

# **MIF tautomeráz gátlók hatásának vizsgálata gyulladáso makrofág aktivációban és kísérletes colitisben**

**PhD tézis**

**Vámos Eszter**



**Interdiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola**

**Analitikai technikák a biokémiában és molekuláris biológiában program**

**Doktori Iskola és Programvezető: Prof. Dr. Gallyas Ferenc**

**Témavezető: Dr. Radnai Balázs**

**Pécsi Tudományegyetem**

**Általános Orvostudományi Kar**

**Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet**

**2025**

## **1. Szakirodalmi áttekintés**

### **1.1. Gyulladásos bélbetegségek általános jellemzése**

A gyulladásos bélbetegségek (inflammatory bowel diseases [IBD]) két fő megjelenési formája a Crohn-betegség és a fekélyes vastagbélgyulladás (colitis ulcerosa [UC]) Mindkét betegség prevalenciája és incidenciája világszerte növekszik. A gyulladásos bélbetegségek száma csak az Egyesült Államokban körülbelül 2,4-2,7 millió közé tehető.

A Crohn-betegség a tápcsatorna bármely pontján előfordulhat a szájüregtől a végbélnyílásig, de leggyakrabban a csípőbél (ileum) terminális szakaszát érinti és a bélfal minden rétegében kimutatható a mucosától a serosáig. Élesen körülírt, a bélfal minden rétegére kiterjedő (transmuralis), a bélnyálkahártya szerkezeti károsodását eredményező gyulladás. A betegség rendkívül változatos megjelenésű, visszatérő hasmenéses epizódok, a görcsös hasi fájdalom és a napokig, akár hetekig elhúzódó lázas periódusok jellemzik.

A colitis ulcerosa a vastagbél fekélyképződéssel járó visszatérő gyulladásos megbetegedése, amely a legsúlyosabb formák kivételével rendszerint a bélfal felületi rétegeire (mucosa és submucosa) korlátozódik. A mélyebb rétegek csak a toxikus megacolon esetén érintettek. A gyulladásos bélbetegségek olyan multifaktoriális kórképek, amelyek kialakulásának közvetlen okát jelenleg még nem ismerjük.

Az IBD hátterében a genetikai tényezők mellett, azzal szoros kapcsolatban számtalan környezeti tényezőt feltételeznek, így például kialakulásukat kapcsolatba hozzák többek között a táplálkozással, egyes fertőzésekkel, a dohányzással vagy például az appendectomiával is. A betegség kialakulásáért felelős különböző genetikai és környezeti tényezők gyakran az epitéliális barrier károsodását eredményezik. A megváltozott barrier funkció ezt követően a baktériumok és mikrobiális termékek transzlokációját eredményezi a bél lumenéből a bélfalba, ami az immunsejtek szabályozatlan gyulladásos aktivációjához és citokintermeléshez vezet. Ha az akut nyálkahártya-gyulladást nem kezelik gyulladáscsökkentő terápiával, akkor krónikus bélgyulladás alakulhat ki. Az azonban az esetek többségében bizonytalan, hogy az epitéliális barrier funkció megváltozása az oka, vagy inkább következménye a gyulladásnak.

### **1.2. A gyulladásos bélbetegségekben alkalmazott terápiák**

Az IBD kezelésében többféle terápia használható. Az esetek többségében a gyógyszeres kezeléssel jó eredmény érhető el, de vannak helyzetek, amikor sebészi megoldásra is szükség

lehet. A kezeléssel elérhető a tünetek enyhülése, a remissziós állapot kialakulása és fenntartása, a relapszus megelőzése, a szöveti működés helyreállása, valamint az átmeneti gyógyulás is. Oki terápia azonban ma még nincs, így végleges gyógyulás sem várható. Az elváltozás pontos lokalizációja alapvető fontosságú, mert ennek alapján lehet dönteni a szisztémás vagy lokális kezelés megindításáról. Jelenleg a gyógyszeres terápiában immunszuppresszorokat, kortikoszteroidokat, illetve antibiotikumokat alkalmaznak, azonban ezeknek a gyógyszereknek olyan súlyos mellékhatásai lehetnek, mint a láz, görcsök, magas vérnyomás és ezek a tényezők limitálják a hosszú távú használatukat.

### **1.3. A mitokondrium szerepe a gyulladásoos bélbetegségeekben**

A mitokondriális biogenezis, a mitokondriális funkció és szerkezet stabilitása jelentős szerepet játszik a sejtek metabolikus egyensúlyának fenntartásában. Így a mitokondriális funkció döntő jelentőségű a bélhám fiziológiás működésének fenntartásában is. A mitokondriális diszfunkció viszont negatívan befolyásolja a sejtek bioenergetikáját, a sejtek közötti kommunikációt és megszakíthatja a mitokondriumok és más sejtorganelumok (pl. endoplazmás retikulum [ER] stb.) közötti fizikai kapcsolatokat. Mindez reaktív oxigén fajták (reactive oxygen species [ROS]) képződéséhez és az immunsejtek gyulladásoos aktiválásához vezethet, amely a bélfal-barrier károsodásával, megnövekedett permeabilitással és végső soron bélgyulladás kialakulásával járhat.

Az oxidatív foszforiláció (oxidative phosphorylation [OXPHOS]) folyamata a mitokondriumban zajlik, ami a sejt fontos anyagcsere útvonalainak és a hatékony energiatermelésnek ad otthont. A katabolikus folyamatokban a NADH és a FADH<sub>2</sub>, mint hidrogéntranszporter a citrát körből származó elektronokat a légzési láncba (electron transport chain [ETC]) tudják átvinni, ahol a legtöbb elektron a mitokondriális komplexeken keresztül a citokróm-c oxidázhoz vándorol, ahol oxigénmolekulákkal és hidrogénionokkal vizet képez. Az I. és III. komplex elektronjainak egy kis része (kb. 2%) azonban „elszivároog” az ETC-ből és oxigénmolekulákkal reagálva szuperoxid-anionokat képeznek, amelyek spontán módon vagy mangán-szuperoxid-dizmutáz hatására H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dá alakulhatnak. A sérült mitokondriumok javításának vagy eliminálásának sikertelensége és a fokozódó mitokondriális ROS termelése olyan mitokondriális komponensek (pl.: formilált peptidek) felhalmozódásához vezethet, amelyek károsodással összefüggő molekuláris mintákként (damage associated molecular

patterns [DAMP]) szolgálnak, amelyek az immunsejtek aktiválásával a gyulladás további fokozódását eredményezik.

#### **1.4. Makrofágok szerepe a gyulladásos bélbetegségekben**

A colitis ulcerosában és a Crohn-betegségben is a bélben lévő mikrobiológiai eredetű antigénekkal szembeni immunválasz hibája figyelhető meg. Fiziológias körülmények között a bél mikrobiota mikroorganizmusai ellen ugyanis nem alakul ki gyulladásos immunválasz azaz az immuntolerancia jelensége figyelhető meg, de IBD esetében ez kimutatható. A hatékony immunvédelem a veleszületett és a szerzett immunitásból áll. Ez a védelem az ép epitéliumsejtekből, az azokat fedő nyákból és az ép perisztaltikus tevékenységből áll össze. Homeosztázisban monociták folyamatosan jelen vannak a bélben és érett makrofágokká differenciálódnak. Ezek a makrofágok M2-szerű fenotípust mutatnak, a gyulladásgátló makrofágok tipikus funkcióival, mint például az interleukin-10 (IL-10) és a transzformáló növekedési faktor- $\beta$  (transforming growth factor [TGF- $\beta$ ]) gyulladásgátló citokinek szekréciója, valamint a Toll-like receptorok (TLR) módosult expressziója. Gyulladásos bélbetegségekben a monociták M2 irányú differenciálódási folyamata azonban megakad, ugyanis bizonyos kemokinek (pl.: CCL2, CCL7 és CCL8) a gyulladt területekhez vonzzák őket, ahol gyulladást indukáló M1 makrofágokká differenciálódnak. Ezek az M1 polarizált makrofágok viszont már gyulladásos citokineket termelnek, mint például az IL-1, IL-6, IL-18, és a tumornekrózis faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) Ezek a citokinek közvetlenül vagy közvetve hatnak a bélhámsejtekre és e sejtek direkt károsodását és nekrotikus sejthalálát is indukálhatják, ami gyulladásos bélbetegségek kialakulásához vezethet. Az említett gyulladásos citokinek túlzott szekréciója az IBD egyik tipikus jellemzője.

#### **1.5. A makrofágok metabolizmusa a gyulladás során**

A makrofágokban a legfontosabb immunmetabolikus útvonalak a glikolízis, a citromsavciklus (tricarboxylic acid cycle [TCA]), a pentóz-foszfát útvonal, a zsírsavszintézis és az aminosav-anyagcsere. Az M1 polarizáció a sejtm metabolizmus teljes átprogramozását foglalja magában, melynek során a sejtek alkalmazkodnak az új feltételekhez. A lipopoliszacharid (LPS)- vagy interferon- $\gamma$ -stimulált (IFN- $\gamma$ ) makrofágok megváltozott metabolikus fenotípust mutatnak, amelyet Warburg-metabolizmusnak neveznek. A Warburg-effektus jellemzője, hogy a sejtek energiametabolizmusát a szövet megfelelő oxigénellátása

ellenére az oxidatív foszforilációról laktáttermeléssel járó aerob glikolízisre állítják át. A Warburg-metabolizmus során a sejtek kénytelenek nagyobb mennyiségű glükózt felhasználni ATP és laktát előállítására, mivel az energetikailag hatékonyabb mitokondriális OXPHOS gátolt. Érdekes módon a citrát körön keresztüli csökkent fluxus ellenére a mitokondriális szukcinát oxidációja a szukcinát-dehidrogenáz (TCA enzim) hatására megnövekszik a makrofágokban. Ez fokozza a ROS termelést és stimulálja az M1 aktivációt. A Warburg-típusú metabolizmussal működő makrofágok megrekednek ebben a gyulladós M1-es állapotban. IL-4 kezelést követően, ami az M2 polarizáció erős aktivátora a makrofágokban, sem tudnak ezek a sejtek M1-ről M2 irányba polarizálódni. Ezenkívül a megfelelő mitokondriális funkció is elengedhetetlennek tűnik az M1-M2 irányú polarizáció stimulálásához.

A lipidmetabolizmus megváltozásáról is beszámoltak IBD-betegekben, ezért a gyulladós lipid mediátorokat az IBD potenciális biomarkereinek tekintik. A nukleáris peroxisoma-proliferátor-aktivált receptor gamma (PPAR- $\gamma$ ) lehet a kapcsolat a lipidek és a veleszületett immunitás között. Érdekes módon a makrofágok PPAR- $\gamma$  aktivációja megvédi az egereket a kísérletes vastagbélgyulladástól és a makrofág-specifikus PPAR- $\gamma$  hiány fokozza a vastagbélgyulladást. A lipidanyagcsere kritikusan befolyásolja a makrofágok polarizációját, és a PPAR- $\gamma$  potenciális terápiás célpont lehet az IBD-terápiában.

Az IBD-ben szenvedő betegek aminosav-anyagcseréjének zavara is összefüggésbe hozható a betegség aktivitásával. A gyulladós bélbetegségben szenvedő betegek megváltozott glutamin-anyagcserét mutatnak, beleértve a csökkent glutaminfelvételt, a plazma alacsony glutaminkoncentrációját és a nyálkahártya glutamináz aktivitásának csökkenését. Az arginin mennyisége a bélgyulladás során jelentősen csökken, mivel az NO bioszintézise L-argininből történik, és bélgyulladás során az NO mennyisége megnövekszik ezért a gyulladás során a „kereslet” meghaladja a „kínálatot”. Ez azért sem kívánatos, mert az arginin a makrofágokban különböző jelátviteli útvonalakon keresztül gyulladásgátló vagy gyulladáscsökkentő hatású.

## **1.6. MIF**

A makrofág migráció gátló faktort (MIF) több mint 40 évvel ezelőtt fedezték fel és ez volt az egyik elsőként azonosított T-limfociták által termelt citokin. A humán MIF monomer 114 aminosavból álló fehérje, jelen tudásunk szerint a MIF aktív formája azonban a homotrimer. A MIF nagy mennyiségben makrofágokban, de emellett sokféle más sejt típusban is termelődik, többek között limfocitákban, monocitákban, endoteliális sejtekben és

fibroblasztokban is. Mára a MIF számos aktivitása és funkciója ismert. Makrofágokban fokozni képes a sejtek adhézióját, a fagocitózist, valamint a migráció gátlását is indukálja. Jelentős szerepet játszik a veleszületett és a szerzett immunválaszban, jelentősége van a tumor növekedésben és az angiogenezisben. Bizonyítékok azt mutatják, hogy a MIF a makrofágokban fokozza a gyulladást elősegítő citokinek és más gyulladással kapcsolatos komponensek termelését, mint például a TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-8, nitrogén-monoxid, és a COX-2. Endokrin faktorként a MIF-et a hipotalamusz-hipofízis-mellékvesekéreg tengelye szabályozza. A MIF a hipotalamusz-hipofízis-mellékvesekéreg tengely minden szintjén termelődik.

A MIF egyik érdekes és különös aktivitásával katalizálja a természetben nem előforduló D-dopachrom tautomerizációját, illetve a fenilpiruvát és a hidroxifenilpiruvát keto-enol tautomerizációját, azaz tautomeráz enzimaktivitással is rendelkezik. Ez a tautomeráz aktivitás a ketonáz és enoláz alaktivitásokra bontható. Természetes szubsztrátjai nem ismertek, de ilyenek lehetnek valószínűleg a catecholaminok anyagcseretermékei. Ugyanakkor feltételezhető, hogy ez a tautomeráz aktivitás szerepet játszhat a MIF biológiai hatásának kialakításában is.

### **1.7. A MIF szerepe a gyulladásban**

A MIF mitogénekre, gyulladási ingerekre (pl.: lipopoliszaccharid) valamint specifikus antigénekre vagy citokinek (TNF- $\alpha$ , interferon- $\gamma$ ) hatására is felszabadul. Az aktív MIF pedig extracellulárisan receptoron keresztül és intracellulárisan jelátviteli fehérjék aktiválásán keresztül is kifejtheti hatását. Akut gyulladásban a MIF gyulladási hatása különböző citokinek (TNF, IL-6), nitrogén-monoxid és más mediátorok termelésének stimulálásával valósul meg. A MIF antagonistikus hatása a glükokortikoidok immunszuppresszív hatásával szemben. *In vitro* kísérletekben megfigyelték, hogy a MIF szabályozza a glükokortikoidok által gátolt perifériás vér mononukleáris sejtek TNF, IL-1, IL-6 és IL-8 szintézisét, a citoszol PLA2 aktivitását, a fibroblasztok arachidonsav felszabadulását és a T-sejtek proliferációját. A glükokortikoidokhoz hasonlóan a MIF koncentrációja megnő gyulladás, fertőzés és stressz esetén. A MIF számos krónikus és akut gyulladási kórképben játszik kulcsszerepet, mint a szepszis, pulmonáris gyulladási megbetegedésekben (krónikus tüdőgyulladás, akut légzési distressz szindróma), valamint megemelkedett MIF szintet találtak gyulladási bélbetegségek esetében is.

## 1.8. MIF gátlás

A MIF gátlásának védő hatását már számos gyulladásos betegségben leírták. A glükokortikoidok immunszuppresszív hatásának gátlása a MIF gyulladásos hatásának egyik mechanizmusa lehet. Így a MIF-gátlást potenciálisan hasznos farmakológiai stratégiaként javasolták gyulladásos és autoimmun betegségek kezelésére.

Kutatások során közvetlen kapcsolatot találtak a MIF citokin aktivitása és a fehérje tautomeráz enzimaktivitása között. Ez alapján feltételezhető, hogy a MIF tautomeráz aktivitásának gátlása pozitív hatással lehet a különböző gyulladásos folyamatokra. A MIF tautomeráz aktivitás kis molekulájú modulátorai befolyásolhatják a MIF citokin aktivitását, mivel megváltoztatják annak konformációját és/vagy más fehérjékkel való kölcsönhatásait. MIF tautomeráz gátlók szép számmal előfordulnak a természetben is. Ilyen természetes tautomeráz gátló például a kávésav és a kurkumin. Szintetikus gátlószer a paracetamol metabolitja (NAPQI) és az ISO-1 is. A MIF tautomeráz aktivitás leggyakrabban alkalmazott referencia inhibitora az ISO-1. Ez az izoxazolin osztályba tartozó inhibitor dóziszfüggő módon gátolja a MIF tautomeráz aktivitását, és ugyanazon a helyen kötődik, mint a szubsztrát, a p-hidroxifenilpiruvát, azaz a tautomeráz aktív helyen. Így az ISO-1 széles körben alkalmazható referenciainhibitoroként kis molekulájú MIF tautomeráz inhibitorok tesztelésében, validálásában.

Mindazonáltal a magas hatékonysággal és kedvező tulajdonságokkal rendelkező MIF-gátlók továbbra is korlátozott számban állnak rendelkezésre, és csak kevés esetben történt meg ezek részletes jellemzése különböző releváns betegségmodellekben.

## 1.9. KRP-6 és TE-11

A munkám során alkalmazott egyik vegyület az E-3-(2-methoxybenzylidene) chroman-4-one (KRP-6), amely erőteljesen gátolta a MIF ketonáz aktivitását ( $IC_{50} = 4,31 \pm 1,34 \mu\text{mol/L}$ ), ugyanakkor az enoláz aktivitását nem befolyásolta ( $IC_{50} = 1260 \pm 159 \mu\text{mol/L}$ ), így szelektív ketonáz gátlónak tekinthető. A másik vegyület, az (E)-2-(Piridin-2-ilmetilén) -3,4-dihidronaftalin-1(2H) -on (TE-11) mind a MIF ketonáz ( $IC_{50} = 5,63 \mu\text{mol/L}$ ), mind az enoláz ( $IC_{50} = 28,58 \mu\text{mol/L}$ ) alaktivitásokat hatékonyan gátolta. Ezeknek a vegyületeknek, melyek szerkezetileg hasonlóságot mutatnak a természetben előforduló MIF-gátló flavonoidokkal, a kutatócsoportunk igazolta a MIF tautomeráz enzimaktivitásra gyakorolt gátló hatását.

## 2. Célkitűzések

A MIF gátlás különböző gyulladásos megbetegedésekben gyakorolt pozitív hatása ismert. Így mi munkánkban a KRP-6 és a TE-11, MIF tautomeráz gátló vegyületek, hatását vizsgáltuk TNBS-indukálta kísérletes vastagbélgyulladásban egérben, valamint IFN- $\gamma$ , illetve LPS+IFN- $\gamma$  indukálta M1 makrofágokon.

Dolgozatomban a következő kérdésekre kerestem a választ:

1. Korábbi eredményeink azt mutatták, hogy a TE-11 volt az egyik leghatékonyabb a munkacsoportunk által szintetizált és tesztelt MIF inhibitorok közül LPS indukálta gyulladásos makrofág modellben, és védő hatásúnak bizonyult a szeptikus sokk egérmodelljében is (172). Ezért most azt vizsgáltuk meg, hogy milyen hatással van a TE-11 kezelés a TNBS által kiváltott gyulladásra Crohn-betegség modellben egérben?
2. Hogyan befolyásolja a TE-11 a vastagbélben a gyulladásos citokinek termelését?
3. A KRP-6 az egyik leginkább szelektív, ketonáz inhibitor volt az összes tesztelt vegyület közül, így megvizsgáltuk, hogy csökkenti-e a KRP-6 és az igen hatásos, de nem szelektív TE-11 a neutrofilek és eozinofilek migrációját, valamint befolyásolja-e a MIF indukálta apoptózist?
4. Milyen hatással van a KRP-6 és a TE-11 az IFN- $\gamma$  és LPS+IFN- $\gamma$  indukált makrofágok ROS, nitrit és gyulladásos citokin termelésére?
5. Hogyan befolyásolja a KRP-6 és a TE-11 a gyulladásos makrofágok energiatermelését, fontos mitokondriális paramétereit?
6. Hat-e a szelektív ketonáz inhibitor KRP-6 az LPS+IFN- $\gamma$  indukálta makrofágok PARP1,2,3 enzimeinek expressziójára?

Dolgozatom fő célkitűzése, hogy állatkísérletes és sejt kultúrák modellek alkalmazásával hozzájáruljak a MIF tautomeráz gátlás terápiás potenciálját alátámasztó tudományos bizonyítékok bővítéséhez.

### **3. Eredmények**

#### **3.1. TE-11 hatásának vizsgálata TNBS által indukált colitis egérmodellben**

##### **3.1.1. A vastagbél makroszkópos kiértékelése**

A TE-11 hatását vizsgáltuk TNBS alkalmazásával egérmodellben. A TNBS súlyos szövetpusztulás okozott a vastagbélben a kontroll csoporthoz képest, amelyet vérzéses fekélyek és magas makroszkopikus pontszámok jellemeztek. A pontozás során a bélhossz rövidülését, bélsúlyt, bélfal vastagságát, béltartalom állagát és vértartalmát, fekélyes sebek számát és nagyságát, valamint a hasüregi összenövések számát vettük figyelembe. A TE-11 a magasabb 10 mg/kg dózisban elsősorban a fekélyek méretének csökkentésével mérsékelte a szövetkárosodást, ami csökkent gyulladási pontszámot eredményezett a TNBS-csoporthoz képest.

##### **3.1.2. Szöveti gyulladáshoz citokin szintek**

A TNBS gyulladáshoz citokintermelést indukált a vastagbélben. A TNBS az IL-6 termelést fokozta, míg a TE-11 az IL-6 szintet megközelítőleg a felére csökkentette. A kezelés IL-1 $\beta$  termelést is fokozta a szövetben, de a TE-11 hatására az IL-1  $\beta$  szint is szignifikánsan csökkent.

#### **3.2. KRP-6 és TE-11 hatásának vizsgálata polimorfonukleáris leukociták (PMNL) és eozinofilek migrációjára és apoptózisára**

##### **3.2.1. Kemotaxis vizsgálat eredménye**

A MIF-ről kimutatták, hogy a krónikus gyulladás során nagy mennyiségben termelődik, és szabályozni képes a leukocita migrációt azáltal, hogy sejtfelszíni receptorokhoz, például CXCR2-hez, CXCR4-hez és CD74-hez kötődik. A leukocita migrációra gyakorolt hatások vizsgálata során humán perifériás vér neutrofileket és eozinofileket használtunk. A migrációt különböző kemotaktikus vegyületekkel indukáltuk. A neutrofilek migrációját MIF-fel vagy IL-8-cal, az eozinofileket MIF-fel vagy CCL11-gyel serkentettük. Az ISO-1 és a KRP-6 szignifikánsan csökkentette a MIF-indukált neutrofil és eozinofil migrációt. Ezzel szemben egyik sem befolyásolta a neutrofilek IL-8-stimulált kemotaktikus mozgását azonban a KRP-6 gátolta a CCL11 által kiváltott eozinofil kemotaxist, míg az ISO-1 erre nem volt képes. A TE-

11 mind a MIF, mind az IL-8 által indukált neutrofil, valamint a MIF és a CCL11 által stimulált eozinofil migrációt is csökkentette.

### **3.2.2. Sejtéletképesség vizsgálat eredménye**

Mivel korábban kimutatták, hogy a MIF direkt és indirekt mechanizmusokon keresztül gátolja a neutrofil apoptózist, ezért KRP-6 és TE-11 hatását vizsgáltuk neutrofilek és eozinofilek apoptózisára. A MIF csökkentette a korai és a késői apoptózist a neutrofilekben, de nem befolyásolta az eozinofil apoptózis egyik formáját sem az első munkánkban végzett kísérletben. A korai apoptózis 40%-kal, míg a késői apoptózis 47%-kal csökkent. A KRP-6 gátolta ezt az antiapoptotikus hatást, így ellensúlyozva a MIF egyik gyulladáskeltő tulajdonságát a neutrofilekben. Ellenben a második munkánkban, a TE-11 hatásának vizsgálata során a MIF csökkentette a késői apoptózist és a nekrozist a neutrofilekben és az eozinofilekben egyaránt. A TE-11 előkezelés szignifikánsan megnövelte az apoptotikus és nekrotikus neutrofilek és eozinofilek mennyiségét a MIF-kezelt sejtekhez képest. Ebben a második munkában a MIF az eozinofilek késői apoptózisát és nekrozisát feltehetően azért gátolhatta, mert az alkalmazott médium FBS tartalmát korábbi tapasztalatok alapján 1%-ról 3%-ra emeltük.

### **3.3. KRP-6 és TE-11 hatásának vizsgálata gyulladásoos makrofág modellen**

#### **3.3.1. ROS mérés eredménye**

A KRP-6 és TE-11 hatását vizsgáltuk IFN- $\gamma$  vagy IFN- $\gamma$  és LPS stimulálta RAW 264,7 makrofágok ROS termelésére 24 órás kezelést követően. Az DHR123 hozzáadása után rögtön (háttér), majd két óra után mért értékeket kivontuk egymásból, így megkaptuk a ténylegesen termelődött ROS mennyiségét. Az első alkalmazott modellben a kezeletlen csoport ROS termelése az IFN- $\gamma$  kezeltének körülbelül 73%-a volt. A KRP-6 csökkentette a megemelkedett ROS termelést. A másik alkalmazott modell esetében pedig a kezeletlen csoport ROS termelése az IFN- $\gamma$  és LPS kezeltének körülbelül 44%-a volt. Az TE-11 kezelés szintén csökkentette a megemelkedett ROS termelést.

### **3.3.2. Nitrit mérés eredménye**

A makrofágok aktivációjának egy fontos kísérője a nitrogén monoxid szintézise. Az igen reaktív NO átalakul nitritté, ami felhalmozódik a sejtek médiumában, és Griess reagenssel kimutatható. A nitrit mennyiségéből lehet következtetni az NO eredeti mennyiségére. 24 órás IFN- $\gamma$  vagy IFN- $\gamma$ +LPS kezelést követően mértük a nitrit produkciót. Arra voltunk kíváncsiak, hogy van-e különbség az IFN- $\gamma$  és az IFN- $\gamma$ +KRP-6, valamint az IFN- $\gamma$ +LPS és az IFN- $\gamma$ +LPS+TE-11 hatására bekövetkező nitrit produkcióban RAW 264,7 makrofág sejteken. A KRP-6 kezelés a megnövekedett nitrit termelésre nem volt hatással, hiszen a mért körülbelül 18%-os különbség nem bizonyult statisztikailag szignifikánsnak. A TE-11 kezelés a megnövekedett nitrit termelést viszont statisztikailag szignifikánsan csökkentette.

### **3.3.3. HIF-1 $\alpha$ mérés eredményei**

Az LPS+IFN- $\gamma$  kezelés HIF-1 $\alpha$  mRNS transzkripciót és fehérjeexpressziót indukált RAW264.7 sejtekben. Az LPS+IFN- $\gamma$  a HIF-1 $\alpha$  mRNS transzkripciót növelte, amit a TE-11 kezelés szignifikánsan csökkentett. Az LPS+IFN- $\gamma$  hatására HIF-1 $\alpha$  fehérje termelés emelkedett, amit a TE-11 kezelés lecsökkentett.

### **3.3.4. A TE-11 gyulladásoos mRNS expresszióra gyakorolt hatása**

Az LPS+IFN- $\gamma$  kezelés számos gyulladásoos gén mRNS expresszióját indukálta makrofágokban. A CCL2, IL-6, TNF- $\alpha$ , iNOS és SOD2 szint emelkedett a DMSO kezelt (VEH) csoporthoz képest. Ezzel szemben a TE-11 csökkentette a CCL2 és az IL-6 mRNS szintet, azonban nem tudta megváltoztatni a TNF- $\alpha$  és az iNOS-gén-transzkripciót. Ezenkívül a TE-11 tovább növelte a SOD2 mRNS szintet az LPS+IFN- $\gamma$ -aktivált sejtekhez képest. Modellünkben nem észleltünk változást az Nrf1 mRNS expressziójában.

### **3.3.5. Gyulladásoos citokinszint mérés eredménye**

A gyulladásoos folyamatok egyik fontos tényezője a makrofágok citokin termelése, ezért megmértük a CCL2, IL-6, TNF- $\alpha$  citokin szinteket. Az ELISA citokin méréssel arra szeretnénk volna választ adni, hogy a gyulladásoos citokinek mennyiségében van-e különbség az IFN- $\gamma$  és az LPS+IFN- $\gamma$  által aktivált modellekben a KRP-6 vagy a TE-11 kezelés hatására. Az IFN- $\gamma$  a TNF- $\alpha$  termelést a kontroll szinthez képest növelte, míg a KRP-6 kezelés a TNF- $\alpha$  szintet nem tudta statisztikailag szignifikáns módon csökkenteni. Az LPS+IFN- $\gamma$  a TNF- $\alpha$  termelést, a

CCL-2 termelést és az IL-6 termelést növelte a kontroll sejtekhez képest. A TE-11 kezelés hatékonyan csökkentette a CCL-2 és az IL-6 szintet, azonban a TNF- $\alpha$  szintjében itt sem tapasztaltunk változást.

### **3.3.6. Az extracelluláris savasodási ráta mérés eredményei**

Az M1 makrofágok az oxidatív foszforilációból az aerob glikolízis irányába tolják át a metabolizmusukat. Ennek megfelelően meghatároztuk az extracelluláris savasodási rátát (extracellular acidification rate [ECAR]) az LPS+IFN- $\gamma$ -val kezelt RAW264.7 sejtekben. Mivel ez lényegében a laktát termelésből ered, ami a sejtek fermentatív ATP-termelésének (azaz aerob glikolízis) aktivitására utal. Az IFN- $\gamma$ +LPS-sel kezelt sejtek esetében az alap savasodási ráta megemelkedett, ami arra enged következtetni, hogy az anyagcsere eltolódott a glikolízis felé, azonban a KRP-6 és TE-11 hatására az ECAR szignifikánsan csökkent. Ezenkívül az oligomycin kezelés fokozta az ECAR-t a VEH-kezelt sejtekben, ami azt bizonyítja, hogy a makrofág sejteink ATP termelésében fontos szerepet játszik az OXPHOS, hiszen az FOF1-ATP szintáz oligomycin általi gátlásával az ATP termelés csökken, amit a sejt emelkedett glikolitikus rátával kompenzálhat. Az FCCP, a rotenon és az antimycin A nem módosította tovább az ECAR-t egyik kezelési csoportban sem.

### **3.3.7. Mitokondriális funkció vizsgálat eredménye**

Oligomycin hozzáadására, amely tehát az F<sub>o</sub>F<sub>1</sub>-ATP szintáz F<sub>o</sub> alegységét gátolja, az oxigénfogyasztás leesik. FCCP hatására, ami egy mitokondriális szétkapcsolószer, amely a mitokondriális protongradiens megszüntetésén keresztül egymástól függetlenné teszi a légzési lánc elektrontranszport és az ATP szintézis folyamatát, kiegyenlítődik a proton gradiens. Ezáltal az elektrontranszportlánc felpörög és megnő az oxigénfogyasztás a CIV-en. Az antimycin A és a rotenon az elektrontranszportlánc CI és CIII komplexeinek gátlásával megszünteti a mitokondriális oxigénfogyasztást. A nem-mitokondriális oxigénfogyasztást levonva az alap oxigénfogyasztásból megkapjuk az alap légzést, amely az ATP termelésre és a protonszivárgásra bontható fel. A maximális légzési kapacitás az FCCP beadása utáni érték. A tartalék légzési kapacitást a maximális és a bazális légzés közötti különbség adja. Az alaplégzést az oligomycin beadása előtti adatokból számoltuk.

A mérés első felében meghatározásra került a sejtek alaplégzése. Az LPS+IFN- $\gamma$  kezelés körülbelül 80%-kal csökkentette a bazális respirációt, a KRP-6 hatására ez a csökkenés 62%

volt, a TE-11 kezelés esetében viszont 29%. A VEH és a TE-11 kezelés között nem volt szignifikáns különbség. Az oligomycin hozzáadása után kiszámolható a sejtek ATP termelése. Az ATP termelés LPS+IFN- $\gamma$  hatására 95%-kal csökkent a kontroll sejtekhez képest, a KRP-6 esetében ez a csökkenés 67%-os a TE-11 kezelésnél pedig 24% volt. LPS+IFN- $\gamma$  hatására a mitokondriumok kapcsoltsági hatékonysága 75%-kal romlott, amit a KRP-6 és a TE-11 kontroll szintre emelt. FCCP hatására a protongrádiens megszűnt, a mitokondriális oxigénfogyasztás megnőtt, ezáltal meg tudtuk határozni a sejtek maximális légzését. LPS+IFN- $\gamma$  hatására a maximális légzés 93%-kal csökkent a kontrollhoz képest. KRP-6 jelenlétében ez a csökkenés kisebb mértékű 72%-os, a TE-11 hatására mindössze 48%. A tartalék légzési kapacitást úgy lehet kiszámolni, hogy a maximális légzésből kivonjuk az alaplégzést. A tartalék légzési kapacitás LPS+IFN- $\gamma$  kezelés hatására 99%-ot csökkent, a KRP-6 kezelés nem befolyásolta, mert a mért, körülbelül 78%-os különbség nem volt statisztikailag szignifikáns. A TE-11 hatására a csökkenés 67%-os volt. A protonszivárgás mértékét úgy számoljuk ki, hogy az oligomycin gátlás után mért oxigénfogyasztásból levonjuk a rotenon és antimycin A hozzáadását követően mérhető nem-mitokondriális oxigénfogyasztást. Vizsgálatunkban az LPS+IFN- $\gamma$  hatására a protonszivárgás körülbelül 54%-os volt, amit a KRP-6 és TE-11 nem tudott befolyásolni.

### **3.3.8. A KRP-6 PARP enzimekre gyakorolt hatása**

Korábbi eredmények arra utalnak, hogy az aktivált makrofágok csökkentik a PARP-1 mRNS expresszióját. Ennek megfelelően elemeztük a PARP-1,-2 és -3 mRNS expresszióját LPS+IFN- $\gamma$ -val kezelt RAW264.7 sejtekben. Kísérleteink azt mutatták, hogy míg a PARP-1 és PARP-2 mRNS expressziója csökkent LPS+IFN- $\gamma$ -indukált makrofágokban, a PARP-3 mRNS szintézise változatlan maradt. Ezzel szemben a KRP-6 kezelés szignifikánsan fokozta a PARP-1 és PARP-2 expresszióját.

#### 4. Összefoglalás

Munkám során a MIF-gátlók egy új családjába tartozó két vegyület, a KRP-6 és a TE-11 hatásait vizsgáltam. A TE-11-et TNBS-indukálta kísérletes vastagbélgyulladás modellben, és a KRP-6-hoz hasonlóan klasszikus M1 típusú makrofág polarizáció, valamint leukocita- és eozinofil migráció vonatkozásában, *in vitro* körülmények között vizsgáltam.

A kutatás első részében a KRP-6 hatásait tanulmányoztam IFN- $\gamma$ -val stimulált makrofágokon. Eredményeink alapján a KRP-6 gátolta a ROS termelést, csökkentette a glikolitikus aktivitást, ugyanakkor fokozta a mitokondriális energiatermelést. Emellett a KRP-6 fokozta a PARP-1 és PARP-2 gének transzkripcióját, ami a MIF lehetséges szerepét jelzi a két PARP izoforma szabályozásában. Annak pontos meghatározása, hogy ezek a hatások MIF-receptor-mediált vagy tautomeráz-aktivitáshoz köthetőek-e, túlmutat a jelen dolgozat keretein. Mindazonáltal eredményeink arra utalnak, hogy a KRP-6 – egy rendkívül szelektív ketonáz-inhibitor – jelentősen csökkenti a makrofágok aktivációját és a leukocita migrációt, ezáltal ígéretes farmakológiai célpontként szolgálhat különböző krónikus gyulladásos és autoimmun betegségek terápiájában. Mivel a KRP-6 gyulladáscsökkentő hatásait eddig kizárólag sejt kultúrák modellekben vizsgáltuk, egy esetleges jövőbeni klinikai kipróbáláshoz további *in vivo* vizsgálatok szükségesek. Ugyanakkor a receptor aktiváció és a tautomeráz aktivitás különálló biológiai hatásainak feltérképezése, valamint a kizárólag ketonáz- vagy enoláz-függő folyamatok azonosítása, ha vannak ilyenek, nagy jelentőséggel bírhatnak. Tekintettel arra, hogy a prolin-1 mutáns MIF-ek teljes mértékben elvesztik tautomeráz aktivitásukat, ezek a genetikai modellek nem alkalmasak a két enzimfunkció elkülönített vizsgálatára. Erre a célra a szelektív inhibitorok, így a KRP-6 is, hatékony eszközt jelenthetnek, és hozzájárulhatnak a MIF biológiai szerepének mélyebb megértéséhez.

A kutatás második részében a TE-11, egy új MIF tautomeráz inhibitor hatásait vizsgáltam. A TE-11 csökkentette a gyulladásos makrofágok aktivációját, valamint gátolta a metabolikus eltolódást az oxidatív foszforiláció irányából az aerob glikolízis felé. Ezen túlmenően a TE-11 hatékonyan gátolta a leukocita- és eozinofil migrációt, és enyhítette a kísérletes Crohn-megbetegedéshez hasonló vastagbélgyulladás tüneteit egérben. A kezelés következtében mérséklődött a makroszkópos elváltozások súlyossága, valamint csökkent a szöveti IL-6 és IL-1 $\beta$  citokinek szintje. Összességében eredményeink arra utalnak, hogy a MIF tautomeráz aktivitása – valószínűleg a MIF/HIF-1 $\alpha$  tengelyen keresztül – szabályozza a

glikolízis folyamatait, így gátlása csökkenti az M1 makrofág aktivációval kapcsolt metabolikus átprogramozást.

Mivel a leukocita migráció, valamint az M1 makrofág polarizációhoz kapcsolódó metabolikus átprogramozás jelentős szerepet játszik a gyulladásos bélbetegségek patomechanizmusában, a MIF ígéretes terápiás célpont lehet ezek befolyásolására. Így eredményeink alapján a TE-11 potenciális gyógyszerjelölt lehet az IBD jövőbeni kezelésében.

## 8. Publikációk listája

### Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

Vámos E., Kálmán N, Sturm EM, et al. Highly Selective MIF Ketonase Inhibitor KRP-6 Diminishes M1 Macrophage Polarization and Metabolic Reprogramming. *Antioxidants (Basel)*. 2023;12(10):1790. Published 2023 Sep 22. **IF:6.000**

Vámos, E., Vántus, V. B., Deák, P., Kálmán, N., Sturm, E. M., Nayak, B. B., Makszin, L., Loránd, T., Gallyas, F. J., & Radnai, B. (2025). MIF tautomerase inhibitor TE-11 prevents inflammatory macrophage activation and glycolytic reprogramming while reducing leukocyte migration and improving Crohn's disease-like colitis in male mice. *Frontiers in immunology*, 16, 1558079. **IF:5.900**

### További közlemények

Bruszt, K., Horvath, O., Ordog, K., Toth, S., Juhasz, K., Vamos, E., Fekete, K., Gallyas, F., Toth, K., Halmosi, R., & Deres, L. (2024) Cardiac effects of OPA1 protein promotion in a transgenic animal model. *PloS one*, 19(11), e0310394. **IF:2.600**

Garai, J., Radnai, B., Vámos, E., Kovács, D., Vántus, V. B., Rumbus, Z., Pákai, E., Garami, A., Gulyás-Fekete, G., Agócs, A., Krekó, M., Zaman, K., Prókai, L., Órfi, L., Jakus, P. B., & Lóránd, T. (2023) Synthesis and evaluation of a new class of MIF-inhibitors in activated macrophage cells and in experimental septic shock in mice. *European journal of medicinal chemistry*, 247, 115050. **IF:6.000**

Kokhanyuk, B., Vántus, V. B., Radnai, B., Vámos, E., Kajner, G., Galbács, G., Telek, E., Mészáros, M., Deli, M. A., Németh, P., & Engelmann, P. (2022) Distinct Uptake Routes Participate in Silver Nanoparticle Engulfment by Earthworm and Human Immune Cells. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)*, 12(16), 2818. **IF: 5.300**

Garai, J., Krekó, M., Órfi, L., Jakus, P. B., Rumbus, Z., Kéring, P., Garami, A., Vámos, E., Kovács, D., Bagóné Vántus, V., Radnai, B., & Lóránd, T. (2021) Tetralone derivatives are MIF tautomerase inhibitors and attenuate macrophage activation and amplify the hypothermic response in endotoxemic mice. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 36(1), 1357–1369. **IF: 5.756**

Andreidesz, K., Szabo, A., Kovacs, D., Koszegi, B., Bagone Vantus, V., Vamos, E., Isbera, M., Kalai, T., Bognar, Z., Kovacs, K., & Gallyas, F., Jr (2021) Cytostatic Effect of a Novel Mitochondria-Targeted Pyrroline Nitroxide in Human Breast Cancer Lines. *International journal of molecular sciences*, 22(16), 9016. **IF: 6.208**

Kovács, D., Vántus, V. B., Vámos, E., Kálmán, N., Schicho, R., Gallyas, F., & Radnai, B. (2021) Olaparib: A Clinically Applied PARP Inhibitor Protects from Experimental Crohn's Disease and Maintains Barrier Integrity by Improving Bioenergetics through Rescuing Glycolysis in Colonic Epithelial Cells. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2021, 7308897. **IF: 7,310**

**Összesített Impakt Faktor: 45.074**

#### **Az értekezéssel kapcsolatos elsőszerzős konferencia posztterek**

Eszter Vámos, Viola Bagóné Vántus, Dominika Kovács, Péter Deák, Ferenc Gallyas Jr., Balázs Radnai “*Effect of MIF tautomerase inhibitors on macrophage activation and mitochondrial function*”, Hungarian Molecular Life Sciences 2023 Conference, Eger, Hungary, 24-26 March 2023

Eszter Vámos, Viola Bagóné Vántus, Dominika Kovács, Péter Deák, Ferenc Gallyas Jr., Balázs Radnai “*Effect of KRP-6, a novel MIF tautomerase inhibitor on macrophage activation and mitochondrial function*”, Annual Meeting of the Hungarian Biochemical Society 2022 Conference, Pécs, Hungary, 25-27 August 2022

Vámos Eszter, Bagóné Vántus Viola, Kovács Dominika, Deák Péter, Kőszegi Balázs, Kálmán Nikoletta, Vass Ibolya, Ifj. Gallyas Ferenc, Radnai Balázs “*A MIF TAUTOMERÁZ INHIBITOR KRP-6 GÁTOLJA A GYULLADÁSOS MAKROFÁG AKTIVÁCIÓT ÉS VÉDI A MITOKONDRIÁLIS ENERGIATERMELÉST*” “51. Membrán-Transzport Konferencia Sümeg, Magyarország 2022. május 17-20

#### **Egyéb elsőszerzős konferencia posztterek**

Eszter Vámos, Viola Bagóné Vántus, Ferenc Gallyas Jr., Balázs Radnai “*The effect of trimethylamine, a metabolite of gut microbiota on the metabolic reprogramming of MI*

*macrophages*”, Annual Meeting of the Hungarian Biochemical Society 2024 Conference, Budapest, Hungary, 29-31 August 2024

Vámos Eszter, Bagóné Vántus Viola, Ifj. Gallyas Ferenc, Radnai Balázs “*EGY BÉL MIKROBIOTA METABOLIT: A TRIMETIL-AMIN HATÁSA MAKROFÁGOK METABOLIKUS ÁTPROGRAMOZÁSÁRA*” “53. Membrán-Transzport Konferencia Sümeg, Magyarország 2024. május 14-17

### **Társzerzős konferencia posztterek**

Bagóné Vántus Viola, Kovács Dominika, Vámos Eszter, Deák Péter, Ifj. Gallyas Ferenc, Radnai Balázs “*A PARP INHIBITOR TALAZOPARIB CSÖKKENTI A KÍSÉRLETES CROHN BETEGSÉG TÜNETEIT EGÉR BEN EPITHELIÁLIS BARRIER VÉDELME N KERESZTÜL*” “52. Membrán-Transzport Konferencia Sümeg, Magyarország 2023. május 16-19

János Garai, Balázs Radnai, Eszter Vámos, Dominika Kovács, Viola Bagóné Vántus, Zoltan Rumbus, Eszter Pakai, András Garami, Khadiza Zaman, László Prókai, Gergely Gulyás-Fekete, Attila Agócs, Marcell Krekó, László Örfi, Péter B. Jakus, Tamás Lóránd “*Synthesis and evaluation of new class of MIF-inhibitors inactivated macrophage cells, and in experimental septic shock in mice*”, Annual Meeting of the Hungarian Biochemical Society 2022 Conference, Pécs, Hungary, 25-27 August 2022

Viola Bagóné Vántus, Dominika Kovács, Eszter Vámos, Péter Deák, Ibolya Vass, Ferenc Gallyas Jr., Balázs Radnai “*Investigation the effects of the PARP inhibitor Talazoparib in a TNBS-induced Inflammatory Bowel Disease Mice Model*”, Annual Meeting of the Hungarian Biochemical Society 2022 Conference, Pécs, Hungary, 25-27 August 2022

Bagóné Vántus Viola, Kovács Dominika, Vámos Eszter, Deák Péter, Vass Ibolya, Ifj. Gallyas Ferenc, Radnai Balázs “*A PARP INHIBITOR TALAZOPARIB VÉDŐ HATÁSÚ KÍSÉRLETES COLITIS BEN ÉS OXIDATÍV STRESSZ ÁLTAL KÁROSÍTOT T EPITHÉL BARRIER EN*” “51. Membrán-Transzport Konferencia Sümeg, Magyarország 2022. május 17-20

Kokhanyuk B., Bodó K., Radnai B., Bagóné Vántus V., Vámos E., Telek E., Mészáros M., Németh P., Engelmann P. Uptake routes of silver nanoparticles are different between invertebrate and vertebrate immunocytes. 2021. A Magyar Immunológiai Társaság 50. Vándorgyűlése

Kovács, D., Vámos, E., Sümegi, B., Gallyas, F., Radnai, B. The Effect of PARP Inhibitor Olaparib on Oxidative Stress-induced Epithelial Barrier Disruption and Mitochondrial Dysfunction. Medical Conference for PhD Students and Experts of Clinical Science, Pécs, 2018.

Kovács, D., Vámos, E., Sümegi, B., Gallyas, F., Radnai, B. PARP Inhibitor Olaparib Protects Against Oxidative Stress-Induced Epithelial Barrier Dysfunction and Inhibits Proinflammatory Macrophage Activation. 7th Interdisciplinary Doctoral Conference, Pécs, 2018.

Kovács, D., Vámos, E., Sümegi, B., Gallyas, F., Radnai, B. Az olaparib (PARP inhibítor) véd az oxidatív stressz indukálta epithel barrier diszfunkció ellen és gátolja a gyulladássos makrofág aktivációt. 48. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2018.

Dominika Kovács; Eszter Vámos; Máté Götzer, Péter Balogh, Balázs Radnai, A mitokondriális ciklofilin D szerepe kísérletes ulceratív kólitiszben In: Bódog, Ferenc; Csiszár, Beáta; Hegyi, Dávid; Pónusz, Róbert (szerk.) DKK17-Doktoranduszok a Klinikai Kutatásokban absztraktkötet Pécs, Magyarország: Pécsi Tudományegyetem Doktorandusz Önkormányzat (2017) 89 p. p. 71, 1 p.

## 9. Köszönetnyilvánítás

Ezúton köszönöm Gallyas Ferenc Professzor úrnak, a PTE ÁOK Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet igazgatójának, hogy lehetővé tette számomra a doktori képzésben való részvételt és biztosította a kutatáshoz szükséges feltételeket. Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Radnai Baláznak a sok segítségért, a szakmai irányításért, a jó tanácsokért, a fáradtságot nem kímélő munkáért. Hálás köszönettel tartozom Deák Péternek a szakmai meglátásaiért és barátságáért. Köszönöm Bagóné Dr. Vántus Violának és Dr. Kovács Dominikának az állatkísérletekben való segítséget és aktív részvételt. Köszönöm Dr. Kálmán Nikolettának a génexpressziós vizsgálatok során végzett munkáját, valamint köszönetet szeretnék mondani minden munkatársamnak, aki bármilyen módon segítette a munkámat.

Itt is szeretném megköszönni a családomnak a támogatásukat, segítségüket. Valamint a férjemnek köszönök mindent, a motiválást, és azt, hogy bármiben számíthatok rá.