

A kutatás témája a PARP-1 enzim működésének további vizsgálata.

**1./ A PARP/p53/TopoizomerázI hármass komplex vizsgálata.** Előzetesen in vitro kimutattuk a terner komplex keletkezésének lehetőségét in vitro immunoprecipitálással. Ezt most megerősítettük Superose 12 oszlopon való gélszűréssel, az eluált frakciók Western blotjaival, mindhárom fehérjére specifikus antitestek alkalmazásával. Relaxációs méréseket végeztünk, a p53 és PARP TopoizomerázI enzimaktivitás növelő hatásának esetleges szinergizmusának elemzésére, de úgy találtam, hogy nincs szinergizmus és a p53 jobb aktivátor. Eras20 sejtekből szintén sikerült kimutatni a hármass komplexet. Ugyanakkor nem találtam olyan biológiai hatást melyet a hármass komplex jelenlétére foghattam volna. A PARP/TopoizomerázI komplex létét megkérdőjelezték (Young, TM, et al. JBC, 2004, 279, 11992), majd ugyanazon szerzők belátták tévedésük (Young, TM et al. JBC, 2004, 279, 39686). Végül Baumann, C. és mtsi.-nak sikerült a terner komplexhez biológiai jelenséget rendelni, miszerint a PARP antagonizálja a p53 TopoizomerázI függő homológ rekombinációs hatását (Baumann, C. et al, Nucl. Acid Res., 2006, 34, 1036). A topors/p53/TopoisomeraseI terner komplexben szereplő topors-ról kiderült, hogy egy Sumo1 E3 ligáz a p53 számára (FEBS Letters, 2005, 579, 5007).

**2./ A PARP DNS kölcsönhatás, valamint az auto és transz ADP-ribozilálás vizsgálata.**

A PARP-1 enzim működés további jellemzéséhez csonkított és egy-pont mutánsokat terveztünk és a rekombináns fehérjéket előállítottuk a bakulovírus rendszer használatával és a fehérjéket standard módszerek segítségével megtisztítottuk. Az egy vagy mindkét Zn ujj hiányos mutánsok enzimaktivitása dramatikusan csökkent. A továbbiakban az un. Cterminális PARP molekulát vizsgáltuk részletesebben, ahol mindkét Zn ujj hiányzik és a fehérje N-terminális a két NLS szignál között van. Kimutattuk, hogy az enzim aktiválható DNS-sel vagy DNS szerkezetekkel, képes auto és transz ADP-ribozilálásra. Ha az un. Fiziológias enzim assay körülményei közt mérünk, a Km értékek hasonlóak a vad típusú enziméhez (10nM), a Vmax érték annak egy tizede. A DNS struktúrák koncentráció görbéi nem követik a Michaelis Menten görbe alakját. A K0.5 értékek a 10-100 nM tartományba esnek. Ezek az értékek magasabbak a vad típusú enzim estében mért értékeknél. Mielőtt eredményeink publikáltak lettek volna megjelentek Lonskaja és mtsi (JBC, 2005, 280, 17083) és Potaman és mtsi (J.Mol.Biol., 2005, 342, 609) közleményei, melyek a PARP DNS struktúra felismerésével foglalkoznak és lenullázták eredményeinket.

Az ATP-nek a PARP-1 enzimre való gátló hatását vizsgáltuk. Kimutattam, hogy az ATP fiziológias koncentrációban effektíven gátolja a PARP aktivitást. Izolált sejtmagok használatával kimutattam azt is, hogy ha a DNS-t tördeljük, az ötven százalékos gátlást okozó ATP koncentráció megnő, de 10 mM alatt marad. Ez a megfigyelés szoros kapcsolatot teremt az energiatermelés és a PARP metabolizmus között. Eredményeink megerősítik, hogy kismértékű DNS károsodás még kivédhető, a sejtmagi ATP szint jelentős kezdeti csökkenése kell, hogy a PARP aktiválás nagymértékben lecsökkentse a celluláris NAD és ATP szinteket. Úgy tűnik, hogy mitokondriumban termelt ATP hatékonyabban gátolja a PARP-ot mint a glikolizisben termelt. Abból a megfigyelésből, hogy az R34G mutáns az ATP effektust nem mutatja arra jutottunk, hogy az első Zn-ujjon lehet az ATP támadáspontja. Másrészt kimutattam, hogy a poliADP-ribóz polimert lebontó PARP enzim aktivitását az ATP fokozza. Ez a hatás hosszú PAR polimerek esetében kifejezettebb. Mindkét effektust kimutattuk úgy izolált sejtmagok, mint permeabilizált sejtek használatával is. A PARP-1 sejtes aktivitását meghatároztuk az un. fiziológias PARP assay segítségével, a PARP, a PAR módosított

fehérjék mennyiségének 1D ill 2D Western blot-os elemzésével úgy log fázisban növekedő mint konfluens primer tüdő sejtekben, valamint gyorsan növő tumor sejtekben, Ernest Kun laborjával kooperálva. A PARP aktivitások nagy különbségeket mutatnak, a konfluens primer sejteké a legalacsonyabb, míg jelentősen magasabb a növekedő primer ill. a tumor sejtekben. Az eltérő PARP szinteket nem transzkripciós különbségek okozzák, hiszen real-time RT-PCR-rel kimutattam, hogy a mRNS szintek azonosak konfluens primer és tumor sejtekben. Ugyancsak 5-10 szerez PARP aktivitás növekedést tapasztaltunk két differenciálódási modellben (myocite/myotube és 3T3LI fibroblaszt/adipocita), míg ezt nem tapasztaltuk a HL60/granulocita átalakulás során. A miocita rendszerrel Dr Charles Ordahl laborjában dolgoztam 2005 nyarán. Ugyanakkor folytattam az in vivo PARP FRET méréshez vezető kísérleteket. Sajnos a yellow-GFP-PARP komplex nem fluoreszkál. Mérete megfelelő, úgy PARP mind GFP antitesttel kimutatható. Talán a GFP rész átklonolása az PARP N-terminálisáról a C-terminusra feloldja a problémát.

### **3./ Más PARP témában végzett, vagy el nem végzett munka.**

Dr. Kénesi Erzsébet távozása lelassította munkámat. Ezért és kisebb mértékben a változó OTKA körülmények miatt a H1 foszforilálás témájában tervezett munka elmaradt. Ezt részben kárpótolják a grant periódus elején elvégzett kooperációs munkák, melyeknek minden esetben köze van a PARP enzim működéséhez. Az ATP kötőhelyen át ható PARP inhibitorok keresésénél kb. 50 a tirozin kinázok ATP kötő helyére kifejlesztett inhibitorot teszteltem és közülük két lead molekulát találtam.

Budapest, 2007-02-27