

PARP-gátlás: a mitokondrium védelmének új útja

PARP inhibition: a novel pathway for mitochondrial protection

Süimegi Balázs

Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvosi Kar,
Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet, 7624 Pécs,
Szigeti út 12., E-mail: balazs.sumegi@aok.pte.hu

Összefoglalás

A korábban elfogadott nézetek szerint a poli-(ADP-ribóz) polimeráz-1 (PARP) gátlószerei megakadályozzák az enzim oxidatív stressz során történő aktiválódása következtében kialakuló NAD⁺- és ATP-depléciót, valamint a következményes nekrotikus sejthalált. Ugyanakkor, saját korábbi eredményeink arra mutattak, hogy a PARP katalizálta ADP-riboziláció hatással lehet jelátviteli útvonalakra, amelyeknek a túlélésben meghatározó szerepük lehet. Sejt kultúrában a PARP-aktivitást ismert farmakológiai ágenssel (PJ-34), illetve nemfarmakológiai úton, nevezetesen siRNA segítségével történő elnyomással, valamint a PARP N-terminális DNS-kötő doménjének (PARP-DBD) transzdomináns expressziójával gátoltuk, majd a sejteket oxidatív stressznek tettük ki. A PARP gátlása megvédte a sejteket az oxidatív károsodásoktól, miközben indukálta az Akt kináz foszforilációját, ezáltal aktiválódását. Az Akt aktiválódásának gátlása PI3- vagy Src kináz-inhibitorokkal a PARP-gátlás citoprotektív hatása ellen dolgozott, miközben ezek a gátlószerek nem befolyásolták a NAD⁺-depléciót. Következésképpen, a PARP-gátlás következtében fellépő Akt-aktiváció jelentős mértékben felelős a PARP-gátlók oxidatív stresszben mutatott citoprotektív hatásáért.

Süimegi, B.

University of Pécs, Medical School, Institute of Biochemistry and Medical Biology, H-7624 Pécs, Szigeti út 12., E-mail: balazs.sumegi@aok.pte.hu

Summary

According to the classical view, the cytoprotective effect of inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP) enzyme in oxidative stress was based on the prevention of NAD⁺ and ATP depletion, and so the attenuation of necrotic cell death. However, our previous data suggested that PARP-catalyzed ADP ribosylations may affect signaling pathways which can play a significant role in cell survival. We inhibited PARP activity either by a well-established pharmacological inhibitor (PJ34) or by non-pharmacological means, namely by suppressing PARP-1 expression by siRNA or by transdominantly expressing N-terminal DNA-binding domain of PARP-1 (PARP-DBD) in cell culture before exposing the cells to oxidative stress. PARP inhibition protected cells from oxidative damages and induced the phosphorylation and activation of Akt protein kinase. Inhibition of Akt activation by specific inhibitors of PI-3- and Src kinases counteracted the cytoprotective effect of PARP inhibition, but did not affect NAD⁺ depletion. In conclusion, PARP-inhibition-induced Akt activation is responsible in a considerable extent for the cytoprotective properties of PARP inhibitors in oxidative stress.

A reaktív oxigéngyökök (ROS) által okozott károsodások fontos szerepet játszanak számos betegség patogenezisében [1-3]. Különböző forrásokból származhatnak a szabadgyökök, pl. a xantin oxidáz rendszerből [1], a mitokondriális respirációs lánc tökéletlen működése következtében [2], az arachidonsav-anyagcsere cikloxygenáz útvonalából [3] és a fagocitáló sejtek átmeneti respirációs aktivitás-fokozódása következtében, amelyek aztán – számos egyéb károsodás mellett – egyszerű DNS-töréseket okoznak [4]. A poli-(ADP-ribóz) polimeráz (PARP, EC 2.4.2.30) multifunkcionális nukleáris enzim [5],

amelyet az egyszerű DNS-törések aktiválnak, és amely NAD⁺-ot használva szubsztátumként különböző nukleáris fehérjéken, például hisztonokon és saját magán kovalensen kapcsolt, elágazó láncú poli-(ADP-ribóz)-szálakat szintetizál. A PARP-1 szerepet játszik a kromatin *remodeling* folyamatában, a DNS-hibajavításban, a genomikus stabilitás megőrzésében; s ezeket a szerepeket részben poli-ADP-riboziláló aktivitása révén éri el [5]. Enyhe DNS-károsodás esetén a PARP-1 szükséges a hibajavításhoz [6], de oxidatív stressz során, amikor a nagy mennyiségű DNS-törés a PARP-1 túlzott

aktivációját okozza, az enzim depletálhatja a NAD^+ -ot, illetve a NAD^+ reszintézisének nagy energiaigénye miatt az ATP-t is, ami sejthalált eredményez [7]. A PARP-inhibitorok védnek a miokardiális [8] és neuronális [9] ischemia, akut tüdőgyulladás [10], akut szeptikus sokk [11], zimogén-indukálta többszervi elégtelenség [12] és diabetikus pankreászkárosodás [13] ellen, mutatva, milyen jelentős a túlzott PARP-1-aktiváció szerepe a sejthalál kiváltásában. A klasszikus elképzelés szerint a PARP-inhibitorok a NAD^+ - és ATP-depléción megakadályozásával védnek az oxidatív stressz ellen, de néhány új adat a citoprotekció egy sokkal összetettebb mechanizmusát sugalja [14, 15].

Kísérletesen bizonyított, hogy a PARP-aktiváció hozzájárulhat a mitokondriális károsodások [16] és a mitokondriális ROS-termelés [17] megnövekedéséhez, mutatva, hogy a PARP a magon kívüli folyamatokat is képes befolyásolni. Friss eredmények szerint létezik mitokondriális PARP, ami gátolható PARP-1-inhibitorokkal [18], ezért, fontos azt tisztázni, hogy a mitokondriumvédelem a mitokondriális ADP-riboszilációs folyamatok gátlásának egyenes következménye, vagy a nukleáris PARP-1 befolyásol olyan – egyelőre nem tisztázott – mechanizmusokat, amelyek a mitokondriális protekciót eredményezik. Saját korábbi eredményeink szerint PARP-inhibitorok az Akt foszforilációját, ezáltal aktivációját eredményezték lipopoliszahariddal kezelt egerek májában, tüdejében és lépében, ami annak lehetőségét veti fel, hogy a PARP-inhibitorok védő hatása a PI3-kináz/Akt útvonalon keresztül mediálódik [19]. Ezek a megfigyelések arra mutatnak, hogy a PARP-inhibitorok védő hatása sokkal összetettebb lehet, mint a NAD^+ - és ATP-depléción megakadályozása, mivel az Akt kináz képes számos regulátorfehérje, így a GSK-3 β , a kaszpáz-9, a BAD vagy a FKHR foszforilálására [20], amely folyama-

tok közrejátszanak a mitokondriális membránrendszerek stabilizálásában [21, 22].

Módszerek

A PARP DNS-kötő doménjének transzdomináns expressziója. A PARP N-terminális DNS-kötő doménjének kódoló régióját (PARPN214, 1-214 aminosavak [23]) PCR technikával kiterjesztettük és „in-frame” pEGFP-C1/N3 vektorokba illesztettük be Hind III és EcoRI restriktációs enzimekkel. Annak érdekében, hogy a zöld fluoreszcens fehérjét (GFP) tartalmazó PARP-N214 a magba juthasson, az erősítéshez nukleáris lokalizációs szignált (NLS) kódoló PCR-primer alkalmaztunk. A rekombináns pPARPGFP-C1/N3 vektorokat tranziensen transzfektáltuk WRL-68 humán májsejtvonalba Lipofectamine2000 segítségével. Hatásos transzdomináns expresszió érdekében egy második transzfekciót is végeztünk.

A PARP-1 szuppressziója kis interferáló RNS (siRNS) technikával. WRL-68 sejteket tranziensen transzfektáltunk a PARP-1 szuppressziójára tervezett siRNS-sel Lipofectamine2000 segítségével. A PARP hatásos elnyomása érdekében még két transzfekciót végeztünk.

Western blot analízis. A sejteket 3 órán át H_2O_2 -tartalmú médiumban tartottuk inhibitorok jelenlétében és távollétében, majd proteáz- és foszfatázgátlót tartalmazó pufferben homogenizáltuk. Zsebenként 35 μg fehérjét vittünk fel 12%-os poliakrilamid-gélre, és blotolást követően a nitrocellulózmembránt 5%-os zsírmentes tejben 1:1000 arányban hígított primer antitestoldatban inkubáltuk 4°C-on egy éjszakán át. A második antitest torma-gyóker peroxidáz enzimhez konjugált anti-nyúl IgG volt, a vizualizálást SuperSignal West Pico kemilumineszcenciás szubsztrátum használatával végeztük. Minden kísérletet négyszer ismételtünk.

Fluoreszcens mikroszkópia. A vad típusú vagy transzfektált WRL-68 sejteket poli-L-lizinnel borított



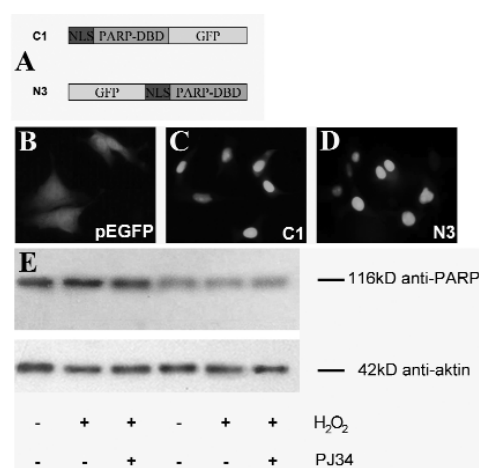
Sümegi Balázs 1975-ben szerzett okleveles vegyész diplomát a szegedi József Attila Tudományegyetem Természettudományi Karán, azóta a Pécsi Orvostudományi Egyetem Biokémiai Intézetében (jelenleg PTE, ÁOK, Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet) dolgozik. Egyetemi doktor (1978), biológiai tudományok kandidátusa (1987) és biológiai tudományok doktora (1990) fokozatot szerzett, 1994-től tanszékvezető egyetemi tanár. Vendégkutatóként, illetve vendégprofesszorként dolgozott a *University of Texas, Health Science Center* és a *Veterans Administration, Medical Center* intézetekben (1983–84, 1985–88). A PTE ÁOK dékánja (1996–99 és 2003–06). Korábbi tudományos eredményei az enzimrendszerek szupramolekuláris szerveződése a mitokondriumban, *in vivo* szubsztrátchannelling, valamint metabolitok *in vivo* kompartmentalizációja témákban születtek. Jelenlegi tudományos érdeklődése az oxidatív stressz molekuláris mechanizmusa, a PARP-aktiváció jelátviteli hatásai és új gyógyhatású anyagok kifejlesztése témakörökhöz kapcsolódik.

(2,5–5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) üvegfedőlemezekre tenyésztettük. A kezelések után a lemezeket mostuk, a sejteket JC-1 membránpotenciál-függő festékkel feltöltöttük 10 percig, majd ColorView CCD kamerával és analySIS szoftverrel felszerelt Olympus BX61 fluoreszcens mikroszkóppal fényképeket készítettünk 60-szoros nagyítású objektív alatt. A GFP fluoreszcenciához 450–490 nm gerjesztési és >520 nm emissziós (zöld) fényszűrőket használtunk. JC-1 fluoreszcenciához ugyanarról a látómezőről 546 nm *bandpass* gerjesztési és >590 nm emissziós (piros), majd zöld fényszűrővel készült kép.

Eredmények

Az 1. ábra mutatja a nukleáris lokalizációs szignálból, a PARP DBS-kötő doménjéből és a zöld fluoreszcens fehérjéből álló kétféle fúziós fehérjét (1. ábra, A), amelyeket a PARP aktivitásának nemfarmakológiai úton történő kompetitív gátlására készítettünk. A GFP következtében fluoreszcens mikroszkóppal jól látható, hogy transzfekciót követően a fúziós fehérje valóban bejutott a magba (az NLS-nak köszönhetően) (1. ábra, C,D), míg az üres plazmiddal transzfektált sejtben a GFP egyenletesen oszlott el a sejtben belül. (1. ábra, B). A PARP-1 fehérje elnyomására tervezett PARP-siRNS révén jelentősen lecsökkent a PARP fehérje mennyisége WRL-68 sejtekben a transzfekciót követően (1. ábra, E), továbbá az is látszik, hogy sem az oxidatív stressz, sem a farmakológiai inhibitor jelenléte nem befolyásolta a PARP fehérje expresszióját sem normál körülmények között sem siRNS módszerrel végzett szuppresszió során (1. ábra, E).

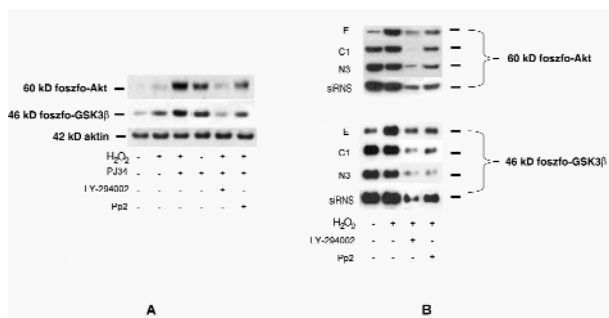
A 2. ábra mutatja, hogy a dokumentáltan citoprotektív Akt kináz oxidatív stressz hatására foszforilálódott, ezáltal aktiválódott. Aktiválódása következtében megnőtt célfehérjéje, a GSK3 β foszforilációja is. A PARP-gátló PJ-34 ugyancsak megnövelte mindkét fehérje foszforilációját oxidatív stressz távollétében is, ugyanakkor, még erőteljesebben megnövelte az Akt aktivációját oxidatív stressz körülményei között. A kináz jelátviteli folyamatban az Akt előtt álló PI-3 és Src kinázok inhibitorai érthető módon megakadályozták az Akt akár oxidatív stressz, akár PARP-gátló hatására bekövetkező foszforilációját (2. ábra, A). A PJ-34 hatásával teljesen azonos módon viselkedtek a PARP-siRNS-, illetve a PARP-DBD-expresszálo sejtek. Mivel ezekben a sejtekben a PARP folyamatos gátlás



1. ábra A PARP DNS-kötő domén (PARP-DBD) transzdomináns expressziójának hatása a hepatociták túlélésére. PARP-DBD GFP fúziós fehérje konstrukciója (A). WRL-68 májsejteket pEGFP (B), C1pEGFP (C) vagy N3pEGFP (D) plazmiddal transzfektáltunk. A GFP fluoreszcenciáját fluoreszcens mikroszkóppal detektáltuk. A WRL-68 májsejteket PARP-siRNS módszerrel transzfektáltuk, majd 0,1 mM H_2O_2 vagy 1 mM H_2O_2 + 10 μM PJ-34 reagenssel kezeltük őket 1 órán át. A PARP elnyomását anti-PARP primer antitest felhasználásával, Western blot technikával detektáltuk (E). A felvitt fehérjemennyiségek azonos voltát anti-aktin antitesttel ellenőriztük. 1-3. minta: vad típusú sejtek; 4-6. minta: PARP-siRNS módszerrel transzfektált sejtek.

alatt állt, ezért a sejtek kezelés nélkül a PJ-34-kezelt sejtekre hasonlítottak (2. ábra, B). Ugyanakkor az LY292002 és a PP2 ezekben a sejtekben is megakadályozta az Akt aktivációját.

Az oxidatív stressz hatására bekövetkező mitokondriális károsodások *in vivo* követésére a JC-1, speciális membránpotenciál-függő mitokondriális festéket alkalmaztunk. A festék megfelelő koncentrációban akkumulálódik a mitokondrium membránjában, és piros fluoreszcenciát mutat. Enyhe depolarizáció során a membrán elengedi a festék egy részét, és a fluoreszcenciája zöldre vált, míg a membránpotenciál teljes elvesztésével elengedi az összes festéket, és megszűnik a fluoreszcencia. Enyhe oxidatív stressznek (0,3 mM H_2O_2 3 órán át) tettünk ki vad típusú, valamint pEGFP, C1, N3 plazmiddal, illetve PARP-siRNS módszerrel transzfektált WRL-68 májsejteket 10 μM PJ-34, 10 μM LY294002 vagy 10 μM PP2 jelenlétében és hiányában. A kezelés után JC-1 festékkel töltöttük fel a sejteket, és azonos területekről a mikroszkóp zöld és piros csatornájában is készítettünk képeket róluk. Az egészséges sejtekről készült képek élesek voltak,



2. ábra Az Akt útvonal aktiválódása oxidatív stressz, PARP-gátlás és különböző kinázinhibitorok hatására. Az Akt aktivációját és célfehérjéje, a GSK3β foszforilálódását tanulmányoztuk WRL-68 májsejtekben foszforilációs-specifikus primer antitestek (P-Ser473Akt és P-Ser9GSK3β) és Western blot módszer segítségével. Vad típusú (A), illetve PARP-siRNA, pEGFP, C1 vagy N3 konstrukciókkal kezelt (B) WRL-68 sejteket 1 órán át 1 mM H₂O₂, 10 μM PJ-34, 10 μM LY294002 vagy 10 μM PP2 reagenssel, illetve az említett vegyületek kombinációjával kezeltük. Önmagában a LY294002 és a PP2 nem befolyásolta a vizsgált fehérjék foszforilálódását (nincs dokumentálva). A felvitt fehérjemennyiségek azonos voltát anti-aktin antitesttel ellenőriztük.

és jelentős mértékben volt bennük piros fluoreszcens komponens, ugyanakkor a károsodott sejtek zölden fluoreszkáltak, és sokkal elmosódottabbak voltak. H₂O₂ hatására jelentősen károsodtak a sejtek, ami lecsökkent mitokondriális membránpotenciálban is megnyilvánult. A PARP gátlása – függetlenül a gátlás módjától – megakadályozta a H₂O₂ mitokondriumkárosító hatását, ugyanakkor, a specifikus kinázinhibitorok visszafordították a PARP-gátlás védő hatását (3. ábra).

Mind a siRNA, mind a PARP-DBD konstrukció a PARP-1 szekvenciája alapján készült, így kísérleteink nyomán egyértelművé vált, hogy a nukleáris PARP aktivációja, és nem egyéb ADP-ribózilációs folyamatok felelősek az oxidatív stressz kiváltotta mitokondriális károsodás mediálásában.

3. ábra (lásd a címlapon) PARP-gátlás és különböző kinázinhibitorok hatása a mitokondriális membránpotenciálra oxidatív stresszben. Azonos mikroszkópos területről készült zöld és piros fluoreszcens képeket szuperponáltunk, hogy az alábbi kezelések mitokondriális membránpotenciálra történő hatását demonstráljuk. WRL-68 májsejteket pEGFP, C1 vagy N3 plazmidokkal transzfektált májsejteket, valamint PARP-siRNA módszerrel transzfektált májsejteket 3 órán át 0,3 mM H₂O₂, 10 μM PJ-34, 10 μM LY294002 vagy 10 μM PP2 reagenssel, illetve az említett vegyületek kombinációjával kezeltük. A kezelés után a sejteket mostuk, 10 percig JC-1 membránpotenciál-függő festékkel töltöttük, majd fluoreszcens mikroszkópra szerelt digitális kamera segítségével fényképeztük.

Az is valószínűnek látszik, hogy a PARP aktivitása, nem pedig a fehérje jelenléte az, ami a nekrotikus sejthalál kiváltásához hozzájárul. Ugyanis mindhárom módszer, a farmakológiai gátlás, a fehérje mennyiségének elnyomása, illetve a kompetitív, de nem farmakológiai gátlás, a PARP-DBD transzdomináns expressziója ugyanazokat a hatásokat váltotta ki. Ráadásul, ez utolsó esetben a PARP-1 intakt módon jelen volt a sejtben, csupán versengenie kellett a katalitikus aktivitással nem bíró PARP-DBD fehérjével az egyszálú DNS-törésekhez való kötődésért. Mindezek alapján a PARP-1 fontos terápiás célpont az összes oxidatív stresszel járó megbetegedésben.

Irodalomjegyzék

- [1] Xia, Y., Khatchikian, G., Zweier, J. L. (1996) *J. Biol. Chem.*, **271**: 10096–10102.
- [2] Turners, J. F., Bovanis, A. (1980) *Biochem. J.*, **156**: 434–444.
- [3] Rowe, G. T., Manson, N. H., Caplan, M., Hess, M. L. (1983) *Circ. Res.*, **53**: 584–591.
- [4] Martin, D., Salinas, M., Fujita, N., Tsuruo, T., Cuadrado, A. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**: 42943–42952.
- [5] D'Amours, D., Desnoyers, S., D'Silva, I., Poirier, G. G. (1999) *Biochem. J.*, **342**: 249–268.
- [6] de Murcia, G., Menissier de Murcia, J. (1994) *Trends Biochem. Sci.*, **19**: 172–176.
- [7] Jagtap, P., Szabo, C. (2005) *Nat. Rev. Drug Discov.*, **4**: 421–440.
- [8] Zingarelli, B., Salzman, A. L., Szabo, C. (1998) *Circ. Res.*, **83**: 85–94.
- [9] Eliasson, M. J., Sampei, K., Mandir, A. S., Hurn, P. D., Traystman, R. J., Bao, J., Pieper, A., Wang, Z. Q., Dawson, T. M., Snyder, S. H., Dawson, V. L. (1997) *Nat. Med.*, **3**: 1089–1095.
- [10] Liaudet, L., Pacher, P., Mabley, J. G., Virag, L., Soriano, F. G., Hasko, G., Szabo, C. (2002) *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **165**: 372–377.
- [11] Soriano, F. G., Liaudet, L., Szabo, E., Virag, L., Mabley, J. G., Pacher, P., Szabo, C. (2002) *Shock*, **17**: 286–292.
- [12] Szabo, C., Lim, L. H., Cuzzocrea, S., Getting, S. J., Zingarelli, B., Flower, R. J., Salzman, A. L., Perretti, M. (1997) *J. Exp. Med.*, **186**: 1041–1049.
- [13] Burkart, V., Wang, Z. Q., Radons, J., Heller, B., Herceg, Z., Stingl, L., Wagner, E. F., Kolb, H. (1999) *Nat. Med.*, **5**: 314–319.
- [14] Veres, B., Radnai, B., Gallyas, F. Jr., Varbiro, G., Berente, Z., Osz, E., Sumegi, B. (2004) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **310**: 247–255.
- [15] Palfi, A., Toth, A., Kulcsar, G., Hanto, K., Deres, P., Bartha, E., Halmosi, R., Szabados, E., Czopf, L., Kalai, T., Hideg, K., Sumegi, B., Toth, K. (2005) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, in press.
- [16] Murriel, C. L., Churchill, E., Inagaki, K., Szweda, L. I., Mochly-Rosen, D. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**: 47985–47991.
- [17] Halmosi, R., Berente, Z., Osz, E., Toth, K., Literati-Nagy, P., Sumegi, B. (2001) *Mol. Pharmacol.*, **59**: 1497–1505.
- [18] Du, L., Zhang, X., Han, Y. Y., Burke, N. A., Kochanek, P. M., Watkins, S. C., Graham, S. H., Carcillo, J. A., Szabo, C., Clark, R. S. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**: 18426–18433.
- [19] Veres, B., Gallyas, F. Jr., Varbiro, G., Berente, Z., Osz, E., Szekeres, G., Szabo, C., Sumegi, B. (2003) *Biochem. Pharmacol.*, **65**: 1373–1382.
- [20] Scheid, M. P., Woodgett, J. R. (2001) *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **2**: 760–768.
- [21] Virag, L., Salzman, A. L., Szabo, C. (1998) *J. Immunol.*, **161**: 3753–3759.
- [22] Hong, S. J., Dawson, T. M., Dawson, V. L. (2004) *Trends Pharmacol. Sci.*, **25**: 259–264.
- [23] Kim, J. W., Won, J., Sohn, S., Joe, C. O. (2000) *J. Cell. Sci.*, **113**: 955–961.
- [24] Shah, G. M., Poirier, D., Duchaine, C., Brochu, G., Desnoyers, S., Laguerre, J., Verreault, A., Hoflack, J.-C., Kirkland, J. B., Poirier, G. G. (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**: 1–13.
- [25] Tapodi, A., Debreceni, B., Hanto, K., Bogner, Z., Wittmann, I., Gallyas, F. Jr., Varbiro, G., Sumegi, B. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**: 35767–35775.