

Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

**A poli(ADP-ribóz) polimeráz-2 (PARP-2) enzim
szerepe a mitokondriális metabolizmusban és a
doxorubicin által okozott érrendszeri károsodásban**

Szántó Magdolna

Témavezető: Dr. Bay Péter



DEBRECENI EGYETEM
Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

Debrecen, 2012.

A poli(ADP-ribóz) polimeráz-2 (PARP-2) enzim szerepe a mitokondriális metabolizmusban és a doxorubicin által okozott érrendszeri károsodásban

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében
az Elméleti Orvostudományok tudományágban

Írta: Szántó Magdolna okleveles gyógyszerész

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Orvostudomány doktori
iskolája
(Jelátviteli folyamatok sejt- és molekuláris biológiája programja)
keretében

Témavezető: Dr. Bay Péter, Ph.D.

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Csernoch László, az MTA doktora
tagok: Dr. Pórszász Róbert, Ph.D.
Dr. Geiszt Miklós, Ph.D.

A doktori szigorlat időpontja: 2012. június 1., 11:00

Az értekezés bírálói:

Dr. Bíró Tamás, az MTA doktora
Dr. Nicola Curtin, Ph.D.

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Csernoch László, az MTA doktora
tagok: Dr. Pórszász Róbert, Ph.D.
Dr. Geiszt Miklós, Ph.D.
Dr. Bíró Tamás, az MTA doktora
Dr. Nicola Curtin, Ph.D.

Az értekezés védésének időpontja: 2012. június 1. 13:00

BEVEZETÉS

A PARP-ok szupercsaládja

A poli(ADP-ribóz) polimeráz (PARP) enzimek különböző fehérjék poli(ADP-ribóz)ilációját (PARiláció) katalizálják. Az enzimek a polimerek felépítéséhez NAD^+ molekulákat használnak. A PARP-ok szupercsaládjának emberben 17 tagja ismert, mindegyiket különböző gének kódolják. A PARP enzimek katalitikus doménje az evolúció során jelentős konzerváltságot mutat. A fehérjék PARilációját elsősorban DNS-törések aktiválják. A legfontosabb enzim ebben a folyamatban a PARP-1. A PARiláció során felépülő PAR polimerek élettideje igen rövid, ugyanis a poli(ADP-ribóz) glikohidroláz (PARG) enzim gyorsan lebontja azokat.

Eddigi ismereteink alapján a PARP-ok közül a PARP-1, a PARP-2, valamint a PARP-3 az egyedüli olyan PARP enzim, melyek aktivitását elsősorban DNS-törések stimulálják. A PARP-2 a sejtek összes PARP aktivitásának kb. 5-15%-áért felel.

A PARP-2 gén és PARP-2 fehérje szerkezete

A PARP-2 kódoló génje emberben a 14-es kromoszómán található. A PARP-2 szekvenciája nagyfokú homológiát mutat a különböző emlős fajokban.

A PARP-2 gén transzlációja egy 62 kDa nagyságú fehérjét eredményez. A PARP-2 fehérje 3 doménre osztható fel. A fehérje N-terminális végén található a DNS-kötő domén, amelyet az E domén, végül pedig az F domén (katalitikus domén) követ. A fehérje auto-

PARilációja az E doménen történik, valamint ez a domén felelős a fehérje-fehérje interakciók kialakulásáért is. A C-terminális F domén tartalmazza a PARP-okra jellemző ún. PARP-szekvenciát, amely a katalitikus helyeket hordozza. A PARP-1 és a PARP-2 katalitikus doménjei között 69%-os a hasonlóság. Azonban a PARP-2 háromdimenziós szerkezetében megfigyelhető egy olyan hurok jelenléte, amely a PARP-1 szerkezetéből hiányzik.

A PARP-2 génexpressziós mintázata

A PARP-2 szöveti expressziója eltér a PARP-1 és a PARP-3 szöveti expressziós mintázatától. A PARP-2 expresszióját megvizsgálták egerekben, magzati és újszülött korban. Magzatban a PARP-2 expressziója nagyon magas volt a csecsemőmirigyben, valamint a májban is. Ugyancsak intenzív PARP-2 expressziót írtak le az agy egyes területein, valamint a vesekéregben, a lépben, a mellékvesékben, a gyomorban, a bélhámsejtekben és a herékben is.

Emberben kicsit eltérő génexpressziós mintázat figyelhető meg. Intenzív a PARP-2 expressziója a vázizomszövetben, az agyban, a szívben, a herékben, a hasnyálmirigyben, a vesékben, a méhlepényben, a petefészkekben és a lépben. Alacsonyabb a PARP-2 expressziója a tüdőkből, a fehérvérsejtekben, az emésztő traktusban, a csecsemőmirigyben és a májban.

A PARP-2-vel kölcsönható fehérjék

Affinitás-tisztítást követő tömegspektrometriás analízis során összesen 42 olyan fehérjét azonosítottak, amely a PARP-2-vel

kölcsönhathat. Ezen fehérjék között megtaláljuk a sejtciklus, a sejthalál, a DNS hibajavítás, a DNS replikáció, a transzkripció, a metabolizmus, az energia háztartás és az RNS metabolizmus szabályozásában résztvevő fehérjéket. Ezen fehérjéknek egy része a PARP-1 enzimmel is kölcsönhatásban állhat.

A PARP-2 szerepe a DNS hibajavításban és a genom integritásának fenntartásában

A *PARP-2^{-/-}* (*PARP-2* knock-out) egerek túlérzékenyek ionizáló sugárzással és alkiláló reagensekkel szemben, valamint sejteikben a PARP-2 hiánya kromoszóma-törések kialakulásához vezet. A PARP-2 a PARP-1 mellett a sejtekben a DNS-törések szenzoraként működik. Normális esetben a DNS-törések az SSBR vagy a BER hibajavító útvonalon keresztül kijavítódnak. A549 sejtekben a PARP-2 hiánya nem befolyásolja jelentősen az SSBR útvonalat, azonban egerekben a BER útvonal lelassul PARP-2 hiányában. A PARP-2 kölcsönhat a BER útvonalban szereplő különböző faktorokkal, mint pl. az XRCC1, a DNS polimeráz β valamint a DNS ligáz III. Ezek faktorok a PARP-1-gyel is kölcsönhatásban állnak. Ezek alapján feltételezhető, hogy a PARP-1 és a PARP-2 egyaránt fontos szereplői az SSBR/BER útvonalaknak. Ezt megerősíti az a megfigyelés, miszerint a *PARP-1^{-/-}PARP-2^{-/-}* egerek nem életképesek. A PARP-1 és PARP-2 aktivitásának különböző célpontjai vannak a DNS-en és a kromatinban. Míg a PARP-1-et elsősorban egyszálú DNS-törések aktiválják, a PARP-2 inkább a DNS molekulán kialakuló résekhez kötődik. Ezen felül

leírták már a PARP-2 esetleges szerepét kettős szálú DNS-törések hibajavításában is. Valamint a PARP-2 aktivitása szükséges a kromoszómák szerkezetének fenntartásához is.

A PARP-2 szerepe a spermiogenezis folyamatában

A PARP-2 expressziója igen magas a herékben. PARP-2 hiányos egerekben a spermiogenezis folyamata komoly zavart szenved, emiatt ezen egerek heréi kisebb méretűek és csökken a hím állatok nemzőképessége. Feltehetően a spermiogenezis zavarának hátterében a genom integritás fenntartásában bekövetkező rendellenesség állhat.

A PARP-2 szerepe a timociták érésében és a gyulladás szabályozásában

A PARP-2 expressziója figyelemreméltóan magas a csecsemőmirigy azon régióiban, ahol a timociták érési folyamata zajlik. *PARP-2^{-/-}* egerekben a timociták száma fele a vad típusú egerekben, valamint a *PARP-1^{-/-}* egerekben lévő timociták számának. A timociták számában bekövetkező csökkenés oka nem a sejtek lelassult osztódási rátája, hanem inkább a CD4⁺CD8⁺ sejtek csökkent túlélésével hozható összefüggésbe.

A PARP-2 hiánya gátolja az asztrociták aktivációját és védelmet biztosít vastagbélgyulladással szemben. A PARP-2 hiánya gátolja bizonyos, a gyulladás kialakulásának folyamatában szereplő gének (pl. *iNOS*, *IL-1 β* , *TNF α*) expresszióját.

A PARP-2 szerepe a génexpresszió szabályozásában

A PARP-2 a kromatin szerkezetét módosíthatja azáltal, hogy közvetett módon szabályozza olyan gének expresszióját, mint a *Mest* vagy a *HNF4*. A PARP-2 közvetlen DNS kötés révén is részt vehet a génexpresszió szabályozásában, és ezáltal szabályozza a különböző típusú RNS-ek expresszióját. A PARP-2 kölcsönhat a nukleofoszmin/B23 komplexszel, ami az rRNS transzkripciójában vesz részt.

A PARP-2 kölcsönhat továbbá a magreceptorok családjának egyes tagjaival, mint pl. a PPAR receptorokkal. A PARP-2 hiányában a PPAR γ aktivációja zavart szenved, míg a PPAR α és a PPAR δ aktivációja úgy tűnik, fokozódik.

Ezekén felül a PARP-2 kölcsönhat a TTF-1 transzkripciósfaktorral, ami által befolyásolja a tüdőben a surfactant termelését.

A PARP-ok interakciója a SIRT1-gyel és szerepük a mitokondriális metabolizmusban

A SIRT1 egy NAD⁺ függő fehérje deacetiláz enzim. A SIRT1 szabályozza a sejtekben a metabolikus folyamatokat azáltal, hogy a sejtek NAD⁺ szintjein keresztül érzékeli a sejtek energiaállapotát. A SIRT1 deacetilálja és aktiválja a PGC-1 α és FOXO1 metabolikus transzkripciósfaktorokat. Ezen faktorok aktivációja fokozza a mitokondriális biogenezist és az oxidatív metabolizmust azáltal, hogy hatásukra növekszik számos mitokondriális enzim expressziója. A SIRT1 aktivitásának NAD⁺ függése alapján feltételezzük, hogy a sejtek más NAD⁺ függő

enzimjeinek (pl. a PARP-oknak) a gátlásával a SIRT1 számára felhasználható NAD^+ mennyisége növekszik, és így a sejtek NAD^+ szintjén keresztül a SIRT1 aktivitása szabályozható. Számos kísérlet bizonyította, hogy valóban létezik ilyen kapcsolat a SIRT1 és a PARP-1 között, és a PARP-1 gátlásával a SIRT1 aktivitásának növekedése érhető el, és ennek következtében a sejtek mitokondriális aktivitása is fokozódik. Azonban arról nincs adat, hogy a PARP család más tagjai (pl. a PARP-2) is befolyással lehet a SIRT1 aktivitására és ezáltal a mitokondriális metabolizmusra.

A PARP-2 szerepe oxidatív stresszhez kapcsolódó kórképekben

A PARP-1-ről tudjuk, hogy oxigén-tartalmú szabadgyökök által okozott DNS károsodás hatására aktiválódik, és aktivációja során katalizálja NAD^+ -molekulákból ADP-ribóz polimerek felépítését. A PARP-1 nagyfokú aktivációja a sejtek NAD^+ és ATP készleteit felemészt, ami a sejtek halálához vezet, és ez a folyamat nagymértékben hozzájárul az oxidatív stressz hatására fellépő szöveti károsodások kialakulásához. A PARP-1 gátlásával kivédhetőek az oxidatív stressz hatására kialakuló káros hatások. A sejtekben megnövekedett oxidatív stressz a fő oka a doxorubicin (DOX) kardiotoxicitásának is.

A PARP-2-ről ugyancsak tudjuk, hogy DNS-törések aktiválják. Számos eredmény mutat arra, hogy a PARP-2 hiánya szintén védelmet nyújt az oxidatív stresszrel járó kórképek káros hatásaival szemben, mint például agyi iszkémia reperfüzió vagy

vastagbélgyulladás esetében. Azonban az ennek hátterében álló mechanizmus nem tisztázott.

IRODALMI ÁTTEKINTÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK

A SIRT1 aktivitása fokozza, illetve helyreállítja a mitokondriális aktivitást, és ez a hatás igen hasznos az oxidatív stresszel járó kórképek esetében fellépő mitokondriális károsodás kivédésében. Számos tanulmány bizonyítja, hogy a PARP-2 hiánya véd az ilyen oxidatív stressz által okozott károsodással szemben. Ismert az is, hogy oxidatív stressznek kitett sejtekben a PARP-1 és a SIRT1 kölcsönhatásban áll. Ezen megfigyelések arra biztattak minket, hogy megvizsgáljuk egy PARP-2 – SIRT1 interakció lehetőségét.

DOX kezelés hatására a mitokondriális membránok károsodnak a kardiovaszkuláris rendszerben, ami ellen a *PARP-1^{-/-}* egerek védettek. Ráadásul, több eredmény utal a SIRT1 védőszerepére kardiovaszkuláris károsodással szemben. Ezek alapján azt a hipotézist állítottuk fel, hogy a PARP-2 hiánya védő hatású lehet a DOX által okozott érrendszeri károsodásokkal szemben.

Tudományos céljaink voltak tehát:

1. Megállapítani, hogy a PARP-2 kölcsönhat-e a SIRT1-gyel.
2. Megvizsgálni, hogy a PARP-2 hiánya védelmet nyújt-e a DOX által indukált oxidatív károsodással szemben.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Sejtkultúrák

Az egér eredetű myoblastokat (C2C12 sejtek), valamint a szintén egér eredetű aorta simaizomsejteket (MOVAS sejtek) 5% szén-dioxidot tartalmazó atmoszférában, 37°C-on tenyésztettük DMEM tenyésztőfolyadékban. A sejtek tenyésztőfolyadékát kiegészítettük 10% magzati marha szérummal, 100 U/ml penicillin / 100 µg/ml sztreptomycin antibiotikum-koktéllal, valamint MOVAS sejtek esetében 0.2 mg/ml geneticinnel.

A C2C12 és MOVAS sejtek lentivirális fertőzése

A sejtekben a PARP-2-t lentivirális vektorban bejuttatott specifikus shRNS-sel csendesítettük. A fertőzött sejtek szelekciója és további fenntartása puromicin-tartalmú tenyésztőfolyadékban történt.

Állatkísérletek

A kísérletekhez C57/Bl6J / SV129 kereszteződésből (87.5%/12.5%) származó homozigóta nőstény *PARP-2^{-/-}* és *PARP-2^{+/+}* egereket használtunk. Az egereket véletlenszerűen 4 csoportba osztottuk: *PARP-2^{-/-}* és *PARP-2^{+/+}* kontrol (CTL), és *PARP-2^{-/-}* és *PARP-2^{+/+}* DOX-nal kezelt. DOX kezelés során 25 mg/kg DOX-t, illetve a kontrol csoportokban sóoldatokat alkalmaztunk. Két nappal a DOX beadása után az egerekből az aortákat kimetszettük.

RNS preparálás és RT-qPCR

Az RNS preparálás TRIzol reagens alkalmazásával történt, majd az RNS-t reverz transzkripció során átírtuk cDNS-sé. Az RT-qPCR reakciókhoz a cDNS mintákat kihígítottuk.

Mitokondriális DNS analízis

A mitokondriális DNS meghatározása qPCR reakciókban történt.

Szövettan

Az immunhisztokémiát 7 μ m vastagságú, paraffinba ágyazott szöveti metszeteken végeztük, anti-PAR, anti-PARP-2 és anti-simaizom-aktin (SMA) antitestek felhasználásával.

TUNEL analízis

A DNS-töréseket terminális deoxiribonukleotidil transzferázzal (TdT) és egy digoxigeninnel jelölt dUTP-t tartalmazó deoxiribonukleotid keverékkel jelöltük. A detektáláshoz peroxidáz-konjugált anti-digoxigenin antitestet használtunk, és a peroxidáz kimutatása diamino-benzamid reakcióban történt.

Malondialdehid mérés

A lipid peroxidáció és a szöveti oxidatív stressz mértékének meghatározása a malondialdehid képződésének mérése révén történt.

PARP aktivitás mérés

A sejtlyázatokban a PARP aktivitás mérésének elve a ^3H -NAD $^+$ izotóp beépülésének mérése TCA által kicsapható fehérjékbe.

Sejtek oxigén fogyasztásának mérése

A sejtek oxigén fogyasztásának mérése egy XF96 oximéter alkalmazásával történt (Seahorse Biosciences).

Sejtek NAD $^+$ koncentrációjának meghatározása

A sejtek NAD $^+$ koncentrációjának meghatározása egy alkohol dehidrogenáz által katalizált enzimatis reakciót követő fotometriás mérésen alapult.

Luciferáz riporter aktivitás mérés

A sejteket olyan luciferáz riporter konstrukciókkal transzfektáltuk, ahol a luciferáz aktivitást a SIRT1 promotor régió deléciós mutánsainak aktivitása szabályozza. A luciferáz aktivitást a mért luciferáz aktivitás és β -galaktozidáz aktivitás hányadosaként adtuk meg.

Mitokondriális membrán potenciál mérése

A mitokondriális membrán potenciált TMRE fluoreszcens festéssel határoztuk meg.

Szuperoxid-gyökök termelődésének mérése

A szuperoxid-gyökök termelődését hidroetidin fluoreszcens méréssel határoztuk meg.

Western blot analízis

A fehérjemintákat SDS-poliakrilamid gélen megfuttattuk, majd nitrocellulóz membránra transzferáltuk. Az általunk használt elsődleges antitestek a következők voltak: anti-PARP-2, anti-SIRT1, anti- β -aktin. A peroxidáz-konjugált másodlagos antitestek kötődésének detektálása kemilumineszcens reakcióban történt.

Kromatin immunprecipitáció (ChIP)

A sejtlizátumokból kromatint preparáltunk. A kromatinhoz kötődött fehérjéket specifikus PARP-2 és nem-specifikus MMP2 elleni antitestekkel immunprecipitáltuk. Majd az immunprecipitált kromatin fragmenteket qPCR reakcióban felerősítettük a SIRT1 promóter régiójára specifikus primer segítségével.

Statisztikai elemzés

A statisztikai különbségeket a különböző csoportok között Student-féle t-próbával állapítottuk meg. A $p < 0.05$ értékek jelölnek statisztikailag szignifikáns különbséget.

EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉSÜK

A PARP-2 a SIRT1 promoter aktivitás repressziója révén szabályozza a mitokondriális metabolizmust

Kísérleteink előzményei azon megfigyelések voltak, miszerint a *PARP-2*^{-/-} egerek jellegzetes metabolikus tulajdonságokat mutatnak. A *PARP-2*^{-/-} egerek a vad típusú egerekhez képest sokkal kisebbek és soványabbak. Ugyanakkor, a *PARP-2*^{-/-} egerek oxigén fogyasztása magasabb a vad típusúakénál, ami intenzívebb oxidatív metabolizmusra utal. Valamint a *PARP-2*^{-/-} egerek vázizomszövetében a mitokondriumok száma emelkedett, és emiatt ezen egerek energia felhasználása is nagyobb. Ezeken felül a *PARP-2*^{-/-} egerek védettek a túlzott táplálékbevitellel kialakított elhízással szemben. Számos tanulmány adatai alapján tudjuk, hogy egerekben a SIRT1 aktivációja nyomán emelkedik az egerek energia felhasználása és védettek lesznek a túlzott táplálékbevitellel kialakított elhízással szemben. Ezek alapján megállapíthatjuk, hogy a *PARP-2*^{-/-} egerek a SIRT1 aktivációjára jellemző metabolikus tulajdonságokat mutatják. Az a tény, hogy a PARP-1 a SIRT1-gyel a közös magi NAD⁺ készleten keresztül kapcsolatban áll, tovább erősítette azt a feltevésünket, hogy a PARP-2 depléciója hatással van a SIRT1 aktivitására.

Jelen tanulmány keretei között megmutattuk, hogy valóban létezik kapcsolat a PARP-2 és a SIRT1 között. Azonban, a PARP-1-gyel ellentétben, a PARP-2 hatása a SIRT1 aktivitására nem a sejtek NAD⁺ készletén keresztül valósul meg. Ezt alátámasztja az a

megfigyelés, hogy a PARP-2 a sejtekben csak másodlagos PARP aktivitást képvisel, vagyis nem befolyásolja jelentősen a sejtek NAD⁺ szintjét.

A kromatin immunprecipitációs kísérletek arra utaltak, hogy a PARP-2 közvetlenül a SIRT1 promoter proximális, -1 - -91 bázis pár hosszúságú régiójához kötődik. Luciferáz riporter aktivitás mérések pedig kimutatták, hogy a PARP-2 deplécója a SIRT1 promoter aktivitásában kétszeres emelkedést indukál. Ennek megfelelően a SIRT1 expressziója, valamint a SIRT1 fehérje mennyisége is jelentősen emelkedett PARP-2 depléciójának hatására. Következésképpen, a mitokondriális metabolizmus szabályozásában részt vevő egyes gének (pl. MCAD, Ndufa2, Cyt C) expressziója is növekedett. Ezek alapján megállapítottuk, hogy a PARP-2 a SIRT1 promoterének negatív regulátora.

Már korábban is leírták a PARP-2 szerepét a transzkripció szabályozásában. A *PARP-2*^{-/-} egerek csecsemőmirigyében emelkedett a proapoptotikus NOXA fehérje expressziója. Tüdőepitél sejtekben a PARP-2 kölcsönhat a TTF-1-gyel, és ezáltal szabályozza a surfactant protein-B expresszióját. Továbbá csoportunk kimutatta, hogy a PARP-2 a PPAR γ pozitív regulátora, vagyis a PARP-2 hiányában a zsírszövetek szintézise zavart szenved. Lényeges kiemelni, hogy a SIRT1 gátolhatja a PPAR γ -t, így ez is hozzájárulhat a PARP-2 hiányában fellépő lipid szintézis zavarához. A PARP-2 depléciójának hatására tehát számos előnyös metabolikus tulajdonság alakul ki, a SIRT1 aktivációjának fokozódása révén.

Összefoglalva, eredményeink tovább bővítik a PARP-2 transzkripció szabályozó szerepével kapcsolatos ismereteinket, mivel kimutattuk, hogy a PARP-2 szabályozza a SIRT1 promoter aktivitását. Ennek megfelelően a PARP-2 depléciónak indukálja a SIRT1 transzkripcióját, valamint a mitokondriális metabolizmust. Mindazonáltal, a PARP-2 valószínűleg további transzkripció faktorokat is befolyásolhat, ezek felderítése további vizsgálatok tárgyát fogja képezni. Azt azonban mindenképp ki kell emelnünk, hogy a kölcsönhatást a PARP-2 és a SIRT1 promoter régiója között ki tudtuk mutatni vázizomsejt kultúrában, vázizomszövetben, májban, valamint simaizomszövetben is. Úgy tűnik tehát, hogy ez a szabályozó mechanizmus széles körben elterjedt, és filogenetikai jelentősége lehet. Bizonyos szövetekben viszont a PARP-2 depléciónak nyomán nem tapasztaltuk az energia felhasználás fokozódását (pl. barna zsírszövet), ami arra utalhat, hogy esetenként kiegészítő mechanizmusokra is szükség lehet ahhoz, hogy a SIRT1 indukciója ilyen jellegű hatásban is megnyilvánuljon. Mindent egybevetve, adataink alapján javasoljuk PARP-2 specifikus inhibitorok terápiás felhasználását metabolikus kórképekben.

A PARP-2 depléciónak szerepe a DOX által indukált vaszkuláris simaizom károsodásban

Két nappal a DOX beadása után, az egerek vaszkuláris endotél és simaizom sejtjei károsodást szenvedtek, azonban a *PARP-2^{-/-}* egerekben a simaizom sejt károsodása jóval kisebb mértékű volt. Az endotél sejt károsodásának mértékében ezzel szemben

nem volt különbség a *PARP-2*^{-/-} és a vad típusú egerek között. Ezen kívül a vad típusú egerek aortáiból készült metszeteken DOX kezelés hatására csökkent a simaizom aktin immunreakció, míg a *PARP-2*^{-/-} egerek esetében a reakció intenzitása lényegesen nem csökkent DOX kezelés hatására. Ezen eredmények alapján arra következtettünk, hogy a *PARP-2* depléciója megvédte a vaszkuláris simaizom sejteket a DOX kezelés károsító hatásaival szemben.

A *PARP-2* depléciója nem befolyásolja a sejtekben a *PARP* aktivitást

DOX hatására a sejtekben szabad gyökök képződnek, amelyek DNS töréseket okoznak. A DNS törések hatására *PARP*-ok aktiválódnak. A *PARP-1* gátlása vagy depléciója révén a DOX által okozott káros hatások kivédhetőek. Mivel a *PARP-2* is egy *PARP*, amely DNS törések hatására aktiválódhat, célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk a *PARP-2* szerepét a DOX által kiváltott *PARP* aktivációban.

Azt tapasztaltuk, hogy a *PARP-2* depléciója nem befolyásolja a sejtekben a DOX kezelés hatására fellépő DNS törés – *PARP* aktiváció – NAD^+ depléció – sejthalál útvonalat. Ezek alapján megállapíthatjuk, hogy a *PARP-2* hiánya megvédi az ereket a DOX által okozott káros hatásokkal szemben anélkül, hogy megzavarná a sejtekben a *PARP* aktivációt.

A PARP-2 deplécióna következtében fellépő SIRT1 aktiváció véd a DOX toxicitásával szemben

A fenti eredmények alapján megállapíthatjuk, hogy a PARP-2 deplécióna következtében kialakuló védő hatás más mechanizmus szerint zajlik, mint a PARP-1 gátlása esetén láttuk. Mivel ismeretes, hogy a DOX a mitokondriális funkciókat károsítja, és ennek megelőzése kívánatos lehet a káros hatások kivédése szempontjából, ezért megvizsgáltuk a mitokondriális folyamatokat szabályozó útvonalakat.

A SIRT1 aktivációja fokozza a mitokondriális biogenezist. Ahogy azt korábban leírtuk, a PARP-2 depléciójának hatására növekszik a SIRT1 aktivitása, ezért feltételeztük, hogy ebben az esetben ez is közrejátszhat a védő hatás kialakulásában.

A *PARP-2^{-/-}* egerek aortáiban, valamint a PARP-2 depletált sejtekben valóban megnövekedett a SIRT1 expressziója és a SIRT1 fehérje mennyisége. Ez a növekedés pedig a SIRT1 promoterének nagyobb aktivitásának eredménye. Ezután megvizsgáltuk a mitokondriális funkciókat. A PARP-2 depléciójának hatására az aortákban és a simaizom sejtekben emelkedett a mitokondriális DNS mennyisége. Valamint nőtt egyes, mitokondriális oxidációban szerepet játszó gének (FOXO1, ATP5g1, ndufa2, ndufb5) expressziója, még DOX kezelés mellett is. Ezek az adatok intenzív mitokondriális biogenezisre utaltak. Ezek mellett megvizsgáltuk a sejtek oxigén fogyasztását és mitokondriális membránpotenciáljukat is. DOX kezelés előtt a PARP-2 depletált sejtek oxigénfogyasztása

magasabb volt. Bár a DOX kezelés csökkentette az oxigénfogyasztás mértékét mindkét sejtvonal, a kezdeti különbség megmaradt. A DOX koncentráció növekedésével párhuzamosan a kontrol sejtvonal mitokondriális membránpotenciálja emelkedett, ami mitokondriális hiperpolarizáció következménye lehet, ami pedig az apoptózis egy korai jele. A PARP-2 depletált sejtvonalban ilyen jellegű hatást nem tapasztaltunk DOX kezelés során, ami megtartott mitokondriális funkciókra utal.

A PARP-2 depléciónak hatására bekövetkező SIRT1 aktiváció, és ennek következtében megnőtt mitokondriális biogenezis tehát hozzájárulhatott a DOX által okozott káros hatások elleni védő hatás kialakulásában a vaszkuláris rendszerben. A SIRT1 aktivációjának védő szerepét már korábban is leírták a kardiovaszkuláris rendszerben, de ez az első olyan alkalom, amikor ez közvetlen transzkripciós szabályozás útján valósult meg. Ez a mechanizmus egy új módszert kínál az oxidatív stressz által okozott káros hatások kivédésében. Valamint valószínűleg hozzájárulhatott más oxidatív stresszrel járó kórképekben is a PARP-2 depléciónak nyomán kialakult védő hatáshoz.

Eredményeink alapján felmerül PARP-2 specifikus inhibitorok terápiás alkalmazásának lehetősége a DOX kezelés következtében kialakuló mellékhatások kivédésére. Jelenleg ilyen célra a dexrazoxánt használják (Cardioxane, Novartis). Azonban ennek használatát mellékhatásai miatt jelentősen korlátozták, és csak felnőttek esetében alkalmazható megfelelő körülmények között. A

PARP-2 specifikus inhibitorok alkalmazásával ezek a korlátok esetleg kiküszöbölhetőek lehetnek.

Azonban a PARP-2 specifikus inhibitorok fejlesztése nehézségekbe ütközik, mivel a PARP-2 szerkezete nagymértékben hasonlít a PARP-1 szerkezetéhez, így nem lehet kizárni bizonyos fokú PARP-1 gátlást sem az ilyen hatású vegyületek alkalmazása esetén. A ma elérhető leginkább PARP-2 szelektív inhibitor, az UPF-1069, 60-szor nagyobb mértékben gátolja a PARP-2-t, mint a PARP-1-et. A PARP-2 szelektív gátlás annál is inkább kívánatos lehet, mivel így talán nem kell számolnunk a PARP-függő DNS hibajavító útvonalak jelentős zavarával, hiszen a PARP-2 a sejtek PARP aktivitásának csak 5-15%-áért felel.

Összefoglalva, az eredményeink azt mutatják, hogy a PARP-2 depléciója következtében megemelkedett SIRT1 aktivitás és mitokondriális biogenezis alkalmas lehet a mitokondriális diszfunkció kivédésére, nemcsak a kardiovaszkuláris rendszerben, hanem más szövetekben is.

KÖVETKEZTETÉSEK

1. A PARP-2 a SIRT1 aktivitását közvetlen promoter kölcsönhatás útján szabályozza.
2. A PARP-2 a SIRT1 promoterének represszora.
3. A PARP-2 deléciója vagy depléciója a SIRT1 aktivitás, ezáltal pedig a mitokondriális biogenezis fokozódását eredményezi.
4. A PARP-2 deléciójának vagy depléciójának előnyös metabolikus hatásai vannak, ami a megnövekedett SIRT1 aktivitás következménye.
5. A PARP-2 depléció vagy deléció következtében megnövekedett mitokondriális biogenezis egy új megközelítést jelent az oxidatív stressz hatására kialakuló káros hatások kivédésében.
6. Munkánk nyomán felvetődik PARP-2 specifikus inhibitorok alkalmazásának lehetősége metabolikus kórképek terápiájában, valamint a DOX által okozott kardiovaszkuláris károsodás csökkentésére.

FÜGGELÉK



DEBRECENI EGYETEM EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR
KENÉZY ÉLETTUDOMÁNYI KÖNYVTÁRA

Iktatószám: DEENKÉTK /103/2012.
Tételszám:
Tárgy: Ph.D. publikációs lista

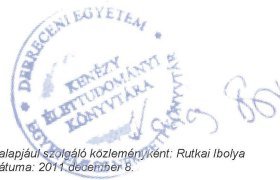
Jelölt: Szántó Magdolna

Neptun kód: CBEJ25

Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Bai, P., Cantó, C., Brunyánszki, A., Huber, A., **Szántó, M.**, Cen, Y., Yamamoto, H., Houten, S.M., Kiss, B., Oudart, H., Gergely, P., Menissier-de, M.J., Schreiber, V., Sauve, A.A., Auwerx, J.: PARP-2 regulates SIRT1 expression and whole-body energy expenditure. *Cell Metab.* 13 (4), 450-460, 2011.
IF:18.207 (2010)
- *2. **Szántó, M.**, Rutkai, I., Hegedűs, C., Czikora, Á., Rózsahegy, M., Kiss, B., Virág, L., Gergely, P., Tóth, A., Bai, P.: Poly(ADP-ribose) polymerase-2 depletion reduces doxorubicin-induced damage through SIRT1 induction. *Cardiovasc. Res.* 92 (3), 430-438, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/cvr/cvr246>
IF:6.051 (2010)



*A közlemény kettős felhasználású. Korábban felhasználta értekezés alapjául szolgáló közleményként: Rutkai Ibolya (HDBA73). Készült nyilatkozat a részleges felhasználásról, melynek dátuma: 2011. december 8.

További Közlemények

3. Brunyánszki, A., Hegedűs, C., **Szántó, M.**, Erdélyi, K., Kovács, K., Schreiber, V., Gergely, S., Kiss, B., Szabó, É., Virág, L., Bai, P.: Genetic ablation of PARP-1 protects against oxazolone-induced contact hypersensitivity by modulating oxidative stress.
J. Invest. Dermatol. 130 (11), 2629-2637, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/jid.2010.190>
IF:6.27

Összesített impakt faktor: 30.528

Összesített impakt faktor: (értekezés alapjául szolgáló közlemények esetén): 24.258

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár a Jelölt által a Publikációs Adatbázisba feltöltött adatok bibliográfiai és tudásmetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2012.04.02

