute thymic involution which can be prevented by PARP inhibition. 40. Membrán-Transzport Konferencia, May 18-21, 2010, Sümeg, Hungary.

Veto S, Acs P, J. Bauer J, H. Lassmann, Z. Berente, B. Sumegi, S. Komoly, F. Gallyas Jr, Z. Illes. Poly(ADP-ribose) polymerase is activated in multiple sclerosis pattern III lesions and its inhibition prevents experimental demyelination and oligodendrocyte death.

25th Congress of the European Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis, September 9-12, 2009, Düsseldorf, Germany

Veto S, Acs P, Berente Z, Doppler H, Kanizsai A, Lendvai Z, Komoly S, Illes Z, Gallyas F Jr. Inhibition of poly(ADP)ribose polymerase protects against cuprizone-induced demyelination by preserving mitochondrial integrity in a degenerative murine model of multiple sclerosis.

12th Meeting of the Hungarian Neuroscience Society, 22-24 January, 2009, Budapest, Hungary **legjobb poszter díj**

Veto S, Acs P, Tapodi A, Lendvai Z, Komoly S, Illes Z, Gallyas F Jr. Poly(ADP)ribose polymerase inhibitor modifies the activities of various kinase cascades in the cuprizone induced demyelination model.

World Congress on Treatment and Research in Multiple Sclerosis. September 17-20, 2008, Montreal, Canada

Veto S, Palinkas L, Lendvai Z, Balogh P, Illes Z, ifj. Gallyas F. Az immunrendszer változásai a cuprizone kiváltotta demielinizációs modellben.

38. Membrán-Transzport Konferencia, May 20-23, 2008, Sümeg, Hungary

Veto S, Acs P, Dolowschiak T, Lendvai Z, Gallyas F Jr., Komoly S, Berente Z. In vivo MRI follow-up of cuprizone induced CNS changes.

23rd Congress of the European Committee for Treatment and Research of Multiple Sclerosis (ECTRIMS) and the 12th Conference of Rehabilitation in Multiple Sclerosis (RIMS), October 11–14, 2007, Prague, Czech Republic

Veto S, Dolowschiak T, Kanizsai A, Doppler H, Acs P, ifj. Gallyas F, Komoly S, Berente Z. Cuprizone indukálta központi idegrendszeri elváltozások *in vivo* követése MRI segítségével.

37. Membrán-Transzport Konferencia, May 22-25, 2007, Sümeg, Hungary

Veto S, Acs P, Berente Z, Szabo A, ifj. Gallyas F, Komoly S. 4-hydroxiquinazoline hatása a cuprizone indukálta központi idegrendszeri elváltozásokra.

A Magyar Biokémiai Egyesület 2006. évi Vándorgyűlése, August 30 – September 2, 2006, Pécs, Hungary

Egyéb idézhető absztraktok, előadások és poszterek:

Idézhető absztraktok: 5

Előadások: 3

Poszterek: 12