

Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

A POLI(ADP-RIBÓZ) POLIMERÁZ-1 (PARP-1) SZEREPE A TRANSZKRIPCIÓ SZABÁLYOZÁSÁBAN

Brunyánszki Attila

Témavezet : Dr. Bai Péter



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2011

A poli(ADP-ribóz) polimeráz-1 (PARP-1) szerepe a transzkripció szabályozásában

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében
az elméleti orvostudományok tudományágban

Írta:
Brunyánszki Attila
okleveles biológus/biotechnológus

Készült a
Debreceni Egyetem
Molekuláris Orvostudomány
Doktori Iskola keretében

Témavezet : Dr. Bai Péter, Ph.D.

A doktori szigorlati bizottság:

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

A doktori szigorlat id pontja:

2011.06.29. 11:00

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Gallyas Ferenc, az MTA doktora
Dr. Fülöp Péter, Ph.D.

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Csernoch László, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Gallyas Ferenc, az MTA doktora
Dr. Fülöp Péter, Ph.D.
Dr. Geiszt Miklós, Ph.D.
Dr. Szatmári István, Ph.D.

Az értekezés védésének id pontja:

2011.06.29. 13:00
I. sz. Belgyógyászati Klinika tanterme

Bevezetés

A poli(ADP-ribóz) polimeráz-1 enzimatiskus tulajdonságai

Poli(ADP-ribóz) polimeráz-1 (PARP-1) a poli(ADP-ribóz) polimerázok (PARP-ok) szupercsaládjába tartozik. Egy multidomén fehérje, amely az N-terminális végen DNS-kötő doménből, egy automodifikációs doménből és a C-terminális végen egy katalitikus doménből épül fel. A katalitikus domén ADP-ribóz egységekből poli(ADP-ribóz) polimereket (PAR) képez.

A PARP-1 katalitikus működése a DNS-károsodáshoz és szignál molekula szerepéhez kapcsolódik. A PARP-1 képes az egy- és kétszálú DNS törések felismerésére, a DNS-hez kapcsolódik, aktiválódik és a NAD⁺-molekulákból ADP-ribóz egységeket állít elő. Az ADP-ribóz egységeket kovalensen kapcsolja különböző célfehérjékhez, lineáris vagy elágazó PAR polimereket kialakítva.

Fiziológiai körülmények között a PARP-1 enzimatiskus aktivitása nagyon alacsony, de különböző allosztérikus aktivátorok jelenléte, mint például egy- és kétszálú DNS törések, DNS-fehérje keresztkötések, keresztalakok, valamint nukleoszómák, duplaszálú DNS szekvenciák és különböző fehérje partnerek nagymértékben növelhetik a PARP-1 aktivitást. A legjobban jellemzett PARP-1 aktivátor a szabad gyökök okozta DNS törés, ami számos különböző hatást okoz a sejtekben. Az intenzív oxidatív stressz okozta, kiterjedt PARP aktiváció kimerítheti a sejt NAD⁺/ATP raktárát, ezzel blokkolva az apoptózist és nekrotízis kialakulását idézi elő. Továbbá a reaktív gyökök szerepet játszhatnak még más sejt folyamatok egész sorában úgymint, sejt szignalizáció, genom integritás vagy transzkripció.

Reaktív gyökök okozta oxidatív stressz: a PARP-1 aktivátorai

Az oxidatív stressz a ROS (reaktív oxigén gyökök) és/vagy RNS (reaktív nitrogén gyökök) illetve a limitált antioxidáns védekező rendszer közötti egyensúly megbomlása. Kémiai értelemben a párosítatlan elektronnal rendelkező molekulákat vagy elemeket nevezzük szabad gyöknek. Biológiai értelemben a szabad gyökök, nem rendelkeznek mindannyian párosítatlan elektronnal, azonban nagyon reaktív tulajdonsággal bírnak. Kémiaiilag a szabad gyökök és származékaik a központi atomtól függően két csoportba sorolhatók, úgymint reaktív oxigén gyökök és reaktív nitrogén gyökök. A szabad gyökök

származékaik egy időben és azonos helyen keletkeznek, így együttesen fejtik ki hatásukat a sejtekre.

A reaktív gyökök között a hidroxil gyök, a hidrogén-peroxid és a peroxinitrit a legreaktívabb. A hidroxil gyök reaktivitása nagyon magas ezért igen rövid életű. Nagyon erős oxidáló ágens, amely nagy sebességgel reagál a legtöbb szerves és szervetlen vegyülettel a sejtekben. A hidrogén-peroxid ugyan nem gyök definíció szerint, de szintén károsítja a sejteket. Vizes oldatban spontán disszociál és könnyen áthatol a biológiai membránokon. Ezzel ellentétben a superoxid gyök viszonylag stabil és folyamatosan jelen van, illetve alacsony reakció sebességgel reagál a biológiai vegyületekkel. A superoxid képes reagálni a nitrogén-monoxiddal és egy erős oxidáló ágens alakít ki, nevezetesen a peroxinitritet, amely – protonáció során – hidroxil gyökre és nitrogén-dioxidra bomlik. Így megtámadja a szulfhidril csoportokat és nagyon sokféle biomolekulát, amelyek károsodást okoznak a sejtekben.

A reaktív gyökök endogén forrásai

A sejteket nagy mennyiségben éri ROS és RNS mind exogén mind pedig endogén forrásból. Az endogén eredetű gyökök folyamatosan termelődnek és a sejtek teljes élettartamán keresztül jelen vannak. Legfontosabb forrásaikat az alábbiakban tárgyaljuk.

Mitokondrium A legkiemelkedőbb ROS termelő sejt szervecske a mitokondrium. Mitokondrium a terminális oxidáció és az oxidatív foszforiláció helyszíne. A mitokondriumból kiszivároghatnak elektronok az I-es és III-as komplex révén és így az oxigén superoxiddá redukálódik. A két komplex közül kizárólag a III-as komplex képes elektront kiszivárogtatni a membránok közötti térbe. Ennek eredményeként több különböző oxigén származék alakul ki (pl.: hidrogén peroxid).

Peroxiszómák A peroxiszómák szintén rendelkeznek ROS termelő képességgel. A fagocitáris metabolikus folyamat, amely a peroxiszómákban a H_2O_2 keletkezéséhez vezet az a zsírsavak α -oxidációja és a flavin oxidázok enzimatis reakciója. A reaktív gyökök megjelenése lipid peroxidációhoz, a peroxiszóma membrán károsodásához és működésvesztéshez vezet.

Fagolizoszómák A fagolizoszómákban a külső behatolók (pl.: bakteriális fertőzés) a reaktív gyökök hatására pusztulnak el. A fagolizoszómák első sorban (granulocitákban, monocitákban és limfocitákban) fordulnak elő és a gyulladás során felelősek az endogén forrásai a ROS-nak. A stimulációt követően a sejtek nagy mennyiségű ROS-t termelnek, amelyek elpusztítják a bekebelezett baktériumokat.

NO szintáz enzimek A nitrogén-oxid szintetáz enzimek (NOS) nitrogén-monoxidot állítanak elő. A NOS enzimek L-argininből NO-t és L-citrullint állítanak elő N-hidroxi-L-argininen keresztül. A NOS-nak három izotípusa van. Neuronális NOS (nNOS, NOS-1), endotéliás NOS (eNOS, NOS-3) és az indukálható NOS (iNOS or NOS-2). Az nNOS-t és az eNOS-t kalcium szignál aktiválja, míg az iNOS az expresszió szintjén szabályozódik. Az iNOS, ellentétben az nNOS-sal és az eNOS-sal, magas koncentrációban termel NO-t. Az iNOS-nak kiemelkedő szerepe van a gyulladásos folyamatok során bekövetkező gyöktermelésben.

A reaktív gyökök káros hatásai

A reaktív gyökök élő sejtek olyan komponenseket képesek megtámadni, mint a telítetlen zsírsavak, fehérjék és nukleinsavak.

A lipid peroxidáció olyan membrán foszfolipideket érint, amelyek telítetlen zsírsavakat tartalmaznak. A lipidek peroxidációja zavarja a membránok újrakepzését oly módon, hogy a fluiditás és permeabilitás, az ionok transzportjának megváltozását és a metabolikus folyamatok gátlását okozza.

Jelentős mértékű a hidroxil, alkoxil és nitrogén-központú gyökök okozta fehérje károsodás. A fehérjék keresztül lehetnek az oxidáción úgy, hogy specifikus aminosavszármazékok károsodnak vagy a negyedleges szerkezet degradálódik és fragmentálódik. A fehérje károsodás következménye az enzimaktivitás elvesztése, ebből eredően megváltoznak a sejt funkciók.

A reaktív gyökök DNS módosításokat is indukálhatnak, mint nukleotid bázisok módosítását, egy- és kétszálú DNS töréseket, deoxiribóz károsodásokat, DNS-fehérje keresztkötéseket és a DNS hibajavító rendszer károsodását.

A reaktív gyökök indukálta oxidatív módosítások szerepet játszhatnak a redox szignalizációban. Ezek a változások módosíthatják a génexpressziót a redox szenzitív transzkripciós faktorokon keresztül, úgymint NF- κ B, AP-1, vagy ATF-2. Ezekről a transzkripciós faktorokról ismert, hogy kölcsönhatnak a PARP-1-gyel, azonban a legtöbb esetben a kölcsönhatás pontos molekuláris háttere még nem tisztázott.

PARP-1 biológiai funkciói

Mint korábban említettük a PARP-1-nek sokféle biológiai funkciója van, amely a DNS-repairrel kapcsolatos, például bázis, nukleotid kivágásos hibajavítás és kétszálú DNS-törés

javítása. Azonban a PARP-1 egyéb funkciókkal is rendelkezhet bizonyos biológiai folyamatokban, úgymint vazokonstriktió, asztrocita és mikroglia működés, hosszútávú memória, kardiális remodelling szabályozása, gyulladás, öregedés, oxidatív metabolizmus és transzkripció.

A PARP-1 szerepe a transzkripció szabályozásában

A gén expresszió szabályozásához a fehérje faktorok széles skálája szükséges, amelyek módosíthatják a kromatin szerkezetet. A PARP-1 szabályozhatja a transzkripciót insulátor komponenseként, enhanszer/promóter szabályozó komplexként, a kromatin szerkezet modulátoraként és a transzkripció koregulátoraként.

A PARP-1 működhet insulátorként. Az insulátorok DNS elemek, amelyek segítenek a genomot egyedi szabályozó egységekbe szervezni, ezáltal korlátozzák az enhancerek hatását a promoteren vagy megakadályozzák a heterokromatin kibontását.

A PARP-1 legkorábban jellemzett hatása a genomra a kromatin szerkezet módosítása és a hiszton fehérjék PARilációja volt. A PARP-1 NAD⁺ hiányában történő kötődése a nukleosómákhoz, a nukleosómák magasabb fokú szerkezetekbe történő rendezését indítja el. NAD⁺ jelenlétében, a PARP-1 automodifikálja önmagát és leválik a kromatinról, ami a kromatin kitekeredését és a transzkripció visszanyerését eredményezi *in vitro*.

Sok korai tanulmány leírta a PARP-1 közvetlen hatását a transzkripció szabályozására. Ebben az esetben a PARP-1 specifikus DNS szekvenciákhoz vagy szerkezetekhez kötődik a gének szabályozó régiójában és a PARP-1 klasszikus enhancer-kötődésként játszik szerepet.

A PARP-1-et több transzkripció faktor esetében promóter-specifikus koregulátorként (koaktivátorként vagy korepresszorként) azonosították az NF- κ B oldalon vagy a magreceptorok esetében. A PARP-1 képes kölcsönhatni a gének enhanszereivel vagy promótereivel közvetlen szekvencia-specifikus kötődéssel, transzkripció faktorok összeszerelésével a DNS-kötődéseik révén, közvetlen kötődéssel DNS szerkezetekhez és diádokhoz. A megfelelő DNS-kötődésként faktorok a PARP-1-et a releváns cél promóterhez vonzzák, ahol a PARP-1 további faktorok DNS-hez való kötődését válthatja ki, így stimulálva az enhanszoszómák kialakulását és a transzkripció aktivációját. A legtöbb transzkripció faktornál a megfelelő működés érdekében a PARP-1 enzimatis aktivitása szükséges a DNS-kötődéshez (Sp1, NFAT). A DNS-kötődésként faktorok vagy a koregulátor komplex más

komponensei a PARP-1- függ PARiláció targetjei. Ezek a tanulmányok együttesen kiemelik a PARP-1 koregulátor funkciójának a sokféle mechanizmusát, amelyek valószínűleg aktivátor- és gén-specifikus módon változnak. Ezen transzkripciós faktorok legtöbbször különböző fiziológiai és patofiziológiai körülményeket modulál, mint például gyulladás, sejt differenciáció, sejt proliferáció, sejt adhézió vagy metabolikus szabályozás.

A PARP-1 mediálta transzkripciós változások gyulladásban

Sok tanulmány szerint, amelyekben a PARP-1 gént egerekben vizsgálták, a PARP-1 farmakológiai gátlása vagy genetikai csendesítése gátolja a gyulladás kialakulását. A gyulladásos betegségekkel szembeni védekezést a különböző transzkripciós faktorok diszregulációja okozza. A f transzkripciós faktorok, amelyek a gyulladás során aktiválódnak az NF- B, AP-1 és ATF-2.

A p65 vagy RelA az NF- B családba tartozik, amelyek tulajdonképpen minden sejtben megtalálhatóak, ahol ezek a gyulladásos folyamatok f szabályozói. Az NF- B transzkripciós faktor tartalmaz egy lokalizációs szignált, amely a magba irányítja az NF- B-t, ahol DNS-hez kötődik. A nem-stimulált sejtekben ez a szignál egy inhibitor fehérje az I B m kötésének köszönhetően lefedett, amely a transzkripciós faktor citoplazmatikus felhalmozódását eredményezi. Citokin stimuláció során az NF- B-ről leválik az I B, amelyet a sejtmagi transzlokáció követ és az NF- B irányított gének transzkripciója.

Az ATF-2 komplexet hoz létre a c-Jun-nal vagy önmagával és az AP-1-kötő helyre kötődik a DNS-en. A heterodimer komplex AP-1 a c-Fos, c-Jun vagy ATF-2 dimerizációjából alakul ki. Az extracelluláris stressz által indukált gének az AP-1 aktivációhoz kapcsolatosak alakítják ki a sejt stressz elleni válaszát. Az AP-1-et ezért sok szignál transzdukciós folyamatban kritikus intermediárnak tekintik. Oxidatív stressz során az aktivált p38^{MAPK} gyorsan áthelyeződik a citoplazmából a sejtmagba és foszforilálja a szubsztrátjait, úgymint az ATF-2 és a c-Jun vagy más kinázokat. Az így kialakult AP-1 transzkripciós faktor hozzákötődhet a DNS-hez és elindul a transzkripciója a gyulladásos géneknek.

A gyulladásos citokinek, mint a TNF , IL-1 a Th1 függ gyulladás f szabályozói. Ezek a citokinek további citokinek, kemokinek, adhéziós molekulák, iNOS, ciklooxygenáz-2 és a mátrix-metalloproteinázok expresszióját indukálják. A PARP-1 gátlás vagy a PARP-1 csendesítése esetén a gyulladásos citokinek expressziója lecsökken (MIP-1 , MIP-2, IL1 ,

TNF , and MCP-1). Ezek a citokinek és kemokinek NF- B által szabályozottak, ezért az NF- B aktivitás szupressziója valószínű magyarázatot ad ezen gének csökkent expressziójára.

Az iNOS felelős az NO szintéziséért gyulladási körülmények között. Az iNOS az NF- B transzkripciós faktoron keresztül szabályozott, ezért a PARP-1 gátlása jól látható csökkenést okoz az iNOS expresszióban és így a nitroztatív stresszben.

Az MMP-k nélkülözhetetlenek a sejtek kötőszöveti mozgásában. Az MMP-k a szabadgyökök indukálta szerkezeti változások hatására aktiválódhatnak. Az MMP aktiváció a gyulladás során megakadályozható a PARP-1 gátlásával.

Az MMP-k szöveti inhibitorai (TIMP-ek), amelyek az MMP aktivitást szabályozzák, gyulladás során a fehérje szintjük lecsökken. A PARP gátlás képes megakadályozni a csökkenést és helyre állítani az egyensúlyt a TIMP-ek és az MMP-k között.

A PARP-1 az oxidatív energia metabolizmus transzkripciós szabályozásában

SIRT-ek – az élesztő sir2 (silent mating-type information regulation 2) homológjai - III-as típusú NAD^+ -függő hiszton deacetylázok osztályába tartoznak, amelyek kalórikus restriktió hatására indukálódnak és hatással vannak az öregedésre, a transzkripció szabályozására, stressz rezisztenciára és az energia felhasználás hatékonyságára egyaránt. Mindegyik esetben az intracelluláris NAD^+ szint indukálja a SIRT1 aktivitást. Az aktiváció során a SIRT1 olyan transzkripciós faktorokat köt meg és deacetylál, mint a PGC-1 és FOXO1. A deacetyláció aktiválja ezeket a transzkripciós faktorokat és rajtuk keresztül mitokondriális biogenezis indukciójához vezet vázizomban, májban, barna zsírszövetben és agyban. Ezekben a szövetekben a zsírégetés, a glükolízis, glükoneogenezis megemelkedik. Továbbá vázizomban a SIRT1 aktiváció izomrost izotípus váltáshoz vezet, ami az I-es típusú izomrostok (oxidatívok, sok mitokondiumot tartalmaznak) számának a növekedéséhez vezet.

A SIRT1 aktivitása során NAD^+ -ot használ, emiatt a SIRT1 közvetlenül a sejtek energia állapotát érzékeli, az intracelluláris NAD^+/NADH arány változásán keresztül. A PARP-1 és a SIRT1 úgy néz ki, hogy kölcsönhat a közös NAD^+ szubsztrátért való versengésen keresztül. Fontos megemlíteni, hogy a PARP-1 gyorsabb és hatékonyabb NAD^+ fogyasztó, mint a SIRT1. Ebből következik, hogy a PARP-1 aktivitása hatással lehet a gének transzkripciójára a SIRT1 aktivitás módosításán keresztül. PARP-1 és -2 egy alap PARP aktivitással rendelkeznek, amely a mitokondriális oxidatív metabolizmusból származó folyamatos oxidatív stressz hatására inicializálódik. Ezért ezek a PARP enzimek folyamatosan

NAD⁺-ot használnak még fiziológias körülmények között is. Újabb kutatások szerint a NAD⁺ módosításán keresztül a PARP-1 hatással lehet más NAD⁺-függő enzimekre is, úgymint a SIRT1-re.

Célkitzés

PARP-1-ről már korábban bizonyították, hogy több szinten is hatással van a transzkripcióra és az oxidatív stresszre. Vizsgálataink során a PARP-1 depléció transzkripcióra kifejtett hatását kívántuk vizsgálni különböző modellekben. Elsőként az oxazolon indukált hiperszenzitivitási reakciót vizsgáltuk. Ebben a modelben már korábban kimutattuk a PARP aktiváció és az oxidatív stressz kiemelkedő szerepét. Azonban a pontos molekuláris mechanizmus illetve hogy a PARP-1 vagy -2 a felelős a gyulladásért, egyelőre még nem ismert. Másrészt azt vizsgáltuk, hogy a PARP-1 szerepet játszik-e az oxidatív metabolizmusban és a SIRT1 aktiváció szabályozásában. Ahogyan már a bevezetőben is utaltunk rá a PARP-1 és SIRT1 kölcsönhatására vannak adatok, azonban a lehetséges metabolikus hatások még nem ismertek.

Céljaink a következők voltak:

I. A PARP-1 szerepének vizsgálata kontakt hiperszenzitivitásban:

- Meghatározni a PARP-1 and -2 a szerepét az oxazolon indukált CHS-ben.
- Az oxidatív stressz jellemzése az oxazolon indukált CHS-ben.
- Transzkripciós változások jellemzése az oxazolon indukált CHS során.

II. A PARP-1 csendesítése vagy gátlása okozta transzkripciós változások vizsgálata:

- vázizomban, barna zsírszövetben, májban
- egér embrionális fibroblasztokban,
- PARP-1 farmakológiai gátlása PJ34 felhasználásával.

Anyagok és Módszerek

Állatkísérletek

Az állat kísérleteket a helyi eitkai bizottság által jóváhagyott engedéllye (9/2008/DE MÁB) végeztük.

Az oxazonon indukálta kontakt hiperszenzitivitási reakciót homozigóta PARP-1 és PARP-2 géncsendesített (KO) és a megfelelő vad típusú (VT) egereken kiviteleztük. A n stény egereket 4 csoportba osztottuk (VT nem-szenzitivizált, VT-szenzitivizált, KO nem-szenzitivizált, KO szenzitivizált).

A PMA indukálta irritatív dermatitis modelben a PMA-t (10 µl, 0.05% w/v) n stény egerek (csoportonként 6 egér) füleinek mindkét oldalát kentük. A fülvastagodás mérését és további biokémiai méréseinket 24 órával az elicitációt követ en végeztük.

A metabolikus vizsgálataink során a hím PARP-1^{+/+} és PARP-1^{-/-} egereket ad libitum módon használtuk. Az egerek ad libitum kapták a vizet és táplálékot (10 kcal% of fat, Safe, Augy, France).

PJ34 kezelés esetében, ez egerek 12 óránként kaptak 10 mg/kg PJ34 intraperitoneálisan 5 napon keresztül. Az állatokat minden kísérlet végén CO₂-dal vagy cervikális diszlokációval öltük meg 6 óra éhezést követ en (melyet reggel 8:00-kor kezdtük), majd a szöveteket mindegyes alkalommal ugyanabban az id intervallumban gy jtöttük be (délután 14:00 és 15:00 között).

Egér embrionális fibroblasztok preparálása

PARP-1^{+/+} egerek keresztezését követ en a vemhes állatokat a párosodást követ 13 napon cervikális diszlokációval megöltük. Eltávolítottuk az állatok embrióval teli méhét aztán az embriókat feldaraboltuk, majd trypsin-EDTA-vál emésztettük ket. A szövet darabkákat petricsészékbe helyeztük, amelyekb l csak a fibroblast sejtek tapadtak ki.

Szövettan és mikroszkópia

Haematoxilin-eozin (HE), és a különböző hisztokémiai reakciókat (nitrotirozin (Sigma), neutrofil elasztáz (Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA) és PAR elleni antitesteket használtunk (BD Biosciences, San Jose, CA, USA)) 7 µm-es szöveti metszeteken végeztük el.

Mieloperoxidáz aktivitásmérés

Mieloperoxidáz aktivitást (MPO) fülhomogenizátumokban végeztük tetrametilbenzidin és hidrogén peroxidáz felhasználásával.

MMP aktivitásmérés

MMP aktivitást fül fehérje extraktumában végeztük fluorescens festékkel jelölt zselatinnal (DQ gelatine, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

8-OHdG meghatározás

8-OHdG meghatározáshoz a Cell Biolabs által forgalmazott kit-et használtuk (San Diego, CA, USA).

Protein karbonil mérés

Protein karbonil méréshez a Cayman Chemicals által forgalmazott kit-et használtuk (Ann Harbour, MI, USA).

Lipid peroxidáció mérése

Lipid peroxidáció méréséhez a Cell Biolabs által forgalmazott kit-et használtuk (San Diego, CA, USA).

RNS preparálás, reverz transzkripció és qPCR

RNS preparáláshoz TRIzol reagenst használtunk (Invitrogen), az így preparált RNS-ből cDNS-t készítettünk. A cDNS mintákat 10x hígításban használtuk kvantitatív PCR (qPCR) reakcióban.

Transzkripciós faktor transzaktivációs vizsgálat

A magi fehérjekivonatokat a Transfactor Extraction kit (Clontech, Mountain View, CA, USA) segítségével készítettük el. A transzkripciós faktorok transzaktivációjának méréséhez a TransFactor Inflammatory Profiling-1 kit-et (Clontech) használtuk. A meghatározáshoz 10 µg sejtmagi fehérje extraktumot használtunk.

mtDNS analízis

A mitokondriális DNS-t qPCR reakcióban határoztuk meg.

Statisztiaki analízis

Eredményeinket \pm SEM fejeztük ki. A statisztikai szignifikanciát a csoportok között a Student t-póbával határoztuk meg, $p < 0.05$ jelenti a szignifikáns különbséget. A szórásokat \pm SEM tüntettük fel.

Eredmények és megbeszélésük

Számos tanulmány bizonyította már a PARP-1 fontos szerepét a transzkripció szabályozásában. Célunk az volt, hogy tisztázzuk a PARP-1 transzkripció szerepét a gyulladásos folyamataiban és a SIRT1-függő gének transzkripciójában.

A PARP-1 szerepe oxazolon indukálta kontakt hiperszenzitivitási reakcióban

Az oxazolon indukálta kontakt hiperszenzitivitási reakció jellemzése PARP-1^{-/-} és PARP2^{-/-} egerekben

Oxazolon kezelést követően az első jól mérhető fizikai paramétere a CHS-nek a fülvastagodás, amely az ödéma mértékét jelzi. A fülvastagodást az OXA kezelést követően 24 óra elteltével határoztuk meg. Az OXA kezelt PARP-1^{+/+} egerek füle vastagabb volt, mint a hordozó-anyaggal kezelt állatok esetében, míg az OXA indukált PARP-1^{-/-} egereknek a füle szignifikánsan kevésbé vastagodott. Ellentétben a PARP-2 egerknél nem tapasztaltunk szignifikáns változást a kezelt csoportok között.

A neutrofil infiltráció jellemzője a mieloperoxidáz aktivitás, amely könnyen mérhető és felhasználható az infiltráció mértékének a jellemzésére. PARP-1^{-/-} egerekben az MPO aktivitás csökkent, ugyanakkor a PARP-2^{-/-} egerekben nem tapasztaltunk változást. A PARP-1^{-/-} fenotípus esetén a védelem mértéke hasonló volt a PARP inhibitor (PJ34) esetében tapasztaltakhoz. A szövettani vizsgálatok az OXA kezelt PARP-1^{-/-} egerekben csökkent inflammatorikus sejt infiltrációt mutatott, mely hasonló volt a fülvastagodás során kapott eredményeinkhez és az MPO aktivitáshoz. Sejtspecifikus markereket használva felfedeztünk neutrofil infiltrációt figyeltünk meg.

Az Oxazolon erős irritatív tulajdonságokkal rendelkezik, ezért irritatív dermatitis modellben vizsgáltuk a PARP-1 esetleges védő hatását. Hasonlóan korábbi megfigyeléseinkhez, amikor PJ34-gyel gátoljuk a PARP-kat, a PARP-1^{-/-} egerek szintén részleges védettséget mutattak a PMA indukálta irritatív dermatitis ellen. Ezzel ellentétben a PARP-2 genetikai csendesítése nem volt hatással az irritatív dermatitis mértékére. Úgy tűnik, mind az irritatív, mind az immunológiai komponensre hat a PARP-1 hiánya. Mivel azt az eredményeket kaptuk, hogy a PARP-2-nek nincs funkcionális szerepe sem a CHS-ben, sem

pedig az irritatív dermatitis modellben ezért a további vizsgálatainkból kizártuk a PARP-2 egereket

A PARP-1^{-/-} egerekben csökken az oxidatív/nitrozatív stressz

A leukocita infiltráció általában ROS és RNS termelésével párosul. Ezek a szabad gyökök redox szenzitív transzkripciós faktorokat befolyásolnak, amelyek arra ösztönöztek minket, hogy megvizsgáljuk az oxidatív stresszt és az ahhoz kapcsolódó biokémiai eseményeket OXA indukált CHS-ben.

Meghatároztuk a NOS enzimek expresszióját. Mind az eNOS, mind az iNOS izoforma expresszálódik alacsony szinten a fülben, azonban csak az iNOS indukálódik OXA kezelés hatására, s t az iNOS aktiváció alacsonyabb a PARP-1^{-/-} egerekben. Az iNOS t nik a f NO forrásnak a model rendszerünkben, amely megegyezik mások által megfigyelt eredményekkel más gyulladási folyamatokban. A nitrozatív stressz egy másik jellegzetessége a fehérjék tirozin oldalláncainak a nitrálása, amely kimutatható volt a vad típusú egyedekben, míg a PARP-1^{-/-} egerekben alacsonyabb mérték volt.

A nitrozatív stressz markáns reaktív oxigén gyöktermeléssel társul. CHS-ben a megemlekedett ROS szintet emelkedett lipid, fehérje és DNS bázis oxidáció jellemzi, amelyek csökkent mérték ek PARP-1^{-/-} egerekben.

Az oxidatív és nitrozatív stressz DNS törést indukálhat és ez által PARP aktivációt. Ezért megvizsgáltuk a DNS törést TUNEL módszerrel. A DNS törések PARP-1^{+/+} egerek keratinocitáiban, endotél sejtjeiben és leukocitáiban jelentek meg, míg a PARP-1^{-/-} mintákban jelent sen kevesebb volt a TUNEL pozitív sejtek száma. A DNS törések PARP-1 aktivációhoz vezetnek, ez PAR megjelenését eredményezi, amely hasonló mintázatot mutatott, mint a DNS törés.

A PARP-1 mediált gén expresszió OXA indukált CHS-ben

A polimorfonukleáris sejtek infiltrációja proinflammatorikus citokinek és kemokinek megjelenésével társul. A CHS reakció során MIP-1 , MIP-2, IL-1 , MCP-1 és TNF gének expresszióinak az indukcióját tapasztaltuk, amely jelent sen alacsonyabb volt a PARP-1^{-/-} egerekben. Továbbá hasonló változásokat tapasztaltunk különböző sejtadhéziós molekulák expressziójában is, úgymint az I-CAM, az L-CAM, a V-CAM és az E-Selectin.

OXA kezelés hatására MMP-9 aktivációt is tapasztaltunk PARP-1^{+/+} egerekben, ami csökkent a PARP-1^{-/-} állatokban. A szöveti inhibitor metalloproteináz-2 expressziója – ami ellensúlyozza az MMP aktivitást – csökkent a PARP-1^{+/+} egerekben, ami hozzájárulhat a nagyobb MMP aktivitáshoz. Ezzel szemben PARP-1^{-/-} egerekben a TIMP-2 expresszió nem csökkent.

Az iNOS, kemokinek, adhéziós faktorok, MMP-9 és a TIMP2 összehangolt változásai arra utaltak, hogy gén expressziós szinten közösen reuglálódnak. A PARP-1 nagyon sokféle transzkripciós faktoral lép kölcsönhatásba és módosítja azok aktivitását, ezáltal a gén expressziót is. Ezért több különböző transzkripciós faktor aktivációját vizsgáltuk meg a mintáinkban. Két redox szenzitív transzkripciós faktor estében találtunk er s aktivációt a PARP-1^{+/+} egerekben OXA kezelés hatására, a p65, amely az NF- B család tagja és az ATF-2 esetében. A p65 aktivációja PARP-1^{-/-} egerekben elmarad, míg az ATF-2 aktivitás csak kismértékben csökkent a PARP-1^{-/-} egerekben.

A defektív p65 aktiváció összhangban van számos NF- B célgén csökkent expressziójával ilyenek az iNOS, adhéziós faktorok és a citokinek. A közvetlen molekuláris kölcsönhatás a PARP-1 és az NF- B között már bizonyított más modellekben. Azonban a pontos molekuláris mechanizmus, amelyen keresztül a PARP-1 befolyásolja az NF- B-t még nem tisztázott. Úgy t nik, hogy a PARP-1 az NF- B DNS-kötésén keresztül befolyásolja az NF- B transzaktivációt de az nyitott kérdés, hogy a PARP-1 aktiváció dönt -e az NF- B transzkripciós aktivitásában.

A DNS törés is hozzájárulhat a transzkripció szabályozásához a PARP-1-en keresztül. Az ösztrogén receptor (ER) esetében igazolták, hogy az aktivációja DNS törések képz déséhez vezet. Ezek a DNS törések javításra szorulnak, hogy az ER-kapcsolt transzkripció megfelelő en m ködjön. A PARP-1 aktiváció dönt folyamat ezen törések javításában. Ezért elképzelhet , hogy hasonló mechanizmus szintén szerepet játszhat az NF- B és ATF-2 aktivációjában.

A PARP-1-nek központi szerepe van az oxidatív stressz szabályozásában a CHS elicitációs fázisában, és a gátlása vagy genetikai csendesítése megakadályozza a gyulladásnak ezt az öngerjeszt képz dését. Összességében, ezek az eredmények a PARP inhibitorok lehetséges terápiás alkalmazhatóságát támogatják CHS-ben.

A PARP-1 SIRT1 kölcsönhatás révén kialakuló transzkripciós változások hatása

PARP-1^{-/-} egerek barna zsírszövetében és vázizomzatában indukálódik az oxidatív metabolizmus génjeinek az expressziója.

Több kutató csoport igazolta a kapcsolatot a SIRT1 és PARP-1 között, amelyekben a SIRT1 aktiváció gátolja a PARP-1 aktivitását. Az élettani megfigyelések azt mutatták, hogy a PARP-1^{-/-} egerekben oxidatív metabolizmus indukálódik, magasabb az oxigénfogyasztásuk, kevesebb fehér zsírszövettel rendelkeznek, jobb a glükóz toleranciájuk és alacsonyabb éhomi vér glükóz szinttel rendelkeznek annak ellenére, hogy hasonló inzulin szinttel rendelkeznek, mint a PARP-1^{+/+} egerek. Ezeket a megfigyeléseket a magas zsírtartalmú táplálékon tartott állatokon végzett megfigyelések is alátámasztották.

Mivel a PARP-1 jelentős NAD⁺ fogyasztó ezért úgy gondoltuk, hogy a PARP-1 hiánya megnövelheti a sejtek NAD⁺ tartalmát aktiválva a SIRT1-et, ami magyarázhatja a fent említett változásokat. Ahhoz, hogy betekintést nyerjünk ezekbe a változásokba megvizsgáltuk a SIRT1 aktivációra reagáló gének expresszióját *in vivo* és sejtes modellben. A PARP-1^{-/-} egerek barna zsírszövetében megnőtt a mitokondriumok száma. A PARP-1^{-/-} egerekben ezzel az emelkedett mitokondriális számmal összhangban nőtt a mitokondriális uncoupling (UCP1 and UCP3), a zsírsav oxidáció (MCAD) és a respirációs (Ndufa2, Ndufa3, Ndufb5, Cyt C, COX17 és Deiodinase-2 (Dio2) gének expressziója. Az izomrost izotípus gének (Troponin I (Trop I), Myosin heavy chain I (MHCI) expressziós analízise növekedést mutatott az oxidatív izomrostok számában.

Megvizsgáltuk több gén expresszióját a májban: ERR α , PPAR α , PGC-1 α , SREBP1, Ndufa2, Ndufa3, cyt c, ATP5g1, MCAD, ACO, ACC1, ACC2, malic enzyme, PEPCCK, GK and G6Pase. A metabolikus gének expressziójában tapasztalt szignifikáns változás hiánya arra utalt, hogy a PARP-1 hiánya csak kicsiny metabolikus hatással rendelkezik a májban, amit magyarázhat az, hogy a májban expresszálódik a legalacsonyabb szinten a PARP-1 összehasonlítva a vázizmokkal és a BAT-tel.

Csökkent PARP-1 expresszió mellett egér embrionális fibroblasztokban megn az oxidatív metabolizmus.

In vivo megfigyeléseinket igazolandó kíváncsiak voltunk, hogy a PARP-1 aktivitás csökkenése a MEF-ban hasonló változásokat okoz-e az oxidatív metabolizmusban. A PARP expresszió hiánya a MEF sejtekben teljesen azonos expressziós változásokat mutatott az *in vivo* eredményeinkkel a PGC-1 , Ndufb5, Cyt C, COX17, UCP-2, mCPT-1 és ACO gének esetében.

A PARP aktivitás farmakológiai gátlása er sítí az oxidatív metabolizmust a SIRT1-en keresztül.

Mivel a PARP-1 ablációja növeli a SIRT1 kapcsolt gének expresszióját felvet dött, hogy a PARP-1 farmakológiai gátlása okozhat-e hasonló változást. Az egereket PJ34-gyel (10 mg/kg) kezeltük 5 napon keresztül. A vázizomban PJ34 hatására megn tt a mitokondriális gének expressziója (Ndufa2, Ndufb5, UCP2 and UCP3), ami emelkedett mioglobin expresszióval társult. Ezek az adatok azt mutatják, hogy a PJ34 kezelés a PARP-1 géncsendesítés által indukált oxidatív tulajdonságokhoz hasonló fenotípust hoz létre.

Kísérleti eredményeink alátámasztják azt az elméleti feltevést, miszerint a PARP-1 deléció a NAD^+ tartalom növekedésén keresztül növeli és lehetővé teszi a SIRT1 aktivációt. Továbbá az eredményeink azt is jelzik, hogy a kölcsönhatás a két fehérje között farmakológiailag felhasználható metabolikus betegségek kezelésében. Mivel sok SIRT1 szubsztrát, például PGC-1 , FOXO-k vagy p53 nagy jelent séggel bíró metabolikus szabályozó faktorok ezért nem meglep , hogy a megnöveked NAD^+ -szint és SIRT1 megnöveli a mitokondriális biogenezist és az oxidatív metabolizmust. Ily módon a SIRT1 aktiváció modulálásával a PARP-1 közvetett szerepet játszik a sejt energia homeosztázisáért felel s gének expressziójának a szabályozásában.

A kölcsönhatás a PARP-1 és SIRT1 között számos egyéb területre is hatással lehet, ilyen például a cirkadián ritmus, a sejtproliferáció vagy az élethossz, amelyek további kutatások alapjait képezhetik.

Következtetések

A PARP-1 szerepe oxazolon indukálta kontakt hiperszenzitivitásban

1. A PARP-1 a f^{c} szabályozó a CHS-ben.
2. A PARP-1 kiemelkedő szerepet játszik a ROS/RNS termelésben a CHS során.
3. A PARP-1 az NF- κ B és az ATF-2 (redox szenzitív transzkripció faktorokon) keresztül szabályozza a gyulladási folyamatot a CHS során.

A PARP-1 SIRT1 kölcsönhatás révén kialakuló transzkripció változások hatása

1. Vázizomban a PARP-1 depléciónövel a sejt NAD^+ tartalmát, amely megnövekedett SIRT1 aktivációval társul és izomrost izotípú váltást okoz.
2. Barna zsírszövetben a PARP-1 depléciónövel a sejt NAD^+ tartalmát, ami emelkedett mitokondriális biogenezist és SIRT1 aktivációt okoz.
3. Májban a PARP-1 csendesítés nem okozott változást a gén expresszióban.
4. *In vivo* gén expressziós vizsgálatainkat *in vitro* is megismételtük MEF-ekben.
5. A PARP-1 farmakológiai gátlása a PARP-1 szomatikus depléciójához hasonló fenotípust alakít ki.

Referenciák



DEBRECENI EGYETEM EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR
KENÉZY ÉLETTUDOMÁNYI KÖNYVTÁRA

Iktatószám: DEENKÉTK /55/2011.
Tételszám:
Tárgy: Ph.D. publikációs lista

Jelölt: Brunyánszki Attila

Neptun kód: I0M0PN

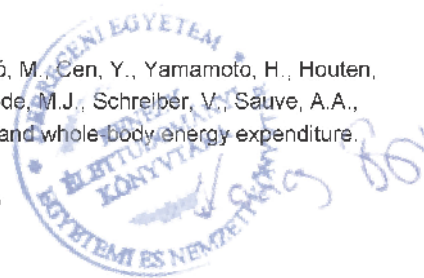
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Bai, P., Cantó, C., Oudart, H., **Brunyánszki, A.**, Cen, Y., Thomas, C., Yamamoto, H., Huber, A., Kiss, B., Houtkooper, R.H., Schoonjans, K., Schreiber, V., Sauve, A.A., Menissier-de, M.J., Auwerx, J.: PARP-1 inhibition increases mitochondrial metabolism through SIRT1 activation.
Cell Metab. 13 (4), 461-468, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2011.03.004>
IF:17.35 (2009)
2. **Brunyánszki, A.**, Hegedüs, 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. Investigative Dermatology. 130 (11), 2629-2637, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/jid.2010.190>
IF:5.543 (2009)

További Közlemények

3. 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.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2011.03.013>
IF:17.35 (2009)



4. Bai, P., Hegedűs, C., Szabó, É., Gyüre, L., Bakondi, E., **Brunyánszki, A.**, Gergely, S., Szabó, C., Virág, L.: Poly(ADP-ribose) polymerase mediates inflammation in a mouse model of contact hypersensitivity.
J. Invest. Dermatol. 129 (1), 234-238, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/jid.2008.196>
IF:5.543
5. Juhász, L., Docsa, T., **Brunyánszki, A.**, Gergely, P., Antus, S.: Synthesis and glycogen phosphorylase inhibitor activity of 2,3-dihydrobenzo[1,4]dioxin derivatives.
Bioorg. Med. Chem. 15 (12), 4048-4056, 2007.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2007.03.084>
IF:2.662
6. Bentlifa, M., Vidal, S., Fenet, B., Msaddek, M., Goekjian, P.G., Praly, J.P., **Brunyánszki, A.**, Docsa, T., Gergely, P.: In search of glycogen phosphorylase inhibitors:5-substituted 3-C-glucopyranosyl-1,2,4-oxadiazoles from beta-D-glucopyranosyl cyanides upon cyclization of O-acylamidoxime intermediates.
European J. Org. Chem. 2006 (18), 4242-4256, 2006.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/ejoc.200600073>
IF:2.769
7. Györgydeák, Z., Hadady, Z., Felföldi, N., Krakomperger, A., Nagy, V., Tóth, M., **Brunyánszki, A.**, Docsa, T., Gergely, P., Somsák, L.: Synthesis of N-(beta-D-glucopyranosyl)- and N-(2-acetamido-2-deoxy-beta-D-glucopyranosyl) amides as inhibitors of glycogen phosphorylase.
Bioorg. Med. Chem. 12 (18), 4861-4870, 2004.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2004.07.013>
IF:2.018

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

Debrecen, 2011.05.03

