

OTKA PD 84476 „A poli(ADP-ribóz) polimerázok gátlásának hatása a metabolikus egyensúlyra, a lipid és a glükóz metabolizmusra” pályázat zárójelentése

Kutatásaink homlokterében a poli(ADP-ribóz) polimeráz (PARP) enzimek metabolikus szerepének vizsgálata állt különös tekintettel a lipid metabolizmusban betöltött szerepükre. Kutatásaink a májra, mint az intermediér anyagcsere központi szervére, illetve a bőrre fókuszáltak.

A májban lezajló folyamatokat HepG2 sejtekkel modelleztük, melyekből PARP-2 depletált sejteket állítottunk elő PARP-2 specifikus shRNS bevitelével (lentivirális transzfer) (shPARP2 sejtek). Előállítottunk párhuzamosan egy olyan vonalat is, amely olyan shRNS szekvenciát tartalmaz, amely nem specifikus egyetlen humán génre sem (scPARP-2), ez kontrollként szolgált.

Az alábbi metabolikus eltéréseket mutattuk ki az shPARP2 sejtekben, illetve PARP-2 knockout egerekben:

- a mitokondriális membránpotenciál megemelkedése,
- a sejtek oxigénfogyasztásának megemelkedése,
- csökken a sejtek lipid és glikogénraktározása,
- a PARP-2 depléciónak hatására indukálódik a SIRT1 expressziója, ami magyarázhatja a mitokondriális hatásokat,
- a májban megnő a szabad és az észterezett koleszterin mennyisége.

A koleszterin mennyiségének növekedése váratlan és érdekes felfedezés volt, így ezt a jelenséget tovább vizsgáltuk. A jelenség okának megismerésére microarray vizsgálatot végeztünk, ahol az shPARP-2 és az scPARP-2 HepG2 sejtek steady-state mRNS készletét hasonlítottuk össze. 616 gén expressziója változott, a gének zömének (460 gén) expressziója csökkent. A géneket csoportosítva a máj szekretoros funkciójának és lipid háztartásának megváltozására utaló jeleket tapasztaltunk. A lipid metabolizmus génjeinek jelentős része indukálódott, a PARP-2 depléciónak hatására expressziójuk növekedett. A lipid metabolizmusban részt vevő gének tüzetesebb vizsgálata során a szterol-regulált elemekhez kötődő fehérjék, az ún. SREBP fehérjék, közülük az SREBP1 és az általa regulált gének expressziójának a növekedését, illetve az SREBP1 magi transzlokációját tapasztaltuk. Mivel az SREBP1 a koleszterin szintézis pozitív regulátora, az SREBP1 expresszió és transzlokáció emelkedése jól magyarázza a koleszterin szint emelkedését. Az SREBP1 promoterének vizsgálata kimutatta, hogy a PARP-2 a promoterhez kapcsolódik és az SREBP1 promóter repressziójához valószínűleg szükséges a PARP-2 aktivációja. A PARP-2 depléciónak – ennek megfelelően – az SREBP1 promóter aktivációjához és az SREBP1 fokozott expressziójához vezet.

In vivo, mint az előbb említettük, a májban a koleszterin szint emelkedését tapasztaltunk, azonban sem a vérben, sem a székletben nem tapasztaltuk a koleszterinszint vagy a szérumban LDL szint emelkedését. Az epesav homeosztázis szintén nem mutatott eltéréseket. Azonban a HDL szint jelentősen csökkent a PARP-2^{-/-}

egerekben, ami az ABCA1 koleszterin transzporter expressziójának csökkenéséhez volt köthető. Az ABCA1 expresszió csökkenésének molekuláris mechanizmusa ismeretlen.

Szántó et al. *Biochimica and Biophysica Acta – Molecular Basis of Disease* 1842(4):594-602

Meghívott előadó a Cold Spring Harbor PARP Family & Friends konferencián (2014).

Vizsgáltuk a poli(ADP-ribóz) (PAR) termelődést, ami a PARP-1 aktiváció markere, a bőrben, a bőrfüggelékekben, illetve különböző festékes tumorokban. Kimutattuk a PAR jelenlétét keratinocitákban, follikulusokban, endotél sejtekben, szebocitákban, illetve szubkután zsírsejtekben, ami arra utalt, hogy a PARP-1 szerepet játszik a bőr lipid háztartásának szabályzásában.

Dr. Ralph Rühl-lel (Debreceni Egyetem), illetve. Prof. Decsi Tamással (Pécsi Egyetem) együttműködésben vizsgáltuk a PARP-1^{+/+} és a PARP-1^{-/-} egerek bőrének lipidösszetételében megfigyelhető változásokat. Kimutattuk, hogy mind stimulálatlanul, mind kontakt hiperszenzitivitási reakció (gyulladás) során magasabb a PARP-1^{-/-} egerekben két n-3 többszörösen telítetlen zsírsav (EPA és DHA) és metabolitjaik szintje. Ezt a megfigyelést támasztja alá az FABP7 gén expressziójának növekedése PARP-1^{-/-} egerek bőrében. A PARP-1 csendesítése az FABP7 promóterének aktivációjához vezet, ami közvetlen, a promóteren keresztül történő szabályzásra utal. Ezzel párhuzamosan az arachidonsav szint szintén emelkedik, azonban pro-inflammatorikus metabolitjainak és a prosztaglandinoknak a szintje csökken PARP-1^{-/-} egerekben, ami a ciklooxygenáz-2 expresszió csökkenésével magyarázható. Mivel az EPA és DHA metabolitok elsősorban gyulladáscsökkentő hatással bírnak, úgy tűnik a PARP-1 delécioja a bőr lipidösszetételének változtatásán keresztül egy anti-inflammatorikus környezetet hoz létre a gyulladás jelenléte nélkül is, ami gyulladásos folyamatok során is megtartott.

Kiss és mtsai. *Molecular Medicine Reports in press*

Géhl és mtsai., 2012. *Histology Histopathology* (5):651-9

Kutatásaink koncepcionális újdonságait több áttekintő közleményben mutattuk be. A PARP-2 transzkripcionális hatásairól (Szántó és mtsai, *Cellular and Molecular Life Sciences*), a PARP enzimek metabolikus és gyulladásos hatásairól (Bai és Cantó, *Cell Metabolism*; Bai és Virág, *FEBS Letters*), a PARP és Sirtuin enzimek kölcsönhatásairól (Cantó és mtsai, *Molecular Aspects of Medicine*), illetve a PARP enzimek és az atherosclerosis kapcsolatáról (Xu és mtsai, *Medicinal Research Reviews*) írt közleményeink magasan idézettek, a Cell Metabolism cikkünk a 4. legtöbbet letöltött, míg a Molecular Aspects of Medicine a 18. legtöbbet letöltött közlemény volt az újság által vizsgált időszakban.

Cantó C és mtsai., 2013. *Molecular Aspects of Medicine* 34(6):1168-1201

Bai P és Virág L. 2012. *FEBS Letters* 586(21):3771-7.

Xu S és mtsai. 2014. *Medicinal Research Reviews* 34(3):644-75.

Bai P és Cantó C. 2012. *Cell Metabolism* 16(5) 290-295.

Szántó M és mtsai. 2012. *Cellular and Molecular Life Sciences* 69(24):4079-4092.

Dr. Gergely Pállal és Dr. Somsák Lászlóval kollaborációban vizsgáltuk egy glikogén foszforiláz inhibitor a KB228 (N-(3,5-dimetil-benzoil)-N'-(β -D-glucopiranozil)urea) in vivo hatásait. Kimutattuk, hogy a KB228 egerekben képes a vércukorszint csökkentésére, ami a máj fokozott glükózfelvételéhez kötött. Furcsa módon a KB228 egerekben és sejtekben is fokozott oxigénfogyasztást okozott, ami a mitokondriumban található UCP-2 fehérje mennyiségének a növekedésével magyarázható. Az UCP-2 aktiváció valószínűleg a mitokondrium védelmi reakciója a fokozott glükózfelvételre. KB228 májának vizsgálatával kimutattuk, hogy az mTORC2 komplex is aktiválódott, ami hozzájárulhat a glikogénszintézis emelkedéséhez.

Nagy L és mtsai. *PLOS ONE* (8)7:e69420.

A poli(ADP-ribóz) polimeráz-2 enzim mitokondriális biogenezist indukáló hatásából kiindulva megvizsgáltuk a PARP-2 lehetséges szerepét a Doxorubicin (DOX) indukálta vaszkuláris károsodásban. A DOX kezelés az erek simaizom és endotél függő válaszait károsítja. 25 mg/kg egyszeri i.p. DOX kezelést követően a PARP-2 deplációja védelmet nyújtott a DOX kiváltotta simaizom károsodás ellen. PARP-2 knockout állatokon és PARP-2 knockdown sejtes modelleken vizsgáltuk a PARP-2 szerepét. Kimutattuk, hogy a PARP-2 deplációja nem azonos módon biztosít védelmet a DOX toxicitás ellen, mint a PARP-1 deplációja. A PARP-2 a PARP-1-hez képest jelentősen alacsonyabb aktivitással rendelkezik, ezért deplációja nem véd az oxidatív stressz által kiváltott NAD⁺ és ATP szint csökkenés ellen. A PARP-2 deplációja a SIRT1 indukcióján keresztül a mitokondriális biogenezis megemelkedéséhez vezet és így stabilizálja a mitokondriumokat. Eredményeink arra mutatnak, hogy a mitokondrium stabilizációja központi szereppel bír a PARP-2 deplációja által létrehozott protektív fenotípus megjelenésében.

Szántó és mtsai. 2011. *Cardiovasc. Res.* 92(3):430-8

Több más kutatási programban is részt vettünk az elmúlt év során.

- Kimutattuk, hogy a cigarettafüst tüdő epithel sejtekben egyrészt PARP-1 függő módon sejthalált indukál, másrészt szekunder gyöktermelés révén is károsítja az epithel sejteket.

Kovács és mtsai. 2012. *Free Radical Biology and Medicine* 53:1680-1688.

- Kimutattuk, hogy SAOS sejtek megfelelő csont irányú differenciációjához elengedhetetlen a PARP-1 aktiváció és az ezzel kapcsolt sejthalál.

Robaszkiewicz és mtsai. 2012. *Free Radical Biology and Medicine* 53:1552-1564.

- Kimutattuk, hogy humán primer keratinocitákban az UV sugárzás a PARP-1 aktivációtól függetlenül képes sejthalál folyamatokat elindítani.

Lakatos és mtsai. 2013. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* 1833:743-751.

- Elvégeztük egy molekulakönyvtár szűrését, ahol több antioxidáns és citoprotektív vegyületet azonosítottunk.

Hegedűs Cs és mtsai, 2013. *Pharmacological Research* 72:25-34.

- Immunhisztokémiai, molekuláris biológiai és élettani módszerekkel karakterizáltuk a TRPV1 csatorna jelenlétét a vaszkulátúrában. Bizonyítottuk, hogy nem található meg a vaszkulátúra minden elemében, így hiányzik az arteria mesentericából.

Tóth A és mtsai., 2014. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 62(2):129-144

- Kimutattuk, hogy az A2B receptor jelenléte anti-diabetikus hatású, hiányában az egerek elhízhatnak. Az A2B receptor a zsírszövet makrofágjainak alternatív aktivációjáért felelős, így tartja fenn a zsírszövet inzulin érzékenységét.

Csóka B és mtsai., 2014. *Diabetes*. 63(3):850-866