dc_792_13

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS

POLI(ADP-RIBÓZ) POLIMERÁZ-1 ÉS 2 ENZIMEK SZEREPE METABOLIKUS TRANSZKRIPCIÓS FAKTOROK SZABÁLYOZÁSÁBAN

BAY PÉTER

DEBRECENI EGYETEM, ÁOK, ORVOSI VEGYTANI INTÉZET

2013.

1. Bevezetés

1.1 A poli(ADP-ribóz) polimeráz enzimek biokémiai jellemzése

A poli(ADP-ribóz) polimeráz (PARP) aktivitást Pierre Chambon és munkatársai írták le 1963-ban (Chambon és mtsai, 1963), majd a PARP-1 enzimet, amely az aktivitás jelentős részéért felelős, 1967-ben Shimizu és munkatársai jellemezték (Shimizu és mtsai, 1967). A PARP enzimek több doménből álló, multidomén fehérjék. Az értekezésben a PARP-1 és a PARP-2 enzimekkel foglalkozom. Mindkét enzim N-terminálisán a DNS kötéséhez szükséges szerkezeti elemeket találunk: a PARP-1-ben két cink ujj (a harmadik cink ujj motívum a dimerizációhoz szükséges), míg a PARP-2-ben egy SAP domén segíti a DNS-sel történő kölcsönhatást (Ame és mtsai, 1999, Schreiber és mtsai, 2006). Ezt mindkét enzim esetében fehérje–fehérje kölcsönhatások kialakítására alkalmas domének követik, mint a BRCT domén a PARP-1-ben (Schreiber és mtsai, 2006). PARP-2-ben az analóg szakaszon belül egyelőre nem írtak le ismert szerkezetű domén(eke)t. A PARP-1 és PARP-2 lokalizációját nukleáris és nukleoláris lokalizációs szignálok biztosítják (Schreiber és mtsai, 2006).

A PARP-1 és a PARP-2 C-terminálisán található a PARP enzimekre jellemző katalitikus domén. Mindkét enzim NAD^+-ot bont nikotinamidra (NAM) és ADP-ribózra (ADPR), majd a két enzim az ADPR monomerekből elágazó polimereket épít különböző akceptor fehérjékre (Schreiber és mtsai, 2006). A PARP-1 és a PARP-2 által létrehozott polimerek hosszúak lehetnek, akár 200 ADPR egység is alkothatja. A klasszikus elképzelés szerint a PARP-1 és -2 a DNS törésekhez kötődve aktiválódik (Altmeyer és mtsai, 2009). A PARP aktivitás nagy részéért (a sejt teljes alap és indukált PARP aktivitásának 85-90%-a) a PARP-1, míg a maradékért gyakorlatilag a PARP-2 felelős (Schreiber és mtsai, 2002). Ennek megfelelően, amikor

PARP aktivációról van szó, akkor sejtek össz-PARP aktivitását értem alatta (tulajdonképpen PARP-1 + PARP-2), míg a PARP-1, vagy PARP-2 gátlás az adott gén megszakítása során a PARP aktivitásban fellépő változásokra utal.

A PAR polimerek életciklusa rövid, a féléletidejét 1 perc körülinek fogadja el az irodalom (Schreiber és mtsai, 2006). A PAR lebontásáért a poli(ADP-ribóz) glikohidroláz (PARG) és az ADP-ribozil liáz felelős (Kawaichi és mtsai, 1983, Ueda és mtsai, 1972). A PAR épülhet a PARP-1, vagy a PARP-2 enzimre (autoPARiláció), illetve más fehérjékre (transzPARiláció). Az autoPARiláció gátolja a PARP-1-et és valószínűleg a PARP-2-t is, így visszacsatolási kört alakít ki, ami megakadályozza a túlzott PARP aktivációt. A PARP-1 autoPARilációjának meghatározása jó közelítéssel jellemzi a sejt vagy szövet teljes PARP aktivitását. A transzPARiláció a célfehérjék biológiai, biokémiai aktivitását befolyásolja (Schreiber és mtsai, 2006).

A klasszikus DNS törés mellett poszttranszlációs módosítások és különböző jelátviteli útvonalak is befolyásolják a sejtek PARP aktivitását. Ezek közül a később bemutatásra kerülő adatok értelmezéséhez a legfontosabb, hogy a PARP-1 acetilált fehérje, a p300/CBP-association factor (PCAF) és a p300 acetilálja, és acetilált formában aktív (Hassa és mtsai, 2005).

1.2 A PARP enzimek által befolyásolt biológiai folyamatok

Elsőként a PARP enzimek a PARP-1, majd később a PARP-2 és -3 DNS hibajavításban játszott szerepét ismerték fel (De Vos és mtsai, 2012). Jelenlegi ismereteink szerint a PARP-1 és -2 enzimek bár nem eszenciálisak a DNS hibajavítás megindulásához genotoxikus stressz (pl.

gyökök jelenléte, ionizáló sugárzás, stb.) esetén, de szükségesek a hatékony hibajavításhoz. A PAR polimerek kijelölik a DNS károsodás helyét és a DNS repair fehérjék számára kapcsolódási felszínt biztosítanak. A PARP-1 és a PARP-2 enzim szerepét leírták az egyszálú és kétszálú törések javításában, illetve a báziskihasítással járó javítási folyamatokban (De Vos és mtsai, 2012).

A PARP aktiváció mértéke befolyásolja a sejtek további sorsát. Amennyiben a DNS sérülése javítható a PARP aktiváció hozzájárul az hatékony DNS hibajavításhoz. Amennyiben a DNS sérülés nagymértékű a túlzott PARP aktiváció elhasználja a sejtek NAD^+ készletét és a NAD^+ újraszintézise pedig az ATP készletet meríti ki. Mivel az apoptózis sikeres végrehajtásához szükséges a sejtek normális energiatöltöttsége, ezért az energetikai katasztrófa állapotában lévő sejtekben az apoptózis nem megy végbe, így ezek a sejtek nekrózissal pusztulnak el. A PARP aktivitás gátlása megakadályozza az energetikai krízis kialakulását (Virag és Szabo, 2002).

A PARP-1 és a PARP-2 enzim több ponton is befolyásolja a génexpressziót. A PAR polimerek módosíthatják a kromatinszerkezetet és így a DNS hozzáférhetőségét. A PARP-1 és a PARP-2 transzkripciós kofaktorként enhanszer, promóter és inzulátor elemekhez kapcsolódhatnak és összetett génexpressziós változásokat okozhatnak (Kraus, 2008). A PARP enzimek és a transzkripció kapcsolatában több a megválaszolatlan kérdés. Nem ismert, hogy a PARP enzimek transzkripciós kofaktor funkciójához szükséges-e az enzimatikus aktivitás.

Az előbbiekben leírt folyamatok egyszerre jelennek meg különböző élettani és kórélettani folyamatokban (pl. gyulladásos folyamatok, vagy a gyök közvetítette események). A PARP-1 deléciója vagy PARP inhibitor

kezelés védelmet nyújt az oxidatív stresszel jellemezhető betegségek ellen (Virag és Szabo, 2002). A PARP-2 deléciója ezzel szemben csak részleges védelmet nyújt hasonló kórképekben eddig ismeretlen hatásmechnizmussal (Kofler és mtsai, 2006). A PARP-mediált citotoxicitással jellemezhető betegségek száma jelentős. Etiológiájukat tekintve vegyesek, gyakoriak köztük a gyulladásos betegségek vagy egyes gyógyszerek (pl. citosztatikumok) mellékhatásaként jelentkezik a PARP aktiváció. Ilyen citosztatikum például a kísérleteinkben alkalmazott doxorubicin (DOX), ami antraciklin típusú citosztatikum. A mitokondriális elektrontranszport lánc a DOX-ot részlegesen szemikinonná redukálja, a mitokondriumból kikerülő szemikinon kinonná oxidálódik, az elektront a környezetébe leadja és így szabadgyököket generál (Davies és Doroshow, 1986, Doroshow és Davies, 1986). A szabadgyökök DNS szálak töréséhez és a PARP-1 aktivációjához vezetnek, ami több útvonalon (pl. a mitokondriális funkció károsítása) keresztül a kardiomiociták, az erek simaizmai, illetve az endotél sejtek diszfunkcióját eredményezik (Davies és Doroshow, 1986, Doroshow és Davies, 1986).

1.3. A poli(ADP-ribóz) polimeráz enzimek metabolikus szerepe

A PARP-1 és a PARP-2 enzimek metabolizmust szabályzó szerepe több elemi jelenségre vezethető vissza.

1.3.1 A PARP aktiváció akut metabolikus hatásai és a mitokondriális poli(ADP-ribozil)áció

Nagymértékű, akut genotoxikus stressz a DNS-függő PARP enzimek aktiválásán keresztül a sejtek NAD^+ szintjének drasztikus csökkenéséhez, és következményesen az ATP szint csökkenéséhez vezet (Virag és Szabo,

2002). Ezen felül NAD^+ hiányában lelassul a glikolízis asztrocitákban, májban, vesékben és a központi idegrendszerben (Ying és mtsai, 2002).

A PARP-1 aktiváció rontja a mitokondriális funkciót, bár jelenleg nem tudjuk pontosan meghatározni, hogy ez a NAD^+ szint csökkenéséből, a glikolízis lassulásából, vagy a PARP-1 valamilyen direkt hatásából adódik. A PARP-1 expresszió és aktivitás fordított arányosságot mutat a mitokondriális I, II, III és IV komplexek aktivitásával (Canuelo és mtsai, 2011, Klaidman és mtsai, 2003). A PARG bizonyos izoformái és az ADP-ribozilhidroláz-3 (ARH3) jelen vannak a mitokondriumban (Niere és mtsai, 2008). Vagyis a PARilációs ciklusból a PAR-t eltávolító enzimek megtalálhatóak a mitokondriumban, azonban a PAR-t szintetizáló enzim(ek)et nem tudtak minden kétséget kizáró módon kimutatni. Nem egyértelműek az akceptor fehérjékre vonatkozó eredmények sem, mert a preparálás során aktív, magi PARP-okkal kerülhetnek kapcsolatba a mitokondriális fehérjék (Lai és mtsai, 2008). Niere és munkatársai (Niere és mtsai, 2008) egy mesterséges, rövidített PARP fehérjeláncot és mitokondriális lokalizációs szignált tartalmazó konstrukt segítségével kimutatták, hogy a PARP aktivitás növelése a mitokondriumban a mitokondriális funkció zavarához vezetett, a glikolítikus fluxus változása nélkül. A mesterségesen indukált mitokondriális PARiláció csökkenti a mitokondriális aktivitást, vagyis ha létezik mitokondriális PARiláció, annak mindenképpen jelentős hatása van a mitokondriális aktivitás szabályzására.

1.3.2. PARP enzimek és metabolikus másodlagos jelátvieli útvonalak kölcsönhatásai

A PARP-1 aktivitás összefüggést mutat az AMP-aktivált kináz (AMPK) (Walker és mtsai, 2006)és az mTOR (mammalian Target Of Rapamycin)

útvonallal (Munoz-Gamez és mtsai, 2009), melyek közül az AMPK-val fogunk részletesen foglalkozni. Az AMPK több alegységből álló kináz, amely képes a sejtek energiatöltöttségének érzékelésére. Az ATP/AMP arány csökkenése, azaz növekvő AMP koncentráció az AMPK aktivációjához vezet, ami fokozza a mitokondriális biogenezist. A PARP-1 és az AMPK egyrészt fizikai kölcsönhatásban van egymással. Másrészt, a két enzim aktivitása egymást potencírozó hatást mutat - az AMPK aktiváció növeli a PARP-1 aktivitását és fordítva.

1.3.3 A poli(ADP-ribóz) polimeráz enzimekkel kölcsönható metabolikus regulátorok: a peroxiszóma proliferátor aktivált receptor-γ (PPARγ)

A PARP-1 több magreceptorral is kölcsönhat (pl. retionoid X receptor, tiroid receptor vagy ösztrogén receptor) (Ju és mtsai, 2006, Miyamoto és mtsai, 1999). A magreceptor dimerek az egyes gének promótereiben található specifikus válaszadó szekvenciákhoz kapcsolódnak jellegzetes DNS-kötő doménjükkel (Francis és mtsai, 2003). A magreceptorokhoz nagyszámú kofaktor kapcsolódik, amelyek a magreceptorok ligandkötésétől függően kicserélhetőek. Ligand hiányában a magreceptorokhoz represszorok kapcsolódnak, míg a ligand bekötődése a represszorok leválását és koaktivátor molekulák kötődését okozza (Francis és mtsai, 2003). A magreceptorok aktivitásában bekövetkező változás a génexpressziós mintázat átrendeződéséhez vezet. A magreceptorok ligandjai gyakran hormonok, a metabolizmus közti termékei, vagy a táplálék bizonyos összetevői, vagyis a magreceptorok elősegítik a sejtek szövetek alkalmazkodását a metabolizmus, vagy a táplálékbevitel változásaihoz (Francis és mtsai, 2003).

A PPAR-ok közé tartozik a PPARα, a PPARβ/δ és a PPARγ receptorok tartoznak (Fajas és mtsai, 2001). Mindhárom receptor dimert alkot a retinoid X-receptorral (RXR). Bár mindhárom receptor szerteágazó metabolikus szereppel bír, a PPARα elsősorban a máj, a PPARβ/δ (a továbbiakban PPARδ) pedig a harántcsíkolt izmok lipid háztartását, míg a PPARγ (NR1C3) a fehér zsírszövet működését és differenciálódását szabályozza (Fajas és mtsai, 2001). A PPARγ-t kisméretű lipofil ligandok aktiválják, például a táplálékból, vagy metabolikus útvonalakból származó zsírsavak, vagy az antidiabetikus tiazolidindionok. A PPARγ-RXR dimer az energia, a lipid és a glükóz homeosztázist befolyásoló gének expresszióját szabályozza (Fajas és mtsai, 2001).

1.3.4 A poli(ADP-ribóz) polimeráz enzimekkel kölcsönható metabolikus regulátorok: a SIRT1

A sirtuin (SIRT) enzimek családjába 7 fehérje tartozik, közülük a legjobban a SIRT1 enzimet jellemezték. A SIRT1 egy NAD^+ függő, III. típusú deacetiláz enzim, amely a magreceptorok kofaktoraként működik. Az acetilcsoport lehasításával egyidőben az enzim egy NAD^+ molekulát elhasít ADP-ribózra és nikotinamidra, majd a lehasított acetilcsoportot az ADP-ribózhoz köti O-acetil-ADP-ribózt hozva létre (Canto és Auwerx, 2012). SIRT1 NAD^+-ra vonatkoztatott Km értéke a sejtek fiziológiás NAD^+ szintjéhez közel esik, vagyis valószínű, hogy a sejtek NAD^+ koncentrációjának változása szabályozza a SIRT1 enzim aktivitását (Canto és Auwerx, 2012). A SIRT1 aktiváció az éhezéshez való alkalmazkodás jellegzetes biokémiai története. A gyors, NAD^+-függő szabályozáson kívül a SIRT1 expressziója is követi a tápanyag ellátottságot. A SIRT1 promóterének aktivitását több transzkripciós faktor befolyásolja, melyek

közül éhezés során a CREB (cAMP response element binding protein), PPAR-ok, vagy a FOXO-k fokozzák a SIRT1 expressziót, míg a magas glükóz szint (megfelelő tápláltság) által aktivált faktorok, mint a ChREBP (carbohydrate response element binding protein) a SIRT1 expresszió negatív regulátorai (Noriega és mtsai, 2011).

A SIRT1 aktiváció a sejtek metabolikus adaptációját segíti elő stressz állapotokban a génexpresszió átalakításával. A SIRT1 számos transzkripciós faktor deacetilálására és aktiválására képes (pl. peroxisome proliferator activated receptor γ coactivator: PGC1α, PPAR-ok, sterol regulatory element binding protein (SREBP)-1, liver X receptor (LXR), FOXO-k, CREB, CREB regulated transcription coactivator-2 (CRTC2)) és ennek megfeleően a zsírsavak és a szénhidrátok oxidációját indukálja (Canto és Auwerx, 2012). Ebben a folyamatban központi szerepe van a mitokondriális biogenezis aktivációjának a májban, a BAT-ban (barna zsírszövetben) és a harántcsíkolt izomban. A harántcsíkolt izomban a SIRT1 aktiváció az oxidatív I. típusú (lassú), illetve IIa típusú rostok megjelenésének kedvez (Canto és Auwerx, 2012). A pankreász béta-sejtjeiben a SIRT1 overexpressziója a mitokondriális funkció ugrásszerű javulásához és az inzulin szekréció növekedéséhez vezet (Moynihan és mtsai, 2005).

1.3.5 A PARP enzimek ismert metabolikus funkciói

A legelső megfigyeléseket, amelyek a PARP enzimeket metabolikus folyamatokhoz kötötték, a fehér zsírszövet vizsgálata során tették. Janssen és Hilz (Janssen és Hilz, 1989) kimutatta, hogy 3T3-L1 preadipociták differenciálódás során PAR keletkezik. Amikor Zhao-Qi Wang és munkatársai 1995-ben elkészítették az első PARP-1 knockout egértörzset,

azt találták, hogy a PARP-1 deléciója a testsúly és a fehérzsír depók méretének növekedését okozta (Wang és mtsai, 1995). Smulson és munkatársai 3T3-L1 sejtek differenciációját vizsgálva kimutatta, hogy a PARP-1 aktivitása szükséges a sejtek megfelelő zsírsejt-irányú differenciációjához (Smulson és mtsai, 1995).

A PARP-1 túlaktiváció és a mitokondriális funkció romlása között az összefüggést Virág László és munkatársai tárták fel (Virag és mtsai, 1998), ez volt az első utalás arra, hogy a PARP-1 és a mitokondriális aktivitás között összefüggés van. Azonban sokáig a PARP-1 és a mitokondrium kapcsolatát egyirányúnak ismertük, ahol a PARP-1 aktiváció rontja a mitokondriális funkciót. A SIRT1 és a PARP-1 kapcsolatát - amelyet a disszertációban tárgyalni fogok - először Zhang (Zhang, 2003) vetette fel, majd azt, hogy a PARP-1 – SIRT1 kapcsolatnak lehet metabolikus vetülete először Asher és munkatársai mutatták ki (Asher és mtsai, 2010).

2. Célkitűzések

Munkánk során az alábbi kérdésekre kerestünk választ:

1. A PARP-1 enzim hogyan befolyásolja a metabolikus szervek, szövetek működését?
2. A PARP-2 enzim hogyan befolyásolja a metabolikus szervek, szövetek működését?
3. Képes védelmet nyújtani a PARP-2 deléciója oxidatív károsodás ellen?

3. Kísérleti módszerek áttekintése

3.1 *In vivo* kísérletek

A kísérletekben használt PARP-1$^{+/+}$ és PARP-1$^{-/-}$, illetve a PARP-2$^{+/+}$ és PARP-2$^{-/-}$ egerek heterozigóta keresztezésekből származtak, míg a farmakológiai kísérletekben (i.p. 10 mg/kg PJ34 BID, 5 napon át) C57Bl6 hím egereket használtam. Az állatok normál (chow) vagy magas zsírtartalmú táplálékot (60% hiperkalorikus diéta) kaptak. Az egerek 87,5% C57/Bl6J 12,5% SV126 háttéren voltak.

Az állatok táplálékfogyasztását és súlygyarapodását minden héten ugyanazon a napon mértük. Az egereken orális/intraperitoneális glükóztolerancia (ipGTT/OGTT), intraperitoneális inzulintolerancia (ipITT), az intraperitoneális piruvát tolerancia (ipPTT), euglikémiás-hiperinzulinémiás clamp, a hidegtolerancia és indirekt kalorimetria kísérleteket végeztünk el.

A kísérletben négy kohortot alakítottunk ki *PARP-2*$^{+/+}$ és *PARP-2*$^{-/-}$ kontroll (CTL), illetve *PARP-2*$^{+/+}$ és *PARP-2*$^{-/-}$ doxorubicin (DOX) kezelt csoportokat. A DOX kezelt állatok i.p. 25 mg/kg DOX-ot kaptak, majd az aortákat a kezelést követő 2. napon eltávolítottuk funkcionális és biokémiai vizsgálatok céljából. Az érfunkció vizsgálatokat izometrikus kontraktilis erőmérő apparátussal határoztuk meg.

3.2 Sejtes kísérletek

Kísérleteinkben PARP-1$^{+/+}$, PARP-1$^{-/-}$, PARP-2$^{+/+}$, PARP-2$^{-/-}$, SIRT1$^{+/+}$, SIRT1$^{-/-}$ primer embrionális fibroblasztokat (MEF-eket), 3T3-L1 preadipocitákat, HEK293T, scPARP-2, illetve shPARP-2 C2C12 mioblasztokat és scPARP2, illetve shPARP-2 MOVAS sejteket használtunk. A MEF sejtek zsírsejt irányú differenciációjához a MEF sejteket konfluenciáig növesztettük, majd differenciációs médiumot tettünk a sejtekre (DMEM (1 g/L glükóz) 10% NCS 5 μM troglitazone (TZD), 5 μM dexamethasone (Dex), 500 μM IBMX and 10 μg/ml inzulin), míg a kontroll sejtek 10% FCS DMEM (1 g/L glükóz) 0,21% DMSO médiumot kaptak. A médiumot két naponta cseréltük, a differenciáció nyolc napig tartott.

A C2C12 sejtek differenciációját DMEM-ben (4,5 g/l glükóz, 10% FCS) tartottuk fenn, differenciációjukat a szérumszint csökkentésével indítottuk be (2% ló szérum). A sejteket két nappal a differenciáció megindítása után kezeltük farmakológiai szerekkel.

3.3 Molekuláris biológiai és biokémiai módszerek

A transzaktiváció vizsgálata - A transzkripciós faktorok transzaktivációjának meghatározására luciferáz riporter esszét alkalmaztunk. A PPAR receptorok aktivitásának meghatározására HEK293T sejteket transzfektáltuk az egyes receptorokkal és egy mesterséges PPAR válaszadó konstrukttal. Az ösztrogén receptor β (ERβ) aktivitás meghatározása hasonló módon történt, HEK293T sejteket ERβ receptorral és ER válaszadó szekvenciát tartalmazó luciferáz konstrukttal történt. A SIRT1 promóter aktivitás meghatározására a SIRT1 deléciós mutánsokat tartalmazó luciferáz riporter konstruktokkal transzfektáltunk HEK293T és

MOVAS sejteket. A luciferáz aktivitást a β-galaktozidáz aktivitásra normalizáltuk.

Áramlási citometria - A differenciált MEF-eket nílusvörös festékkel festettük (20 µg/ml, 5 perc), majd a sejteket mostuk, tripszineztük és áramlási citometriai vizsgálatnak vetettük alá. A hidroetidin festéssel a sejtek szuperoxid termelését vizsgáltuk.

SDS-PAGE, Western blot - A sejteket, vagy szöveteket lízis pufferben (50 mM Tris, 100 mM KCl, 1 mM EDTA, 1% NP40, 5 mM NAM, 1 mM Na-butirát, proteáz inhibitor koktél (Sigma, 100x hígítás) pH 7,4) feltártuk, majd a fehérjéket SDS-PAGE eljárással elválasztottuk és nitrocellulóz membránra blotoltuk, elsődleges és másodlagos antitesttel kezeltük, majd ECL technikával előhívtuk.

Immunprecipitáció – A sejteket lízispufferben feltártuk, majd a lizátumokból immunprecipitáltuk anti-PGC1α, anti-FOXO1, anti-tubulin és anti-Ndufa9 antitesttel. A precipitátumot két részre osztottuk, SDS-PAGE-et és Western blotot hajtottunk végre, az egyik membránt anti-acetil-lizin antitesttel, míg a másikat az immunprecipitációhoz használt antitesttel hívtuk elő (az immunprecipitált fehérjére normalizáláshoz).

Sejtmag izolálás izomrostokból – A preparálást Edelman és mtsai (Edelman és mtsai, 1965)szerint végeztük el.

RT-qPCR és qPCR - Sejtekből és szövetekből teljes RNS-t Trizol reagenssel tisztítottunk, majd 2 µg RNS-t reverz transzkripcióval írtunk át cDNS-sé. A specifikus cDNS-ek mennyiségét hígítás után kvantitatív PCR-ral (qPCR) határoztuk meg. Sejtekből és szövetekből teljes DNS-t (genomi és mitokondriális DNS-t is tartalmazó preparátum) proteináz K emésztést követő fenol-kloroformos extrakcióval tisztítottuk és qPCR-ral vizsgáltuk.

Kromatin immunprecipitáció - A kromatin fixálása és feltördelése után a kromatin egyes részeit antitestekkel gyűjtöttük össze. Minden mintából vettünk a teljes kromatin tartalmazó ún. „input”-ot. A PARP-2 kötődésének kimutatására PARP-2 specifikus antitestet, a PPARγ kötődésének kimutatására PPARγ specifikus antitestet használtunk, míg a nem specifikus kötődés meghatározására egy nem specifikus antitestet (MMP9-re/MRE11-re/TNF-R1-re specifikus antitestet) és egy antitestet nem tartalmazó mintát alkalmaztunk. Az összegyűjtött kromatin darabokat specifikus primerpárokkal qPCR reakciókkal vizsgáltuk. Az egyes antitestekkel kapott c_t értékeket a input (totál) értékekre normalizáltuk.

PARP aktivitás meghatározása - A PARP aktivitás jellemzésére több módszert használtunk. Egyrészt Western blot vagy immunhisztokémiai technikával mutattuk ki a PAR szinteket sejtekből, illetve szövetekből. Másrészt tríciált NAD^+ beépülését határoztuk meg és ezzel jellemeztük a PARP aktivitást. A módszer lényege, hogy a stimulált sejteket egy digitonint és ^3H-NAD^+-ot tartalmazó oldatba helyezzük tíz percre, majd TCA-val kicsapjuk a fehérjéket és a hozzákapcsolódó PAR polimereket. A be nem épült ^3H-NAD^+-ot elmostuk, majd a csapadékot feloldva a beépült ^3H radioaktivitást szcintillációs számlálóval meghatároztuk.

Sejtek oxigénfogyasztásának meghatározása - A sejtek oxigénfogyasztását a Seahorse Biosciences XF24, vagy XF96 készülékével (Seahrose Biosciences, North Billerica, MA, USA) mértük meg.

NAD^+ meghatározás - A NAD^+ meghatározására vagy kolorimetriás eljárást, vagy tömegspektrometriai (MS) módszert használtunk. Sejtfrakcionálást végeztünk a NAD^+ sejten belüli eloszlásának vizsgálatára.

Egyéb biokémiai eljárások

A szabad zsírsav és a triglicerid szintek meghatározására kolorimetriás kiteket használtunk. Az inzulintartalmat ELISA módszerrel mértük (Mercodia, Uppsala, Svédország). A szabadgyök termelődés jellemzésére malondialdehid-assayt használtuk. A máj lipid tartalmának meghatározására Floch-extrakciót végeztünk, majd a lipideket biokémiai módszerekkel, vagy súlyméréssel határoztuk meg.

3.4 Szekvencia összehasonlítás

Több gerinces faj SIRT1 promóterének a szekvenciáját a Pubmed-ről gyűjtöttük össze. Az első 300 bp-os szakaszt ($^{-}1$ - $^{-}300$) a ClustalW algoritmus segítségével hasonlítottuk össze.

3.5 Mikroszkópia

Hematoxilin-eozin (HE) festés – HE festést 7 µm formalin fixált metszeteken végeztük.

Immunhisztokémia – Az immunhisztokémiai protokollt 7 µm formalin fixált metszeteken anti-F4/80 antitest (Serotec, Raleigh, NC, USA, 1:100, DAB előhívás), anti-PAR (1:500, DAB előhívás), simaizom aktin (SMA, *Novocastra*, Newcastle upon Tyne, UK, 1:300, DAB), illetve inzulin DAKO primer antitestek felhasználásával végeztük el. Az inzulinra festett metszeteket lefotóztunk és a szigetszervek méretét Image J szoftverrel megmértük.

Oil Red-O festés (ORO) – 1% ORO-val festettünk formalin fixált sejteket, majd PBS-sel kimostunk a többlet festéket.

TUNEL assay – A DNS töréseket terminális deoxiribonukleotidil transzferáz enzim segítségével digoxigenin kapcsolt dUTP-vel jelöltük, amit digoxigenin antitesttel mutattunk ki.

Szukcinát dehidrogenáz (SDH) festés – A lassú rostok kimutatására használt szövetkémiai módszer.

Transzmissziós elektronmikroszkópia (TEM) – A vizsgálatok glutáraldehid fixált preparátumokon történtek az ICS-ben (Strasbourg, Franciaország).

3.6 Statisztikai feldolgozás

Két csoport összehasonlítására párosítatlan kétszélű t-tesztet alkalmaztunk. Több csoport összehasonlítására Anova tesztet használtuk, ahol a szignifikanciát post-hoc tesztekkel számítottuk ki.

4. Eredmények

4.1. Hogyan befolyásolja a PARP-1 enzim a metabolikus szervek, szövetek működését?

A PARP-1$^{-/-}$ egerek testsúlygyarapodása a PARP-1$^{+/+}$ állatokhoz képest lassúbb volt, ami mögött metabolikus eltéréseket gyanítottunk. A PARP-1$^{-/-}$ egerek tápanyagfogyasztása magasabb volt, mint vad típusú társaiké, azonban a boncolás a zsírszövet csökkent mennyiségét mutatta ki, ami az energiaegyensúly zavarára utalt. Indirekt kalorimetriával kimutattuk, hogy a PARP-1$^{-/-}$ állatok több oxigént fogyasztanak az aktív periódusokban a PARP-1$^{+/+}$ egerekhez képest, illetve az RQ értékük magasabb, mint vad típusú társaiké, ami együtt a biológiai oxidáció és a glükóz felhasználás megemelkedésére utalt. A PARP-1$^{+/+}$ és PARP-1$^{-/-}$ egerek glükóz toleranciája javult.

Az inzulinérzékenységet hiperinzulinémiás-euglikémiás clamp-ben vizsgálatuk, ahol az euglikémiához szükséges glükóz infúzió sebessége kisebb volt a PARP-1$^{-/-}$ egerekben. Amikor az állatokat 60%-os hiperkalorikus magas zsírtartalmú diétát (HFD-t) kaptak a PARP-1$^{-/-}$ egerek kisebb mértékben híztak el és a glükóz toleranciájuk, illetve inzulin szenzitivitásuk is kevésbé károsodott a HFD során, mint a PARP-1$^{+/+}$ egereknek. Ezen kívül a PARP-1$^{-/-}$ egerekben a HFD diéta végén alacsonyabb volt a szérum szabad zsírsav szint. Mindezek a változások köthetőek a mitokondriális aktivitás növekedéséhez is, ezért két fontos, az energia leadásban szerepet játszó szervben (izom és BAT) megvizsgáltuk a mitokondriális aktivitás paramétereit.

A PARP-1$^{-/-}$ egerekben a BAT élénkpiros színe és tömegének növekedése utalt a mitokondriális aktivitás emelkedésére, amelyet elektronmikroszkópos eljárással és a mitokondriális DNS mennyiségének,

illetve a mitokondriális funkcióhoz kapcsolódó gének és fehérjék expressziójának meghatározásával erősítettünk meg. A harántcsíkolt izomban (*m. gastrocnemiusban*) szukcinát dehidrogenáz hisztokémiai eljárással, illetve a mitokondriális funkcióhoz kapcsolódó gének és fehérjék expressziójának meghatározásával mutattuk ki a mitokondriális aktivitás növekedésére.

A SIRT1 kiemelten fontos a mitokondriális aktivitás szabályzásában, illetve a SIRT1 és a PARP-1 közötti kapcsolatot már több szerző is valószínűsítette ezért megvizsgáltuk, hogy a PARP-1$^{-/-}$ egerekben magasabb-e a SIRT1 aktivitás a BAT-ban és a harántcsíkolt izomban. Mindkét szervben a PARP-1 deléciója csökkentette a PARP aktivitást, megnövelte a NAD^+ szintet és megemelte a SIRT1 aktivitását, amit a PGC1α és a FOXO1 deacetilációja jelzett. Emellett a SIRT1 fehérje mennyiségének jelentős növekedését is tapasztaltuk. Ezekből a megfigyelésekből arra következtettünk, hogy a PARP-1 deléciója a NAD^+ szint megnövelésén keresztül a SIRT1 aktivitását és/vagy expresszióját indukálja.

A jelenség vizsgálatát sejtes modelleken folytattuk. HEK293T sejtekben shRNS segítségével depletáltuk a PARP-1-et, ami a NAD^+ szint és a SIRT1 aktivitás emelkedésével járt hasonlóan az egerekben tapasztalt változásokhoz. Bár a SIRT1 mennyisége *in vivo* növekedett a PARP-1 depléciója kapcsán, a HEK293T sejtekben nem tapasztaltunk különbséget. Ez arra utal, hogy valószínűleg a NAD^+ szint emelkedése az elsődleges oka a SIRT1 aktivitás növekedésének. A mitokondriális funkció markereit megvizsgálva azt tapasztaltuk, hogy a PARP-1 depléció hatására a mitokondriális DNS mennyisége, egyes mitokondriális gének expressziója, illetve a sejtek oxigénfogyasztása megnő. Ha a SIRT1-et is depletáltuk,

akkor az előbbi fiziológiás paraméterek változása elmaradt. Ez arra utal, hogy a PARP-1 deléciója által kiváltott mitokondriális biogenezis indukcióban központi szerepe van a SIRT1 aktivitás emelkedésének. Hasonló változásokat tapasztaltunk primer PARP-1$^{-/-}$ MEF sejtekben.

Az eddigi eredmények arra utalnak, hogy a PARP-1 depléciója NAD^+ szint emelkedéséhez és a SIRT1 indukciójához vezet. Logikusan adódik a kérdés, hogy PARP inhibitor adása hasonló fenotípust alakít-e ki, mint a PARP-1 deléciója. A jelenség vizsgálatára izomrostokká differenciált C2C12 mioblasztokat kezeltünk 1 μM PJ34 PARP inhibitorral. A PJ34 gátolta a PARP-1 aktivitást, ezzel párhuzamosan idő- és dózisfüggő módon a NAD^+ szint emelkedését okozta, illetve aktiválta a SIRT1 enzimet, azaz hasonlóan működött, mint a PARP-1 genetikai inaktiválása. A SIRT1 deléciója, vagy csendesítése felfüggesztette a PJ34 hatását. A PJ34 a SIRT1 aktiváción keresztül tehát a mitokondriális biogenezis indukciójához vezet, amit a mitokondriális gének expressziójának és a sejtek oxigénfogyasztásának emelkedése jellemzett. Alátámasztja eredményeinket, hogy SIRT1 knockout MEF-ekben a PJ34 nem képes kiváltani a mitokondriális biogenezis indukcióját.

C57/Bl6J hím egereket kezeltünk PJ34-gyel (10 mg/kg BID 5 napig), majd a *m. gastrocnemiusban* megvizsgáltuk, hogy a PARP gátlás hatását. A PJ34 kezelés hatékonyan gátolta a PARP aktivitást, ami a NAD^+ szint és a SIRT1 aktivitás növekedésével járt együtt. A PJ34 kezelt állatokban a szérum triglicerid és szabad zsírsav szintje lecsökkent. Ezek a változások együtt jártak a *m. gastrocnemius* expressziós mintázatának a változásával, ami az izmokban a PJ34 kezelés hatására megnövekvő mitokondriális biogenezisre utal.

Meghatároztuk a PARP aktivitást C57/Bl6J egerek *m. gastrocnemiusában* 24 órás éhezés, illetve 12 hetes HFD diéta (hiperkalorikus, 60% zsírtartalom) után. Az éhezés hatására a PARP aktivitás lecsökkent, míg a kalorikus terhelés hatására a PARP aktivitás és a PARP-1 szintje megnő, vagyis úgy tűnik a PARP-1 valamilyen módon képes reagálni a tápanyag ellátottságra is. Továbbá kimutattuk, hogy a PARP-1 delációja sem a SIRT2, sem a SIRT3 aktivitását nem változtatja meg.

4.2. Hogyan befolyásolja a PARP-2 enzim a metabolikus szervek, szövetek működését?

A PARP-2 enzim, szerkezetében és több funkciójában hasonlít a PARP-1-re, ezért hasonló metabolikus fenotipizálást végeztünk el a PARP-2 törzsön is. A PARP-2$^{-/-}$ egerek alacsonyabb testsúlyúak vad típusú társaiknál azonos táplálékfelvétel és kisebb mértékű spontán mozgás ellenére. A PARP-2$^{-/-}$ egerek oxigénfogyasztása nem volt szignifikánsan magasabb, mint a PARP-2$^{+/+}$ állatoké, bár tendenciájában növekedést mutatott. A sötét (aktív) periódusban a PARP-2$^{-/-}$ állatok RQ értéke a vad típusú egerekhez képest csökkent, ami emelkedett zsírsav oxidációra utalt.

A kisebb testsúly egyik kézenfekvő oka lehet, hogy csökken a szervezetben a tárolt zsír mennyisége. A vizsgált depók kisebbek voltak a PARP-2$^{-/-}$ egerekben, sőt a modellként kiválasztott epididimális zsírszövetben a zsírsejtek mérete is kisebb volt, ami az adipociták diszfunkciójára utalhat. A PPARγ izoformák és a PPARγ által vezérelt gének expresszióját vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy a PPARγ izoformák expressziója nem változott, azonban a PPARγ függő gének expressziója jelentősen lecsökkent. Azon kísérleteinkben, ahol PARP-2$^{+/+}$ és PARP-2$^{-/-}$

MEF-eket differenciáltattunk zsírsejtekké és azt tapasztaltuk, hogy a PARP-2 hiányában a differenciáció mértéke lecsökken, mint azt az Oil-Red O festés, a FACS mérés, a lipid tartalom, vagy PPARγ függő gének expressziójának meghatározása mutatja.

Eredményinek a PPARγ rendszer csökkent működésére utaltak. Riporter assay-ket végeztünk PPAR-specifikus riporter konstrukttal PARP-2-t depletált HEK293T sejtekben. A PARP-2 depléció drasztikusan csökkentette a PPARγ specifikus alap- és ligand-aktivált transzaktivációt. A PARP-2 overexpressziója megemeli a PPARγ alapaktivitását, azonban a maximális aktivitást nem befolyásolja. Érdekes módon a PPARα és a PAPRβ/δ függő transzaktivációt a PARP-2 a PPARγ-hoz képest ellentétesen, míg nem befolyásolta az ösztrogén receptor-β-t (ERβ). A riporter assay-k eredményei arra utalnak, hogy a PARP-2 a PPARγ transzkripciós rendszer tagja és valószínűleg közvetlenül a DNS-hez kapcsolódik közel a PPARγ-RXR dimerhez, amit kromatin immunprecipitációs kísérletekkel igazoltunk.

A kisebb testsúly adódhat még a szervezet energia leadásának a megemelkedéséből is, ennek megfelelően megvizsgáltuk az energia leadásban szerepet játszó szerveket, mint a BAT, a harántcsíkolt izom és a máj. Bár a PARP-1 knockout egerekben, illetve a PARP inhibitor kezelés hatására a BAT aktivitása megemelkedik, azonban a PARP-2 – annak ellenére, hogy delációja a SIRT1 fehérje mennyiségének növekedéséhez vezet – úgy tűnik, nem befolyásolja a BAT működését.

Jellegzetes energia leadásra alkalmas szövet a harántcsíkolt izom, amely vizsgálatára PARP-$2^{+/+}$ és PARP-$2^{-/-}$ egerek *m. gastrocnemius* izmát, illetve PARP-2 csendesített (shPARP-2) és kontroll (scPARP-2) C2C12 sejteket használtunk. A PARP-2 depléciója a harántcsíkolt izmokban az

izotípusváltás jeleit mutatja, megjelennek az I. típusú, mitokondriumokban gazdag, lassú rostok, amit a génexpresszió átrendeződése, az mtDNS mennyiségének növekedése, az elektronmikroszópos és az SDH hisztokémiai vizsgálatok jeleznek. Ezt megerősíti, hogy az egerek kifáradásig tartó futtatása (forced running) során a PARP-2$^{-/-}$ egerek hosszabb távot tesznek meg, mint vad típusú társaik.

A PARP-2 deléciója nem változtatja meg jelentősen az izomrostok össz-PARP aktivitását, a NAD^{+} szint, a SIRT1 expresszió és a SIRT1 aktivitás fokozódik. Ez arra utal, hogy a PARP-2 deléciója, a PARP-1 deléciótól eltérő módon képes a SIRT1 aktiválására. Elvégeztük az előbbiekben részletezett méréseket PARP-2 csendesített C2C12 sejtekben is. Ebben a modellben a PARP-2 depléciója nem vezetett sem a PARP aktivitás, sem a NAD^{+} szint növekedéséhez. Az egerekben tapasztaltakhoz hasonlóan a PARP-2 depléciója a SIRT1 mRNS és fehérjeszint és a SIRT1 aktivitás növekedéséhez vezetett, ami arra utalt, hogy a PARP-2 valószínűleg a SIRT1 expressziót szabályozza.

Riporter kísérletekben kimutattuk, hogy a PARP-2 depléciója indukálja a SIRT1 promóterét. A legrövidebb konstrukt ($^{-}$1-$^{-}$91 régiót tartalmazó) a hosszabbakkal azonos módon válaszol, ami arra utal, hogy ehhez a régióhoz kötődik a PARP-2. Ezzel a feltételezéssel összhangban kromatin immunprecipitációval kimutattuk, hogy a PARP-2 valóban fizikailag kötődik a humán SIRT1 $^{-}$1-$^{-}$91 régiójába. Összehasonlítva az NCBI honlapján elérhető SIRT1 promóter szekvenciákat azt tapasztaltuk, hogy a SIRT1 promóter transzkripciós origóhoz közel eső része nagymértékben konzervált az emlősök között.

A májban is megvizsgáltuk indukálódik-e a mitokondriális biogenezis. Elektronmikroszkópos vizsgálattal és a mitokondriális DNS mennyiségének

meghatározásával kimutattuk, hogy a mitokondriális aktivitás megnő a PARP-2$^{-/-}$ egerekben. A májban is azt tapasztaltuk, hogy a SIRT1 fehérjemennyisége és ennek megfelelően a SIRT1 aktivitása is fokozódik. A PARP-2$^{-/-}$ egerek májában alacsonyabb tárolt triglicerid szintet találtunk, ami megemelkedő energia leadásra utal, amit alátámaszt, hogy a májban megnőtt az oxidatív metabolizmusra jellemző gének expressziója. Úgy tűnik tehát, hogy a PARP-2 deléciója következtében fellépő energialeadás célszerve a harántcsíkolt izom és a máj.

A PARP-2 deléciója a metabolikus profil javulásához vezetett, amiből adódott a kérdés, hogy a metabolikus kihívásokra, mint pl. a magas zsírtartalmú diéta, adott választ milyen mértékben befolyásolja a PARP-2 hiánya. Az állatokat magas zsírtartalmú diétával (HFD, 60% hiperkalorikus diéta) etettük kilenc héten át. A PARP-2$^{-/-}$ állatok testtömege vad típusú társaikhoz képest kevésbé nőtt a kezelés során, ami a fehérzsír depók arányosan kisebb méretével magyarázható. A fehér zsír depók kisebb mérete azonban nem vezetett a májban fokozott lipid lerakódáshoz, ami a magasabb energia leadásra vezethető vissza. Ezzel párhuzamosan a harántcsíkolt izomban több, az energia leadáshoz vezető gén expressziója magasabb volt, mint a vad típusú állatokban, ami azt valószínűsíti, hogy ez a szövet – nagy tömege miatt - elsődleges szerepet játszik a szervezet energia leadásban. Ezzel párhuzamosan javult az állatok inzulin szenzitivitása, ami szintén a metabolizmus oxidatív irányba tolódásával magyarázható.

Bár a PARP-2$^{-/-}$ egerek inzulinérzékenysége javuló tendenciát mutatott, a glükóz érzékenység azonban meglepő módon romlott, ami a glükóz-indukált inzulin felszabadulás zavarára volt visszavezethető. Bár a PARP-2$^{-/-}$ egerek pankreászában normál (chow) tápon nem tapasztaltunk

változást, HFD adása esetében a PARP-2$^{-/-}$ egerek béta-sejtjei nem voltak képesek hiperpláziával kompenzálni az emelkedő inzulin iránti igényt. Vagyis a PARP-2$^{-/-}$ egerek szigetszerve HFD adása esetén nem nőtt meg, amire a pankreász súlyának változásából, szövettani és biokémiai vizsgálatokból következtettünk. Fontos megjegyezni, hogy a PARP-1 deléciójának nincs negatív hatása a szigetszerv működésére. A PARP-2$^{-/-}$ egerekben a pankreatikus-duodenális homeobox-1 (PDX1) csökkent expresszióját tapasztaltuk. A PDX1 megfelelő működése elengedhetetlen a béta-sejt proliferációhoz. A PARP-2$^{-/-}$ egerek pancreasában a SIRT1 mRNS mennyisége és fehérje expressziója magasabb volt. A SIRT1 deacetilálja és aktiválja a FOXO1 enzimet, ami a PDX1 expresszió csökkenéséhez és a hiperplasztikus válasz elmaradásához vezet, ami esetünkben is lehetséges magyarázat.

A PARP-1 knockout egereken végzett kísérletsorozathoz hasonlóan megvizsgáltuk a SIRT2 és SIRT3 aktivitásának változását a PARP-2 deléciója esetén is. Sem a harántcsíkolt izomban, sem a májban nem változott a SIRT2 és SIRT3 célfehérjék acetiláltsága. Itt szeretném kiemelni, hogy az alkalmazott metabolikus modellekben nem tapasztaltuk a DNS törések akkumulációját a PARP-1 vagy a PARP-2 deléciója során.

4.3 Képes védelmet nyújtani a PARP-2 deléciója oxidatív károsodás ellen?

A mitokondriális funkció károsodása gyakori kísérőjelensége az oxidatív stresszel jellemezhető betegségeknek, ezért a mitokondriális funkció javítása ilyen esetekben elősegíti a túlélést. A PARP-2 deléciója a SIRT1 expresszió és aktivitás indukcióján keresztül a mitokondriális biogenezis indukciójához vezet – vagyis a PARP-2 deléciója védelmet nyújthat az

oxidatív stressz-indukált sejtelhalás ellen. Ezt az elméletet akut doxorubicin (DOX)-indukált vaszkuláris károsodás modellben próbáltuk ki.

PARP-2$^{+/+}$ és PARP-2$^{-/-}$ egereket kezeltünk 25 mg/kg DOX-szal, vagy vehikulummal (fiziológiás sóoldat) és a kezelés után két nappal megvizsgáltuk az aorták kontraktilitását norepinefrin, szerotonin és KCl hatására. Bár a vehikulum kezelt PARP-2$^{+/+}$ és PARP-2$^{-/-}$ egerek ereinek kontraktilitása között nem találtunk különbséget, a DOX kezelés mindhárom vazokonstriktor anyag hatását rontotta, ami ellen a PARP-2$^{-/-}$ egerek részleges védelmet élveztek, ami a simaizom sejtek érintettségére utal. Ezt ellenőrzendő simaizom aktinra (SMA) specifikus antitesttel megfestettük az állatok aortáját és azt tapasztaltuk, hogy a simaizom marker jele lecsökken a PARP-2$^{+/+}$ egerek aortájában, ami az előző eredményekkel összhangban a simaizom sejtek pusztulására utal két napos DOX kezelés után, amit a PARP-2 hiánya részlegesen kivéd.

A DOX által termelt gyökök DNS töréseket hoznak létre, ami PARP aktivációhoz vezet és a sejtek NAD$^+$ és ATP készletét elhasználva sejthalált indukál. A PARP-1 deléciója vagy a PARP gátlás a NAD$^+$ és ATP készlet elhasználását akadályozza meg. Megvizsgáltuk, hogy a PARP-2 deléció esetében is hasonló módon jön-e létre védelem. További kísérleteinket PARP-2$^{+/+}$ és PARP-2$^{-/-}$ egereken, illetve scPARP-2 és shPARP-2 MOVAS (egér aorta simaizom) sejteken végeztük el. Mint vártuk, aortákban, és MOVAS sejtekben a DOX kezelés gyöktermelést okozott, ami DNS törésekhez, PARP aktivációhoz és a NAD$^+$ szint radikális csökkenéséhez vezetett, azonban a PARP-2 hiánya nem okozott jelentős különbséget egyik vizsgált paraméterben sem, ami arra utal, hogy a védelem mechanizmusa eltér a PARP-1 deléciójával elérhető védelemtől.

Alternatív lehetőségként megvizsgáltuk a SIRT1 expressziót és az azt követő eseményeket. Aortában és MOVAS sejtekben a PARP-2 deléciója a SIRT1 mennyiségének növekedését eredményezte a SIRT1 promóter aktivitásának növelésén kersztül. A SIRT1 expresszió emelkedése az aortában megnövelte a mitokondriális DNS mennyiségét és több, a mitokondriális oxidációhoz szükséges gén expresszióját, ami a mitokondriális funkció javulását jelzi. A sejtes modellben is a mitokondriális funkció javulását tapasztaltuk DOX kezelés után.

5. Megbeszélés és perspektívák

5.1. A PARP-1 és PARP-2 metabolikus szerepének molekuláris mechanizmusa

Munkám során a PARP-1 és PARP-2 enzimek metabolikus szerepét vizsgáltuk. Értekezésemben bemutatott egér és sejtes modellekben a PARP-1 deléciója, vagy PARP gátlószer adása esetében a NAD^+ szint emelkedését tapasztaltuk. Erre a legelfogadhatóbb magyarázatnak az tűnik, hogy a PARP-1 aktivitás (még stimulálatlan állapotban is!) jelentős mértékben használja a sejtek NAD^+ készletét ezért a PARP-1 gátlása jelentős NAD^+ megtakarítással jár. A PARP-1 affinitása a NAD^+ iránt magas (Km = 20-60 μM), ami majd egy nagyságrenddel alacsonyabb a sejtek nyugalmi NAD^+ koncentrációjánál (200-500 μM) (Houtkooper és mtsai, 2010). Ez arra utal, hogy a NAD^+ szint fiziológiás fluktuációja, sőt a PARP-1 aktiváció által előidézett NAD^+ szint csökkenés sem képes jelentős mértékben csökkenteni a PARP-1 aktivitását. A PARP-1 felelős a sejtek, szövetek össz-PARP aktivitásának 85-90%-ért (Schreiber és mtsai, 2002), amit kísérleteink is igazoltak, ezért érthető, hogy a PARP gátlószerek alkalmazása a PARP-1 delécióra jellemző fenotípust alakít ki. A

megemelkedő NAD^+ szint aktiválja a SIRT1-et, mivel a SIRT1 érzékeny a NAD^+ szint változásaira: Km értéke (150-200 μM) közel áll a nyugalmi NAD^+ koncentrációhoz, azaz a NAD^+ szint fluktuációja befolyásolhatja a SIRT1 aktivitását is (Houtkooper és mtsai, 2010). Ez arra is utal, hogy a PARP-1 és a SIRT1 között a molekuláris kapocs a NAD^+ koncentráció változása. A nagyobb affinitású és hatékonyabb PARP-1 enzimmel versenyzik a kisebb affinitású SIRT1 a közös szubsztrátért.

Ha megvizsgáljuk, hogy a SIRT1 reciprok módon képes-e befolyásolni a PARP-1 működését, azt tapasztaljuk, hogy a SIRT1 - az előbbiekben említett kinetikai jellemzői miatt - nem képes hatékonyan gátolni a PARP-1 aktivitását a NAD^+ szintek befolyásolásával. Kimutatták azonban, hogy a SIRT1 aktiváció valóban gátolja a PARP-1 aktivitást a PARP-1 deacetilálásával (Rajamohan és mtsai, 2009). Belátható, hogy a SIRT1 és a PARP-1 kölcsönösen szabályozza egymás működését. Fontos kiemelni, hogy a fiziológiás/patofiziológiás hatások, amelyeket a PARP-1 aktivációhoz köthetőek javarészt átfednek a SIRT1 gátlásához, vagy hiányához köthető fiziológiás/patofiziológiás folyamatokkal, ami arra utal, hogy a két enzim aktivitása közti „egyensúly” megbomlása több betegség kialakulásában is szerepet játszhat.

A PARP-2 a PARP-1-hez hasonlóan NAD^+-függő enzim, azonban PARP-2 kinetikai jellemzői inkább hasonlítanak a SIRT1-re: NAD^+-ra vonatkoztatott $Km_{PARP-1} > Km_{PARP-2} \sim Km_{SIRT1}$ (Houtkooper és mtsai, 2010), ezért valószínűtlen, hogy PARP-2 aktiváció megfelelő mértékben csökkenti a NAD^+ szubsztrátot a SIRT1 elől. Minden alkalmazott modellben a PARP-2 deléciója esetén a SIRT1 expresszió növekedését tapasztaltuk és kimutattuk, hogy a PARP-2 a SIRT1 promóter represszora. A PAPR-2 hiányában a SIRT1 promóter aktiválódik és a SIRT1 fehérje

mennyiségének növekedése vezet a SIRT1 aktivitás indukciójához. A PARP-2 jelenlétét és transzkripciós aktivitását moduláló hatások egyelőre nem ismertek, azonban feltételezhető, hogy a környezet redox állapotát közvetíti. A SIRT1 expressziója, illetve a egyes SNP-k a SIRT1 génben összefüggést mutatnak az energialeadás, az inzulin szenzitivitás, az inzulin szekréció és az elhízásra való hajlam mértékével emberben (Canto és Auwerx, 2012), vagyis a SIRT1 promóterének aktivitása úgy tűnik fontos faktora a metabolikus adaptációnak, amiben a promótert szabályzó transzkripciós faktoroknak központi szerepe lehet.

A PARP-2 más metabolikus transzkripciós faktorok működésébe is beavatkozik, a fehér zsírszövetben a PARP-2 hiányában az RXR-PPARγ dimer diszfunkcióját tapasztaltuk, ami lipodisztrófiához vezetett. Úgy tűnik, hogy a PARP-2 az RXR-PPARγ pozitív kofaktora, a PARP-2 jelenléte szükséges mind a PPARγ alapaktivitásához és ligandfüggő aktivációjához. A rendelkezése álló eredmények azt valószínűsítik, hogy a PARP-2 állandó kofaktora a RXR-PPARγ dimer környezetében kialakuló fehérjekomplexnek, amelyben szerep lehet egy nagymértékben konzervált magreceptor aktivációs motívumnak (LIQLL szekvencia) az E doménben. Bár a PARP-2 nem minden magreceptorral képes kölcsönhatásba lépni (pl. az ERβ receptor aktivitását nem befolyásolja a PARP-2 expresszió változása, míg a PPAR-ok vagy az ERα aktivitását igen), várhatóan más magreceptorok működését is módosíthatja a PARP-2, ennek megismerése, azonban további vizsgálatokat igényel.

Milyen molekuláris mechanizmuson keresztül aktiválja az RXR-PPARγ dimert a PARP-2? A kromatin immunprecipitációs kísérletek arra utalnak, hogy a PARP-2 transzkripciós események során a DNS-hez kötődik, melyek között több abnormális szerkezet is található, mint a DNS kétszálú

törése (Kutuzov és mtsai, 2013). A PARP-2 által közvetített represszió molekuláris mechanizmusa valamivel jobban tisztázott, mint az aktiváció mechanizmusa. A PARP-2 a kormatin szerkezet zártabbá válását, a heterokromatin megjelenését segíti elő (Quenet és mtsai, 2008). A PARP-2 az általa represszált promótereken az HDAC5 és HDAC7 hiszton-deacetilázok, illetve a G9a hiszton metiltranszferáz akkumulációján keresztül alakít ki represszált kromatint, ami független a PARP-2 enzimatikus aktivitásától (Liang és mtsai, 2013). Mások és saját megfigyeléseink arra utalnak, hogy a PARP-2 hiányában nagyfokú génexpressziós átrendeződés játszódik le, ami arra utal, hogy a PARP-2-ről a PARP-1-hez hasonló, szerteágazó transzkripciós tulajdonságokat fognak leírni a jövőben.

5.2. PARP-1 és a PARP-2 enzimek szerepe metabolikus szövetekben

A PARP-1 vagy a PARP-2 depléciója a harántcsíkolt izomban izotípus váltást okozott, az I. típus (lassú), oxidatív rostok aránya megnőtt a SIRT1 aktiváció következtében. Ezek a változások hasonlóak a SIRT1 farmakológiai aktiválásához. Itt kell, hogy rámutassak, egyedül a harántcsíkolt izomban azonos a két enzim deléciója által kialakított fenotípus.

A BAT-ban a PARP-1 deléciója – a SIRT1 farmakológiai szerekkel történő aktivációjához hasonlóan – megemelte a mitokondriális biogenezist. A BAT-ra jellemző magas mitokondriális aktivitás jelentős szabadgyök képződéssel jár, ami magas PARP aktivitást feltételez ebben a szövetben. Így nem meglepő, hogy a PARP-1 gátlása jelentős NAD^+ koncentráció emelkedéssel jár, ami a SIRT1 aktivációjához vezet. Érdekes módon a PARP-2 deléciója nem fokozza a mitokondriális biogenezist a BAT-ban, ami

arra utal, hogy további szövetspecifikus transzkripciós faktorok szabályozzák a SIRT1 expresszióját.

A májban a PARP-2 deléciója a mitokondriális biogenezis indukciójához vezetett és védett a lipid felhalmozódás ellen mind normál, mind HFD diétán. A PARP-1 deléciója ezzel szemben nem okoz SIRT1 aktivációt a májban, sőt PARP-1 knockout egerekben hepatosteatosis lép fel kalorikus terhelés esetén (Erener és mtsai, 2012) valószínűleg azért, mert a nem indukálódik a PARP-2 deléciójához hasonló mitokondriális védekezési mechanizmus. Ennek az oka feltételezhetően az, hogy a PARP-1 expresszió igen alacsony a májban, vagyis kisebb NAD^+ koncentráció és elhanyagolható SIRT1 aktivitás változások várhatóak, mint más szervekben.

A PARP-2 deléciója a fehér zsírszövet csökkent működéséhez vezet az RXR-PPARγ dimer funkciójának a redukciója miatt. Ugyanakkor ez nem vezet a szérum TG és FFA szint emelkedéséhez valószínűleg a harántcsíkolt izomban történő lipid oxidáció mértékének növekedése miatt. Saját eredményeink arra utalnak, hogy kalorikus terhelés esetén a PARP-$1^{-/-}$ egerekben kevesebb zsír halmozódik fel.

A pankreász béta-sejtjei esetében a PARP-1 hiánya véd az oxidatív stresszel jellemezhető állapotokban bekövetkező béta-sejt pusztulás ellen (Burkart és mtsai, 1999), mint a streptozotocin indukált diabétesz vagy a részleges pankreász eltávolítás, amit saját eredményeink is megerősítettek. A PARP-2 deléciója azonban csökkentette a béta-sejtek proliferatív kapacitását, ezért elmaradt a HFD által indukált kompenzatórikus béta-sejt hiperplázia, ami a pankreász csökkent endokrin funkciójához vezetett. A tapasztalt hatásokat a SIRT1 expresszió emelkedését követő FOXO1 aktiválásnak és a következményes PDX1 expresszió csökkenésnek

tulajdonítjuk. Mindenképpen váratlan a pankreász hipofunkció a PARP-2$^{-/-}$ egerekben, mivel a SIRT1 overexpresszió a mitokondriális funkció javulásán keresztül a pankreászban az inzulin szekréciót fokozza (Bordone és mtsai, 2006, Moynihan és mtsai, 2005). Magyarázat lehet az ellentmondásra, hogy a két hatás eredője (PDX1 gátlás és a mitokondriális biogenezis indukciója) szabja meg a béta-sejtek viselkedését, amelyek eltérő arányban vannak jelen a két modellben. A PARP-2 delécióját követő kismértékű SIRT1 overexpresszió következtében fellépő FOXO1 deacetiláció (és következményes PDX1 gátlás) túlsúlya miatt a proliferáció gátlás válik dominánssá. Ezzel szemben nagymértékű SIRT1 overexpresszió esetén (a két megjelölt tanulmányban az expresszió ~30-szoros növekedését tapasztalták) kifejezettebbé válik a mitokondriális funkció javulása. Természetesen nem zárható ki, hogy ismeretlen, PARP-2 specifikus útvonalak játszanak szerepet a két egymástó eltérő hatás kialakításában.

5.3. A farmakológiai PARP gátlás következményei

A rövid távú PARP inhibitor kezelés előnyös metabolikus változásokat okozott, ami felveti a PARP inhibitorok ilyen irányú alkalmazhatóságát, azonban kérdésként vetődik fel, hogy milyen mértékben okozunk ezzel genomi instabilitást. Széles körben elfogadott tény, hogy a PARP-1 és a PARP-2 aktivitása szükséges a hatékony DNS hibajavításhoz stressz esetén, azonban úgy tűnik, hogy a külső stresszhatás nélkül a hatékony DNS hibajavításhoz nem szükséges a két enzim működése (De Vos és mtsai, 2012). Az általunk alkalmazott modellekben nem tapasztaltunk DNS hiba akkumulációt. A metabolikus betegségek azonban megemelkedett

oxidatív stresszel jellemezhetőek. Ezért a metabolikus betegségekben a hosszú távú PARP inhibitor kezelés biztonságosságát külön vizsgálni kell.

A jelenleg ismert, illetve kereskedelmi forgalomban lévő PARP inhibitorok nem szelektívek az egyes PARP izoformákra (Wahlberg és mtsai, 2012). Emiatt a PARP inhibitorok hosszú távú alkalmazása során számíthatunk a szövetspecifikus hatások kevert megjelenésére annak ellenére, hogy az általunk elvégzett rövid távú PARP inhibitor kezelés során ezeket nem tapasztaltuk (pl. nem károsodott az endokrin pankreász).

5.4. A PARP enzimek és energiaszenzor útvonalak kölcsönhatásai

PARP-1 az irodalmi adatok alapján olyan jelátviteli útvonalakkal alakít ki kölcsönhatást, amelyek részt vesznek a mitokondriális biogenezis szabályzásában. Jelen munkában a PARP-1 és az AMPK közötti kapcsolatot vizsgáltuk. Mint a Bevezetőben tárgyaltuk, a PARP-1 és az AMPK egymással fizikailag kölcsönhat és képesek egymást kölcsönösen aktiválni (Walker és mtsai, 2006). Ennek megfelelően a PARP-1 deléció, illetve a PARP enzimek farmakológiai gátlása esetén több esetben az AMPK aktivitás enyhe csökkenését tapasztaltuk. A PARP-1 gátlás által indukált AMPK aktivitás változások metabolikus következményei ismeretlenek.

5.5 A PARP enzimek és a metabolikus betegségek közti összefüggések

Az általunk leírt biokémiai változások több fiziológiai folyamatba vagy betegségek patomechanizmusába is beavatkoznak. Ha az egész egyed szintjén vizsgáljuk a PARP enzimek energiaforgalomra gyakorolt hatását, azt figyelhetjük meg, hogy a PARP-1 vagy a PARP-2 eltávolítása eltolja az

energiaegyensúlyt a leadás irányába, ami a mitokondriális biogenezis indukciójához köthető. Másrészt a PARP-1 delétiója megnövelte a táplálékfelvételt, ami a hipotalamusz érintettségére utal. Ismert, hogy a PARP-1 delétiója esetén szétkapcsol a szervek saját cirkadián ritmusa az állat környezetének cirkadián ritmusától (Asher és mtsai, 2010), ami hiperfágiához vezethet. A szétkapcsolás oka valószínűleg a NAD^+ szint és a SIRT1 aktivitás cirkadián ritmusának zavara lehet. A PARP-2 deléció esetében nem tapasztaltunk változásokat a cirkadián ritmus szabályzásában, illetve a táplálékfelvételben.

A PARP-1 és a PARP-2 hiánya csökkenti a fehér zsírszövetben, illetve a PARP-2 hiánya csökkenti a májban történő lipid raktározást. Ennek megfelelően magas zsírtartalmú diétán ezen szövetekben kisebb mértékben növekszik a lipidek mennyisége a knockout egértörzsekben a vad típushoz képest. A nem raktározott lipidek azonban nem dúsulnak fel a szérumban valószínűleg azért, mert a mitokondriális biogenezis indukciója miatt a zsírsavak oxidációja emelkedik. Ezt támasztja alá, hogy a PARP-2 delétiója az RQ érték csökkenéséhez vezet.

A glükóz metabolizmusra kifejtett hatásban jelentős eltérés van a PARP-1 és a PARP-2 között. Az inzulin szenzitivitás javul a PARP-1 vagy a PARP-2 delétiója esetében, ami szintén a harántcsíkolt izomban bekövetkező mitokondriális biogenezis indukcióhoz köthető. A PARP-1 knockout egerek szérum glükózszintje alacsonyabb és az RQ értéke magasabb, mint a vad típusú állatokban, ami fokozott glükóz oxidációra utal. Ezzel szemben a PARP-$2^{-/-}$ egerekben a szérum glükózszint emelkedik ami a pankreász béta-sejtjeinek csökkent hiperplasztikus válaszával és csökkent glükóz-indukált inzulin felszabadulással magyarázhatóak.

A PARP-1 deléciója és a rövid távú PARP inhibitor kezelés javuló metabolikus profilt eredményez, ami védelmet nyújt a hiperkalorikus táplálékbevitel által indukált elhízás és az ennek a talaján kialakuló II. típusú diabétesz ellen. Fontos kiemelni, hogy a PARP-1 deléció, vagy a PARP gátlás a diabétesz vaszkuláris diszfunkcióhoz köthető komplikációi (endoteliális diszfunkció, neuropátia, nefropátia és retinopátia) ellen is védelmet nyújt (Virag és Szabo, 2002). A PARP-1 deléció vagy a PARP gátlószerek alkalmazása anti-aterogén hatású, ami a PARP-1 gátlás anti-inflammatorikus hatásán kívül metabolikus változásokhoz is köthető (Xu és mtsai, 2013). ApoE$^{-/-}$ környezetben aterogén diéta mellett PARP-1 gátlás hatására csökken az LDL és nő a HDL szint (Xu és mtsai, 2013).

A mitokondriális biogenezis csökkenése jellemzi az öregedést. Az átlagoshoz képest magasabb PARP-1 aktivitás, alacsonyabb NAD$^+$ szint és SIRT1 aktivitás jellemzi az idős embereket (Massudi és mtsai, 2012). Felvetődik, hogy a PARP-1 – SIRT1 – NAD$^+$ tengely egyensúlyának az eltolódása szerepet játszhat mitokondriális aktivitás időskori csökkenésében és ezen keresztül hozzájárulhat több, az időskorra jellemző betegség kialakulásához (pl. diabétesz). Ezt a feltételezést megerősíti a PARP-1 knock-in egértörzs vizsgálata, ahol a PARP-1 extra kópiája bár javította a DNS javítás hatékonyságát, azonban emelte a mitokondriális diszfunkcióval jellemezhető betegségek incidenciáját (Mangerich és mtsai, 2010). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a PARP-1 – SIRT1 – NAD$^+$ tengely egyensúlyának visszaállítása alkalmas lehet az egészségben eltöltött idő növelésére, illetve az életminőség javítására. A PARP-1 – SIRT1 arány befolyásolása talán a legperspektivikusabb az időskori mitokondriális diszfunkció javítására, mivel idős korban a DNS javítás deficienciával összefüggő malignitások megjelenése és proliferációja jóval

lassúbb, mint fiatalkorban, vagyis a PARP inhibitoroknak várhatóan kevesebb mellékhatása lehet.

A PARP-1 fontos proinflammatórikus fehérje. Elsőként a PARP-1 és az NFκB közti kölcsönhatást írták le, azonban feloldatlan ellentmondás maradt, hogy a PARP-1 közvetlenül módosítja-e az általa regulált proinflammatorikus transzkripciós faktorokat. Ezt az ellentmondást oldották fel Kauppinen és munkatársai (Kauppinen és mtsai, 2013), amikor kimutatták, hogy a PARP-1 gátlás a NAD^+ szint emelésével a SIRT1 aktivitás emelkedéséhez vezet, a SIRT1 pedig az NFκB p65 alegységének deacetilálásával inaktiválja az NFκB dimert. Bár ez az egyetlen ismert példája annak, amikor a SIRT1 és PARP-1 kölcsönhatása közvetlenül szabályoz gyulladásos folyamatot, várhatóan más, hasonló útvonalakat is felismerhetnek a közeljövőben – erre utal, hogy a SIRT1 (anti-inflammatórikus hatású) és a PARP-1 (proinflammatórikus hatású) antagonisztikus a gyulladás szabályzásában.

5.6. A PARP és sirtuin enzimek kölcsönhatása oxidatív stresszre adott válasz során

Az oxidatív stresszre adott válaszban megfigyelhető a PARP-1 és a SIRT1 közti kölcsönhatás. A PARP-1 enzimet aktiválja az oxidatív stressz, sőt a PARP-1 aktiválás – több útvonalon keresztül – az oxidatív stressz fokozódásához is vezet és sejthalál folyamatokat indít be (Virag és Szabo, 2002). A SIRT1 aktiválás antagonisztikus hatású a PARP-1 aktivációhoz képest, mert (1) a sejtciklus megállása esetén apoptózist indukál; (2) fokozza több antioxidáns enzimek expresszióját mint a mangán szuperoxid diszmutáz vagy a kataláz; (3) visszaállítja az oxidatív stressz által károsított mitokondriális aktivitást; (4) illetve autofágiát indukál. A SIRT1 redox

szenzitív enzim, a SIRT1 karbonilációja, illetve a tiol-csoportok redox állapotának a megváltozása gátolja a SIRT1 enzimet. Számos esetben tapasztalható a SIRT1 és a PARP-1 kölcsönhatása magas oxidatív stresszel jellemezhető patológiás állapotokban. Ki szeretném emelni, hogy a SIRT1 aktivitás emelése, vagy a PARP aktivitás gátlása több – egyébként nehezen befolyásolható – neurológiai kórképben (pl. Huntington, Alzheimer vagy Parkinson betegség) javította a kísérleti állatok állapotát, ami ezekben az idősödő társadalmakat egyre jobban érintő betegségcsoportban jó kezelési alternatívát kínál (Chong és mtsai, 2012).

A PARP-2 az oxidatív stresszre adott válaszban a PARP-1-hez hasonlóan viselkedik, deléciója azonban csak részleges védelmet nyújt oxidatív stresszel jellemezhető betegségekben, mint a cerebrális iszkémia vagy a kolítisz (Kofler és mtsai, 2006). A PARP-2 deléciója a SIRT1 aktiválásán keresztül stabilizálja a mitokondriális funkciót és ezen keresztül fejti ki védő hatását. A védő hatás nem teljes mértékű, mert érintetlenül hagyja a folyamatosan működő PARP-1 enzimet. A SIRT1 promóterében található egyes SNP-k összefüggést mutatnak az oxidatív stresszel jellemezhető Parkinson-kór megjelenésének esélyével emberben (Zhang és mtsai, 2012), ami arra utal, hogy az oxidatív stresszel jellemezhető kórképek kialakulásában szerepet játszhat a SIRT1 promóter diszfunkciója, illetve a SIRT1 expresszió modulálása.

Jelenleg több PARP inhibitor van a klinikai kipróbálás különböző fázisában. Különböző tumorok kemo- és radioterápiájában kerülnek ezek a szerek bevezetésre, mint kemo- és radioszenzitizáló szerek (Curtin és Szabo, 2013). A tumorsejteket jellegzetes metabolikus átrendeződések jellemzik, amelyet Warburg hatásként ismerünk. A tumorsejtek energiatermelésükben a glikolízisre támaszkodnak, míg a mitokondriális

oxidáció limitált, a mitokondriumok több, a tumorsejtek osztódásához elengedhetetlen intermedier szintézisét végzik. A mitokondriális oxidáció induktorai csökkentik a mitokondriumokban zajló metabolitok szintézisét ezáltal leállítják a sejtciklust és csökkentik a mitotikus potenciált. Eredményeink arra utalnak, hogy a PARP inhibitoroknak is lehet anti-Warburg hatása, mivel indukálják a mitokondriális biogenezist. A PARP inhibitorok anti-Warburg hatása új támadáspontot (a metabolizmus befolyásolása) jelenthet, ami hozzáadódhat a kemo- és radioptencírozó hatásokhoz.

Bár a PARP enzimek és a metabolikus szabályzó elemek kölcsönhatásának vizsgálata még csak a kezdeti lépéseket jelentik, látható, hogy több, nagy populációt érintő betegség (metabolikus, neurodegeneratív és tumoros megbetegedések) esetében központi szerepük lehet. A betegségek széles köre és az érintett betegek óriási száma, illetve a rövidesen megjelenő, és emberben alkalmazható PARP inhibitorok abba az irányba mutatnak, hogy az általunk bemutatott terület potenciálisan kiaknázható a terápiában.

7. Az értekezésben ismertetett új tudományos eredmények összefoglalása

1. A PARP-1 deléciója vagy gátlása a NAD^+ koncentráció emelésével aktiválja a SIRT1 enzimet, ami a mitokondriális biogenezis emelkedéséhez vezet a barna zsírszövetben és a harántcsíkolt izomban.

2. A PARP-1 deléciója nem befolyásolja a SIRT2 és a SIRT3 enzimek aktivitását valószínűleg azért, mert a PARP-1 deléció csak a magi NAD^+ kompartmentet érinti.

3. A PARP-1 deléciót követő mitokondriális biogenezis emelkedés védelmet nyújt több metabolikus betegséggel szemben, mint az elhízás, vagy a II. típusú diabétesz.

4. A rövid távú PARP gátlás a PARP-1 delécióhoz hasonló előnyös metabolikus változásokat hoz létre a harántcsíkolt izomban.

5. A PARP-2 a SIRT1 promóterének represszora. A PARP-2 deléciója a SIRT1 expresszió és ezen keresztül a SIRT1 aktivitás növekedéséhez vezet.

6. A PARP-2 deléciója és az ennek következtében megnő a SIRT1 aktivitás és mitokondriális biogenezis a harántcsíkolt izomban és a májban, ami az energialeadás irányába tolja el a szervezet energiaháztartását.

7. A PARP-2 deléciója az RXR-PPARγ dimer aktivitásának a gátlásán keresztül csökkenti a fehér zsírszövet lipid raktározását egerekben. A PARP-2 deléciója védelmet nyújt az obezitással szemben egér modellben.

8. A PARP-2 deléciója a PDX1 aktivitásának gátlásán keresztül akadályozza a pankreász béta-sejtjeinek a magas zsírtartalmú diétára adott hiperplasztikus válaszát és így glükóz intoleranciához vezet.

9. A PARP-2 deléciója részleges védelmet nyújt az doxorubicin kezelés ellen a SIRT1 indukció és a mitokondriális biogenezis következményes stabilizálódása miatt.

Irodalomjegyzék

Altmeyer M, Messner S, Hassa P O, Fey M és Hottiger M O (2009) Molecular mechanism of poly(ADP-ribosyl)ation by PARP1 and identification of lysine residues as ADP-ribose acceptor sites. Nucleic Acids Res 37:3723-3738.

Ame J C, Rolli V, Schreiber V, Niedergang C, Apiou F, Decker P, Muller S, Hoger T, Menissier-de Murcia J és de Murcia G (1999) PARP-2, A novel mammalian DNA damage-dependent poly(ADP-ribose) polymerase. J.Biol.Chem. 274:17860-17868.

Asher G, Reinke H, Altmeyer M, Gutierrez-Arcelus M, Hottiger M O és Schibler U (2010) Poly(ADP-ribose) polymerase 1 participates in the phase entrainment of circadian clocks to feeding. Cell 142:943-953.

Bordone L, Motta M C, Picard F, Robinson A, Jhala U S, Apfeld J, McDonagh T, Lemieux M, McBurney M, Szilvasi A, Easlon E J, Lin S J és Guarente L (2006) Sirt1 regulates insulin secretion by repressing UCP2 in pancreatic beta cells. PLoS Biol. 4:e31.

Burkart V, Wang Z Q, Radons J, Heller B, Herceg Z, Stingl L, Wagner E F és Kolb H (1999) Mice lacking the poly(ADP-ribose) polymerase gene are resistant to pancreatic beta-cell destruction and diabetes development induced by streptozocin. Nat Med 5:314-319.

Canto C és Auwerx J (2012) Targeting Sirtuin 1 to Improve Metabolism: All You Need Is NAD+? Pharmacol Rev 64:166-187.

Canuelo A, Martinez-Romero R, Martinez-Lara E, Sanchez-Alcazar J A és Siles E (2011) The hypoxic preconditioning agent deferoxamine induces poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent inhibition of the mitochondrial respiratory chain. Mol Cell Biochem 363:816-823.

Chambon P, Weill J D és Mandel P (1963) Nicotinamide mononucleotide activation of new DNA-dependent polyadenylic acid synthesizing nuclear enzyme. Biochem.Biophys.Res.Commun. 11:39-43.

Chong Z Z, Shang Y C, Wang S és Maiese K (2012) SIRT1: new avenues of discovery for disorders of oxidative stress. Expert Opin Ther Targets 16:167-178.

Curtin N és Szabo C (2013) Therapeutic Applications of PARP Inhibitors: Anticancer Therapy and Beyond. Mol Aspects Med doi: 10.1016/j.mam.2013.1001.1006.

Davies K J és Doroshow J H (1986) Redox cycling of anthracyclines by cardiac mitochondria. I. Anthracycline radical formation by NADH dehydrogenase

Redox cycling of anthracyclines by cardiac mitochondria. II. Formation of superoxide anion, hydrogen peroxide, and hydroxyl radical. J Biol Chem 261:3060-3067.

De Vos M, Schreiber V és Dantzer F (2012) The diverse roles and clinical relevance of PARPs in DNA damage repair: current state of the art. Biochem Pharmacol 84:137-146.

Doroshow J H és Davies K J (1986) Redox cycling of anthracyclines by cardiac mitochondria. II. Formation of superoxide anion, hydrogen peroxide, and hydroxyl radical. J Biol Chem 261:3068-3074.

Edelman J C, Edelman P M, Kniggee K M és Schwartz I L (1965) Isolation of skeletal muscle nuclei. J Cell Biol 27:365-377.

Erener S, Mirsaidi A, Hesse M, Tiaden A N, Ellingsgaard H, Kostadinova R, Donath M Y, Richards P J és Hottiger M O (2012) ARTD1 deletion causes increased hepatic lipid

accumulation in mice fed a high-fat diet and impairs adipocyte function and differentiation. Faseb J 26:2631-2638.

Fajas L, Debril M B és Auwerx J (2001) PPAR gamma: an essential role in metabolic control. Nutr.Metab Cardiovasc.Dis. 11:64-69.

Francis G A, Annicotte J S és Auwerx J (2003) PPAR-alpha effects on the heart and other vascular tissues. Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol. 285:H1-H9.

Francis G A, Fayard E, Picard F és Auwerx J (2003) Nuclear receptors and the control of metabolism. Annu.Rev.Physiol. 65:261-311.

Hassa P O, Haenni S S, Buerki C, Meier N I, Lane W S, Owen H, Gersbach M, Imhof R és Hottiger M O (2005) Acetylation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 by p300/CREB-binding protein regulates coactivation of NF-kappaB-dependent transcription. J Biol Chem 280:40450-40464.

Houtkooper R H, Canto C, Wanders R J és Auwerx J (2010) The secret life of NAD+: an old metabolite controlling new metabolic signaling pathways. Endocr Rev 31:194-223.

Janssen O E és Hilz H (1989) Differentiation of 3T3-L1 pre-adipocytes induced by inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase and by related noninhibitory acids. Eur.J.Biochem. 180:595-602.

Ju B G, Lunyak V V, Perissi V, Garcia-Bassets I, Rose D W, Glass C K és Rosenfeld M G (2006) A topoisomerase IIbeta-mediated dsDNA break required for regulated transcription. Science. 312:1798-1802.

Kauppinen T M, Gan L és Swanson R A (2013) Poly(ADP-ribose) polymerase-1 -induced NAD depletion promotes Nuclear Factor-kappaB transcriptional activity by preventing p65 de-acetylation. Biochim Biophys Acta doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.1004.1005.

Kawaichi M, Oka J, Zhang J, Ueda K és Hayaishi O (1983) Properties of poly(ADP-ribose) synthetase and ADP-ribosyl histone splitting enzyme. Princess Takamatsu Symp 13:121-128.

Klaidman L, Morales M, Kem S, Yang J, Chang M L és Adams J D, Jr. (2003) Nicotinamide offers multiple protective mechanisms in stroke as a precursor for NAD+, as a PARP inhibitor and by partial restoration of mitochondrial function. Pharmacology. 69:150-157.

Kofler J, Otsuka T, Zhang Z, Noppens R, Grafe M R, Koh D W, Dawson V L, Menisser-de Murcia J, Hurn P D és Traystman R J (2006) Differential effect of PARP-2 deletion on brain injury after focal and global cerebral ischemia. J.Cereb.Blood Flow Metab. 26:135-141.

Kraus W L (2008) Transcriptional control by PARP-1: chromatin modulation, enhancer-binding, coregulation, and insulation. Curr Opin Cell Biol 20:294-302.

Kutuzov M M, Khodyreva S N, Ame J C, Ilina E S, Sukhanova M V, Schreiber V és Lavrik O I (2013) Interaction of PARP-2 with DNA structures mimicking DNA repair intermediates and consequences on activity of base excision repair proteins. Biochimie doi: 10.1016/j.biochi.2013.1001.1007.

Lai Y, Chen Y, Watkins S C, Nathaniel P D, Guo F, Kochanek P M, Jenkins L W, Szabo C és Clark R S (2008) Identification of poly-ADP-ribosylated mitochondrial proteins after traumatic brain injury. J Neurochem. 104:1700-1711.

Liang Y C, Hsu C Y, Yao Y L és Yang W M (2013) PARP-2 regulates cell cycle-related genes through histone deacetylation and methylation independently of poly(ADP-ribosyl)ation. Biochem Biophys Res Commun doi: 10.1016/j.bbrc.2012.1012.1092.

Mangerich A, Herbach N, Hanf B, Fischbach A, Popp O, Moreno-Villanueva M, Bruns O T és Burkle A (2010) Inflammatory and age-related pathologies in mice with ectopic expression of human PARP-1. Mech Ageing Dev 131:389-404.

Massudi H, Grant R, Braidy N, Guest J, Farnsworth B és Guillemin G J (2012) Age-Associated Changes In Oxidative Stress and NAD(+) Metabolism In Human Tissue. PLoS One 7:e42357.

Miyamoto T, Kakizawa T és Hashizume K (1999) Inhibition of nuclear receptor signalling by poly(ADP-ribose) polymerase. Mol.Cell Biol. 19:2644-2649.

Moynihan K A, Grimm A A, Plueger M M, Bernal-Mizrachi E, Ford E, Cras-Meneur C, Permutt M A és Imai S (2005) Increased dosage of mammalian Sir2 in pancreatic beta cells enhances glucose-stimulated insulin secretion in mice. Cell Metab. 2:105-117.

Munoz-Gamez J A, Rodriguez-Vargas J M, Quiles-Perez R, Aguilar-Quesada R, Martin-Oliva D, de Murcia G, Menissier de Murcia J, Almendros A, Ruiz de Almodovar M és Oliver F J (2009) PARP-1 is involved in autophagy induced by DNA damage. Autophagy 5:61-74.

Niere M, Kernstock S, Koch-Nolte F és Ziegler M (2008) Functional localization of two poly(ADP-ribose)-degrading enzymes to the mitochondrial matrix. Mol Cell Biol. 28:814-824.

Noriega L G, Feige J N, Canto C, Yamamoto H, Yu J, Herman M A, Mataki C, Kahn B B és Auwerx J (2011) CREB and ChREBP oppositely regulate SIRT1 expression in response to energy availability. EMBO Rep 12:1069-1076.

Quenet D, Gasser V, Fouillen L, Cammas F, Sanglier-Cianferani S, Losson R és Dantzer F (2008) The histone subcode: poly(ADP-ribose) polymerase-1 (Parp-1) and Parp-2 control cell differentiation by regulating the transcriptional intermediary factor TIF1beta and the heterochromatin protein HP1alpha. Faseb J. 22:3853-3865.

Rajamohan S B, Pillai V B, Gupta M, Sundaresan N R, Konstatin B, Samant S, Hottiger M O és Gupta M P (2009) SIRT1 promotes cell survival under stress by deacetylation-dependent deactivation of poly (ADP-ribose) polymerase 1. Mol Cell Biol 26:4116-4129.

Schreiber V, Ame J C, Dolle P, Schultz I, Rinaldi B, Fraulob V, Menissier-de Murcia J és de Murcia G (2002) Poly(ADP-ribose) polymerase-2 (PARP-2) is required for efficient base excision DNA repair in association with PARP-1 and XRCC1. J.Biol.Chem. 277:23028-23036.

Schreiber V, Dantzer F, Ame J C és de Murcia G (2006) Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule. Nat.Rev.Mol.Cell Biol. 7:517-528.

Shimizu Y, Hasegawa S, Fujimura S és Sugimura T (1967) Solubilization of enzyme forming ADPR polymer from NAD. Biochem Biophys Res Commun 29:80-83.

Smulson M E, Kang V H, Ntambi J M, Rosenthal D S, Ding R és Simbulan C M (1995) Requirement for the expression of poly(ADP-ribose) polymerase during the early stages of differentiation of 3T3-L1 preadipocytes, as studied by antisense RNA induction. J.Biol.Chem. 270:119-127.

Ueda K, Oka J, Naruniya S, Miyakawa N és Hayaishi O (1972) Poly ADP-ribose glycohydrolase from rat liver nuclei, a novel enzyme degrading the polymer. Biochem Biophys Res Commun 46:516-523.

Virag L, Salzman A L és Szabo C (1998) Poly(ADP-ribose) synthetase activation mediates mitochondrial injury during oxidant-induced cell death. J.Immunol. 161:3753-3759.

Virag L és Szabo C (2002) The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. Pharmacol.Rev. 54:375-429.

Wahlberg E, Karlberg T, Kouznetsova E, Markova N, Macchiarulo A, Thorsell A G, Pol E, Frostell A, Ekblad T, Oncu D, Kull B, Robertson G M, Pellicciari R, Schuler H és Weigelt J (2012) Family-wide chemical profiling and structural analysis of PARP and tankyrase inhibitors. Nat Biotechnol 30:283-288.

Walker J W, Jijon H B és Madsen K L (2006) AMP-activated protein kinase is a positive regulator of poly(ADP-ribose) polymerase. Biochem Biophys Res Commun 342:336-341.

Wang Z Q, Auer B, Stingl L, Berghammer H, Haidacher D, Schweiger M és Wagner E F (1995) Mice lacking ADPRT and poly(ADP-ribosyl)ation develop normally but are susceptible to skin disease. Genes Dev 9:509-520.

Xu S, Bai P, Little P J és Liu P (2013) Poly(ADP-ribose) Polymerase 1 (PARP1) in Atherosclerosis: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Implications. Mol Med Rev doi: 10.1002/med.21300.

Ying W, Chen Y, Alano C C és Swanson R A (2002) Tricarboxylic acid cycle substrates prevent PARP-mediated death of neurons and astrocytes. J Cereb Blood Flow Metab. 22:774-779.

Zhang A, Wang H, Qin X, Pang S és Yan B (2012) Genetic analysis of SIRT1 gene promoter in sporadic Parkinson's disease. Biochem Biophys Res Commun 422:693-696.

Zhang J (2003) Are poly(ADP-ribosyl)ation by PARP-1 and deacetylation by Sir2 linked? Bioessays 25:808-814.

8. Kapcsolódó közlemények

A PhD fokozat megszerzése óta megjelent 21 közlemény (a közlő folyóiratok impakt faktora 139,5)

Ebből az értekezést megalapozó 7 közlemény (a közlő folyóiratok impakt faktora 69,59)

Kísérletes közlemények

Bai P, Canto C, Brunyánszki A, Huber A, Szántó M, Cen Y, Yamamoto H, Houten SM, Kiss B, Oudart H, Gergely P, Schreiber V, Sauve AA, Menissier-de Murcia J, Auwerx J (2011) The absence of PARP-2 promotes SIRT1 expression and enhances whole body energy expenditure. *Cell Metab.* 13(4):450-60.
IF: 13,668

Bai P, Canto C, Oudart H, Brunyánszki A, Cen Y, Thomas C, Yamamoto Y, Huber A, Kiss B, Houtkooper RH, Schoonjans K, Schreiber V, Sauve AA, Menissier-de Murcia J, Auwerx J (2011) PARP-1 inhibition increases mitochondrial metabolism through SIRT1 activation. *Cell Metab.* 13(4):461-8.
IF: 13,668

Szántó M, Rutkai I, Hegedűs Cs, Czikora Á, Rózsahegyi M, Kiss B, Virág L, Gergely P, Tóth A, **Bai P** (2011) Poly(ADP-ribose) polymerase-2 depletion reduces doxorubicin-induced damage through SIRT1 induction. *Cardiovascular Research* 92:(3) 430-438.
IF: 6,064

Bai P, Houten SM, Huber A, Schreiber V, Watanabe M, Kiss B, de Murcia G, Auwerx J, Ménissier-de Murcia J. (2007) PARP-2 controls adipocyte differentiation and adipose tissue function through the regulation of the activity of the RXR/PPARγ heterodimer. *J Biol Chem*. 282, 37738-37746.
IF: 5,581

Összefoglaló közlemények

Cantó C, Sauve AA, **Bai P** (2013) Crosstalk between poly(ADP-ribose) polymerase and sirtuin enzymes. *Molecular Aspects of Medicine* doi: 10.1016/j.mam.2013.01.004.
IF: 10,375

Bai P, Cantó C. The role of PARP enzymes in metabolic regulation and disease. *Cell Metab.* 16(5) 290-295.
IF: 14,619

Szántó M, Brunyánszki A, Kiss B, Nagy L, Gergely P, Virág L, **Bai P** (2012) Poly(ADP-ribose) polymerase-2: emerging transcriptional roles of a DNA repair protein. *Cellular and Molecular Life Sciences* 69(24):4079-*4092*.
IF: 5,615

Köszönetnyilvánítás

Munkám támogatásáért köszönettel tartozom **Virág Lászlónak**, akiktől rengeteget tanultam, emberileg és szakmailag sokat kaptam, alapjaiban befolyásolták a pályámat és a döntéseimet.

A munkacsoport felépítésében nyújtott segítségért, illetve a laboratóriumi munkáért köszönet illeti **Brunyánszki Attilát, Szántó Magdolnát, Nagy Lillát, Fodor Tamást, Márton Juditot, Sipos Adriennt** és **Csumita Máriát**.

Köszönet illeti az Orvosi Vegytani Intézet munkatársait, segítették a napi munkámat, remek kollegák és barátok voltak. Szeretném kiemelni közülük **Gergely Pált**, **Erdődi Ferencet, Csortos Csillát, Bakondi Edinát, Hegedűs Csabát, Erdélyi Katalint, Kovács Katalint, Lakatos Petrát** és **Törő Gábort**. Az Intézet jelenlegi és múltbeli technikusai és adminisztratív munkatársai közül **Kovács Évát, Patka Andreát, Oláh Zsuzsát, Balogh Istvánt, Herbályné Erzsikét, Finta Lászlót** és **Hunyadiné Julikát** szeretném megemlíteni.

A disszertációban bemutatott munkához nélkülözhetetlenek voltak a kollaborátorok. **Johan Auwerx** (EPFL, Lausanne, Svájc), **Gilbert de Murcia** és **Josiane Menissier de Murcia** (ESBS, Strasbourg, Franciaország)) indítottak el a PARP enzimek és a metabolizmus közti kapcsolat vizsgálata irányába, alakították, tágították a látókörömet, illetve megnyitották előttem az európai mozgásteret. **Carles Cantó** (Nestlé Institute of Health Sciences, Lausanne), **Anthony A. Sauve** (Weill Cornell Medical College, USA) és **Valérie Schreiber** (ESBS, Strasbourg, Franciaország) támogatása nélkülözhetetlen volt. **Tóth Attila** (Kardiológiai

Intézet, Debreceni Egyetem) nemcsak önzetlen és odaadó barát, hanem kiváló kollaborátor, aki nélkül az érfunkció vizsgálatokat nem tudtuk volna végrehajtani. Köszönet illeti **Sander M. Houtent** (Icahn School of Medicine, Mount Sinai, USA), **Aline Hubert** (IBMC, Strasbourg, Franciaország), **Rutkai Ibolyát** és **Czikora Ágnest** (Kardiológiai Intézet, Debreceni Egyetem), illetve **Hughues Oudart**-t (CEPE, Strasbourg, Franciaország).

Köszönöm a barátoknak.

Feleségemnek, **Kiss Borbálának** köszönöm, hogy támogatott és erőn felül segített, amikor szükség volt rá, többször is megosztotta velem a külföldi tartózkodás és a laboratóriumi munka kenyerét. A két fiaimnak **Lehelnek** és **Marcinak** köszönöm, hogy ott voltak a mindennapokban. A **családom többi tagjának** pedig, hogy segítettek a mindennapok szervezésében és eljuttattak eddig.

Támogató pályázatok

A disszertációban tárgyalt munkákat az alábbi szervezetek támogatták: OTKA (K108308, PD83476, IN80481, NFF78498), Nemzeti Fejlesztési Ügynökség (FR-26/2009, FR-11/2007, TÁMOP-4.2.2. A-11/1/KONV-2012-0025), Debreceni Egyetem (Mecenatura Mec-1/2008, Mec-8/2011), Swiss National Science Foundation (IZK0Z3_131593), MTA-DE Sejtbiológiai és Jelátviteli Kutatócsoport, Eötvös ösztöndíj, Bolyai ösztöndíj (2007-2010, 2011-2014), Szodoray ösztöndíj, FEBS Long Term Fellowship.