

STRESZCZENIE

Oddziaływanie PARP1 z chromatyną jako mechanizm regulujący nabywanie tolerancji na bakteryjną endotoksynę przez ludzkie monocyty i makrofagi

Zaburzenia immunologiczne wywołane nieprawidłową odpowiedzią monocytów i makrofagów, przyczyniają się do stanu zwanego sepsą (posocznica). Jest to proces, w którym przy nadmiernej stymulacji endotoksyną dochodzi do zahamowania odpowiedzi prozapalnej. Zjawisko to w nomenklaturze naukowej opisywane jest jako „tolerancja immunologiczna”. Obecne na powierzchni komórek receptory TLR4 (Toll-like receptor 4) wiążą się z endotoksyną, aktywując wewnątrzkomórkowe szlaki kontrolujące ekspresję cytokin i czynników prozapalnych m.in. czynnik martwicy nowotworów α (TNF α) czy interleukin: IL-1 β , IL-6, IL-8. Jeden z aktywowanych szlaków zależny jest od czynnika transkrypcyjnego NF κ B, który uruchamia ekspresję genów w odpowiedzi na stymulację bakteryjnym lipopolisacharydem. Szlak ten wymaga dodatkowych kofaktorów takich jak PARP1 (polimeraza poli-(ADP-rybozy)-1) czy acetylotransferaza p300.

Tylko w 2017 roku zdiagnozowano prawie 50 milionów przypadków pacjentów z sepsą, z czego 1/5 stanowiła przypadki śmiertelne. Obecnie istnieje wiele metod leczenia, jednak ich niska skuteczność związana jest m. in. z rozwojem antybiotykoodporności w niektórych szczepach bakteryjnych. Z tego względu poszukuje się alternatywnych metod leczenia pacjentów z sepsą, aby obniżyć negatywne skutki obecnych terapii. Wiadomo, że białko PARP1 związane jest z różnymi zaburzeniami zapalnymi, w tym wstrząsem septycznym, cukrzycą czy zaburzeniami neurodegeneracyjnymi takimi jak choroby Alzheimera i Parkinsona. Obecnie do hamowania aktywności tego enzymu wykorzystuje się różnego typu inhibitory, a część z nich posiada dodatkową właściwość wiązania PARP1 z nicią DNA. Należy do nich m.in. Olaparib (Lynparza[®], AZD-2281).

Celem niniejszej pracy była próba innowacyjnego wykorzystania „pułapkowania” PARP1 na chromatynie za pośrednictwem dobrze poznanego inhibitora Olaparib, w komórkach z tolerancją na bakteryjny lipopolisacharyd. Założeniem pracy było zahamowanie powstawania tolerancji immunologicznej i utrzymanie prozapalnej odpowiedzi zależnej od ścieżki sygnałowej czynnika transkrypcyjnego NF κ B w komórkach potraktowanych bakteryjną endotoksyną.

Pierwszy etap badań obejmował analizę ekspresji PARP1 na poziomie mRNA i białka w monocytach i makrofagach, oraz określenie zależności pomiędzy ekspresją PARP1 i statusem proliferacji komórek. Badania wykazały, że w trakcie różnicowania monocytów w makrofagi dochodzi do znacznego wzrostu mRNA i białka PARP1. Zatrzymanie makrofagów w fazie G0 przy użyciu inhibitorów CDK4/6 powoduje spadek ekspresji PARP1 na poziomie mRNA i białka, co wskazuje na kontrolę ekspresji tego białka zależną od cyklu komórkowego. Następnie sprawdzono rolę białek epigenetycznych EP300, HDAC1 oraz kompleksu SWI/SNF w regulowaniu ekspresji PARP1. Acetylotransferaza EP300 jak również kompleks SWI/SNF okazały się mieć dominujący wpływ nad białkiem HDAC1 na aktywność transkrypcyjną w zróżnicowanych, proliferujących fagocytach. Rola tych białek została również potwierdzona w silnie proliferujących liniach komórkowych MDA-MB-231 oraz MCF7. Wstępne wyniki pozwoliły na sformułowanie wniosku, że podczas indukowanego przez GM-CSF różnicowania monocytów do makrofagów dochodzi do wzrostu transkrypcji PARP1 kontrolowanej przez białka epigenetyczne i jednoczesnej aktywacji proliferacji, związanej z funkcją jaką pełnią makrofagi w organizmie.

Po optymalizacji dawek lipopolisacharydu, wywołujących paraliż immunologiczny, sprawdzono potencjał Olaparibu do hamowania rozwoju tolerancji w makrofagach. Jako wskaźnik wybrano pomiar ekspresji $TNF\alpha$ umożliwiający sprawdzenie odpowiedzi prozapalnej w stymulowanych komórkach. Określono również potencjał innych, komercyjnie dostępnych inhibitorów- Niraparibu (MK-4827), o podobnym potencjale do Olaparibu, oraz Veliparibu (ABT-174 888), który działa wyłącznie jako inhibitor PARylacji. Wykazano, że to właśnie interakcje białka PARP1 z chromatyną, nie proces ADP-rybozylacji, wpływa na paraliż makrofagów. Podobny schemat działania, został wykorzystany w drugiej, wybranej proliferującej linii o wysokim poziomie PARP1- THP1. Tutaj również potraktowanie komórek Olaparibem chroniło $TNF\alpha$ przed represją wywołaną przez LPS i utrzymywało wysoki poziom ekspresji tej cytokiny.

Niski poziom ekspresji PARP1 w monocytach i w różnicowanej linii THP1 w wyniku zatrzymania cyklu komórkowym, podyktował wybór tych modeli komórkowych jako kontroli oceniającej swoistość działania inhibitora PARP1. W liniach tych, nie zaobserwowano efektu działania Olaparibu w odpowiedzi na stymulację endotoksyną. Wiedząc, że PARP1 tworzy kompleks z acetylotransferazą EP300 i kontroluje ekspresję genów w monocytach i makrofagach, sprawdzono zmiany epigenetyczne mogące przyczynić się do rozwoju tolerancji w zróżnicowanej linii THP1. Analiza ChIP-qPCR potwierdziła

obecność PARP1 w promotorze *TNF α* w komórkach nieindukowanych oraz jego usunięcie po stymulacji LPS. Olaparib utrzymywał PARP1 w obrębie promotora badanej cytokiny, i zapobiegał rozwojowi immunotolerancji. Bardziej szczegółowa analiza w zastosowanej techniki ChIP-qPCR wskazała również na możliwą rolę podjednostek p50 i p65 w regulacji transkrypcji w odpowiedzi na LPS. Wyniki badań wykazały, że usunięcie PARP1 z promotora *TNF α* związane jest z przebudową chromatyny, zapobiegając związaniu p65 i sprzyjając wiązaniu podjednostki p50, przyczyniając się do powstania tolerancji.

W końcowym etapie badań sprawdzono epigenetyczne zmiany w promotorze *TNF α* w zróżnicowanych THP1 w odpowiedzi na stymulowanie endotoksyną. Wyniki wykazały wzrost acetylacji lizyny histonu 3 w pozycji 27 (acH3K27) jak również usunięcie białka EP300 z promotora w trakcie różnicowania. Ponadto, stymulacja endotoksyną w zróżnicowanych THP1 zwiększała badaną acetylację, zaś inhibicja białka EP300 sprzyja wiązaniu PARP1 w promotorze *TNF α* . Jednoczesne wiązanie PARP1 z chromatyną i ograniczenie aktywności białka EP300 potwierdziła stawianą hipotezę dotyczącą zahamowania immunotolerancji w odpowiedzi na LPS, co zostało potwierdzone na poziomie mRNA i białka badanej cytokiny.

Podsumowując, przeprowadzone badania wskazują na możliwość nowego zastosowania komercyjnie dostępnego inhibitora PARP1 - Olaparibu w hamowaniu rozwoju tolerancji na bakteryjną endotoksynę. Wzrost ekspresji PARP1 podczas różnicowania makrofagów związany jest z rolą jaką pełnią te komórki w organizmie, zaś nadmierna obecność lipopolisacharydu w środowisku komórek odpowiada za zmiany w szlaku zależnym od NF- κ B. Utrzymanie PARP1 w sekwencji promotorowej cytokin prozapalnych przyczynia się do blokowania immunotolerancji i stałej ekspresji czynnika prozapalnego TNF α .

Julita Pietrak

SUMMARY

PARP1-chromatin interaction as mechanism regulating the acquisition of tolerance to bacterial endotoxin by human monocytes and macrophage

Immune disorders, caused by an abnormal response of monocytes and macrophages, contribute to a condition known as sepsis. It is a process by which the pro-inflammatory response is inhibited after endotoxin overstimulation. This phenomenon is described in the scientific nomenclature as "immune tolerance". TLR4 receptors (Toll-like receptor 4) present on the cell surface bind with endotoxin, activating intracellular pathways controlling the expression of cytokines and pro-inflammatory factors, including tumor necrosis factor α (TNF α) or interleukins: IL-1 β , IL-6, IL-8. One of the activated pathways depends on the transcription factor NF κ B, which triggers gene expression in response to stimulation with bacterial lipopolysaccharide. This pathway requires additional cofactors such as PARP1 (poly (ADP-ribose) -1 polymerase) or p300 acetyltransferase.

In 2017, nearly 50 million cases of sepsis were diagnosed, 1/5 of which were fatal. Currently, there are many treatments available, but their decreased success is related to the development of antibiotic resistance in some bacterial strains. Therefore, alternative treatments for sepsis patients are being sought to reduce the negative effects of current therapies. PARP1 is known to be associated with a variety of inflammatory disorders, including septic shock, diabetes, and neurodegenerative disorders such as Alzheimer's and Parkinson's diseases. Currently, various types of inhibitors are used to inhibit the activity of this enzyme, and some of them have the additional property of binding PARP1 to a DNA strand. They include, among others Olaparib (Lynparza®, AZD-2281).

The aim of this study was an attempt at an innovative use of PARP1 "trapping" on chromatin via the well-known Olaparib inhibitor in cells tolerant to bacterial lipopolysaccharide. The aim of the study was to inhibit the development of immune tolerance and maintain a pro-inflammatory response dependent on the signal path of the NF κ B transcription factor in cells treated with bacterial endotoxin.

The first stage of the research involved the analysis of PARP1 expression at the mRNA and protein levels in monocytes and macrophages, and the determination of the relationship between PARP1 expression and cell proliferation status. Studies have shown that

during the differentiation of monocytes into macrophages, there is a significant increase in mRNA and PARP1 protein. G0 arrest of macrophages using CDK4/6 inhibitors causes a decrease in PARP1 expression at the mRNA and protein levels, indicating a cell cycle dependent control of PARP1 expression. Then, the role of epigenetic proteins EP300, HDAC1 and the SWI/SNF complex in regulating PARP1 expression was tested. EP300 acetyltransferase as well as the SWI/ SNF complex turned out to have a dominant effect over the HDAC1 protein on transcriptional activity in differentiated, proliferating phagocytes. The role of these proteins has also been confirmed in the highly proliferating cell lines MDA-MB-231 and MCF7. Preliminary results led to the conclusion that during GM-CSF-induced differentiation of monocytes to macrophages, there is an increase in PARP1 transcription controlled by epigenetic proteins and the simultaneous activation of proliferation related to the function of macrophages in the body.

After optimizing the doses of lipopolysaccharide inducing immune paralysis, the potential of Olaparib in inhibition of tolerance development in macrophages was tested. TNF α expression was chosen as a determinant, making it possible to test the pro-inflammatory response in stimulated cells. The potential of other commercially available inhibitors was also tested - Niraparib (MK-4827), with similar potential to Olaparib, and Veliparib (ABT-174888), which acts solely as a PARylation inhibitor. It has been shown that it is the interaction of the PARP1 protein with chromatin, and not the ADP-ribosylation process, affects the paralysis of macrophages. A similar scheme of operation was used in the second selected proliferating cell line THP1 with high level of PARP1 expression. Again, it was shown that treatment of cells with Olaparib protected TNF α from LPS-induced repression and maintained high expression level of this cytokine.

Low levels of PARP1 expression in monocytes and in the differentiated THP1 lineage as a result of cell cycle arrest dictated the choice of these cell models as a control to evaluate the specificity of the PARP1 inhibitor. In these lines, no effect of Olaparib in response to endotoxin stimulation was observed. Knowing that PARP1 complexes with EP300 acetyltransferase and controls gene expression in monocytes and macrophages, epigenetic changes that could contribute to the development of tolerance in the diversified THP1 lineage were investigated. ChIP-qPCR analysis confirmed the presence of PARP1 in the *TNF α* promoter in non-induced cells and its removal after LPS stimulation. Olaparib maintained PARP1 within the promoter of the cytokine under investigation, and prevented the development of immunotolerance. A more detailed analysis of the ChIP-qPCR technique used

also indicated a possible role of the p50 and p65 subunits in the regulation of transcription in response to LPS. The results showed that removal of PARP1 from the *TNF α* promoter is associated with chromatin remodeling, preventing p65 binding and promoting p50 binding, contributing to tolerance.

The final stage of the study examined epigenetic changes in the *TNF α* promoter in differentiated THP1 in response to endotoxin stimulation. The results showed an increase in acetylation in lysine of histone 3 at position 27 (acH3K27) as well as removal of EP300 protein from the promoter during differentiation. In addition, endotoxin stimulation in differentiated THP1 increased the acetylation, and inhibition of EP300 protein promotes PARP1 binding in the *TNF α* promoter. The simultaneous binding of PARP1 with chromatin and reduction of EP300 protein activity confirmed the hypothesis concerning inhibition of immunotolerance in response to LPS, which was confirmed at the mRNA and protein level .

In conclusion, the conducted studies show new applications of the commercially available PARP1-Olaparib inhibitor in inhibition of tolerance development to bacterial endotoxin. The increase in PARP1 expression during macrophage differentiation is related to the role they play in the body, and the excessive presence of lipopolysaccharide in the cell's environment is responsible for changes in the NF- κ B-dependent pathway. The maintenance of PARP1 in the pro-inflammatory cytokine promoter sequence contributes to the blocking of immunotolerance and the constant expression of the pro-inflammatory factor TNF α .

Julita Pietrak