



Doctoral Thesis

Involvement of PAR metabolizing enzymes in intra- and extracellular Ca²⁺ fluxes after oxidative stress

Author(s):

Wyrsh, Philippe Rudolf

Publication Date:

2012

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-007333268> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH No. 20411

**Involvement of PAR metabolizing
enzymes in intra- and extracellular
Ca²⁺ fluxes after oxidative stress**

A dissertation submitted to the

ETH Zurich

for the degree of

Doctor of Sciences

presented by

Philippe Rudolf Wyrsh

Dipl. Natw. ETH Zurich, Switzerland

born January 6th, 1982

citizen of Altdorf UR, Switzerland

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Ursula Qitterer, examiner

Prof. Dr. Cornelia Halin-Winter, co-examiner

Prof. Dr. med. vet. Felix R. Althaus, co-examiner

2012

1 Zusammenfassung

Oxidativer Stress kann zu vielfältigen zellulären Schädigungen führen. Autophagie, ein lysosomaler Abbau von Zellbestandteilen, mögliches Überleben oder Tod sind nur einige Reaktionen, die ausgelöst werden. Die Auswirkungen von oxidativem Stress können durch die Poly(ADP-Ribose) Polymerasen 1 und 2 (PARP-1 und PARP-2) beeinflusst werden. Beide werden aktiviert durch DNS-Strangbrüche, ausgelöst von freien Sauerstoffradikalen (ROS). PARP-1 und PARP-2 synthetisieren Poly(ADP-ribose) (PAR) unter Verbrauch des Substrates Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD^+). Die Polyribosylierung ist eine post-translationale Modifikation einer Vielzahl von Akzeptorproteinen. PAR besteht aus stark negativ geladenen und verzweigten Polymeren, die durch das Enzym Poly(ADP-Ribose) Glykohydrolase (PARG) abgebaut werden. Seine Hydrolyseaktivität generiert freie PAR Ketten und schliesslich ADP-Ribose (ADPR). Verschiedene Hinweise aus unterschiedlichen Zelltypen deuten darauf hin, dass der PAR Stoffwechsel beim zellulären Ca^{2+} -Einstrom involviert ist. Für die Zellen ist die Ca^{2+} -Homeostase überlebenswichtig. Nur schon geringste Störungen dieses sensiblen Gleichgewichtes können entscheidend sein für das weitere Schicksal der Zelle.

Wir überprüften in einem ersten Schritt, inwiefern zelluläre Signalwege durch PAR-Metabolite beeinflusst werden können. Unser Hauptaugenmerk richtete sich dabei auf ADPR. *In vitro* wurde gezeigt, dass dieser Metabolit an bestimmte Ca^{2+} Kanäle binden kann. Diese Kanäle wurden als Melastatin-ähnliche Transiente Rezeptor Potential 2 (TRPM2) Kanäle identifiziert. Sie sind in der Lage nach einer oxidativen Schädigung Ca^{2+} aus dem extrazellulären Fluid (ECF) in das Zytosol strömen zu lassen. Um diese Ca^{2+} -Ströme visualisieren zu können, entwickelten wir eine fluoreszenzspektroskopische Messmethode in embryonalen Mäusefibroblasten (MEFs). Durch Anwendung von chemischen Inhibitoren, RNA-Interferenz (RNAi) und genetischem Knockout (k.o.) manipulierten wir in einem weiteren Schritt PARP-1, PARP-2, PARG und TRPM2. Nach Applikation von H_2O_2 , einer Modellschubstanz für oxidativen Stress, konnten drei unterschiedliche Szenarien der Stressbewältigung unter der Kontrolle des PAR-Stoffwechsels beobachtet werden. In *Wildtyp* (*wt*) MEFs manifestierte sich ein mehrphasiger Weg, der im Zelltod mündet. Die Abfolge von Ereignissen spielt sich einerseits zwischen fünf unterschiedlichen Zellkompartimenten ab. Andererseits werden dafür drei verschiedene Botenstoffe benötigt: ein Nukleotid, ein Kation und Proteine. Nach Zugabe von 5mM H_2O_2 wird PARP-1 aktiviert. Unter Verbrauch von NAD^+ produziert dieses Enzym das vorgeschaltete Todessignal PAR. PARG baut im Zytosol PAR zu ADPR ab. Diese Metabolite binden an TRPM2 Kanäle, aktivieren diese und lösen dadurch Ca^{2+} -Ströme in das Zytosol aus. Weitere Inositoltriphosphat 3 (IP3)-abhängige Ca^{2+} -Einströme werden durch H_2O_2 *per se* generiert. Erwähnenswert ist

die Tatsache, dass allein die Zugabe von ADPR Ca^{2+} -Ströme auslöst. Dies geschieht unabhängig von oxidativem Stress. Es zeigt, dass das Schlüsselprodukt ADPR des PARP/PARG Zyklus TRPM2 reguliert. Durch den erhöhten Ca^{2+} -Spiegel werden die Extrazelluläre Signal-regulierende Kinase 1/2 (ERK1/2) sowie AKT phosphoryliert und Calpaine aber auch Caspasen aktiviert. Nur die letztgenannten sind jedoch von PARP-1 abhängig. Die Aktivierung von Caspasen findet schrittweise ($9 \rightarrow 6 \rightarrow 3$) statt. Im finalen Schritt wird mitochondrialer Apoptose-induzierender Faktor (AIF) gespalten. Dieser disloziert zum Nukleus. Dort wird DNS-Fragmentierung, Chromatin Kondensation und am Ende Zelltod ausgelöst. Ein ganz anderes Bild zeigt sich bei den *parp-1*^{-/-} MEFs nach Behandlung mit 5mM H_2O_2 . Das Überleben dieser Zellen ist nur geringfügig beeinflusst. Bei dieser Stressantwort werden unter anderem p38, Stress-aktivierte Protein Kinase/Jun-amino-terminale Kinase (SAPK/JNK) sowie *cAMP response element-binding protein* (CREB) und sein aktivierender Transkriptionsfaktor (ATF) phosphoryliert. Alle sind involviert im Netzwerk der zellulären Stressantwort. Überdies werden *microtubule-associated protein 1 light chain II* (LC3-II) Induktion und massive lysosomale Aktivität beobachtet; beides essentielle Autophagie-Marker. Diese Ereignisse führen zum Überleben der Zelle. Zusammenfassend kann PARP-1 als ein Autophagiehemmer nach H_2O_2 -Behandlung aufgefasst werden. Das dritte Szenario wird ausgelöst durch 10mM H_2O_2 . Diese Dosis verursacht eine hohe Belastung der Zelle durch oxidativen Stress und entspricht den verabreichten 5mM H_2O_2 in *wt* MEFs. Die Rolle von PARP-1 übernimmt hier PARP-2. Nach der Bildung von PAR werden TRPM2-abhängige zytosolische Ca^{2+} -Ströme aus intrazellulären Kompartimenten, höchstwahrscheinlich Lysosomen, generiert. Neben der Zellmembran exprimieren nur noch diese TRPM2. Die erhöhten Ca^{2+} -Spiegel rufen wiederum Autophagie hervor, welche diesmal aber zum Tod der Zelle führt.

2 Summary

Oxidative stress may induce many responses in cells. This can range from an activation of a lysosomal clearance mechanism called autophagy, to survival or death. The nuclear enzymes poly(ADP-ribose) polymerases 1 and 2 (PARP-1 and PARP-2) might be involved controlling these outcomes of oxidative stress. Reactive oxygen species (ROS) initiate nicks and breaks of DNA-strands. They stimulate PARP activation. PARP-1 and PARP-2 produce ramified and highly negatively charged polymers called poly(ADP-ribose) (PAR) consuming nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺). PARs are bound to proteins in a post-translational modification reaction. The PAR concentration is controlled by the poly(ADP-ribose) glycohydrolase (PARG). Its hydrolysing activity leads to free PAR chains and finally monomeric ADP-ribose (ADPR). Evidences from different cell types indicated that PAR metabolism is involved in Ca²⁺ gating into cells. The calcium homeostasis is crucial for cell maintenance. Disturbances of this Ca²⁺ equilibrium lead to cell death.

First of all, we corroborate the hypothesis of distinctive PAR metabolites serving as signalling factors affecting cell fate. In particular ADPR, which has been shown to bind to specific Ca²⁺ channels *in vitro*. Transient receptor potential melastatin 2 (TRPM2) channels were identified earlier to gate Ca²⁺ from the extracellular fluid (ECF) into the cytosol after oxidative insults. Therefore, we established a fluorescence spectroscopic method to measure Ca²⁺ shifts. PARP-1, PARP-2, PARG and TRPM2 were manipulated using chemical inhibition, RNA interference (RNAi) and genetic knockout (k.o.) in mouse embryonic fibroblasts (MEFs). This resulted in three different stress response scenarios after H₂O₂ treatment, a model substance of oxidative stress. Foremost, our results pinpoint the role of PAR metabolism in a multistep cell death pathway. This pathway operates between five different cell compartments and communicates via three types of chemical messengers: a nucleotide, a cation and proteins. Activated PARP-1 produces PAR, the upstream death signal after 5mM H₂O₂. Then PARG converts PAR into ADPR units, which are released into the cytosol, activating intermembrane TRPM2 channels and Ca²⁺ influxes. Inositol triphosphate 3 (IP3)-dependent cytosolic Ca²⁺ elevations are also triggered with 5mM H₂O₂. Notably, ADPR loading of MEFs induced TRPM2 mediated Ca²⁺ transients in the absence of any oxidative stress. This suggests that ADPR is the key metabolite of the PARP/PARG cycle regulating TRPM2. Thus, the Ca²⁺ phosphorylates extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) and AKT, triggers calpains and subsequently caspases. But only the latter depends on PARP-1. Caspases become activated as a cascade (9 → 6 → 3) cleaving mitochondrial apoptosis-inducing factor (AIF). It translocates to the nucleus to cause DNA fragmentation, chromatin condensation and finally cell death. By contrast, the moderate stress levels of

5mM H₂O₂ does not affect cell viability in the absence of PARP-1. This type of stress reaction involves the phosphorylation of p38, stress-activated protein kinase/Jun-amino-terminal kinase (SAPK/JNK) as well as cAMP response element-binding protein (CREB) and its activating transcription factor (ATF), all involved in the cellular stress response network. Beyond, late autophagy markers are triggered in *parp-1*^{-/-} MEFs, i.e. microtubule-associated protein 1 light chain 3 II (LC3-II) induction and massive lysosomal activity. All this leads to cell survival. We conclude that PARP-1 acts as a suppressor of H₂O₂-induced autophagy. The third stress response scenario is provoked by 10mM H₂O₂ causing high levels of oxidative stress. It is the equitoxic killing dose in *parp-1*^{-/-} background compared to *wt* MEFs. Here PARP-2 works as a backup mechanism for the missing PARP-1. It activates PAR synthesis and subsequent TRPM2-dependent cytosolic Ca²⁺ shifts from an intracellular source. This source is most likely lysosomes, the only other membrane system, expressing TRPM2. The released Ca²⁺ imbalances trigger a parallel autophagy pathway, marked by LC3-II induction, leading to cell death.