

**Differenciáció kapcsolt Poly(ADP)-ribóz polimeráz 1
(PARP-1) fehérje expresszió csökkenés miotubulusokban
oxidatív stresszel szembeni ellenállóképesség
növekedéssel jár**

Doktori tézisek

Oláh Gábor

Testnevelési Egyetem
Sporttudományok Doktori Iskola



Konzulens: Dr. Radák Zsolt, PhD, DSc
Dr. Szabó Csaba, PhD, DSc

Hivatalos bírálók: Dr. Bácsi Attila, PhD
Dr. Koltai Erika, PhD

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Pavlik Gábor, PhD, DSc

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Szmodis Márta, PhD
Dr. Bácsi Attila, PhD

Galveston, TX, USA

BEVEZETÉS**PARP-1, Poli(ADP-ribóz) polimeráz 1**

PARP-1, poli(ADP-ribóz) polimeráz 1 a PARP család egyik fő izoformája, ez a család emberben 17, egérben 16 fehérjéből áll. Egy folyamatosan termelődő sejtmagi és mitokondriális fehérje jól ismert szereppel különböző sejtes funkciókban, mint például DNS (dezoxiribonukleinsav) hibajavításban, jelátviteli folyamatokban, különböző sejthalál útvonalakban és különböző kóros folyamatokban mint égés, szepszis, cukorbetegség és rák. A PARP által szabályozott legtöbb funkció oxidatív stresszhez kapcsolódik. A PARP-1 aktivációja oxidatív stimulus hatására poli(ADP-ribóz) egységek kovalens kapcsolását jelenti egyrészt saját magára az enzimre, illetve célfehérjékre NAD^+ felhasználása mellett. A PARP-1 "túlaktivációja" NAD^+ szint csökkenéshez vezet, amely befolyásolja a mitokondriális elektron transzportot és amennyiben továbbra is fennáll, nekrotikus sejthalálhoz vezet.

Más PARP-ok

A katalitikus domén összehasonlító analízisen alapulva, 17 emlős fehérjét soroltak be a PARP-ok közé (Ame et al., 2004).

A PARP-2-t PARP hiányos egér embrionális fibroblasztjában fedezték fel, amely a sejtmaradék PARP aktivitásáért volt felelős (Shieh et al., 1998; Ame et al., 1999). Sejtmagi enzim, kristályszerkezete a PARP-1-hez nagyon hasonló. PARP-2 hiányos egerek késést mutattak a DNS töres javításában, ami PARP-1 hiányos egerekben megfigyeltekhez volt hasonló (de Murcia et al. 2003; Schreiber, 2002).

A PARP-3 egy mono-ADP riboziláz, amely egy fontos eleme a centroszómának, ez az enzim a leánycentriólumokban található a sejtciklus folyamán (Augustin et al., 2003). A PARP-3 kölcsönhatásban van a PARP-1-gyel ami kapcsolatot feltételez a DNS károsodás ellenőrzési rendszere és a mitotikus ellenőrzőpont között. A vPARP (PARP-4), a PARP

család legnagyobb meretű tagja amely mono-ADP ribozilációval bír. Része az ún. Vault részecskéknek, amelyek RNS-eket es fehérjéket tartalmazó ribonukleoprotein (RNP) komplexek. Szintén a sejtmagban lokalizálódik és a mitotikus orsóval kapcsolt.

Smith es kollégái által elnevezett PARP-5 vagy Tankiraz-1 egy TRF-kölcsönható, ankirin-kapcsolt ADP-ribóz polimeráz (Smith et al., 1998). Sejtmagi eredetű, de szintén megtalálható a citoplazmában, aktivitását a mitogén-aktivált-fehérje-kinázok (MAPK) módosítják.

A TiPARP-ot vagy PARP-7 -et a 2,3,7,8-tetraklorodibenzo-p-dioxin kezelés utáni messzendezsér RNS expressziós mintázatának analizisekor találtak. Ez egy mono-ADP riboziláz és együtt található a setmagban az AHR-rel (aril hidrokarbon receptor), ami egy szintetikus hidrokarbon és egyéb más ligandok által aktivált transzkripciós faktor.

A PARP család más tagjai amiről a korábbiakban még nem tettünk említést csoportosíthatók mint CCCH-típusú PARP-ok, makro PARP-ok, és egyéb PARP-ok. A CCCH-csoport tartalmazza a PARP-12-t és -13-at, és a korábban bemutatott tiPARP-ot. Ezek hasonlóságot mutatnak a CCCH-szerű cink ujjakban, a WWE-ben (Triptofán: W, Glutamát: E aminosavak) és a katalitikus doménben. Az ún. makro domén PARP-ok vagy BAL PARP-ok csoportjába, a PARP-9, -14, -15 (BAL 1, 2, 3) tartoznak. A makrodomének konzervált domének az állatvilágban, melyek képesek PAR kötésére. A PARP-9-et diffúziós B-sejtes limfómás betegekben (DLB-CL) irták le "differential display" metodikát alkalmazva. A PARP-14-nek a fokális adhéziós molekulák forgalmában van szerepe és az aktin stressz filamentumok végén lokalizálódik (Vyas et. al., 2013).

Egyéb PARP-ok-hoz tartozik a PARP-6, -8, -10, -11, -16. Funkciójuk kevésbé ismert. A PARP-6 egy mono(ADP-ribozil) transzferáz es végbélrákos betegekben találtak meg. A PARP-10 gátolja a c-myc-et, egy transzkripciós faktort és szerepe van a sejtproliferációban (Yu et. al., 2005). A PARP-16 kristályszerkezetét Karlberg mutatta ki (Karlberg et. al., 2012) ami auto-ADP ribozilációs aktivitást mutatott.

A PARP család doménstruktúrájára alapozva különböző kapcsolatok lehetségesek a különböző sejtalkotókban. Továbbá, a PARP-1 kölcsönhat a PARP-2-vel vagy a PARP-3-al és a Tankiráz 1-gyel és 2-vel (Cook et al., 2002), ami tovább szélesíti a lehetséges biológiai funkciójukat.

A Poli(ADP-ribóz) metabolizmus

Poli(ADP-ribóz), pADPr szintézis

A poli(ADP-riboziláció) egy kovalens, reverzibilis modifikáció amelyben a PARP poli-ADP-ribóz egységeket kapcsol célfehérjékre NAD^+ -ot használva szubsztrátként. Történeti szempontból nézve, 1963-ban Chambon azt közölte, hogy van egy enzimatis aktivitás amely felelős a PAR polimer szintéziséért ami NAD^+ -ot igényel (Chambon et al., 1963). Ez az úttörő munka egy új területet hozott létre a kutatásban.

Nyugalomban lévő sejtekben az akceptor proteinek mono- vagy oligo-ADP-riboziláltak, míg stressz körülmények között, mint például genotoxikus stimulus alatt, a fehérjék poli-ADP-riboziláltak.

Számos fehérje célpontja a PARilációnak, mint például RNS/DNS polimerázok, Topoizomeráz II, p53, PCNA csak, hogy néhányat említsünk. ADP ribóz egységek hozzáadása megváltoztatja a fehérje nettó töltését ami egy megváltozott funkciót eredményez. Ez általánosságban gátolja a DNS-kötés képességét. (D'Amours et al. 1999).

Poli(ADP-ribóz) lebontás: poli(ADP-ribóz) glikohidroláz és egyéb enzimek amelyek PAR-t bontanak

Mono- és poli-(ADP-ribóz) egységek eltávolíthatóak PAR-bontó enzimekkel. Azt becsülték, hogy a PAR élettideje kevesebb mint 1 perc, amely egy szigorúan szabályozott szintézist és lebontást feltételez. A lebontó enzimek fő tagja a poli(ADP-ribóz) glikohidroláz (PARG), melynek gén szintű inaktivációja letalitást okoz a korai embrionális életben egerekben (Koh et al., 2004). Erdélyi és munkatársai munkájukban elegánsan prezentálták, hogy a PARG egy apoptózisból nekrozis irányba történő átkapcsolóként szolgál oxidatív stressz alatt (Erdélyi et al., 2009).

A PARP-1 biológiai funkciói

A PARP-1 szerepe a differenciációban és génexpresszióban

A differenciáció az a folyamat amely által egy sejt egy sejttypusból egy másikba változik át, specifikus feladatokat teljesítve, új funkciókat szerezve vagy másokat elvesztve. Például, a mioszatelit vagy szatelit sejtek a vázizomsejtek előalakjai amelyek aktiváció során újra belépnek a sejtciklusba, elkezdik az osztódásukat és miotubulusokká differenciálódnak.

A PARP-ról kimutatták, hogy változatos mehanizmusokkal részt vesz különféle transzkripciós folyamatokban, mint kromatin szerkezet módosító, illetve mint DNS-kötő transzkripciós faktorok és DNS-metiláció szabályozója.

A kromatin egy DNS-fehérje komplex, a kódolt információ szerkezeti alapja, ami genomiális DNS-ből, magi hisztonokból (H2 H2A, H2B, H3, és H4), kapcsoló hisztonokból (H1), és más kromatin-kapcsolt fehérjékből áll. Egy feltételezett útja annak ahogy a PARP-1 szabályozza a kromatin szerkezetet és transzkripciót, az a kromatinhoz kötődő fehérjék illetve a PARP-1 PARilációja, amely befolyásolja a kromatinszerkezetet. A hisztonok célfehérjék a PARP-1 *in vitro* megkötésében és szabályozzák a PARP-1 enzimaktivitását (Pinnola et al., 2007; Kotova et al., 2011).

A PARP-1 szerepe a DNS hibajavításban

A PARP-1 szerepe kulcsfontosságú a sejt DNS integritásának és stabilitásának a fentartásában. A DNS-t folyamatos intracelluláris (normál anyagcsere termékek) és extracelluláris (sugárzás, kémiai ágensek, hő sokk) hatások érik amelyek megváltoztatják a sejt kémiai állapotát befolyásolva a DNS-t. Ezek mutációkat, kromoszóma rendellenességeket vagy sejthalált okozhatnak. A PARP-1 gátlása érzékenyíti a sejteket genotoxikus stimulusra (Küpper et al., 1995; Ding and Smulson, 1994). PARP^{-/-} egér ugyan élet- és szaporodó-képes normális fenotípussal, azonban rendkívül érzékeny ionizáló sugárzásra és alkiláló szerekre (de Murcia et al., 1997).

A bázis kivágásos/egyszálú törés javítási folyamata (BER/SSBR)

A DNS egyszálú törés az elsődleges mechanizmus a károsodott bázisok es egyszálú törések javítására. A vad típusú es PARP-1 hiányos sejtek vizsgálata betekintést adott a PARP-1 szerepére a javítási folyamatban. A PARP-1 kölcsönhatásban áll a DNS polimeráz β -val ami fontos következményekkel bír. A PARP-1 hiányos sejtekből származó sejt kivonat nem volt képes a Long Patch Repair-re, és csökkent hatást mutatott a Short Patch Repair folyamatára (Dantzer et al., 2000).

A DNS duplaszálú törés (DSBs) hibajavítása HR es NHEJ által

A duplaszálú törésnek (DSBs) vannak a legkomolyabb következményei. A dupla szálú törés kiváltható ionizáló sugárzás, rákellenes gyógyszerek vagy éppen reaktív oxigén/nitrogén vegyületekkel. A természet létrehozott két mechanizmust amely közbelép amikor ezek a hatások kialakulnak, ezek a homológ rekombináció (HR) es nem homológ DNS végek összekapcsolása (NHEJ). HR akkor aktiválódik amikor az NHEJ folyamat gátlás alatt áll; HR-hez PARP-1 jelenléte szükséges (Hochegger et al., 2006).

Az NHEJ két csoportra osztható: klasszikus NHEJ (C-NHEJ) es alternatív NHEJ (A-EJ) függően a KU70-KU80 részvételétől. Amikor a C-NHEJ nem képes működni, úgy az A-EJ veszi át a javítást. A PARP-1 es a KU fehérjék között versengés van a DNS-ért. Ha a KU nem hozzáférhető, akkor a PARP-1 játszik aktív szerepet az A-NHEJ-ben.

PARP-1 a nukleotid kivágásos javításban

A fő mechanizmus pro- és eukariótákban az UV-indukált DNS károsodásban a nukleotid kivágásos javítás (NER). Mutáció a hibajavítási rendszer tagjaiban xeroderma pigmentosummal, Cockayne szindrómával es trichothiodystrophyüval asszociált. Robu es munkatársai bemutatták, hogy PARP-1 együtt működik a DDB2 (DNS-kötő fehérje 2)-vel es XPC (xeroderma pigmentózum csoport C)-vel az UV-károsodott lézióknál (Robu et al.,

2013; Luijsterburg et al., 2012; Pines et al., 2012).

PARP-1 a mitokondriumban

Ámbár a tudományos közélet megosztott a PARP-1 mitokondriális jelenlétét illetően (mtPARP-1) jelentős mennyiségű adat áll rendelkezésre ami alátámasztja az elképzelést és a PARP-1 szerepét a mitokondriális DNS hibajavításban, bioenergetikában és mitokondriális sejthalál útvonalakban (Masmoudi et al., 1998; Du et al., 2003; Rossi et al., 2009; Brunyanszki et al., 2016). SiRNA általi PARP-1 csendesítés A549 sejtekben illetve KO egerek szöveteinek használata megnövekedett mitokondriális biogenezist és hibajavító folyamatokat mutatott (Szczesny et al., 2014).

A PARP-1 sejthalálban betöltött szerepe

A PARP-1 szerepét leírták különböző sejthalál formákban mint például apoptózisban, nekrozisban, partanatoszban és autofágiában (Galluzzi et al., 2012). A DNS törés aktiválja a PARP-1-et melynek szerepe van a javítási folyamatban. A enzim folyamatos aktiválódása, amely nagy mennyiségű poli(ADP-ribóz)-t eredményez, felelős a gyors sejthalálért a lecsökkent NAD^+ raktár és ATP szintézis miatt.

Az apoptózis egy szigorúan szabályozott folyamat, ami sejt zsugorodással, kromatin kondenzációval és DNS fragmentációval, sejtmembrán kitüremkedéssel és sejtalkotók lebontásával jár együtt. Az apoptózis két alcsoportra osztható: a, külső amely sejten kívüli ligandokkal aktiválható és b, belső amely sejten belüli stresszorokkal, mint például DNS károsodással vagy mitokondriális onkogén faktorokkal aktiválható. Az apoptózis egyik fémjelzője a PARP-1 hasítás a kaspáz-3 és kaspáz-9 által. Ez a két kaspáz a PARP-1-et két részre hasítja: egy 24 kilodaltonos, aktív, a DNS kötő domént tartalmazó N-terminális és egy 89 kilodaltonos C-terminális katalitikus domént tartalmazó aktivitást elvesztő doménekre. (Tewari et al., 1995).

Nekrozis vagy az új nevezéktan alapján a nekroptózis, egy szabályozott folyamat, amelyet korábban egy passzív, szabályozatlan útnak gondoltak a sejthalálban. PARP-1 túlzott aktivációja általi bekövetkezett nekrozis számos patofiziológias folyamatban ismert. Nagy

koncentrációjú reaktív oxigén és nitrogén intermedierek (ROS és RNS) a PARP-1 túlzott aktivációját okozzák.

Partanatosz, amely a PAR és a görög eredetű halál szóból ered, szintén egy sejthalál forma. Ez a folyamat egy magi DNS károsodás és PARP-1 aktiváció általi sejthalálforma ami az AIF (apoptosis inducing factor) a mitokondriumból a sejtmagba való transzlokációjával jár együtt, amelyben foszfatidil-szerin sejtmembránból való kifordulásával, mitokondriális membránpotenciál csökkenéssel, kromatin kondenzációval, és az apoptózisban is megfigyelhető sejtsugorodással jár a különbséggel, hogy a sejtek megtartják a sejtmembránjuk integritását, kaszpázok aktíválódása nélkül és 50 kilodalton DNS fragmentumok megjelenése mellett. Az AIF transzlokáció nem történt meg PARP-1 knockout fibroblasztokban.

Az autofágiát egy önvédelmi mechanizmusnak gondolják ami segíti a sejteket abban, hogy fenntartsák az energia homeosztázisukat a sérült sejtalkotók lebontása során. Számos indukáló tényező válthat ki autofágiát, mint például oxidatív stressz, DNS károsodás, éhezés. PARP-1, ahogy az a fentiekben tárgyalva volt, aktivált az oxidatív stressz vagy DNS károsodás alatt amely függően az intenzitástól szintén aktiválhatja az autofágiás folyamatokat.

A PARP-1 szerepe a patofiziológiában

A kiegyensúlyozatlan sejtciklus szabályozás, sejtsztódás vagy DNS-javítás fontos jellemvonásai a tumorképződésnek. A PARP-1,-2,-3 enzimek genetikai kiütése vagy ezen enzimek farmakológiai gátlása nem stressz körülmények között nem vezet lényeges fiziológiai következményekhez vagy rák kialakulásához. Azonban amikor stressz körülmény lép fel az instabilitás megnövekszik. PARP-1^{-/-} egerek teljes testfelületre alkalmazott γ -sugárzás vagy N-methyl-N-nitroso urea (MNU) kezelés után instabilitást mutattak a genomban. A PARP-1^{-/-} egerekből származó sejtek nagy érzékenységet mutattak MNU-val szemben (de Murcia et al., 1997, Rouleau et al., 2007).

A reaktív oxigén és nitrogén gyökök (ROS-RNS) károsítják a sejteket és a sejtösszetevőket, mint például fehérjéket, lipideket, nukleinsavakat. Függően az oxidatív stressz

súlyosságától, ez indukálhat apoptózist, nekrozist vagy autofágiát. Ezek különféle betegségekkel hozhatóak összefüggésbe, mint szív- és ér-rendszeri megbetegedések, neurológiai, immunológiai vagy cukorbetegséggel kapcsolt elváltozások (lásd, Virag es Szabo 2002). A PARP-1-nek szintén szerepe van az energiaháztartásban mint metabolikus szabályozónak. PARP-1^{-/-} egerekből származó izom magasabb SIRT-1-el kapcsolt mitokondriális aktivitást (egy másik NAD⁺ felhasználó enzim), megemelkedett glükóz eliminációt és inzulin szenzitivitást mutatott (Bai and Canto 2012). A PARP-1 hosszú távú farmakológiai gátlása egerekben növelte az állóképességet a mitokondrium légzési lánc komplexeinek számának növelésén keresztül illetve megnövelve a mitokondriális légzés kapacitását. (Pirinen et al., 2012).

Oxidatív stressz mint a PARP-1 aktiváció kiváltója

Mint ahogy azt már említettük korábban, a PARP-1 legjobban vizsgált aktivátora a szabad gyökök által kiváltott DNS károsodás. Hosszantartó ROS-RNS képződés egy emelkedett PARP-1 aktivációhoz vezet csökkentve a sejt NAD⁺ és ATP készletét., amely gátolja az apoptózist es serkenti a nekrozist.

A reaktív oxigén és nitrogén intermedierekről tudjuk, hogy számos betegség kialakulásához járulnak hozzá mint például rákhoz, arteroszklerózishoz, cukorbetegséghez, idegrendszeri elváltozásokhoz vagy éppen az öregedéshez. Nevezéktani szempontból nézve a reaktív vegyületek, mind a ROS mind az RNS, összefoglaló elnevezések és két alcsoportra oszthatóak, szabad gyökökre es nem szabad-gyökökre. A ROS összefoglaló név ami magában foglalja mind az oxigén gyököket és számos nem gyökszerű molekulát amelyek önmagukban oxidáló tulajdonságúak és/vagy könnyen átalakíthatóak gyökökké (HOCl, HOBr, O₃, ONOO⁻, ¹O₂, H₂O₂). Másrészről, *minden oxigén gyök ROS, viszont nem minden ROS oxigén gyök.* RNS szintén egy összefoglaló elnevezés ami magában foglalja a nitrogén oxidot, nitrogén dioxid gyököket, akárcsak a nem gyökökhez tartozó HNO₂-t es N₂O₄. Megkülönböztethetünk endogén és exogén forrásokat. Az endogén forrás a mitokondrium, a peroxiszóma, a fagolizoszóma és az NO-t termelő enzimek, az NO szintetázok.

A reaktív oxigén intermedierek termelésének a fő helye a mitokondrium, amely

folyamatosan energiával látja el a sejtet és felelős a terminális oxidációért és az oxidatív foszforilációért. Az elektron transzport láncban (ETC) elektron (e^-) vándorol a belső membránon keresztül miközben proton (H^+) grádiens alakul ki ami energiát szolgáltat az ATP képzéséhez. Ebben a rendszerben az elektronok kiléphetnek a membránból ami oxigént redukálhat a Komplex I., II. és III.-ban szuperoxidot képezve. A peroxiszómák többszörös funkcióval rendelkező sejtalkotók eukariótákban, amelyek zsírsavat oxidálnak az α - és β -oxidáció által, részei az éter-foszfolipid bioszintézisének, aminosav metabolizmusnak és poliamin oxidációnak. Különböző peroxiszómális oxidázok különíthetők el melyek ROS-RNS-t generálnak. Fagolizoszómák tulajdonképpen reaktív intermediereket használnak a külső betolakodók leküzdésére. Gyakorlatilag egy egyrétegű membrán fagoszóma ami egy lizoszómával fuzionált. Számos fehérvérsejtben megtalálhatóak, úgy mint granuló-, mono-, és limfocitákban (Forman and Torres 2001).

Az oxidatív és nitrozatív stressz hatása a PARP tekintetében

Általánosságban, ROS-ok és RNS-ek képesek a telítetlen zsírsavak, fehérjék és nukleinsavak károsítására megváltoztatva az ő funkciójukat amelyek diszfunkcióhoz vezetnek.

Peroxidáció megváltoztatja a lipidek membránösszetételét amely fluiditás- és permeabilitásbeli különbségekhez vezetnek. A melléktermékek a 4-hidroxi-2-nonenal (HNE) és az akrolein (Niki, 2009).

Fehérjék szintén oxidálódnak ROS/RNS stimulusra. Tirozin oldalláncok módosítása nitrálás által a negyedleges szerkezet változásával és az enzimatis aktivitás csökkenésével jár. Az oxidáció termékei az aldehidek, ketonok illetve karbonilált fehérjék.

Egy másik nagyon fontos molekula amely szintén a reaktív intermedierek károsító hatását szenvedheti el a DNS, dezoxikribonukleinsav. Emberben naponta több ezer DNS károsodás történik, amelyek specifikus mehanizmusokkal javítódnak. Ilyen például a bázis kivágásos vagy a nukleotidkivágásos javítás. Az, hogy vajon a javítás sikeres vagy nem attól is függ, hogy milyen arányú volt az oxidatív károsítás, ami azt is meghatározza, hogy a sejt apoptózis vagy a nekrosis irányába indul-e ami PARP-1 aktivációval kapcsolt. (Virag and

Szabo, 2002).

Fontos azonban megjegyezni, hogy az oxidatív stresszel szembeni érzékenység különbözik a nukleáris és mitokondriális DNS tekintetében. Például egy adott koncentrációjú oxidáns (glükóz oxidáz kezelés) megemeli a mitokondriális DNS károsodást koncentráció függő módon, míg ugyanezen koncentráció nem károsítja a nukleáris genetikai allományt (Szczytny et al., 2013).

Endogén antioxidáns rendszerek

Annak érdekében, hogy egy élő sejt közömbösítse az ROS/RNS termékeket, az élő sejtek antioxidáns rendszerekkel és molekulákkal vannak ellátva. Fontos megemlíteni azokat az antioxidáns forrásokat amelyekhez a táplálkozással juthatunk hozzá. Enzimek mint például a kataláz (CAT), glutation peroxidáz (GPX) és a szuperoxid dizmutáz (SOD) elősegítik a ROS/RNS termékek detoxifikálását. A SOD szuperoxidot alakít át hidrogén peroxiddá, míg a CAT és GPX a hidrogén peroxidot alakítja vízzé. Kétféle SOD különböztethető meg, Cu- és Zn-SOD (SOD1) amelyek citoplazmatikus eredetűek, illetve a Mn-SOD (SOD2) amely a mitokondriumban található (McCord and Fridovich, 1968, Marklund, 1990). A CAT és GPX a mitokondriumban és a citoszólban találhatóak.

A vázizom biológiája

Az élet egyik legalapvetőbb jelensége a mozgás. A test egészének vagy csak egy részének a mozgatása, például az emésztés folyamata, ahogyan a táplálék továbbhalad a bélrendszerben, vagy a szem mozgatása, csak, hogy néhányat említsünk, nélkülözhetetlen az élethez. Ezen funkciók végrehajtására a természet kifejlesztette az izmot amely egy nagyon összetett rendszer, azonban egy közös funkció jellemzi: összehúzódás ami az aktin és miozin molekuláris mehanizmusán alapul.

Az izmokat feloszthatjuk harántcsíkolt- és simaizomra. A harántcsíkolt csoporton belül két típus különíthető el: váz- és szívizom. Az előbbi két általános típusba sorolható: gyors és lassú rostok.

Az összehúzó erő molekuláris szerkezete

A gerincesek izomzatának harántcsíkolt megjelenése van ami többmagvú sejtekből áll. A sejten belül egymással párhuzamosan futó struktúrák különíthetők el amiket izomrostnak neveznek. A miofibrillum hosszanti metszete egy jól karakterizálható alap egységet mutat amit szarkomérnek hívnak amely minden 2.3 μm -enként ismétlődik a rost mentén. Ennek a szerkezetnek a felfedezése az 50-es és 60-as évek úttörő munkájának köszönhető ami utat nyitott a "sliding filament hypothesis" modelljéhez. Két filamentet különítettek el: a vastagot, amely főleg miozint tartalmazott és a vékonyt amely aktint, tropomiozint és troponin komplexet tartalmazott. Az 1940-es években Szent-Györgyi Albert kimutatta, hogy molekuláris szinten az összehúzóadás aktin, miozin és ATP kölcsönhatásán alapul amihez Mg^{2+} szükséges (1942).

A vázizom eredete

A vázizom a középső csíralemezből, a mezodermából fejlődik. A mezodermában kialakuló szomita egy komplex struktúrát alkot, amiben a különböző sejtcsoportok közötti interakciók hatására létrejön az izomszövet.

A miogenezis sejtes alapja

1960-ban Alexander Mauro nevéhez fűződik a béka izomból származó osztódásra képes sejtek felfedezése (Mauro 1961) amiket szatelit sejteknek nevezte el, amelyek a károsodott izomrostok regenerálásáért és fenntartásáért felelnek (Hawke and Garry, 2001). Stimulációra (testmozgás, karosodás) különböző jelátviteli útvonalak aktiválódnak (TWEAK, NF- κB) amelyek hatására ezek a sejtek osztódnak és mioblaszt sejtekké differenciálódnak, amelyekből aztán miotubulusok képződnek.

Harántcsíkolt izomsejtek mint modell rendszerek

A leggyakrabban alkalmazott modell rendszer a miogenezis, szatelit sejt funkció és morfológia vizsgálatára a C2C12 sejt vonal (egér mioblaszt sejtek) amelyet a hetvenes években izoláltak és amely könnyen differenciálódik miotubulussá bizonyos körülmények között (Yaffe and Saxel, 1977). Viselkedésük nagyon hasonló a szatelit sejtekéhez ezért is használják ezeket a sejteket mint model rendszer.

Célkitűzések

Differenciálódó izomsejtekben kimutattuk, hogy a PARP-1 fehérje expressziója szignifikánsan lecsökken a mioblasztból miotubulussá történő sejtek átalakulása során.

Mivel a PARP-1 aktiváció egyik fő kiváltója az oxidatív stressz ezért a következő kérdések merültek fel a munkám során, vajon:

- a lecsökkent PARP-1 szint a miotubulusokban előnyt jelenthet-e az oxidatív károsodással szemben?
- megváltozik-e a mitokondriális funkció összehasonlítva a mioblasztot és a miotubulust?
- farmakológiai PARP-1 gátlás hasonló hatást mutat-e az expresszióbeli PARP-1 csökkenés pozitív hatásához?
- a PARP-1 gátlás hasznos lehet-e patológiai körülményekben?

Anyagok és módszerek

Reagensek. A kísérleteinkhez szükséges reagenseket a Sigma-Aldrich- (St. Louis, MO, USA) és a Life Technologiéstól (Carlsbad, CA, USA) vásároltuk.

Sejtkultúra. A sejteket, nevezetesen a C2C12 (ATCC® CRL-1772™), L6 (ATCC® CRL1458™) izom sejtvonalakat és a humán monocita histiocita limfóma sejtvonalat, U937 (ATCC® CRL-1593.2™) az American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA)-tól szereztük be.

Teljes sejtkivonat készítés és Western blot. A sejtkivonat elkészítéséhez NP-40 puffert (20 mM Tris-HCl, pH 8.8, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5% Nonidet P-40, 12 mM Na-deoxycholate) használtunk. Fehérje koncentrációt Pierce BCA Protein Assay Reagent BCA alapú metodikájával végeztük. A fehérjéket SDS-PAGE segítségével szeparáltuk és nitorcellulóz membránra (Bio-Rad) transzferáltuk.

MTT viabilitási próba. Az MTT mérést a korábbiakban leírtak alapján hajtottuk végre (Gerő et al., 2013).

LDH cititoxicitási próba. Az LDH meghatározást a korábbiakban leírtak alapján hajtottuk végre (Gerő et al., 2014).

NAD⁺ szint mérés. A teljes NAD⁺ szint meghatározásához NAD⁺/NADH Cell-Based Assay Kit-et (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) használtunk követve a cég által javasolt protokollt.

Apoptózis/nekrózis meghatározása áramlási citometriával. A sejthalál mérésére PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I-et (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA) használtunk a cég általi javasolt protokollt követve.

Bioenergetikai analízis izolált mitokondriumból. A bionergetikai funkció mérésére a XF24 Extracelluláris Flux Analyzátort (Seahorse Biosciences, North Billerica, MA) alkalmaztuk. A mitokondrium izolálásához és az extracelluláris bioenergetikai analízishez a korábban közölt protokollokat használtuk (Frezza et al., 2007; Rogers et al., 2011; Módis et al., 2013).

Mitokondriális membrán potenciál mérés. A mitokondriális membrán potenciál változásokat TMRE Membrane Potential Kit-tel mértük (Life Technologies, Carlsbad, California, USA) a cég protokollja alapján illetve korábbi közleményekre hagyatkozva (Módis et al., 2013).

Fluorescens mikroszkópia. Mioblasztokat és miotubulusokat 4% paraformaldehiddel fixáltuk, majd 0.5% Triton-X-100-ban permeabilizáltuk és 0.5% Triton-X-100-ban 2.5% ló szérumot tartalmazva blokkoltuk. Az elsődleges antitesteket 16 óran át alkalmaztuk 4°C-on. A mikroszkópos elemzéshez Photometric CoolSNAP HQ2-vel ellátott Nikon Eclipse 80i fluorescens mikroszkópot illetve a képek értékeléséhez NIS-Elements BR 3.10 szoftvert használtunk (Nikon Instruments, Melville, NY, USA).

PARP-1 csendesítés siRNA-val és a csendesített sejtek bioenergetikai analízise. 1×10^5 sejtet illetve 40 nM PARP-1 specifikus siRNA-t (Applied Biosystems/Ambion, Austin, TX, USA) használtunk a transzfekcióhoz Lipofectamine™ 2000-t alkalmazva mint transzfekciós reagens (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) követve a gyártó protokollját. XF24 Extracellular Flux Analyzátort alkalmaztunk a bioenergetikai paraméterek méréséhez (Módis et al., 2012).

A mioblasztok tranziens transzfekciója PARP-1-vel. A mioblasztokat Lipofectamine 2000-el transzfektáltuk, teljes hosszúságú PARP-1 cDNS-t alkalmazva amely pCMV6-Entry vektorba (Myc-DDK) volt inzertálva (Origene Technologies, Rockville, USA, MD) a cég javaslatának megfelelően.

Proximity Ligation Assay (PLA). Az *in situ* fehérje-fehérje kölcsönhatás kimutatására Duolink *in situ* (Olink Bioscience, Uppsala, Sweden) kit-et használtunk követve a cég által megadott protokollt. A mikroszkópos elemzéshez Photometric CoolSNAP HQ2-vel ellátott Nikon Eclipse 80i fluorescens mikroszkópot illetve a képek értékeléséhez NIS-Elements BR 3.10 szoftvert használtunk (Nikon Instruments, Melville, NY, USA).

Humán izombiopsziák gyűjtése égett gyermekekből. 0-17 év közötti 40% teljes testfelületre vonatkoztatott égéses betegeket választottak a mintavételre akik 96 órán belül érkeztek a Shriners Hospital for Children intézményébe. A betegek a korábbiakban közölt alapvető ellátásban részesültek (Herndon et al., 1998). A mintagyűjtést és analízist az intézményi "IRB" (Internal Review Board) hagyta jóvá.

Propranolol kezelés. A gyógyszeres kezelés a korábbiakban leírtak alapján történt (Jeschke et al., 2007). Napi 4mg/kg propranololt kaptak a betegek az intézménybe kerüléstől számítva 10±1 hónapig.

Western blot poli(ADP-ribóz)-ra. Az izommintákat homogenizáló pufferben vettük fel (50mM Tris pH 7.4, 150mM NaCl, 1% Triton-X-100, 10mM EDTA, Proteáz Inhibitor Kóktél jelenlétében) és a további analízist a korábbiakban közöltek alapján végeztük (Tóth-Zsámboki et al., 2006).

Immunhisztokémiai analízis. Az izom biopsziákból 5 mikron vastagságú fagyasztott metszetek kerültek felhasználásra. Elsődleges antitestek, amelyeket használtunk: 1) PAR (Tulip egér monoklonális anti-test, anti-humán, 1:10), 2) CD-31 (DAKO egér monoklonális anti-test, anti-humán, 1:200), 3) Von Willebrand faktor (DAKO egér monoklonális anti-test, anti-humán, 1:200), 4) (DAKO nyúl poliklonális anti-test, anti-humán, 1:4000).

PAR immunfestés. A metszeteket 7 percig avidin jelenlétében, majd az elsődleges antitesttel (PAR) inkubáltuk egy órán keresztül. Ezek után a másodlagos antitesttel való

inkubáció következett (LSAB2) 15 percig, majd egy másik 15 perc inkubálás történt a LSAB2 jelző reagenssel (DAKO), majd ezt követte a diaminobenzidine alkalmazása (DAB, DAKO) 5 percig.

Kettős immunfestés. A festés a következő kombinációkban történt: 1) PAR (FR) és CD-31 (DAB), 2) PAR (FR) és factor VIII-related antigen (DAB), 3) PAR (FR) és S-100 (DAB).

Statisztikai analízis. A C2C12-, L6-, és U937-sejtek adatait középértékek \pm SEM and SD-ként ábrázoltuk. Egyutas ANOVA-t használtunk a statisztikai analízisre illetve Tukey's post-hoc tesztet alkalmaztunk a szignifikancia meghatározására az egyes csoportok között. A $p < 0.05$ értékeket tekintettük szignifikánsnak. A humán minták analíziséhez nonparametrikus ANOVA tesztet illetve a Kruskal-Wallis post-hoz tesztet használtunk ahol a $p < 0.05$ értékeket tekintettük szignifikánsnak.

Eredmények

Mioblaszt differenciáció PARP-1 fehérje expresszió csökkenésével kísért jelenség

A C2C12 egy jól meghatározott kísérleti modell az izomsejtek differenciálódásához. Osztódó mioblasztok különböznek morfológiájukban, fehérje expressziós mintázatukban a nem osztódó miotubulusokhoz képest. A valódi differenciálódás jellemzéséhez figyelemmel kísértük a transcription factor paired-box 7 (Pax7), a proliferating cell nuclear antigen (PCNA), és a myogenin fehérjék expressziós mintázatát (Wang and Rudnicki 2012). Ezek az eredmények hűen tükrözik, hogy a differenciáció valóban lezajlik. Ezen felül, megfigyeltük, hogy a PARP-1 expressziója lecsökken a differenciált miotubulusokban. Azért, hogy igazoljuk a megfigyelésünket, miszerint a PARP-1 fehérje szintje lecsökken differenciáció alkalmával, egy másik sejtvonalat is alkalmaztunk az eredmények igazolására, nevezetesen patkányból származó L6 sejteket (Hudson et al., 2014). Az L6 sejtekből származó adatok kimutatták, hogy a differenciált sejtek csökkent PARP-1 szinttel rendelkeznek. Ezen felül U937 sejtek PMA (forbol-mirisztil-acetát) általi differenciációja szintén egy csökkent PARP-1 fehérje szintet mutatott. Azt is kimutattuk, hogy ez a változás nem a kontakt gátlás eredménye.

Differenciált miotubulusok rezisztensekké válnak oxidatív stresszel szemben

Azért, hogy megvizsgáljuk a PARP-1 gátlás hatását, először megállapítottuk a maximális nem-toxikus koncentrációját egy jól ismert PARP gátlószernek, nevezetesen a PJ-34-nek. Ez alapján a további kísérletekhez 10 μ M-t választottunk mint a legmagasabb nem-toxikus koncentráció.

Adataink szerint a miotubulusokban a mioblasztokhoz képest a PARP-1 fehérje szintje csökkent és a H₂O₂ kezelés kisebb fokú PARP-1 aktivációt mutatott amelyet a PAR termék Western blot analízisével igazoltunk teljes sejt extraktumot használva.

A következőkben összehasonlítottuk a mioblasztok és miotubulusok viabilitásbeli

változásait miután különböző koncentrációjú H_2O_2 kezelésnek vetettük alá ezeket a sejteket mérve tápoldatból való LDH felszabadulását, az MTT formazánná történő átalakítását illetve meghatároztuk a NAD^+ mennyiségét. Ahogy azt vártuk, a növekvő koncentrációjú H_2O_2 a mioblasztokban LDH emelkedést mutatott, amelyet a PJ-34 PARP gátlószer szignifikánsan csökkentett. Hasonlóan, egy szignifikáns csökkenést figyeltünk meg a mioblasztokban mind az MTT átalakításában, mind pedig a NAD^+ mennyiségének vonatkozásában az emelkedő H_2O_2 kezelés hatására. PJ34 előkezelés csökkentette a H_2O_2 károsító hatását, amely csak kismértékű hatással volt a miotubulusokra. A glukóz oxidáz citotoxikus hatását szintén kivédte a PJ34 mioblasztokban koncentráció-függő módon. Miotubulusokra a glukóz oxidáz csak magas koncentrációban volt hatással. Elvégeztünk egy hasonló kísérletetsorozatot egy másik sejt vonalon, nevezetesen a patkányból származó L6 sejteken amelyekből hasonló következtetéseket vontunk le, miszerint a miotubulusok rezisztensebbek voltak ugyanazon koncentrációjú H_2O_2 -al és glukóz oxidázzal szemben. Megfigyeléseinket, miszerint a miotubulusok ellenállóbbak az oxidatív stresszel szemben, tovább igazoltuk áramlási citometriával. Oxidáns kezelésre, PJ34-vel való PARP gátlás csökkentette a sejthalált, elsődlegesen csökkentve a nekrotikus és apoptotikus sejtek arányát, ami azt javasolja, hogy ennek a folyamatnak egy jelentős PARP-1 függő komponense van.

A miotubulusok mitokondriális funkciója megtartott az oxidatív stressz alkalmával

Extracellular Flux Analízissel vizsgáltuk meg a fő mitokondriális paramétereket mioblasztból és miotubulusból izolált mitokondriumot összehasonlítva és azt találtuk, hogy a miotubulusoknak magasabb ATP termelésük és emelkedett maximális légzési kapacitásuk volt a mioblasztokkal összehasonlítva. A mioblasztokban szintén megfigyelhető volt egy fokozatos membrán potenciál csökkenés az oxidatív stimulus után.

PARP-1 fehérje szint magasabb volt a mioblasztok nukleáris és mitokondriális frakcióiban a miotubulusokhoz képest.

Tranziens PARP-1 csendesítést alkalmazva vizsgálatokat folytattunk a bioenergetikai paraméterek vonatkozásában is. Azt találtuk, hogy a PARP-1 csendesítés megnövelte mind

az oxidatív foszforilációt mind pedig a glikolitikus aktivitást

PARP-1 overexpressziója oxidáns kezeléssel szembeni érzékenység növekedésével jár miotubulusokban

PARP-1-et overexpresszáltuk mioblasztban amelyet differenciáltattunk miotubulussá, annak érdekében, hogy megvizsgáljuk vajon a PARP-1 emelkedett szintje érzékenyíti ezeket a sejteket az oxidatív stresszel szemben és azt találtuk, hogy ezek a miotubulusok érzékenyebbek lettek a hidrogén peroxid kezelésre: ezen sejtek magasabb LDH értéket mutattak összehasonlítva az ő kontrolljukhoz képest.

Oxidatív stressz egy korai PARP-1 aktivációhoz vezet U937 sejtekben

10 perces hidrogén peroxid kezelés (400 μ M) PARP-1 aktivációt indukált (auto-PARiláció) a sejtmagon kívüli térben ami főként mitokondriális lokalizációjú volt. 3-24 órával a kezelés után, összhangban más tanulmányokkal, magi PARP-1 aktiváció volt megfigyelhető. Más patofiziológiás események is megfigyelhetőek voltak mint például mitokondriális DNS károsodás, sejtes oxidánsok felszaporodása és megváltozott sejt membrán integritás.

β -adrenoceptor jelátvitel is szerepet játszik a PARP-1 aktivációban H_2O_2 kezelésben

U937 sejtek előkezelése a β -receptor antagonistá propranolollal (10 μ M) 10 perccel a hidrogén peroxid kezelés előtt szignifikánsan csökkentette számos fehérje PARilációját, beleértve magát a PARP-1 enzimet. A PARP-1 aktivációjának a szabályozása egy általános jelenségnek tűnik ugyanis a propranolol gátolta a hidrogén peroxid okozta PARilációt a C2C12 mioblasztokban is.

A PARP-1 gátlás pozitív hatása égett betegekből vett izombiopsziákban

Munkánk során összehasonlítottuk a PARP aktivációt normál és az égés után különböző időpontban vett izom biopszia mintákból. Az izombiopsziák mintavétele és analízise az intézeti IRB által jóváhagyott protokoll szerint zajlott. A PARiláció főleg a PARP-1-et magát érintette 120 kilodaltonnál, ám más fehérjék is részesei voltak a PARilációs folyamatoknak.

A PARP-1 immunohisztokémiai elemzése leginkább a középső csoportot érintette összehasonlítva a kontrol csoporttal. A PARilációs jel elsődlegesen a kapillárisok endothelsejtjeiből volt származtatható és ko-lokalizálódott a CD-31-el és a VIII-antigénnel. PAR pozitív festés volt megfigyelhető a mononukleáris és neuroglia sejtekben is ami az S-100 festéssel mutattunk ki.

Egy másik célja a tanulmányunknak az volt, hogy kiértékeljük a propranolol terápia hatását a PARP aktivációra vonatkoztatva. A legfontosabb eredmény az volt, hogy a PARiláció csökkent volt a propranolollal kezeltékben az égés után eltelt idővel arányosan azokhoz a betegekhez képest akik nem kaptak propranolol kezelést.

Jövőbeli terveink

A következő kérdésekre keressük a választ az elvégzett munkával kapcsolatban: (a) mi a szerepe más PARP izoformáknak a differenciáció során, (b) mi az a mechanizmus amelyen keresztül a glikolitikus aktivitás emelkedett PARP-1 csendesítés után, és (c) mi az oka, hogy a PARP-1 fehérjeexpresszió csökkenése a differenciáció alatt sejttípus függő. Érdekes megemlíteni, amit nemrégiben mutattak ki, hogy a PARP-2 gátlásakor mitokondriális biogenezis növekedést tapasztaltak (Mohamed et al., 2014). (d) Égett betegek kezelésében hasznos lehetne megvizsgálni, hogy antioxidánsok vagy PARP inhibitorok alkalmazása mint kiegészítő terápia a testedzés mellett, javítja-e a betegek állapotát illetve meghatározni azokat a molekuláris kiváltó tényezőket amelyek PARP aktivációt idéznek elő; mindezeket egy jobb terápiás lehetőség reményében.

Konklúziók

Többféle megközelítési módszert alkalmazva elmondhatjuk, hogy a differenciáció során lezajló PARP-1 fehérje csökkenés C2C12 sejtekben az oxidatív stresszel szembeni ellenállóképesség illetve mitokondriális funkció növekedésével jár együtt. Tisztában vagyunk azzal, hogy a PARP-1 szabályozása a mioblasztban és miotubulusban egy speciális eset lehet, mivel a PARP-1-nek többféle szerepe is lehet a különböző sejtípusokban.

Kimutattunk egy korai, mitokondriális lokalizációjú PARP-1 aktivációt és a β -adrenoceptor agonista propranolol PARP-1 aktivációt gátló szerepét.

Bebizonyítottuk, hogy PARP-1 aktiváció zajlik le az égett betegek izomszövetében, amelyre a propranolol védő hatással bír. Annak érdekében, hogy pontosan meghatározzuk a PARP-1 mechanikai szerepét égéses betegekben, a jövőben megelőző tanulmányokra lesz szükség PARP-1 gátlószerek alkalmazásával.

Eredményeinket összefoglalva elmondhatjuk:

- PARP-1 fehérje expressziójának jelentős csökkenése volt megfigyelhető vázizomsejtek differenciációja során egér és patkány sejtmodellekben.
- A miotubulusok csökkent PARP-1 szintje egy nagyobb oxidatív stresszel szembeni rezisztenciát eredményezett összehasonlítva a mioblasztokkal
- A PARP-1-nek szerepe van az izomsejtek bioenergetikájának szabályozásában mind normál mind oxidatív körülmények között. Emelkedett mitokondriális légzési paramétereket mutattunk ki olyan mioblasztokban amelyeket PARP-1 konstrukttal csendesítettünk. Ez jelentheti, hogy a PARP-1 csendesítés javítja a mitokondriális funkciót.
- U937 sejtekben kimutattuk, hogy van egy korai PARP-1 aktiváció amely mitokondriális lokalizációjú és ez gátolható a β -adrenoceptor agonista propranolollal.

Disszertációhoz kapcsolódó saját közlemények

Olah G, Szczesny B, Brunyanszki A, Lopez-García IA, Gero D, Radak Z, Szabo C. (2015) Differentiation-associated downregulation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 expression in myoblasts serves to increase their resistance to oxidative stress. *PloS One*, 10: e0134227.

Brunyanszki A, **Olah G**, Coletta C, Szczesny B, Szabo C. (2014) Regulation of mitochondrial poly(ADP-ribose) polymerase activation by the β adrenoceptor / cAMP / protein kinase A axis during oxidative stress. *Mol Pharmacol*, 4: 450-62.

Olah G, Finnerty CC, Sbrana E, Elijah I, Gero D, Herndon DN, Szabo C. (2011) Increased poly(ADP-ribosylation) in skeletal muscle tissue of pediatric patients with severe burn injury: prevention by propranolol treatment. *Shock*, 36: 18-23.