

Dr. Szabó Éva

**Oxidatív stressz által kiváltott poli(ADP-ribóz) polimeráz aktiváció a
bőrben és egyéb szervekben**

Egyetemi Doktori (Ph. D.) Értekezés

Debreceni Egyetem, Orvos- és Egészségtudományi Centrum

Bőrgyógyászati Klinika

Témavezetők: Prof. Dr. Hunyadi János, Dr. Virág László

2003

Rövidítések jegyzéke

I. Bevezetés	6
I.1. A poli(ADP-ribóz) metabolizmus	6
I.1.A. A poli(ADP-ribóz) polimeráz 1 (PARP-1) szerkezete és működése	7
I.1.B. A PARP enzimcsalád	8
I.1.C. A poli(ADP-ribóz) katabolizmusa: poli(ADP-ribóz) glikohidroláz	9
I.2. A poli-ADP-riboziláció biológia szerepe	10
I.2.A. A PARP szerepe a DNS hibajavításban	11
I.2.B. A poli-ADP-riboziláció szerepe a kromatinszerkezet, a replikáció és génexpresszió szabályozásában	12
I.2.B.1. A PARP-1 szerepe a sejtproliferáció és a differenciálódás szabályozásában	12
I.2.B.2. A PARP-1 szerepe a génexpresszió szabályozásában	13
I.2.C. A poli-ADP-riboziláció szerepe a sejthalálban	14
I.2.C.1. Poli-ADP-riboziláció és apoptózis	15
I.2.C.2. Poli-ADP-riboziláció és onkózis	17
I.3. Peroxinitrittel kiváltott poli-ADP-riboziláció különböző kórfolyamatokban	18
I.3.A. A peroxinitrit biológiai hatásai	19
I.3.B. PARP aktiváció patofiziológiai állapotokban	21
I.3.C. A peroxinitrit és a PARP aktiváció lehetséges szerepe a bőr kórélettanában	23
II. Célkitűzés	24
III Anyagok és módszerek	25
III.1. Anyagok	25
III.2. Állatok	25
III.3. Módszerek	25
III.3.A. Kontakt hiperszenzitivitási modell és in vivo peroxinitrit kezelés	25
III.3.B. Diabétesz modell, és a diabétesz monitorozása	26
III.3.C. Haemorrhagiás sokk modell	26
III.3.D. Kísérletes uveitis modell	27
III.3.E. Nitrotirozin kimutatása	27
III.3.F. Poli(ADP-ribóz) kimutatása	28

III.3.G. PARP aktiváció vizsgálata enzim hisztokémiai módszerrel	28
III.3.H. CD11 ⁺ sejtek kimutatása az íriszben	28
III.3.I. DNS törések kimutatása	29
III.3.J. Sejttenyésztés és peroxinitrit kezelés	29
III.3.K. Sejtproliferáció és citotoxicitás vizsgálata	30
III.3.L. Sejtes PARP aktivitás mérése	30
III.3.M. Kaszpáz aktivitás meghatározása	30
III.3.N. DNS fragmentáció meghatározása	31
III.3.O. Intercellularis adhézis molekula 1 (ICAM-1) expressziójának meghatározása	31
III.3.P. Interleukin-8 (IL-8) termelődés mérése	31
III.3.Q. Statisztikai elemzés	32
IV Eredmények	33
IV.1. Peroxinitrit által kiváltott PARP aktiváció a bőrben	33
IV.2. Mustár-olaj által kiváltott tirozin nitrálás és PARP aktiváció a bőrben	33
IV.3. Kontakt hiperszenzitivitási modell	34
IV.3.A. Tirozin nitrálás a bőrben CHS reakcióban.	34
IV.3.B. DNS törés és PARP aktiváció kimutatása CHS-ben	34
IV.4. Vizsgálatok HaCaT sejteken	36
IV.4.A. A peroxinitrit antiproliferatív és citotoxikus hatása HaCaT sejteken: a PARP aktiváció szerepe	36
IV.4.B. Peroxinitrit indukálta kaszpáz aktiváció és DNS fragmentáció	36
IV.4.C. A PARP szerepe az ICAM-1 expresszió szabályozásában és az IL-8 termelődésben	37
IV.5. Haemorrhágiás sokk modell	38
IV.5.A. HS okozta tirozin nitrálás és PARP aktiváció a bélben	39
IV.6. Diabétesz modell	40
IV.6.A. A PARP aktiváció szerepe diabéteszes érendothel diszfunkcióban.	40
IV.7. Kísérletes uveitis modell	41
V Megbeszélés	45
V.1. A peroxinitrit→DNS károsodás→PARP aktiváció útvonal szerepe a bőrben	45
V.2. PARP aktiváció diabéteszes endotheliopathiában	48

V.3. PARP aktiváció hemorrhágiás sokkban	49
V.4. PARP aktiváció kísérletes uveitisben	50
V.5. Az oxidatív stressz által kiváltott PARP aktiváció, mint terápiás beavatkozások lehetséges célpontja	50
VI. Konklúzió	53
VII. Irodalom	54
VIII. Köszönetnyilvánítás	73
IX. Összefoglalás	74
X. Summary	75
XI. Közlemények listája	76
XII. Függelék (közlemények másolatai)	

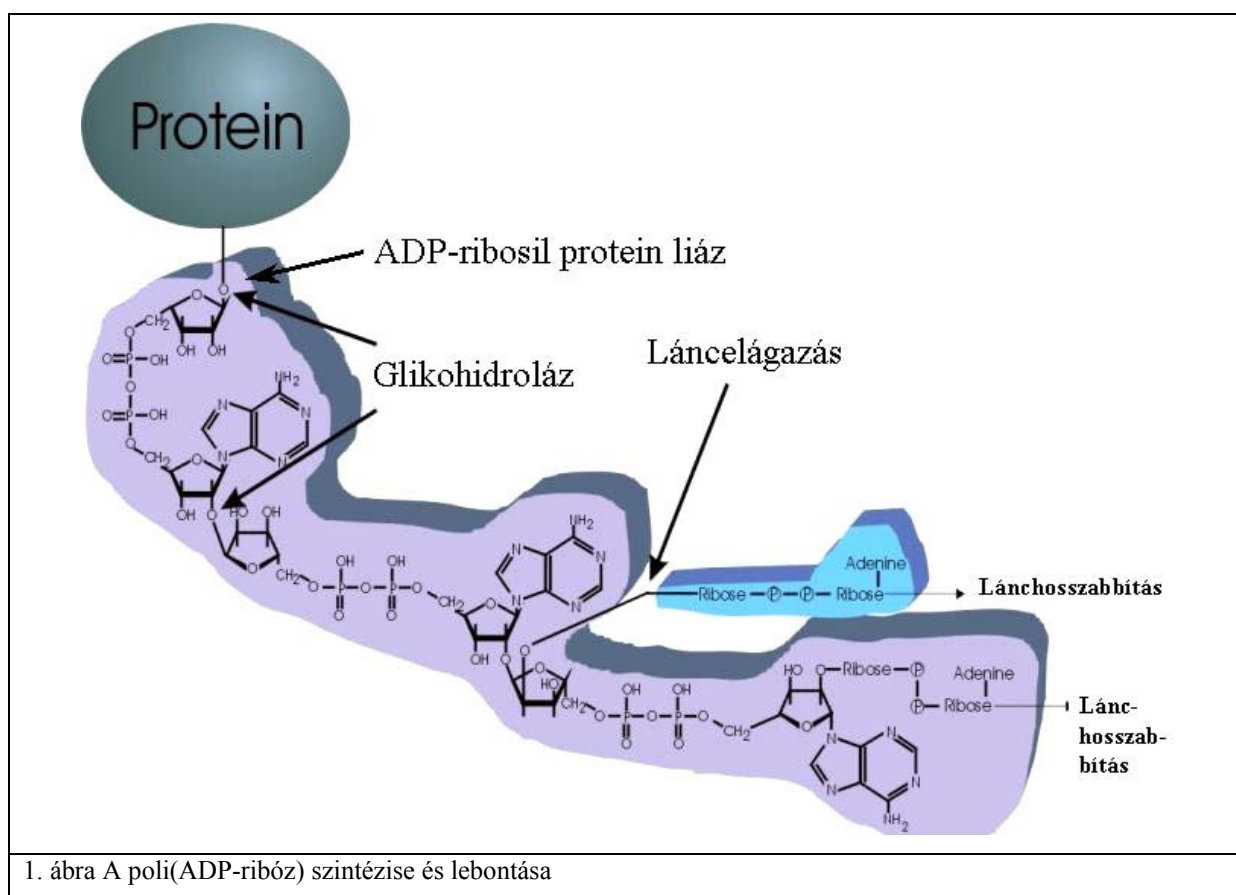
Rövidítések jegyzéke

ABC	avidin- biotin peroxidáz komplex	ONOO ⁻	peroxinitrit
BRCT	breast cancer susceptibility protein C terminus	PADPRT	poli(ADP-ribóz) transzferáz
CHS	kontakt hiperszenzitivitás	PARG	poli(ADP-ribóz) glikohidroláz
eNOS	konstitutív nitrogén monoxid szintetáz	PARP	poli(ADP-ribóz) polimeráz
COX-2	ciklooxygenáz-2 (indukálható ciklooxygenáz)	PARP ^{-/-}	PARP deficiens (knock out)
DAB	diaminobenzidine	PARP ^{+/+}	vad típusú PARP génekkel rendelkező
DBD	DNS kötő domén (DNA binding domain)	PARS	poli(ADP-ribóz) szintetáz
DMSO	dimetil szulfoxid	PBS	phosphate buffered saline
DNS-PK	DNS függő protein kináz	PCNA	proliferating cell nuclear antigen
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	PJ34	N-(-oxo-5,6-dihidro-fenantridi- nin-2-yl)-N,N-dimetilacetamid)
FITC	fluorescein izotiocianát	PKC	protein kináz C
HS	haemorrhagiás sokk modell	SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate-polyac- rylamide gel electrophoresis
HUVEC	human umbilikális véna endothel sejtek	sPARP	short PARP
ICAM-1	intercelluláris adhéziós molekula-1	SPR	short patch repair
IFN- γ	interferon- γ	TCDD	2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p- dioxin
INH ₂ BP	jodo-amino-benzopiron	TdT	terminális deoxiribonukleotid transzferáz
iNOS	indukálható nitrogénmonoxid szintetáz	TIL	tumor infiltráló limfocita
LDH	laktát-dehidrogenáz	TNF- α	tumor nekrosis faktor- α
LPR	long patch repair	TRF1	telomer repeat binding faktor 1
LPS	lipopoliszacharid	TUNEL	TdT-mediated dUTP nick endlabeling
MMP	matrix metalloproteináz	vPARP	vault-PARP
MRC	multiprotein replication complex	XRCC1	X-ray crosscomplementing factor 1
MVP	main vault protein	UV	ultraibolya sugárzás
NAD ⁺	nikotinamid-adenin-dinukleotid		
NES	nuclear export signal		
NF-kB	nuclear factor kappa B		
NLS	nuclear localisation signal		
NMDA	N-metil-D aszpartát		
NO	nitrogén monoxid		
NOS	nitrogén monoxid szintetáz		

I.Bevezetés

I.1. A poli(ADP-ribóz) metabolizmus

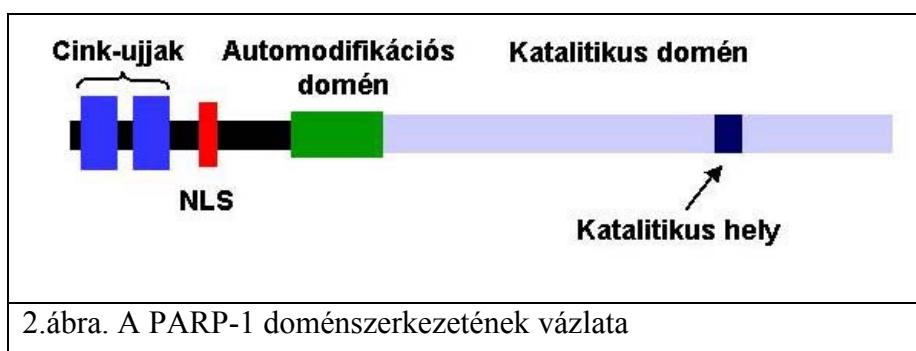
A poli(ADP-ribóz) anyagcsere két alapvető folyamata az (ADP-ribóz)_n polimer szintézise és lebontása. A polimer szintézisére képes enzimeket poli(ADP-ribóz) polimerázoknak (PARP) nevezzük. Elfogadott nevek a poli(ADP-ribóz) szintetáz (PARS) és a poli(ADP-ribóz) transzferáz (PADPRT) is. A PARP enzimek által katalizált reakció során az enzimek a NAD⁺-ot ADP-ribózra és nikotinamidra hasítják (NAD glikohidroláz funkció), majd az ADP-ribóz egységeket megfelelő adapter fehérjék glutamát oldalláncaihoz kapcsolva azokból hosszú elágazó láncú (ADP-ribóz)_n polimereket szintetizálnak (1. ábra) (ADP-ribóz polimeráz funkció) (de Murcia és mtsai, 1994, de Murcia és Menissier de Murcia, 1994, Lindahl és mtsai, 1995, Schreiber és mtsai 1995, Burkle 2001, Smith, 2001). A polimer hossza néhány ADP-ribóz egységtől kb. 200 monomerig terjedhet. A polimer negatív töltéseket kölcsönöz az adapter fehérjéknek, ami megváltoztatja fiziko-kémiai sajátosságait és funkcióit.



A poli-ADP-riboziláció egy dinamikus folyamat, mivel a poli(ADP-ribóz) polimert a poli(ADP-ribóz) glikohidroláz (PARG) és az ADP ribozil protein liáz gyorsan lebontja (1. ábra). A polimer féléletidejét kevesebb mint egy percre becsülik, ami a poli(ADP-ribóz) szintetizáló és lebontó enzimek összehangolt működésére utal.

I.1.A. A poli(ADP-ribóz) polimeráz 1 (PARP-1) szerkezete és működése

A poli(ADP-ribóz) polimeráz-1 (PARP-1) egy sejtmagban található enzim, amit a terminálisan differenciálódott granulocyták és az élesztő sejtek kivételével minden eukarióta sejtben kimutattak. A PARP-1 a sejtmag egyik legnagyobb mennyiségben előforduló fehérjéje. A 116 kDa méretű enzim három fő domént tartalmaz (2. ábra). Az N-terminális végén elhelyezkedő DNS kötő doménban két cinkujj motívum található, míg a katalitikus domént az enzim C-terminális végén találjuk (Mazen és mtsai, 1989, de Murcia és Menissier de Murcia, 1994, de Murcia és mtsai 1994, Schreiber és mtsai 1995, Smith, 2001). A kettő között egy önszabályozó domén helyezkedik el, ami az auto-poli-ADP-riboziláció akceptor helyeként szolgál. Az enzim elsődleges strukturája az eukariotákban nagy fokú konzerváltságot mutat: például az ember és az egér PARP-1 enzimeik között az aminosav szekvencia szintjén 92%-os homológia van. A katalitikus doménben a legnagyobb a homológia a különböző fajok között, s ezen belül is kiemelendő egy 50 aminosavból álló PARP-ra jellemző szekvencia, amelyen belül a gerincesek között 100%-os a homológia.



A PARP-1 főleg egyszálú és kétszálú DNS törések hatására aktiválódik, bár ismeretes bizonyos DNS formákhoz (pl. hajlott vagy kruciform DNS-hez) való kötődése is. A PARP-1, főleg a második cinkujj doménen keresztül kötődve a károsodott DNS-hez, homodimereket alkot és katalizálja a NAD^+ hasítását és a polimer szintézisét. In vivo a poli-ADP-riboziláció egyik legfontosabb akceptora maga a PARP-1. Az intermolekuláris auto-poli-ADP-riboziláció hatására a PARP-1 leválik a károsodott DNS-ről és enzimaktivitása gátlódik. Ha a polimer akceptora más fehérje, akkor transz-poli-ADP-ribozilációról beszélünk. A transz-poli-ADP-riboziláció fontos akceptorai a hisztonok (Tanuma és mtsai, 1985, Nagele 1995), amelyek a folyamat során negatív töltést nyernek, s az ennek következtében a DNS és a hisztonok között fellépő elektrosztatikus taszítás lazítja a kromatin szerkezetét. Számos egyéb magfehérje, pl. transzkripció faktorok, DNS javító enzimek és adapter fehérjék poli(ADP-ribozilációját is kimutatták. [NF- κ B (Oliver és mtsai, 1999), B-MYB (Cervellera és Sala, 2000), DNS-PK

(Ariumi és mtsai, 1999), p53 (Wesierska-Gadek és mtsai, 1996, Kumari és mtsai, 1998, Malanga és mtsai, 1998, Simbulan-Rosenthal és mtsai, 1999, 2001, Wesierska-Gadek és Schmid, 2001, Tong és mtsai, 2001)].

A PARP-1 aktivitás szabályozása több különböző mehanizmuson alapul. A fent ismertetett **auto-poli-ADP-riboziláció** (Kawaichi és mtsai, 1981) kívül kiemelendő egyrészt a **nikotinamidnak**, a NAD^+ kisebbik hasítási termékének az enzim aktivitását gátló hatása, ami negatív visszacsatolással védhet a PARP túlzott aktivációja ellen. A nikotinamidon kívül a poli-ADP-riboziláció endogén gátlószereinek tekinthetők bizonyos **purinok** (pl. hipoxantin, inozin, adenozin) (Virág és Szabó, 2001), melyek intracelluláris koncentrációja főleg ischaemia során érhet el kellően magas szintet ahhoz, hogy PARP gátlást okozzon. A PARP protein kináz C (PKC)-vel történő foszforilálása is enzimgátlást eredményez (Tanaka és mtsai, 1987, Bauer és mtsai, 1992, 1994). Bizonyos állapotokban a PARP fehérje mennyisége változik, ami **transzkripció/poszttranszkripció szabályozás**ra utal (Bergeron és mtsai, 1997, Tramontano és mtsai, 2000, Doucet-Chabeaud és mtsai, 2001). További fontos tény hogy létezik egy DNS töréstől független, **kalcium-függő PARP aktivációs útvonal** is (Homburg és mtsai, 2000), bár ennek részletei kevésbé ismertek.

I.1.B. A PARP enzimcsalád

Az utóbbi évekig a PARP-1 volt az egyetlen poli-ADP-ribozilációt katalizáló enzim. Azt követően, hogy PARP-1 deficiens sejtekben is kimutattak PARP aktivitást (Shieh és mtsai, 1998), intenzív kutatás kezdődött, hogy azonosítsák azokat az enzimeket, melyek felelősek ezért az aktivitásért. Az utóbbi két évben hat másik enzimről írták le, hogy rendelkezik poli-ADP-ribozilációs aktivitással (Virág and Szabó, 2002). De Murcia laboratóriumában 16 különböző cDNS-t izoláltak, melyek mindegyike különböző PARP enzimet kódol (de Murcia, személyes közlés). Bár ezen új PARP enzimek biológiai szerepét vizsgáló kutatások még kezdeti stádiumban vannak, máris érdekes különbségeket írtak le a doménszerkezetükben, sejten belüli elhelyezkedésükben, szöveti eloszlásukban és DNS-kötő képességükben. Mivel az új PARP enzimek vizsgálata nem képezte jelen vizsgálataink tárgyát, ezért itt csak röviden ismertetem az enzimcsalád néhány új tagját.

A PARP-2: sejtmagban található 62 kDa-os fehérje, önszabályozó domén nélkül és a PARP-1-étől eltérő DNS kötő doménnel (Ame és mtsai, 1999). Képes auto-poli-ADP-ribozilációra, de hisztonokat nem tud poli-ADP-ribozilálni.

sPARP, short PARP: Poirier munkacsoportja izolált egy cDNS-t PARP-1 deficiens fibroblasztokból, ami egy 55 kDa-os magfehérjét kódol, és megegyezik a PARP-1 katalitikus

doménjével (Sallmann és mtsai, 2000). A PARP-1-gyel ellentétben, az sPARP aktiválódásához nem szükséges DNS törés, bár genotoxikus ártalom stimulálja. De Murcia egyszerű splice variánsnak tekinti.

A vPARP, vault-PARP: A boltívhez hasonló alakjukról „vault”-nak nevezett, ismeretlen funkciójú szubcelluláris struktúrákban található enzimet jelöli (Kickhoefer és mtsai, 1996, Kickhoefer és mtsai, 1999). Kölcsönhat a fő vault fehérjével (MVP, main vault protein), és poli-ADP-ribozilálja azt.

A tankiráz-1 a kromoszomális végek (telomerek) replikációját katalizáló telomerázzal kapcsolatos PARP enzim (Smith és mtsai, 1998, Smith és de Lange, 2000). A tankiráz 24 ankirinszerű ismétlődő szekvenciát tartalmazó fehérje, mely kötődik a telomeráz egyik negatív szabályozójához, a TRF1-hez (telomer repeat binding factor 1) (Smith és mtsai, 1998), és poli-ADP-ribozilálja azt. A poli-ADP-riboziláció valószínűleg gátolja a TRF funkcióját, mivel a tankirázt overexpresszáló sejtekben nem rövidült a telomerhossz.

A tankiráz-2 egy extranukleáris PARP, ami korábban a Golgi-val kapcsolatban levő és TNLK-nak is nevezett fehérjeként volt ismert (Chi és Lodish, 2000, Lyons és mtsai, 2001). A tankiráz 2 minden eddig vizsgált szövetben megtalálható. A tankiráz 2 overexpressziója 3-aminobenzamiddal gátolható nekrotikus sejthalált okoz (Kaminker és mtsai, 2001).

Ti-PARP: ez a TCDD-vel (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin) indukálható PARP (Ma és mtsai, 2001) egy 75 kDa-os enzim, ami azonos a korábban memória sejtekben RM1-ként és tumort infiltráló limfocitákban TIL-ként leírt fehérjével.

I.1.C. A poli(ADP-ribóz) katabolizmusa: poli(ADP-ribóz) glikohidroláz

Bár Miwa és Sugimura már 1971-ben felfedezte a PARG-ot (Miwa és Sugimura, 1971, Miwa és mtsai, 1974), az enzim kutatása nem folyt olyan intenzíven, mint a PARP-1-é. Ennek egyik oka az, hogy nehéz tiszta PARG enzimet izolálni, mivel az enzim kis mennyiségben van jelen a sejtekben, és a tisztítás során nagyon érzékeny a proteolitikus bontásra (Davidovic és mtsai, 2001). A PARG exoglikozidáz aktivitása révén képes poli(ADP-ribóz) polimerek terminális ADP-ribóz egységeinek hidrolizálására, valamint endoglikozidázként működve nagyobb oligo(ADP-ribóz) fragmentek eltávolítására (Brochu és mtsai, 1994, Davidovic és mtsai, 2001). Mivel a PARG K_m értéke sokkal alacsonyabb a nagyobb (ADP-ribóz) polimerekhez mint a kisebbekhez (Hatekayama és mtsai, 1986), ezért valószínű, hogy az enzim először a nagyobb fragmenteket bontja le. A PARG ezután exoglikozidáz „üzemmódba” vált, és egyenként távolítja el az ADP-ribóz egységeket. A fehérjéhez közvetlenül kapcsolódó ún. proximális ADP-ribóz egységet egy alig jellemzett

enzim, az ADP-ribozil protein liáz távolítja el (Oka és mtsai, 1984). A PARG magas specifikus aktivitása kompenzálja az enzim kis mennyiségét. Közel 90%-os PARG aktivitás gátlás szükséges a poli(ADP-ribóz) intracelluláris felhalmozódásához (Jonsson és mtsai, 1988a,b).

A patkány és borjú PARG cDNS-t Sugimura (Shimokawa és mtsai, 1999) és Jacobson munkacsoportja (Lin és mtsai 1997) is klónozták. A cDNS-ek más proteinekkel jelentős homológiát nem mutató kb. 109-111 kDa-os fehérjéket kódoltak. Az enzimben található egy nukleáris lokalizációs és export szignál (NLS és NES), ami felveti a lehetőségét, hogy a PARG ingázik a sejtmag és a citoplazma között (Shimokawa és mtsai, 1999). Amilyen nagy számú közlemény szól a PARP gátlás sejtes és in vivo hatásairól, olyan kevés cikk található az irodalomban, ami a PARG biológiai funkcióival kapcsolatos. In vivo a PARG gátlásra leggyakrabban tannin származékokat használnak. Az oenothin B-ről, egy makrocirkuláris ellagitannin PARP inhibitorról kimutatták, hogy az egér emlőtumor vírus transzkripcióját gátolja, és a tumort szuprimáló makrofágokat aktiválja (Aoki és mtsai, 1995). Továbbá a gallotanninról és a nobotanin B-ről Swanson munkacsoportja kimutatta, hogy megvédi az egér asztrocitákat és neuronokat a hidrogén peroxiddal, N-methyl-D aszpartát (NMDA) által kiváltott oxidatív károsodástól (Ying és Swanson, 2000), és az alkiláló szerek citotoxikus hatásától (Ying és mtsai, 2001). Bár a PARG-nak és PARP-nak ellentétes hatása van a poli(ADP-ribóz) akkumulációjára, mindkét enzim gátlása citoprotektív hatású (Ying és mtsai, 2001). Mindezek alapján úgy tűnik, hogy mind a poli(ADP-ribóz)-t szintetizáló (PARP), mind az azt lebontó enzim (PARG) gátlásának hasonló sejtvédő hatása van az oxidatív stressz által károsodott sejtekre. Ennek a látszólagos paradoxonnak valószínűleg az a magyarázata, hogy a PARP automodifikációs doménjéről a gátló poli(ADP-ribóz) maradékok PARG általi eltávolítása szükséges a PARP aktív állapotban tartásához. A PARG gátlása a PARP hyper-autopoli-ADP-ribozilációhoz és következményes gátlásához vezet.

I.2. A poli-ADP-riboziláció biológia szerepe

A poli-ADP-riboziláció elsőként azonosított biológiai funkciója a DNS hibajavítást elősegítő hatása volt. Az utóbbi évek kutatásai alapján a poli-ADP-riboziláció egy pleiotróp regulációs mechanizmus, amely számos sejtfunkciót, többek között pl. a kromatinszerkezetet, a replikációt, transzkripciót, a proliferációt, a sérült fehérjék lebontását és a sejthalált is szabályozza. Az új PARP izoformák jobb megismerését követően ez a felsorolás valószínűleg tovább bővül majd. E fejezet célja ezen poli-ADP-riboziláció által szabályozott folyamatok rövid áttekintése.

I.2.A. A PARP szerepe a DNS hibajavításban

A PARP-1 DNS javításban betöltött szerepe régóta ismert. Számos, farmakológiai PARP gátláson alapuló tanulmány megállapította, hogy a PARP-1-nek szerepe van a DNS javításban (Burkle, 2001, Ziegler és Oei, 2001). Kimutatták például, hogy a PARP inhibitor 3-aminobenzamid késlelteti a DNS törések ligálását, fokozza a nem replikációs („unscheduled”) DNS szintézist és a testvérkromatidák kicserélődését alkiláló szerrel kezelt CHO és HeLa S3 sejtekben (Park és mtsai, 1983). A PARP gátlás fokozta a sejtek érzékenységét a DNS károsodás citotoxikus hatásával szemben (Szabó, 2000). Később random mutagenézist alkalmazva Berger munkacsoportja alacsony PARP aktivitású sejtvonalakat hozott létre, és kimutatta, hogy ezek a mutánsok fokozottan érzékenyek UV-sugárzásra, topoizomeráz I gátlókra és különböző alkiláló anyagokra, beleértve az alkilszulfonátokat, alkilnitrozoureákat és a nitrozoguanidint (Chatterjee és mtsai, 1989, 1990a,b). Hasonló eredményre vezettek a PARP-1 elleni antiszenz oligonukleotidokkal végzett és a PARP-1 DNS kötő doménjának overexpresszójával létrehozott domináns negatív gátlást alkalmazó kísérletek is (Molinete és mtsai, Schreiber és mtsai, 1995, Shall és de Murcia, 2000, Smulson és mtsai, 2000). A legmeggyőzőbb érveket a poli-ADP-ribóziláció és a DNS repair kapcsolatának igazolására a knock out állatokkal és a belőlük létrehozott sejtvonalakkal kapott kísérletek szolgáltatták. A de Murcia laboratóriumában előállított PARP hiányos egerek fokozottan érzékenyek voltak ionizáló sugárzás vagy monofunkciós alkiláló anyagok toxikus hatásaival szemben (de Murcia és mtsai, 1997). E knock out egerekből származó embrionális fibroblasztokban az alkiláló szerek kifejezettebb proliferációs blokkot okoztak, mint a PARP^{+/+} sejtekben (de Murcia és mtsai, 1997, Trucco és mtsai, 1998). Mind alkiláló kezelés hatására, mind anélkül a PARP hiányos sejtek genomikus instabilitást is mutatnak, amit a nagyszámú mikronukleolusz jelenléte igazolt. A PARP^{-/-} fibroblasztokban lassúbbnak találták a DNS törések ligálását. A PARP-1 hiánya elsősorban az ún. long patch repair (LPR) aktivitást érintette, de a „short patch repair” (SPR) aktivitásuk is mintegy 50 %-kal csökkent (Dantzer és mtsai, 2000).

A PARP-1 tehát részt vesz a genom integritásának fenntartásában, és fokozza a bázis kihalásos hibajavítást (BER) a besugárzott vagy alkiláló szerrel kezelt sejtekben. A PARP-1-nek a genomintegritás megőrzésében betöltött szerepére utal kapcsolata az excíziós javítási komplex alkotóival: a DNS hibajavító rendszer adapter fehérjével (pl. XRCC1) (Massom és mtsai, 1998) és effektoraival (DNS polimeráz β , DNS ligáz III). A PARP-1 a cinkujj doméneken vagy az automodifikációs domén BRCT motívumán keresztül asszociálódik

ezekkel a fehérjékkel, amint azt kéthibrid rendszerben és ko-immunoprecipitációval végzett kísérletekben kimutatták (Szabó 2000).

I.2.B. A poli-ADP-ribóziláció szerepe a kromatinszerkezet, a replikáció és génexpresszió szabályozásában

I.2.B.1. A PARP-1 szerepe a sejtproliferáció és a differenciálódás szabályozásában

Szövetbeli specifikus feladataik ellátásához az éretlen sejtek proliferációs lépések sorozatán mennek végig, melynek során multipotenciájuk szűkülésével párhuzamosan új funkciókra tesznek szert. Ez a szigorúan kontrollált folyamat összehangolt génaktivációt és szuppressziót igényel, melynek eredménye specializált sejtekké (pl. hepatocitákká, neuronokká, keratinocitákká, stb.) történő differenciálódás. Néhány differenciálódott sejttípus (pl. a limfocita, fibroblaszt, hepatocita) megőrzi szaporodó képességét és az immunválasz, a sebgyógyulás vagy a máj regenerálódása során, megfelelő stimulusokra újra proliferálni kezdhet.

A PARP-1-nek valószínűleg szerepe van a DNS replikáció és differenciálódás, valamint a génexpresszió szabályozásában. A PARP-1 szerepét a replikáció szabályozásában azok a megfigyelések támasztják alá, melyek szerint az osztódó sejtek magjában gyorsabb a poli(ADP-ribóz) metabolizmus (Tanuma és mtsai, 1978, Kanai és mtsai, 1981, Leduc és mtsai, 1988, Bakondi és mtsai, 2002). Ismeretes továbbá, hogy a PARP-1 szerepet játszik az MRC (multiprotein replication complex) kialakulásában (Simbulan-Rosenthal és mtsai, 1996). A PARP-1 asszociációt mutat a DNS polimeráz α -val és β -val, a DNS primázzal, helikázzal, ligázzal, a topoizomeráz I-gyel és II-vel, melyek az MRC főbb alkotórészei (Simbulan-Rosenthal és mtsai, 1996, Dantzer és mtsai, 1998). Számos, a replikációban szerepet játszó faktorról [DNS polimeráz α , topoizomeráz I és II, PCNA (proliferating cell nuclear antigen)] – bebizonyították, hogy poli-ADP-ribózilálódik (Simbulan-Rosenthal és mtsai, 1996). A hisztonok poli-ADP-ribózilációjáról is azt feltételezik, hogy a DNS replikáció alatt segíti a kromatinszerkezet lazulását (Boulikas, 1990). A PARP hiányos egerekből előállított embrionális fibroblaszt sejtvonal lassúbb növekedése is a PARP-1 replikációban betöltött szerepét valószínűsíti.

Mivel a replikáció és a differenciálódás egymással kapcsolódó folyamatok, a fent leírt kísérleti adatok alapján valószínű a PARP differenciálódást befolyásoló hatása is. A PARP gátlása valóban befolyásolja a differenciálódást több sejtmódelben. Néhány myeloid leukemia sejtvonalban megfelelő stimulusokkal mind monocita/makrofág mind neutrofil

granulocita irányú differenciálódás kiváltható. NB4 akut promyelocita leukémia és HL-60 akut myelocitás leukémia sejtek PARP szintje jelentős változást mutatott attól függően, hogy monocita/makrofág vagy neutrofil irányú differenciálódás történik (Bhatia és mtsai, 1995). Ezen kívül PARP inhibitorok gátolták a humán granulocita-makrofág progenitor sejtek makrofággá alakulását, a neutrofil-granulocita vonallá alakulást viszont kevésbé befolyásolták (Francis és mtsai, 1983). Más tanulmányokban a PARP overexpressziója gátolta az NB4 sejtek retinsavval indukált neutrofil irányú terminális differenciálódását. PARP inhibitorok gátolták Daudi limfoma sejtek plazmasejtté differenciálódását is (Exley és mtsai, 1987). A differenciálódás modell-specifikus különbségeit hangsúlyozza az a megfigyelés is, hogy a benzamid PARP inhibitorok fokozzák a melanogenezist és a melanoma sejtek differenciálódását (Durkacz és mtsai, 1992). Ezen kívül a poli-ADP-riboziláció befolyásolja az eritroid differenciálódást (Rastl és Swetly, 1978, Morioka és mtsai, 1979, Terada és mtsai, 1979, Sugiura és mtsai, 1984), a csirke embrió mesenchyma sejtek differenciálódását (Nishio és mtsai, 1983, Cherney és mtsai, 1985), és a trophoblast sejtek differenciálódását a tumorképződés során (Masutani, és mtsai, 2001).

I.2.B.2. A PARP-1 szerepe a génexpresszió szabályozásában

A poli-ADP riboziláció transzkripcióban betöltött szerepére számos kísérleti adat utal (de Murcia és mtsai, 1986, Lindahl, és mtsai, 1995). Yamada és mtsai (1990) leírják pl. hogy pancreas szigetsejtekben a nikotinamid és a 3-aminobenzamid csökkenti a II. típusú hisztokompatibilitási molekulák IFN- γ és a TNF- α által indukált expresszióját, de az MHC-I. expressziót nem befolyásolja. Hasonló eredményeket közöltek humán pajzsmirigy és asztrocita sejteken is (Hiromatsu és mtsai, 1992, Taniguchi és mtsai, 1993, Qu és mtsai, 1994). Kimutatták továbbá, hogy a PARP nikotinamiddal, 3-methoxibenzamiddal és 3-aminobenzamiddal vagy INH₂BP-vel történő gátlása csökkenti a citokin-stimulált iNOS expressziót különböző sejttypusokon (Hauschildt és mtsai 1991, 1992, Pellat-Deceunynck és mtsai, 1994, Szabó és mtsai, 1998). Interleukin-1 beta-val stimulált nyúl szinoviális fibroblasztok 3-aminobenzamid kezelése csökkent kollagenáz szintézist eredményez, ami arra utal, hogy a PARP-nak szerepe van a kollagenáz termelés szabályozásában (Ehrlich és mtsai, 1995). Később PARP hiányos sejteken is bebizonyították, hogy a PARP-nak szerepe van a transzkripció szabályozásában. Szabó és mtsai (1998) kimutatták, hogy PARP-1^{-/-} fibroblasztok mind a protein mind az mRNS szintjén csökkent iNOS expresszióval válaszoltak kombinált lipopoliszaccharid (LPS) és IFN- γ stimulusra. Citokinnel stimulált HUVEC sejteken (human umbilikális véna endothel sejtek) a PARP gátlás vagy inaktiválás

csökkentette az ICAM-1, a P-szelektin és az E-szelektin expresszióját (Zingarelli és mtsai, 1998, Sharp és mtsai, 2001). Azt is leírták, hogy ischaemia-reperfúzió során a PARP hiányos egerek szívében csökkent ezen adhéziós molekulák expressziója a vad típusú kontrollokhoz képest (Zingarelli és mtsai, 1998).

A PARP transzkripció aktivitásának egyik komponense a kromatinszerkezet és funkció szabályozása. A poli-ADP-riboziláció negatív töltést ad a hisztonoknak, ami elektrosztatikus taszítást eredményez a DNS és a hisztonok között. A hiszton-DNS kapcsolat lazulása hozzáférhetőbbé teszi az átírandó DNS régiókat a transzkripció apparátus számára, és így serkenti a transzkripciót (Althaus és mtsai, 1994). Meisterernst és mtsai (1997) szerint a PARP-1 a pozitív kofaktor 1 aktivitás funkcionális alkotórésze, és jelenléte (de aktivitása nem!) szükséges a preiniciációs komplex képződéséhez. Egy másik fontos megfigyelés a PARP-ról mint transzkripció szabályozó faktorról de Murcia laboratóriumából származik (Oliver és mtsai, 1999). A PARP gátlás ismert gyulladásgátló és transzkripciót szabályozó hatása alapján azt feltételezték, hogy kapcsolat van a PARP-1 és a számos gyulladáshoz mediátor (citokinek, adhéziós molekulák, iNOS, COX-2) termelődését beindító transzkripció faktor, az NF- κ B között. Kimutatták az NF- κ B függő transzkripció defektusát PARP-1 hiányos sejtekben. Az NF- κ B endogén inhibitorának, az I κ B-nek a foszforilációja, degradációja és az NF- κ B nukleáris transzlokációja nem sérült, de az NF- κ B konszenzus szekvenciához való kötődése igen (Oliver és mtsai, 1999). Az irodalmi adatok alapján úgy tűnik, hogy a PARP-1 NF- κ B ko-aktivátor funkciójához nincs szükség a PARP-1 katalitikus hatására, hanem az a PARP-1 és az NF- κ B közötti fehérje-fehérje interakció révén valósul meg (Hassa és mtsai, 2001, Chang és Alvarez-Gonzalez, 2001, Jagtap és mtsai, 2002, Soriano és mtsai, 2001c).

A vad típusú és a PARP-hiányos fibroblasztok expressziós mintázatát DNS chip technológiával összehasonlítva a vizsgált 11000 génből 91 olyat találtak, melyek különbözőképpen expresszázódtak (Simbulan-Rosenthal és mtsai, 2000). Érdekes lehet, és folyamatban van e technológia alkalmazása PARP által befolyásolt gének azonosítására stimulált sejteken és in vivo a gyulladás különböző formáiban.

I.2.C. A poli-ADP-riboziláció szerepe a sejthalálban

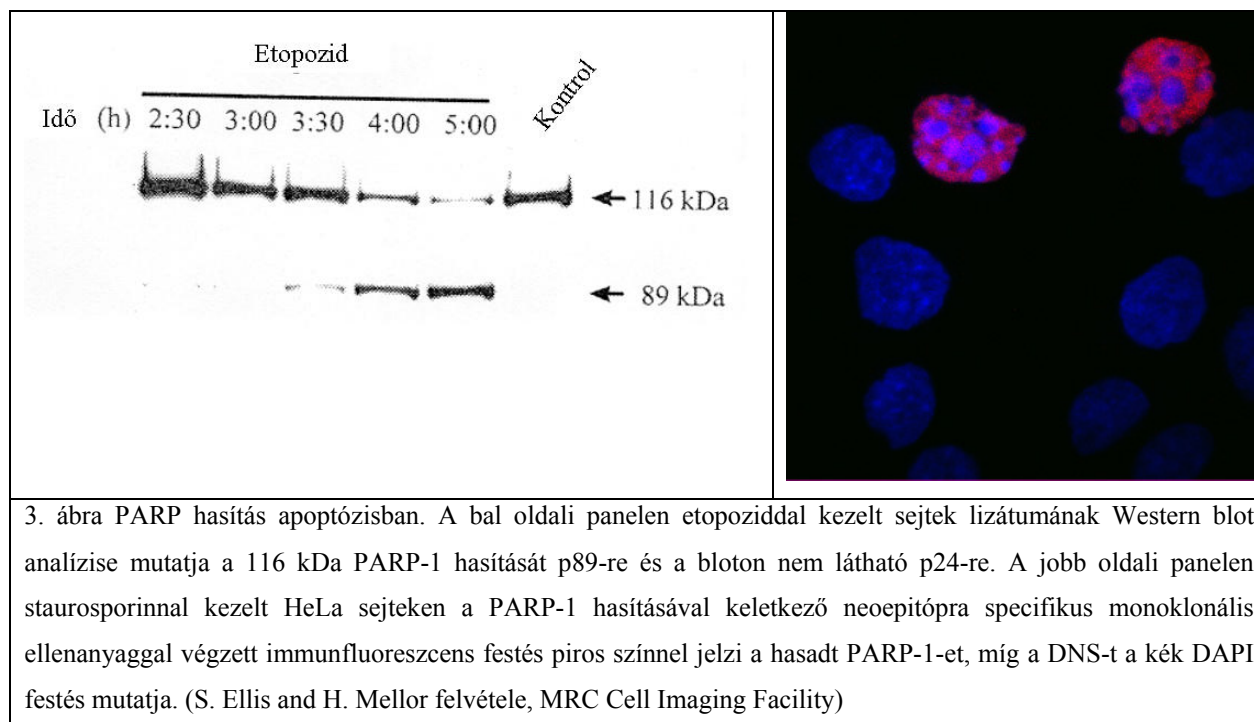
A PARP aktivációt először Berger munkacsoportja hozta összefüggésbe a DNS károsító ágensek citotoxikus hatásával (Berger és mtsai, 1983,1986). Az általuk megalkotott sejttöngyilkossági hipotézis („suicide hypothesis”) lényege az, hogy az intenzív PARP

aktiváció elfogyasztja a sejtek NAD^+ tartalmát, ami következményes ATP deplációhoz és a sejt halálához vezet. Ez a sok ízben és különböző csoportok által is megerősített megfigyelés indította el a PARP aktivációnak, mint sejteliminációs folyamatnak a részletesebb analizisét. Az utóbbi években a poli-ADP-riboziláció kutatásának egyik központi kérdésévé vált, hogy a PARP aktiváció milyen típusú (apoptotikus vagy onkotikus) sejthalált vált ki. A sejthalál formáinak részletes jellemzése meghaladná e munka terjedelmét, ezért itt csupán röviden utalunk a két alapvető sejthalál-forma közti különbségekre. A sejthalál - a kiváltó stimulus jellegétől, intenzitásától, az érintett sejttípus érzékenységétől és a moduláló tényezők aktivitásától függően - alapvetően két formában zajlik le, melyeket apoptózisnak és onkózisnak hívnak. (Az onkózis folyamatára korábban használt nekrosis kifejezést ma már inkább az egyed halála után bekövetkező, post mortem sejthalál megnevezésére tartják fenn.).

I.2.C1. Poli-ADP-riboziláció és apoptózis

Az apoptózis révén elhaló sejtekre jellemző a kompakt morfológia, a kromatin kondenzáció, a plazmamembrán épségének megőrzése és az apoptotikus sejtek fagociták által történő gyors eliminációja. Apoptózis indukálható számos módon pl. sejtfelszíni receptorok ligandkötésével (Fas-ligand, TNF, TRAIL), DNS károsító ágensekkel (alkiláló szerek, ionizáló sugárzás, stb), mitokondriumra ható szerekkel. E sejthalál legtöbb formájában központi szerepet kapnak a kaspáz (cysteinyln aspartate-specific proteases) enzimcsaládba tartozó proteázok és a mitokondriumból kiszabaduló apoptogén faktorok (pl. citokróm c, apoptózis indukáló faktor, SMAC/DIABLO).

A PARP-1 és a sejthalál viszonyának tanulmányozására rányomta a bélyegét az, hogy a PARP-1 volt az apoptózis egyik fő végrehajtó rendszerének, a kaspázoknak az egyik elsőként azonosított szubsztrátja (3. ábra) (Kaufmann és mtsai, 1993). Ennek a megfigyelésnek a hatására a PARP szerepét főleg az apoptózis folyamatában vizsgálták. Az apoptosis során a kaspáz-7 és a kaspáz-3 a PARP-1-et két részre hasítja: egy 89 és egy 24 kDa-os fragmentre (p89 és p24) (Tewari és mtsai, 1995, Germain és mtsai, 1999). Ezek a proteázok a PARP-1 NLS-ben elhelyezkedő DEVD motivumnál vágják ketté az enzimet (Lazebnik és mtsai, 1994). A hasítás eredményeképpen a DNS kötő domén szeparálódik a katalitikus doméntól, ami az enzim inaktiválását eredményezi.



A hasítási fragmentumok közül a p89 gátolja az intakt PARP-1 homoasszociációját, a p24 pedig a PARP-1 DNS-hez való kötődését (Kim és mtsai, 2000a, b, D'Amours és mtsai 2001). A PARP-1 inaktiválásának e túlbiztosítása valószínűsíti, hogy a PARP-1 aktivációjának gátlása létfontosságú az apoptotikus mechanizmus megfelelő működéséhez. A PARP-1 hasításának valószínűleg az a jelentősége, hogy megelőzi az apoptózis későbbi szakaszában bekövetkező DNS fragmentáció PARP aktiváló hatását, és így megőrzi a sejtek energiáját az apoptózis ATP igényes lépéseire (Herceg és Wang, 1999).

Felvetődik a kérdés, vajon a PARP-1 által végzett poli-ADP-ribóziláció befolyásolja-e az apoptózis folyamatát. A PARP-1 apoptózist befolyásoló esetleges hatása csak az apoptózis korai, kaszpáz aktivációt megelőző szakaszaiban érvényesülhet. A PARP gátlószerekkel kapott eredmények ellentmondóak. A vizsgált sejtípustól és az apoptózist kiváltó stimulusoktól függően a PARP gátlása hol gátolta (Tanaka és mtsai, 1995, Kuo és mtsai, 1996, Shiokawa és mtsai, 1997, Guo és mtsai, 1998, Richardson és mtsai, 1999), hol fokozta (Ray és mtsai, 1992, Ghibelli és mtsai, 1995, Payne és mtsai, 1998, Tentori és mtsai, 1999, 2001a, b, Berry és mtsai, 2000), illetőleg egyes esetekben nem befolyásolta az apoptózist (Watson és mtsai, 1995). A poli-ADP-ribóziláció apoptózisban játszott fontos szerepét támogató legújabb megfigyelés Valina Dawson laboratóriumából származik. Dawson munkacsoportja kimutatta, hogy alkiláló szerrel, hidrogén peroxiddal vagy NMDA-val kezelt sejtekben az apoptózis indukáló faktornak (AIF) a mitokondriumból a sejtmagba történő transzlokációja a PARP-1 aktivációjának következménye (Yu és mtsai. 2002). Ez a jelenség

összhangban van Virág és munkatársai korábbi megfigyelésével, mely szerint oxidatív stressznek kitett sejtekben a PARP-1 aktiváció felelős a mitokondriális membránpotenciál csökkenéséért és a szekunder szuperoxid termelődésért (Virág és mtsai 1998b), ami kiváltó oka lehet az AIF mitokondriumból történő kiszabadulásának.

Számos tanulmány szerint a PARP-1 nem szükséges az apoptózishoz. Nem sokkal azután, hogy a PARP-1 hiányos egerek rendelkezésre álltak, összehasonlították PARP^{+/+} és PARP^{-/-} hepatociták, timociták, primer neuronok érzékenységet Fas, TNF- α , etopozid, dexametazon, és ceramid által kiváltott apoptózisban, és nem találtak különbséget a knock out és a vad típusú sejtek között (Leist és mtsai, 1997b). Wang és munkatársai (1997) is zavartalan apoptózist találtak anti-Fas, gamma-sugárzás és dexametazon kezelés után PARP hiányos (knock out) sejtekben. Virág és mtsai sem találtak különbséget timocitákon dexametazon vagy anti-Fas-kezelés hatására létrejövő apoptózisban (Virág és mtsai 1998a). A knock out egerek normális embrionális és posztnatális fejlődése is ellentmond a PARP-1 apoptózisban betöltött meghatározó szerepének (Wang és mtsai, 1995). Mindezek alapján úgy tűnik, hogy a PARP nem szükséges az apoptózis legtöbb formájához, de a PARP hasítása elengedhetetlen az apoptotikus folyamat zavartalan lefolyásához.

I.C.2 Poli-ADP-ribóziláció és onkózis

Az onkózist az apoptózistól elkülönítő legfontosabb ismerv a plazmamembrán integritásának megszűnése és a sejt térfogatának növekedése, szemben az apoptotikus sejt kompaktációjával. Az onkotikus sejt tartalmának a környezetbe szivárgása gyulladást serkentő stimulust jelent, míg az apoptotikus sejt a makrofágok fagocitózisa révén gyorsan eltűnik a szövetből. Ebből következően a sérült szövet szempontjából vizsgálva a történéseket a sejthalálformák nem egyenértékűek, és az onkózis apoptózissá való átalakítása önmagában is terápiás előnnyel járhat. Mindazonáltal, az apoptózis és onkózis biokémiai és morfológiai különbségeinek szem előtt tartásával is kijelenthetjük, hogy e két sejthalálforma egymástól nem teljesen független entitás. Sokkal inkább egy folyamatos skála két végpontja, amint azt Lipton és Nikotera NMDA-val illetve peroxinitrittel kezelt neuronokon kapott eredményeik alapján javasolták (Bonfoco és mtsai, 1995, Nicotera és mtsai, 1999). Különösen oxidatív stresszel kiváltott, vagy erős oxidatív stresszel jellemezhető sejthalálformákban enyhe stimulus apoptózist, míg az erősebb onkózist vált ki. Az is megállapítást nyert, hogy az ATP és a NAD⁺ fontos meghatározói a sejthalál formájának (Coppola és mtsai, 1995, Klaidman és mtsai, 1996, Leist és mtsai, 1997a, 1999, Mukherjee és mtsai, 1997, Lelli és mtsai, 1998,

Lieberthal és mtsai, 1998, Nicotera és mtsai, 1998, Ran és mtsai, 1999, Crowley és mtsai, 2000).

E megfigyelések tükrében vizsgálva a PARP-nak mint egy NAD^+ -ot bontó enzimnek a szerepét a sejthalálban feltételezhető, hogy a PARP-1 fokozott aktivitása az ismert NAD^+/ATP depletáló hatása következtében gátolhatja az apoptózis folyamatát, és azt az onkózis irányába terelheti. A PARP és a sejthalál szerepéről szóló első tanulmányok a PARP farmakológiai inhibitorainak (leggyakrabban a 3-aminobenzamid és a nikotinamid) használata alapján születtek (Szabó és Dawson, 1998). Ezen anyagoknak járulékos hatásai is lehetnek mint pl. scavenger hatás. Több tanulmány azonban $\text{PARP}^{-/-}$ állatokból származó sejteket használva is megerősítette a PARP szerepét az oxidánsok sejtkárosító hatásában. Az első ilyen közleményben Heller és munkatársai (Heller és mtsai, 1995, Wang és mtsai, 1995) leírják, hogy a vad típusú egerből származó sejtekkel összehasonlítva a $\text{PARP}^{-/-}$ egerekből származó pancreas szigetsejtek rezisztensek a nitrogén monoxid és oxidánsok okozta károsodásra. A sejthalál jellemzésére egy onkózis paramétert, a laktát dehidrogenáz (LDH) felszabadulását használták. Eliasson és munkatársai (1997) agyvelő metszeteken mutattak ki különböző oxidánsokkal szemben védettséget $\text{PARP}^{-/-}$ fenotípusban. Watson és mtsai leírták, hogy hidrogén-peroxiddal kezelt HT-29 sejteken a 3-aminobenzamiddal történt PARP gátlás az onkózist gátolta, de az apoptózist nem (Watson és mtsai, 1995). Egy évvel később Palomba és mtsai (1996) hidrogén-peroxiddal kezelt U937 myeloma sejteket vizsgálva azt találták, hogy a 3-aminobenzamid hatására onkózis-gátlás és ezzel párhuzamosan az apoptotikus DNS fragmentáció növekedése figyelhető meg. Később Virág és mtsai (1998a,b) valamint Ha és Snyder (1999) is hasonló eredményekről számoltak be peroxinitrittel és hidrogén peroxiddal kezelt egér timocitákon és fibroblasztokon. A PARP aktiváció onkózisban betöltött szerepére utal az a megfigyelés is, hogy a PARP gátlása vagy az enzim hiánya elsősorban azon betegség modellekben (stroke, myocardialis infarktus, mesenterialis ischaemia-reperfúziós károsodás) nyújt jelentős védelmet, melyekben főleg onkotikus típusú sejthalál dominál (Miesel és mtsai, 1995, Schreiber és mtsai, 1995).

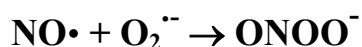
A fent ismertetett kísérleti eredmények fényében indokoltnak látszik annak a széles körben elterjedt nézetnek a revíziója, amely szerint az onkózis egy passzív, farmakológiai módszerekkel nem befolyásolható folyamat. Az a kifejezett védő hatás, ami aktív PARP hiányában számos gyulladás-modellben és reperfúziós károsodásban megfigyelhető, jól magyarázható a PARP gátlás antionkotikus hatásával.

I.3. Peroxinitrittel kiváltott poli-ADP-riboziláció különböző kórfolyamatokban

Bár az extenzív DNS károsodás által kiváltott PARP-aktiváció révén megvalósuló sejthalál jelenségét Nathan Berger munkacsoportja már az 1980-as évek elején leírta, a jelenség nagyobb tudományos érdeklődést igazából csupán egy évtizeddel később váltott ki. Az 1990-es évek elején ugyanis Hubert Kolb munkacsoportja igazolta, hogy a nitrogén monoxid, a számos kórfolyamatban szerepet játszó szabadgyök is képes DNS törést és PARP aktivációt kiváltani (Heller és mtsai 1995). A szabadgyök biológia és medicina felvirágzása folytán számos nagy népcsoportot érintő betegségben vált egyértelművé a reaktív oxigén és nitrogén tartalmú intermedierek (ROI és RNI) kóroki szerepe. E reaktív intermedierek közül megemlítendő a hidrogén peroxid, a hidroxil gyök, a nitroxil anion és a peroxinitrit PARP aktiváló hatása. Ez utóbbi oxidánsról egyre inkább valószínűsíthető, hogy a fokozott NO termeléssel járó DNS törés és PARP aktiváció „valódi mediátora”. Mivel vizsgálataink egyik súlyponti kérdése a peroxinitrit által kiváltott PARP aktiváció, ezért itt röviden ismertetem a peroxinitrit képződését és hatásait.

I.3.A. A peroxinitrit biológiai hatásai

A peroxinitrit a NO és a szuperoxid anion reakciója során keletkezik (Beckman és Koppenol, 1996, Groves, 1999). A peroxinitrit keletkezését a szuperoxid és/vagy a nitrogén monoxid túltermelődése elősegíti (Szabó, 1996a). Az NO az NO szintázok által katalizált reakcióban keletkezik argininből. A kis mennyiségű NO termelésére képes konstitutív NOS (cNOS) enzimek, az endotheliális és neurális NOS (eNOS, nNOS) mellett gyulladásokban különösen fontos a majd minden sejttípusban indukálható és nagy mennyiségű NO-t termelő indukálható NO szintetáz (iNOS). Szuperoxid folyamatosan keletkezik a mitokondriális légzési lánc működése során, valamint a NADPH oxidáz és a xantin oxidáz is termelik. A sejteket kiterjedt védekező rendszer (szuperoxid dizmutázok, kataláz, peroxidázok, nem enzimatis antioxidánsok) védi az oxidatív stresszel szemben (Fridovich, 1999). Az egyetlen ismert biomolekula, amely hatékonyan versenyezhet a SOD-dal a szuperoxidért, a nitrogén monoxid. Joseph Beckman (1996) elképzelése nyomán terjedt el az a nézet, hogy azokban az állapotokban, amikor a nitrogén monoxid termelődés megnövekszik, az NO lép reakcióba a szuperoxiddal, és peroxinitrit keletkezik:



Az NO reakciója a szuperoxiddal közelíti a diffúziós limitet, mértéke $6.7 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}$. Tehát a szuperoxid és az NO majdnem minden ütközése peroxinitritet eredményez. Mivel a

szuperoxid fél-életideje jelentősen rövidebb (kevesebb mint egy ezred másodperc) mint a nitrogén monoxidé (másodpercek), és figyelembe véve az NO diffúzibilitását, a peroxinitrit képződés a szuperoxid termelődés közelében történhet. Az NO és a szuperoxid equimoláris koncentrációja az ideális a peroxinitrit képződéshez, mert mind az NO mind a szuperoxid többlet csökkenti a peroxinitrit képződés esélyét. A peroxinitrit anion (ONOO^-) pH függő módon protonálódik (ONOOH) és a protonát forma homolízise révén hidroxil gyök és nitrogén dioxid keletkezik.

Bár a peroxinitrit nem szabadgyök, hisz nincs párosítatlan elektronja, mégis reaktívabb azoknál a molekuláknál, amelyekből keletkezik. A peroxinitrit reakcióba lép tiolokkal (Radi és mtsai, 1991a), lipid peroxidációt okoz (Radi és mtsai, 1991b), DNS töréseket hoz létre (Salgo és mtsai, 1995). A peroxinitrit számos szignál transzdukciós útvonalat tud aktiválni, több kináz (Go és mtsai, 1999, Klotz és mtsai, 2000, Mallozzi és mtsai, 1999, Oh-hasi és mtsai, 1999, Schieke és mtsai, 1999) és a foszfolipáz A2 (Palomba és mtsai, 2000) aktivációját stimulálja, más szignál transzdukciós útvonalakat pedig blokkolni képes. A peroxinitrit a leghatékonyabban azokat az enzimeket képes gátolni, melyek centrumában redox-aktív átmeneti fémek vannak (Beckman és mtsai, 1996, Groves és mtsai, 1999).

A peroxinitrit a fehérjéket oxidálja és/vagy nitrálja. Az oxidatív változások a fehérjék számos aminosav oldalláncának (metionin, cisztein, triptofán, tirozin) az oxidációját jelentik (Perrin és mtsai, 2000, Viner és mtsai, 1999, Kuhn és mtsai, 1999a, Kuhn és mtsai, 1999b, Stepien és mtsai, 2000, Zhang és mtsai, 2001). A fehérje oxidáció következtében számos enzim és ioncsatorna inaktiválódik (Viner és mtsai, 1999, Kuhn és mtsai, 1999a, Kuhn és mtsai, 1999b, Stepien és mtsai, 2000). Például a dopamin és szerotonin bioszintézis fő enzimjeinek a tirozin vagy triptofán hidroxiláznak a peroxinitrit által okozott gátlása elsősorban a szulfhidril oxidációnak, mintsem az enzimek nitrálásának az eredménye (Kuhn és mtsai, 1999a, Kuhn és mtsai, 1999b). A mangán tartalmú szuperoxid dizmutáz inaktiválásában viszont mind a tirozin oxidáció mind a nitrálás szerepet játszik (MacMillan-Crow és mtsai, 1998). Azt, hogy a nitráció, vagy az oxidáció a meghatározó a peroxinitrit reakcióiban, a széndioxid jelenléte, a pH és a mikrokörnyezet határozza meg. A hidrofób membrán kompartmentek a nitrálásnak, a hidrofil környezet az oxidációnak kedvez (Zhang és mtsai, 2001, Tien és mtsai, 1999, Berlett és mtsai, 1998). A peroxinitrit a széndioxiddal reakcióba lépve nitrozo-peroxokarbonátot képez, ami a nitrálásnak kedvez (Gow és mtsai, 1996b, Uppu és mtsai, 1996). Mivel a peroxinitritnek a széndioxiddal való reakciója igen gyors, ennek a reakcióútnak valószínűleg nagy a biológiai jelentősége.

A peroxinitrit egyik legjellegzetesebb reakciója a fehérjék aromás oldalláncainak, a tirozinnak és a triptofánnak a nitrálása (Alvarez és mtsai, 1996, Crow és mtsai, 1995). A tirozin kinázok szubsztrátjaiban a kulcsfontosságú tirozil oldalláncok nitrálása meggátolja a tirozin foszforilációját (Gow és mtsai, 1996a, Kong és mtsai, 1996). Mivel a fehérjék reverzibilis tirozin foszforilációja egy alapvető szabályozó mechanizmus, ennek a jelenségnek fontos szerepe lehet a peroxinitrit sejtfolymatokra kifejtett hatásaiban. A peroxinitrit a triptofán oldalláncot is képes nitrálni (Alvarez és mtsai, 1996), bár ennek a reakciónak a jelentősége kevésbé ismert.

A nitrotirozin elfogadott indikátora az in vivo termelődő peroxinitritnek (Beckman és mtsai, 1996, Crow és Ischiropoulos, 1996), bár meg kell jegyeznünk, hogy napjainkban a tirozin nitrálásnak más útvonalait is leírták. Például a CuZnSOD is katalizálhatja a peroxinitrit mediálta tirozin nitrálást (Ischiropoulos és mtsai, 1992) és a nitrotirozin keletkezhet nitritből és hidrogén peroxidból peroxidázok által katalizált reakcióban (Eiserich és mtsai, 1998, Sampson és mtsai, 1998). A nitrit és a hipoklórsav reakciója során keletkező vegyületek úgyszintén nitrálhatják a tirozint (Eiserich és mtsai, 1996). Érdekes, hogy van néhány olyan fehérje (pl. proszttaglandin szintáz és a ribonukleotid reduktáz), melyeknek az aktív centrumában tirozil gyök van, amit az NO is nitrálni tud (Guittet és mtsai, 1998, Gunther és mtsai, 1997). Azonban ezeknek az alternatív reakcióutaknak az in vivo jelentősége még bizonyításra vár.

A szintetikus peroxinitrit mellett az endogén peroxinitritről és más oxidánsokról is kimutatták, hogy egyszálú DNS törést és PARP aktivációt okoz. Például immunstimulált makrofágokban és simaizom sejtekben, melyek egyidejűleg termelnek NO-t és szuperoxidot, és így peroxinitritet, egyszálú DNS törések mutathatók ki (de Rojas-Walker és mtsai 1995). Hasonlóképpen neuronok NMDA receptorainak aktivációja peroxinitrit termelődést, egyszálú DNS törést és PARP függő sejtkárosodást okoz (Eliasson és mtsai 1997). Makrofágok és hepatociták ko-kultúrájában az aktivált makrofágokból származó NO és oxidatív metabolitja, a peroxinitrit döntő szerepet játszik a májsejtek károsodásában (Watanabe és mtsai. 2001). Régóta ismert továbbá az aktivált neutrofil sejteknek az a képessége, hogy a szomszédos sejtekben egyszálú DNS törést okoznak (Shacter és mtsai. 1988).

I.3.B. PARP aktiváció patofiziológiai állapotokban

Számos bizonyíték van arra vonatkozóan, hogy gyors, elhúzódó és hosszan tartó PARP aktiváció történik számos patofiziológiai állapotban. Ezek közül kiemelendők az ischaemia-reperfúziós és a gyulladásos folymatok, bár traumában és sokkban is jellemző a PARP-1

aktivációja (Virág és Szabó 2002). Artéria cerebri media okklúzió és reperfüzió által kiváltott agyvérzésben, miokardiális infarktus után és szívtranszplantáció után a szívben aktiválódik a PARP (Endres és mtsai, 1998, Faro és mtsai, 2002, Fiorillo és mtsai, 2002, Szabó és mtsai, 2002), ami a poli(ADP-ribóz) kimutatásával detektálható. PARP aktiváció mutatható ki a szívben és a tüdőben szeptikus sokk során (Watts és mtsai, 2001, Goldfarb és mtsai, 2002, Jagtap és mtsai, 2002, Soriano és mtsai, 2002), egerek tüdejében akut respiratorikus distressz szindrómában (Liaudet és mtsai, 2002), valamint diabéteszes állatok szívében (Pacher és mtsai, 2002b). Bár in vivo nehéz igazolni, hogy milyen stimulusra aktiválódik a PARP, in vitro adatok arra utalnak, hogy a PARP aktiváció kiváltója az egyszálú DNS törése, ami szabad gyökök, oxidánsok, leginkább hidroxil gyökök és peroxinitrit hatására következik be.

Miután a PARP-1 aktivációját az ischaemia-reperfüziós és gyulladásos betegségmodellekben számos bizonyíték támasztja alá, felmerült a PARP-1 szerepének kérdése e kórfolyamatokban. Számos tanulmány igazolja, hogy a poli-ADP-riboziláció farmakológiai gátlása jelentősen javítja az illető betegségmodellekben a legfontosabb klinikai és laboratóriumi paramétereket (infarktus terület, túlélés, gyulladásos sejtek migrációja, gyulladásos citokinek termelődése, szervfunkciók). A farmakológiai eredményekkel egybehangzóan a PARP-1 deficiens egerek is szignifikáns, sokszor drámai mértékű védettséget élveznek az ischaemia-reperfüziós és gyulladásos betegségmodellekben (Virág és Szabó 2002). A következőkben összefoglalom a PARP aktivációnak a gyulladás és a reperfüziós károsodás pozitív visszacsatolási ciklusának aktivációjában betöltött szerepét.

Az ischaemia-reperfüzió és a gyulladás során citokinek serkentik a parenchimasejtek és a gyulladásos sejtek szabadgyök termelését. Ezen kívül a xantin oxidáz és neutrofilok NADPH oxidáz aktivációja révén jelentős szuperoxid termelés történik. A konstitutívan termelődő NO mellett az iNOS is termel NO-t. Az oxidatív stressz egyszálú DNS töréseket indukál. A DNS törések aktiválják a PARP-ot, amely fokozza az NF- κ B aktivációját, ennek következtében fokozódik az NF- κ B függő gének, így az iNOS, ICAM-1, MIP-1 α , TNF- α és a C3 expressziója. A C5a keletkezése az endothel fokozott ICAM-1 expressziójával együtt, nagyszámú aktivált leukocitát mozgósít a gyulladásos góc felé, és így fokozza az oxidatív stresszt. A nagy fokú oxidatív stressz révén olyan szintű DNS károsodás jön létre, ami tartósan magas PARP-1 aktivitást fenntartva, a NAD⁺ és az ATP depléciójával onkotikus sejthalált válthat ki. A ciklus számos pozitív visszacsatolási kör révén erősödik, ahogyan az oxidatív stressz növekedése több DNS törést vált ki. E modell szerint a PARP központi helyet tölt be a gyulladásos károsodás pozitív visszacsatolási körében.

I.3.C. A peroxinitrit és a PARP aktiváció lehetséges szerepe a bőr kórélettanában

Bőr homogenizátumból Western blottal vagy ELISA-val számos betegségben mutattak ki nitrotirozint, mint az *in vivo* peroxinitrit termelődés bizonyítékát. Többek között peroxinitrittel kezelt patkánybőrben (Greenacre és mtsai, 1999), égésben (Rawlingson és mtsai, 2000), krónikus UVB sugárzás után (Hattoni és mtsai, 1996), egér leishmaniasisban (Giorgio és mtsai, 1996), ischaemia-reperfúziós károsodásban (Um és mtsai, 1999), szisztémás szklerózisban (Cotton és mtsai, 1999) sikerült nitrotirozint detektálni. A Western blot és az ELISA azonban nem ad információt arról, hogy a bőrben pontosan hol termelődik a peroxinitrit, és hogy milyen sejttípusokat érint. Néhány esetben immunhisztokémiával is kimutatták a nitrotirozint a bőrben. Önként jelentkező emberek bőrére kent NO-donor tartalmú krém alkalmazása után kifejezett tirozin nitrációt lehetett kimutatni (Ormerod és mtsai, 1999), ami arra utal, hogy az exogén NO kombinálódhat az endogén szuperoxiddal, és peroxinitrit keletkezik. Ebben a vizsgálatban a tirozin nitrálását főleg az epidermiszben észlelték.

A peroxinitritnek számos bőrbetegségben van szerepe. Ezek közül az egyik legtöbbet vizsgált elváltozás a napégés után kialakuló eritéma. Az ultraibolya B sugárzás NO és szuperoxid termelődést indukál az endotel sejtekben és a keratinocitákban (Deliconstantinos és mtsai, 1995, 1996a, 1996b, 1996c). Az UVB sugárzás az NO és szuperoxid termelődésért felelős enzimeket aktiválni képes. Erre utalnak azok az adatok, melyek szerint a keratinocita citoszol preparátumban UVB sugárzás cNOS és a xantin oxidáz aktivációt indukált (Deliconstantinos és mtsai, 1996a). Ezek a megfigyelések arra utalnak, hogy UV sugárzás hatására aktiválódik a cNOS és a xantin oxidáz, és ez NO és szuperoxid termelődést eredményez. Az NO-ból és a szuperoxidból peroxinitrit keletkezik, ami felelős lehet a napégés következtében kialakuló eritémaért. Kísérleti állatokon és önkénteseken a NOS gátlószert tartalmazó krém védelmet nyújtott az UV sugárzás által okozott eritéma ellen (Deliconstantinos és mtsai, 1997).

A PARP aktiváció szerepét a bőrben eddig alig vizsgálták. Munkánk elkezdésekor az irodalomban egy közleményt találtunk, melyben egy DNS károsító anyag, a kénmustár által kiváltott PARP aktivációról számoltak be keratinocitákon (Hinshaw és mtsai, 1999). Azóta igazolták a PARP aktiváció kóroki szerepét napégésben is (Farkas és mtsai, 2002).

II. Célkitűzések

Munkánk során két központ téma köré csoportosítva az alábbi kérdések megválaszolását tűztük ki célul:

A peroxinitrit és PARP aktiváció szerepe a bőrben

1. Termelődik-e peroxinitrit a bőrben kontakt hyperszenzitivitási (CHS) reakció során?
2. Kimutatható-e DNS törés és PARP aktiváció CHS-ben?
3. Milyen mechanizmussal történik a peroxinitrit által kiváltott citotoxicitás HaCaT sejteken?
4. Történik-e PARP- aktiváció a peroxinitrittel kezelt HaCaT sejtekben?
5. Van-e szerepe a poli-ADP-ribózilációnak a keratinociták citokin-stimulált IL-8 és ICAM-1 expressziójának szabályozásában?

A peroxinitrit és PARP aktiváció szerepe egyéb oxidatív stresszel jellemezhető kórfolyamatokban

6. Termelődik-e peroxinitrit haemorrhagiás sokkban (HS)?
7. Kimutatható-e és ha igen, milyen következményekkel jár a PARP aktiváció HS-ban?
8. Kimutatható-e a peroxinitrit→DNS törés →PARP aktiváció útvonal aktivitása diabéteszes vasculopathiában?
9. Hogyan befolyásolja a poli-ADP-ribóziláció gátlása a gyulladásos sejtek extravazációját kísérletes uveitisben.

III. Anyagok és módszerek

III.1. Anyagok

A peroxinitritet Dr Harry Ischiropoulostól (University of Pennsylvania, Medical Center, Philadelphia, PA) kaptuk. A PJ-34 egy 2-szubsztituált 6(5H)-phenantridinone, az N-(6-oxo-5,6-dihydro-phenantridin-2-yl)-N,N-dimethylacetamide HCl sója), melyet Dr. Prakash Jagtap (Inotek Pharmaceuticals, Beverly, MA) szintetizált. Minden egyéb vegyszer, melynek forrása nincs külön megnevezve, a Sigma-Aldrich-tól (St. Louis, MO) származik.

III.2. Állatok

Az állatkísérletek az Egyesült Államok Nemzeti Egészségügyi Intézete (NIH) által kiadott 'Útmutató laboratóriumi állatok gondozásáról és használatáról' című ajánlások figyelembe vételével történtek. A kezelési protokollokat az Állatkísérletes Bizottság előzetesen jóváhagyta.

A kontakt hiperszenzitivitási (CHS) modellhez nőstény CD1 egereket használtunk.

A diabétesz modellhez 6-8 hetes hím, felnőtt BALB/c egereket használtunk (Taconic Farms, Germantown, NY, USA).

A haemorrhagiás sokk (HS) modellhez a PARP^{-/-} és vad típusú PARP^{+/+} egerek Dr Z. Q. Wang (Inst. für Molekulare Pathologie, Bécs) laboratóriumából származnak, fenntarásuk és tenyésztésük az Inotek Pharmaceuticals (Beverly, MA) állatházában történt. A hím egerek 8-10 hetesek, 24-28 gr súlyúak voltak.

Az kísérletes uveitis modellhez 200-220 g-os hím Lewis patkányokat használtunk (Charles River Laboratories, Wilmington, Ma, USA).

Az állatokat minden esetben igény szerinti táplálék és vízfelvétel és 12 órás megvilágítási ciklusok mellett, 21-23 °C-on tartottuk. Az állatok megérkezése után 3-7 napot hagytunk az alkalmazkodáshoz.

III.3. Módszerek

III.3.A. Kontakt hiperszenzitivitási modell (CHS) és in vivo peroxinitrit kezelés

Hat-hat egeret két kísérleti csoportba osztottunk (kontroll csoport és CHS csoport). A szenzitivizálást az állatok leborotvált hasfalán végeztük 100 µl 2%-os oxazolonnal, mely aceton és olíva olaj 4:1 arányú keverékében volt feloldva (CHS csoport). A kontroll csoport állatait

100 µl oldószerrel (aceton : olíva olaj = 4:1) kezeltünk. Hét nap múlva mind a kontroll, mind a CHS állatok mindkét fülét 20 µl 0,5%-os oxazolonnal bekenve váltottuk ki a gyulladásos reakciót. Huszonnégy óra múlva az állatokat CO₂-vel megöltük, a füleket azonnal eltávolítottuk és formalinba tettük, illetve fagyasztó médiumban lefagyasztottuk.

Az in vivo peroxinitrit kezeléshez a peroxinitritet PBS-ben (pH=11,0) hígítottuk és 400 nmólt kentünk az állatok leborotvált hasfalára. Harminc perc múlva a bőrt kimetszettük és fagyasztó médiumban lefagyasztottuk.

III.3.B. Diabétesz modell, és a diabétesz monitorozása

Felnőtt BALB/c egereket nagy dózisú streptozotocinnal (240 mg/kg ip.) kezeltünk a pancreas β -sejtjeinek elpusztítása céljából. Az inzulin termelés megszűnése hyperglycaemiát eredményezett végig a kísérletek 8 hete alatt. Egy kontroll csoport állatait streptozotocin helyett annak vivőanyagával (citrát puffer) kezeltünk. A PARP-ot PJ-34-vel gátoltuk (10 mg/kg az állatok ivóvizébe keverve), a kezelést 1 héttel a streptozotocin adása után kezdve). A glikozilált hemoglobint kereskedelmi forgalomban kapható kittel (Sigma) határoztuk meg. A pancreas inzulin tartalmát pancreas homogenizátumból mértük ELISA-val. (A diabétesz kiváltását, monitorizálását, a kezeléseket és az érfunkciók mérését munkatársam, Dr. Francisco Garcia Soriano végezte.)

III.3.C. Haemorrhagiás sokk modell

Az egereket intraperitoneális ketamin (80 mg/kg) és xylazin (10 mg/kg) beadásával érzéstelenítettük. A jobb oldali arteria carotisba vezetett kanülön át monitoroztuk a vérnyomást. A jobb oldali arteria femoralis-t kanüláltuk, és ezen keresztül vettünk le vért, ill. pótoltuk a folyadékot. A sebészeti beavatkozás után az alapvető haemodinamikai értékeket stabilizáltuk, az értékeket rögzítettük. Ezután 30 percen át véreztettük az egereket. Átlagosan 0,5-1 µl/g/min vér lebocsátásával súlyos vérzésses sokkot hoztunk létre. A vérvételt addig folytattuk, amíg a vérnyomás a 45 Hgmm-t el nem érte. Ezután 45 percig monitoroztuk az állatokat a vérnyomást vérvétellel illetve visszatranszfundálással folyamatosan 45 Hgmm-en tartva. Negyvenöt perc múlva, 10 percen át krisztalloid oldattal (steril, izotóniás sóoldat) pótoltuk a folyadékvesztiséget az arteria femoralis katéteren keresztül.

Az első kísérletsorozatban a túlélést analizáltuk 5-5 PARP^{+/+} és PARP^{-/-} egernél és a folyadékpótlás után a vérnyomást mértük az állat pusztulásáig. A második kísérletsorozatban a HS-ra vonatkozó patofiziológiai mechanizmusokat tanulmányoztuk 8-8 PARP^{+/+} és PARP^{-/-}

egéren. A folyadékpótlás kezdete után 30 perccel elvéreztetéssel öltük meg az állatokat és laparotomia után szövettani vizsgálat céljára mintát vettünk a vékonybélből és egy részét fagyasztó médiumba ágyasztuk be, másik részét formaldehidbe tettük. (A haemorrhágiás sokk kiváltását és monitorozását munkatársam, Dr. Lucas Liaudet végezte.)

III.3.D. Kísérletes uveitis modell

Öt kontroll állat a talpába fiziológiás sóoldatot kapott, míg tíz patkányt 0127:B8 szerotípusú E.coli-ból származó lipopoliszachariddal kezeltünk (150 µg/állat, subcutan a jobb talpba fecskendezve). Egy órával az LPS kezelés előtt 5 állat fiziológiás sót, 5 állat pedig fiziológiás sóban oldott PJ-34-et vagy GED-et kapott orálisan (10 mg/kg). A kezeléseket lokálisan (szemcseppben) is alkalmaztuk 0,1%-os PJ-34 és GED formájában. Tizennyolc órával az LPS befecskendezése után megöltük az állatokat. Az elülső szemcsarnokban kialakult gyulladás (uveitis anterior) fokát az íriszben levő gyulladásos (CD11⁺) sejtek száma jelezte. A megölt állatok szemét eltávolítottuk, az íriszt McMenamin és Crewe (1995) módszere szerint szeparáltuk. A kipreparált íriszeket 3x10 percig mostuk PBS-ben (pH 7.4), majd 2% paraformaldehidet és 6 % szukrózt tartalmazó PBS-ben (pH 7.4) fixáltuk 12 órán át 4 °C-on. Végül a fixát íriszeket PBS-ben mostuk, és ezután végeztük a hisztológiai festéseket.

III.3.E. Nitrotirozin kimutatása

Az immunhisztokémiai vizsgálat során a paraffinba ágyazott (5 µm) metszeteket deparaffináltuk és rehidráltuk (3x10 percig xilolban, majd csökkenő koncentrációjú alkohol sorban (2x5 percig 100% etanol, 2x5 percig 95% etanol, 1x5 percig 70 % etanol). Öt perces PBS-ben (pH 7.2) történő mosás után az endogén peroxidáz aktivitás blokkolásához 15 percig 3%-os hidrogén peroxiddal kezeltük, majd röviden PBS-ben mostuk a metszeteket.. A nem specifikus kötődéseket a metszetek 2 %-os kecskeszérumban 1 órán át történt inkubálásával blokkoltuk. A nitrotirozin kimutatásához a metszeteket 1:300 hígítású nyúl poliklonális antinitrotirozin ellenanyaggal (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY) inkubáltuk 2 órán át szobahőmérsékleten. (A kontroll metszeteket vagy normál nyúlszérummal vagy 1 mM nitrotirozin jelenlétében a primer ellenanyaggal inkubáltuk). PBS-ben történt alapos mosást (5x5 perc) követően, az immunreaktivitást kecskében termelt biotinált anti nyúl-IgG másodlagos ellenanyaggal és avidin-biotin peroxidáz komplex-szel (ABC) mutattuk ki, Mindkét reakcióhoz Vector Elite kit-et (Vector Laboratories, Burlingame, CA) használtunk. A színreakciót nikkel-DAB szubsztráttal hívtuk elő. Háttérfestésként nuclear fast red-et

használtunk 2 percen át, majd a metszeteket dehidráltuk és Permout mediummal rögzítve, tárgylemezzel fedtük. A mikroszkópos vizsgálatokat egy Zeiss Axiolab mikroszkóppal végeztük. A mikroszkópos felvételeket egy Fuji HC-300 digitális kamerával készítettük.

III.3.F. Poli(ADP-ribóz) kimutatása

Paraffinba ágyazott metszeten (5 μ m) a PARP aktivitást az enzim végtermékének, a poli(ADP-ribóz)-nak a kimutatásával végeztük. A deparaffinálás, endogén peroxidáz blokkolás a nitrotirozin festésnél leírtak szerint történt. A nem specifikus kötések blokkolásához a metszeteket 2 %-os lószérumban inkubáltuk szobahőmérsékleten 2 órán át. A poli(ADP-ribóz) kimutatásához egér monoklonális anti-poli(ADP-ribóz)-t (Alexis, San Diego, CA) használtunk 1:100 hígításban. Másodlagos ellenanyagként lóban termeltetett biotinált anti-egér IgG-t alkalmaztunk. A további lépések a nitrotirozin festésnél leírtakkal megegyeznek.

III.3.G. PARP aktiváció vizsgálata enzim hisztokémiai módszerrel

A PARP aktivitást a szövetekben egy enzim hisztokémiai reakcióval is kimutattuk PARP szubsztrátként biotinált NAD^+ -ot használva (Zhang, 1997). A fagyasztott metszeteket 95%-os etanolban fixáltuk $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on, majd PBS-ben mostuk. A reakcióeleggyel (100 mM Tris, pH 8.0, 10 mM MgCl_2 , 1mM ditiotritol, 70 μ M biotinált NAD^+) 30 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk a metszeteket. Kontrollként vagy 5 mM 3-aminobenzamidot adtunk a reakcióelegyhez, vagy kihagytuk a biotinált NAD^+ -ot a reakcióelegyből. PBS-ben történt háromszori mosás után a beépült biotint streptavidinnel konjugált peroxidázzal mutattuk ki (Trevigen, Gaithersburg, MD). A színreakciót és a háttérfestést az immunhisztokémiai módszereknél leírtakkal azonos módon végeztük.

III.3.H. CD11^+ sejtek kimutatása az íriszben

A gyulladásos sejtek kimutatását ezen sejtek jellegzetes felszíni markerének, a CD11 -nek a detektálásával végeztük (Prendergast és mtsai 1998). A PBS-ben történt 10 perces mosás után 1% Triton-X tartalmú PBS-ben először 2 percig, majd 30 percig mostuk tovább az íriszeket. Ezután a nem specifikus fehérjekötések blokkolására az íriszeket 1% borjúsérumot, 0,5 % lószérumot és 0,25%-os Triton-X-et tartalmazó PBS oldatban (pH 7.4) inkubáltuk szobahőmérsékleten folyamatos keverés mellett 2 órán át. Ezt követően az íriszekre rátettük a primer ellenanyagot (egérben termelt anti-patkány CD11) 1:66 hígításban. A primer

ellenanyaggal egy éjszakán át 4 °C-on inkubáltuk az íriszeket, majd 1% Triton-X tartalmú PBS-ben mostuk 3x10 percig. Ezután alkalmaztuk a második ellenanyagot (lóban termelt biotinnal konjugált anti-egér IgG) 1:66 hígításban, 2 órán át 4 °C-on, majd 2x10 percig 1% Triton-X tartalmú PBS-ben mostuk. Ezután az endogén peroxidáz aktivitás inaktiválását végeztük metanolban hígított 2,5 %-os hidrogéperoxiddal 5 percig szobahőmérsékleten, amit 3x10 perces 1% Triton-X tartalmú PBS-ben végzett mosás követett. Az immunreaktivitást avidin-biotin-peroxidáz komplex-szel detektáltuk (ABC) (Vector Elite kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA). A színreakcióhoz DMSO-ban oldott hidrogénperoxidot tartalmazó aminoetilkarbazolt használtunk. A színreakciót PBS-ben történt mosással leállítottuk, majd az íriszeket 4 quadránsra vágva tárgylemezen rögzítettük. Az okulárba helyezett négyzethálót tartalmazó üveg segítségével megszámloltuk a sejteket. (Egy négyzet $1/16 \text{ mm}^2$). Az íriszek minden quadránsában 4 négyzetben számoltunk meg a sejteket, majd minden íriszpárban kiszámoltuk a sejtszámok átlagát.

III.3.I. DNS törések kimutatása

A DNS töréseket a kereskedelemben kapható megfelelő kittel (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN) mutattuk ki a gyártó utasításait követve. A deparaffinált és rehidrált metszeteket 20 µg/ml proteinase K-val (10 mM Tris/HCL-ben pH 7,8) kezeltük 30 percig 37°C-on. A DNS törések szabad 3' végeit terminális dezoxiribonukleotidil transzferázzal (TdT) jelöltük 60 percen át 37 °C-on. Az enzim fluoreszcein izotiocianáttal (FITC) konjugált dUTP-t épít be a tört DNS végek meghosszabbításaiba. Mosás után a metszeteket peroxidázzal konjugált anti-FITC-cel inkubáltuk (30 percig szobahőmérsékleten) és a peroxidáz aktivitást mutattuk ki az immunhisztokémiai módszernél leírtak alapján.

III.3.J. Sejttenyésztés és peroxinitrit kezelés

A HaCaT sejteket Ulrich Rodecktól (Thomas Jefferson University, Philadelphia, PA) kaptuk és Norbert E. Fusening (Német Rákkutató Központ, Heidelberg, Németország) engedélyével használtuk. A sejteket RPMI 1640 médiumban tenyésztettünk, mely 10% borjúsavót, 10 mM glutamint, 10 mM HEPES-t, 100 U/ml penicillint és 100 µg/ml streptomycint tartalmazott. A peroxinitrit koncentrációt spektrofotométerrel határoztuk meg abszorpciójának 302 nm-en történő mérésével, $1670 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ extinkciós koefficiens használva. A peroxinitritet PBS-ben hígítottuk (pH 11.0) és 1/10 térfogatban adtuk a sejtszuspenzióhoz. Ilyen körülmények között a peroxinitrit hozzáadása nem emelte a

medium pH-ját. A kontroll mintákat csak PBS-sel (pH 11.0) kezeltük. A lebomlott peroxinitritet PBS-ben pH 7.2 -n, 37° C-on 30 percig tartó inkubálással állítottuk elő. A lebomlott peroxinitrit hatását megvizsgáltuk minden assayben és azt találtuk, hogy nincs hatása egyetlen általunk vizsgált paraméterre sem.

III.3.K. Sejtproliferáció és citotoxicitás vizsgálata

A sejtproliferációt kereskedelmi forgalomban kapható ELISA-val mértük (Amersham, Pharmacia Biotechnology, Piscataway, NJ), mely a BrDU beépülésén alapszik. A vizsgálatot 96 lyukú szövettenyésztő plate-en végeztük a gyártó utasításait követve.

A citotoxicitást kolorimetriás MTT teszttel határoztuk meg, korábban leírtak alapján (Virág és munkatársai, 1995).

III.3.L. Sejtes PARP aktivitás mérése

A PARP aktivitást korábban leírtak alapján mértük (Virág és mtsai, 1998a). Húsz perces peroxinitrit kezelés után a médiumot 0,5 ml PARP pufferre cseréltük (56 mM Hepes pH 7.5, 28 mM KCl, 28 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 0,01 % digitonin, és 0,125 μ M ³H-NAD) és 37 °C-on, 10 percig inkubáltuk. Ezt követően a sejteket felkapartuk, Eppendorf csövekbe tettük, és 200 μ l jéghideg 50 %-os triklórecetsavval (TCA) a fehérjéket kicsaptuk. A mintákat 4 órán át 4 °C-on inkubáltuk, majd lecentrifugáltuk (10,000g, 10 perc) és a csapadékot kétszer jéghideg 5%-os TCA oldatban mostuk. A csapadékot 250 μ l 2%-os SDS/0.1 N NaOH oldatban szolubilizáltuk egy éjszakán át 37 °C-on. A csövek tartalmát 7 ml ScintiSafe Plus szcintillációs folyadékhoz adtuk és a radioaktivitást folyadékszintillációs számlálóban (Wallac, Gaithersburg, MD) mértük.

III.3.M. Kaszpáz aktivitás meghatározása

A kaszpáz aktivitást a fluorogen tetrapeptid-amino-4-metilkumarin konjugátum (DEVD-AMC) hasításával mértük (Virág és Szabó, 1998). Hat órás peroxinitrit kezelés után a sejteket felvakartuk, PBS-ben mostuk, majd lízis pufferben (10 mM HEPES, 0.1% CHAPS, 5 mM ditiotritol, 2 mM EDTA, 10 μ g/ml aprotinin, 20 μ g/ml leupeptin, 10 μ g/ml pepstatin A, és 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, pH 7.25) lizáltuk. A lizátumokhoz azonos mennyiségű kaszpáz reakció puffert (100 mM HEPES pH 7.25, 10% sucrose, 5 mM ditiotritol, 0.1 % CHAPS, 50 μ M DEVD-AMC) adtunk, és az AMC felszabadulást 30 perc

múlva Shimadzu fluorimeterrel határoztuk meg 380 nm excitációs és 460 nm emissziós hullámhosszokat használva.

III.3.N. DNS fragmentáció meghatározása

A DNS fragmentációt kereskedelmi forgalomban kapható ELISA kittel (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN) mértük a gyártó utasításait követve, korábban leírtak alapján (Virág és mtsai, 1998a). A módszer a citoplazma hisztonokkal asszociált DNS fragmentumainak mérésén alapszik. HaCaT sejteket (2×10^5) szélesztettünk 12 lyukú plate-eken 1000 μ l tenyésztő mediumban majd különböző koncentrációjú peroxinitrit kezelést alkalmaztunk. Hat órás inkubálás után (37 °C, 5 % CO₂) a sejteket hideg PBS-ben mostuk, majd 400 μ l inkubáló pufferben felkapartuk és 60 percig 4 °C-on inkubáltuk. A sejtlizátumokat Eppendorf csövekbe tettük és lecentrifugáltuk (10,000g, 10 perc). A felülúszókat tízszeresére hígítva ELISA-ban teszteltük (anti-hiszton elfogó ellenanyag, peroxidázzal konjugált anti-DNS másodlagos ellenanyag, ABTS szusztrát). Az abszorpciót 405 nm-en mértük Spectramax mikroplate fotométerben (Molecular Devices, Sunnyvale, Ca).

III.3.O. Intercellularis adhéziós molekula 1 (ICAM-1) expressziójának meghatározása

HaCaT sejteket 30 ng/ml (300 U/ml) rekombináns humán interferon-gamma-val (R&D Systems, Minneapolis, MN) stimuláltunk 24 órán át. A sejteket felkapartuk, és kétszer mostuk jéghideg PBS-ben. A festést 1 órán át jégen végeztük FITC-cel jelölt monoklonális anti-human ICAM-1 ellenanyaggal (Pharmingen, San Diego, CA) és azonos izotípusú, indifferens, FITC-cel konjugált kontroll monoklonális ellenanyaggal (Pharmingen). A sejteket kétszer mostuk jéghideg PBS-ben, majd 1%-os paraformaldehidben fixáltuk. A mintákat FACSCalibur áramlási citométerrel (Becton Dickinson, San Diego, CA) analizáltuk, és az ICAM-1 expressziót az átlagos fluoreszcencia intenzitás növekedésével fejeztük ki.

III.3.P. Interleukin-8 (IL-8) termelés mérése

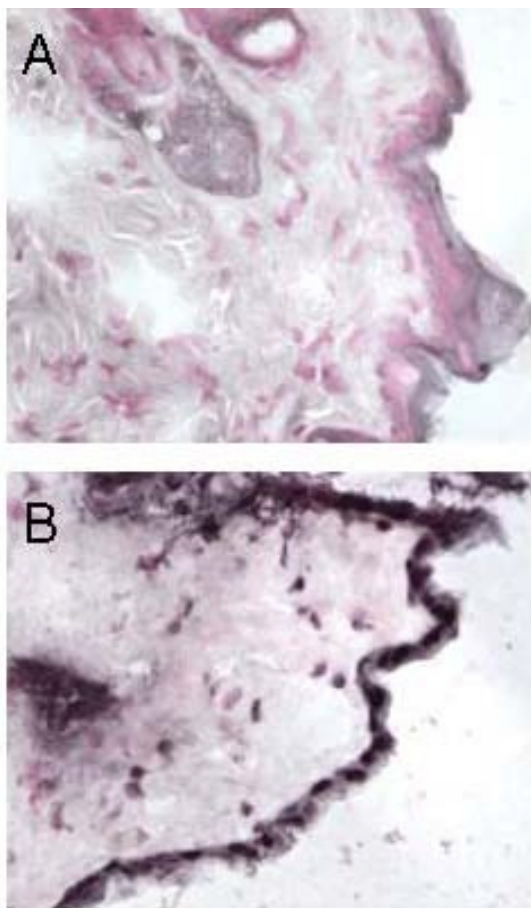
HaCaT sejteket PARP inhibitor jelenlétében és hiányában 24 órán át 20 ng/ml humán rekombináns IL-1 β -val (R&D Systems, Minneapolis, MN) stimuláltunk. A felülúszókat összegyűjtöttük és az IL-8 mennyiségét kereskedelmi forgalomban kapható szendvics ELISA rendszerben mértük (R&D Systems, Minneapolis, MN).

III.3.Q. Statisztikai elemzés

A HaCaT sejtek paramétereit négy párhuzamos minta átlagaként ($\pm$ SD) adjuk meg. A kísérleteket legalább $n=3-4$ alkalommal ismételtük meg. Student t tesztet és ANOVA-t használtunk az átlag értékek összehasonlításához. Statisztikailag szignifikáns különbségről legalább $p<0.05$ esetén beszélünk. Az ábrákon csillaggal jelöltük a primer stimulus szignifikáns hatását (* $p<0,05$; ** $p<0,01$), míg a kettős kereszt a gátlószerek szignifikáns hatásait jelzi a primer stimulussal összehasonlítva (# $p<0,05$; ## $p<0,01$).

IV. EREDMÉNYEK

IV.1. Peroxinitrit által kiváltott PARP aktiváció a bőrben

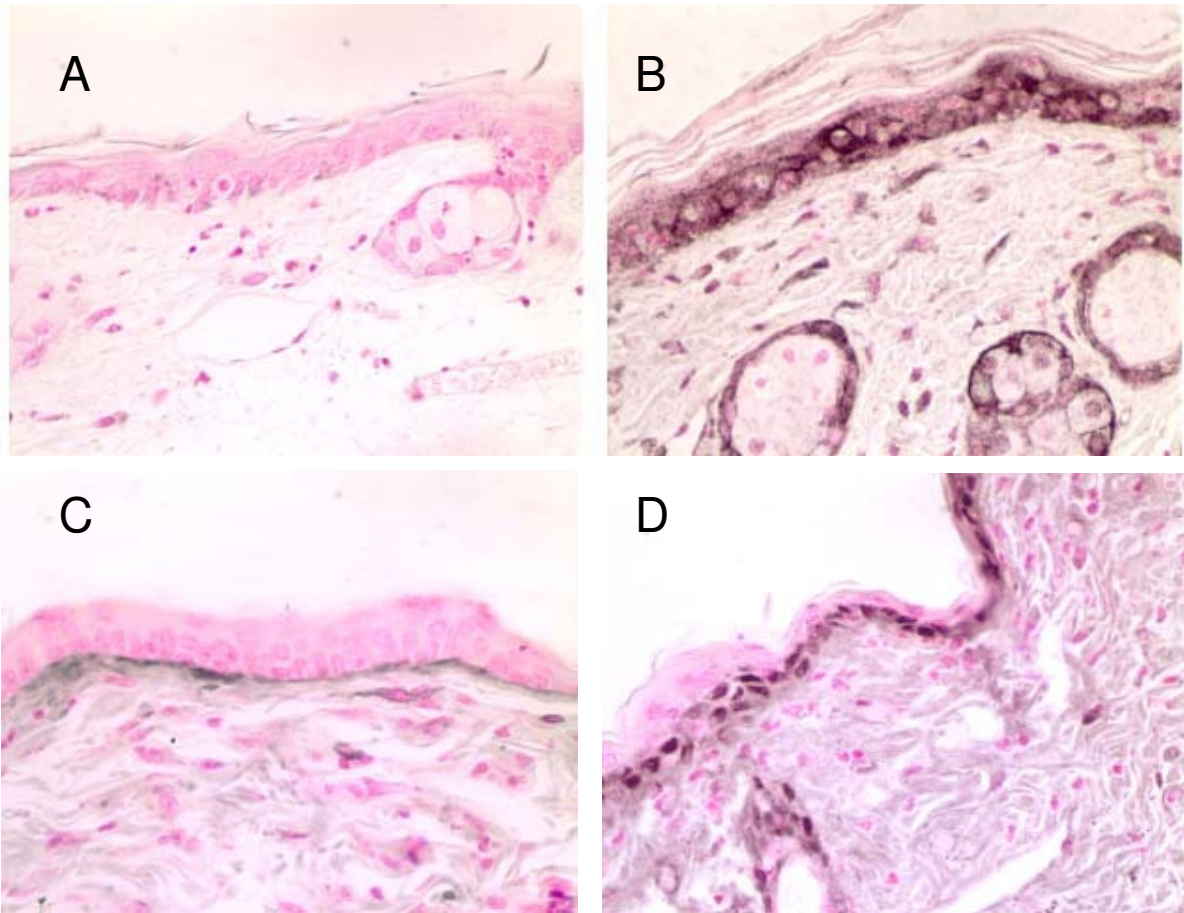


4. ábra PARP enzimhisztokémia kontroll (A) és peroxinitrittel kezelt egér bőrön.

Mivel a peroxinitritről ismert, hogy egyszálú DNS töréseket okoz human keratinocitákon (Spencer és mtsai, 1996), mi azt vizsgáltuk, hogy vajon a poli(ADP-ribóz) polimeráz aktiválódik-e peroxinitrittel kezelt keratinocitákon. E célból 400 nmol peroxinitritet kentünk az egerek bőrére, míg a kontroll csoport állatait a peroxinitrit hígítására használt pufferrel (PBS, pH 11.0) kezeltük. PARP enzimhisztokémiai módszerrel intenzív PARP aktivációt találtunk a peroxinitrittel kezelt bőrben, de a kontroll bőrben nem (4. ábra). A PARP aktiváció a keratinocitákban volt a legintenzívebb, bár néhány dermális sejt is pozitívan festődött. A reakcióelegybe PARP inhibitor (5 mM 3-AB) keverve a reakció nem adott festődést.

IV.2. Mustárolaj által kiváltott tirozin nitrálás és PARP aktiváció a bőrben

Mustárolajat kenve a bőrre, immunhisztokémiai módszerrel vizsgáltuk a nitrotirozin jelenlétét (anti-nitrotirozin ellenanyag) és a PARP aktivációt [poli(ADP-ribóz) immunhisztokémia]. Érdekes módon bár a nitrotirozin az epidermis teljes vastagságában kimutatható volt, PARP aktivációt csupán az epidermisz bazális rétegében észleltünk (5. ábra). A kontroll metszeteken festődést nem tapasztaltunk.



5. ábra Kénmustárral kezelt (B,D) és kontroll (A,C) egérbőrök nitrotirozin (A,B) és poli(ADP-ribóz) festése (C,D).

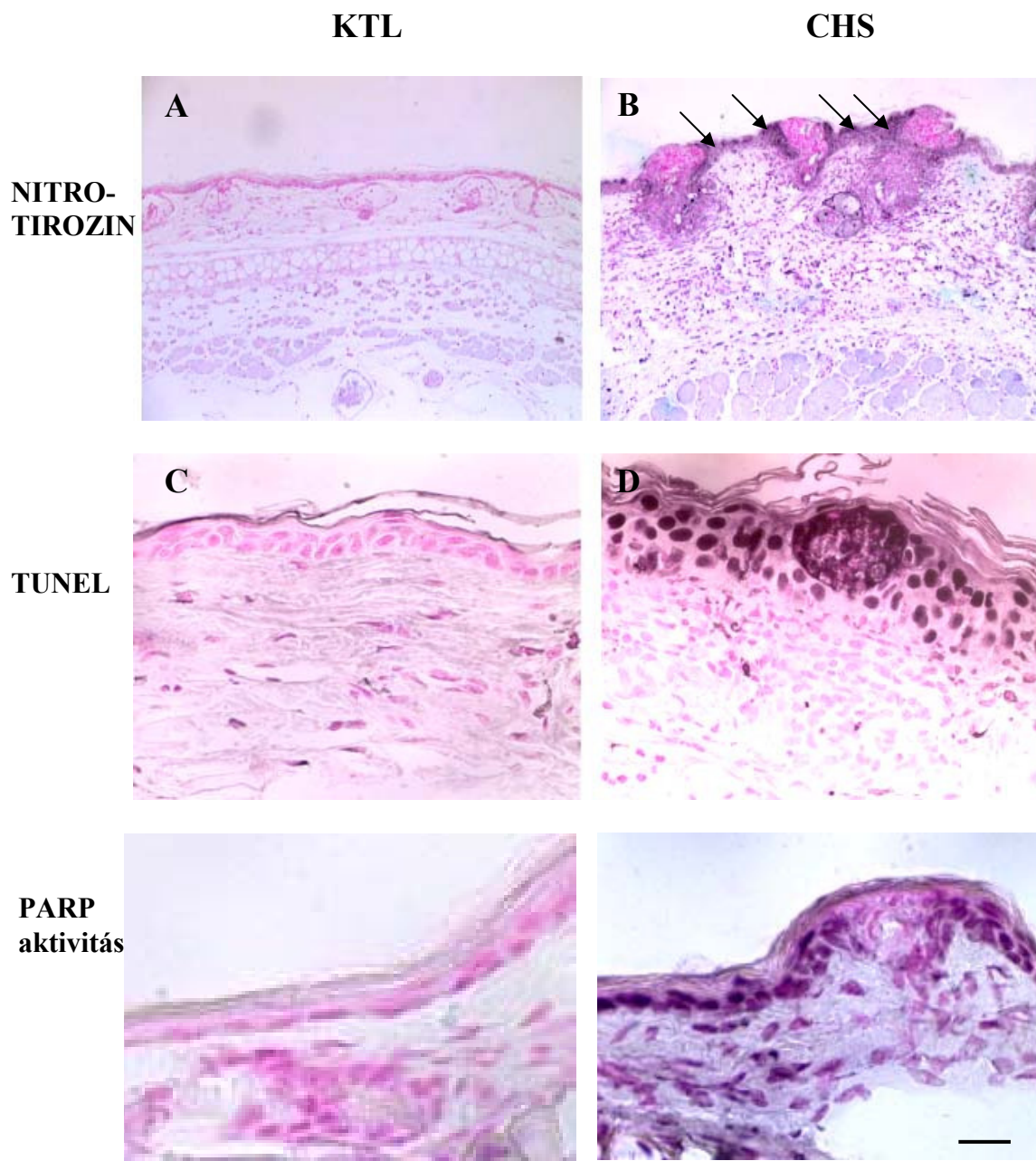
IV.3. Kontakt hiperszenzitivitási modell (CHS)

IV.3.A. Tirozin nitrálás a bőrben CHS reakcióban.

Mivel a peroxinitrit különböző fehérjék tirozin oldalláncait nitrálja, így a szövetekben az in vivo termelődő peroxinitrit termelődést jelzik a nitrotirozint tartalmazó fehérjék. CHS-ben az egerek fülében immunhisztokémiai módszerekkel kimutatható a nitrotirozin jelenléte, míg a kontroll (nem szenzitizált) állatokban nem (6. ábra). A keratinociták tirozin nitrációja a gyulladásos fókuszokban (a mikroabscessusokban) volt a legintenzívebb. Némileg meglepő módon csak kevés infiltráló granulocita mutatott nitrotirozin pozitivitást.

IV.3.B. DNS törés és PARP aktiváció kimutatása CHS-ben

Mivel a nitrotirozin jelenléte peroxinitrit termelődést valószínűsít, ezért megvizsgáltuk, hogy DNS törések és PARP aktiváció kimutatható-e CHS-ben. TUNEL festést alkalmazva, a kontroll bőrben csak néhány elszórt sejtben találtunk pozitivitást. CHS-ből származó mintákban viszont intenzív TUNEL-pozitivitást találtunk a mikroabszcesszusok gyulladásos sejtjeiben és a keratinocitákban is (6. ábra).



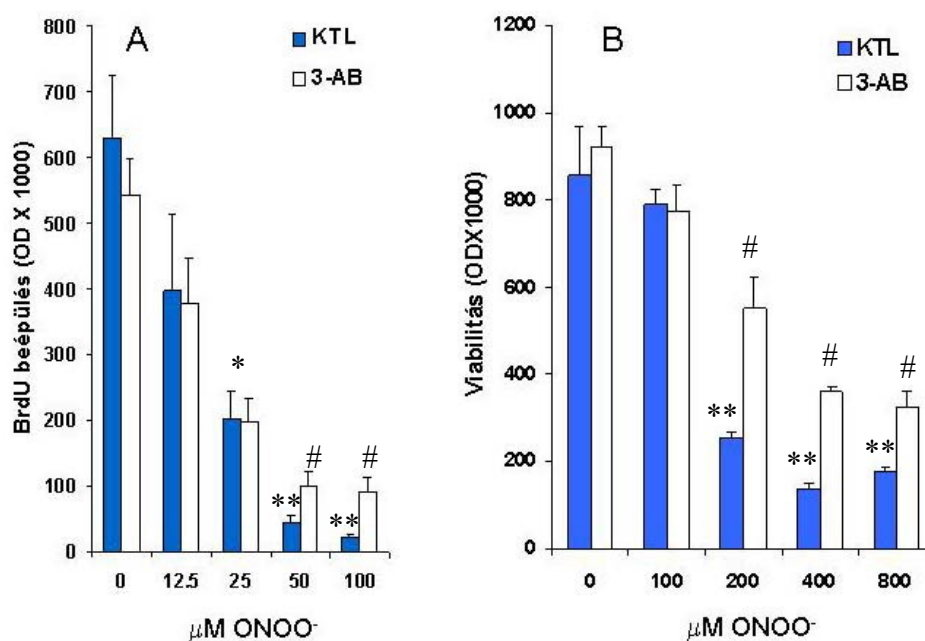
6. ábra. Tirozin nitrálás, DNS törések és PARP aktiváció kimutatása egér CHS modellben.

A PARP aktivitást PARP enzimhisztokémiai módszerrel detektáltuk. Míg a kontroll metszeteken nem találtunk PARP aktivitást, a CHS-ben erős festődést kaptunk a keratinocitákban és dermalis sejtekben is (6. ábra). A reakciót PARP inhibitor (5 mM 3-AB) jelenlétében végezve nem kaptunk festődést.

IV.4.Vizsgálatok HaCaT sejteken

IV.4.A. A peroxinitrit antiproliferatív és citotoxikus hatása HaCaT sejteken: a PARP aktiváció szerepe

A peroxinitrit dózisfüggő sejtprolifерáció gátlást és citotoxicitást okoz (7. ábra). Az alacsonyabb peroxinitrit koncentrációknál megfigyelhető proliferáció-gátlásban a PARP aktiváció valószínűleg nem játszik komoly szerepet, mivel a 3-AB-nek nem volt szignifikáns hatása erre a paraméterre. Nagyobb koncentrációkban a peroxinitrit antiproliferatív hatása részben a PARP aktiváció révén valósul meg, amint azt a 3-AB szignifikáns védő hatása jelzi. Még magasabb koncentrációkban a peroxinitrit citotoxikus hatást fejtett ki, amit a 3-AB (és egy másik, itt nem mutatott PARP inhibitor, 5 μ M 3-amino-fenantridinon) szignifikánsan gátolt (7. ábra). A citotoxicitási vizsgálatok eredményei alapján joggal feltételeztük, hogy a peroxinitrit PARP aktivációt okoz HaCaT sejteken. Ennek igazolására megmértük a peroxinitrittel kezelt HaCaT sejtek PARP aktiváló hatását és azt találtuk, hogy a peroxinitrit koncentráció függő módon fokozta a HaCaT sejtek PARP aktivitását (ábrán nem mutatjuk). A PARP aktivitás 3-AB-val teljesen gátolható volt.

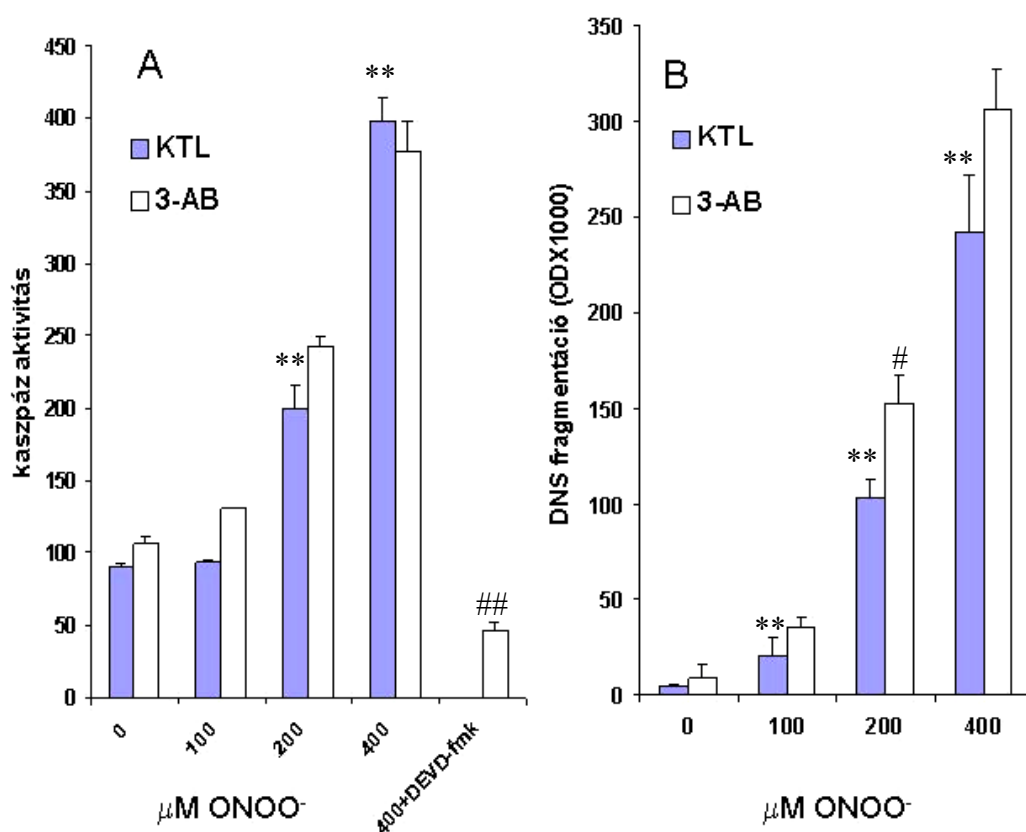


7. ábra Peroxinitrit hatása HaCaT sejt proliferációjára (A) és viabilitására (B).

IV.4.B. Peroxinitrit által kiváltott kaspáz aktiváció és DNS fragmentáció

Mivel ismeretes, hogy a peroxinitrit apoptózist okoz különböző sejtípusokban, pl. thymocytaon, HL-60 sejteken és PC12 sejteken (Estevez és mtsai, 1995, Lin és mtsai, 1995, Virág és Szabó 1998, Virág és mtsai, 1998a), ezért megvizsgáltunk két apoptotikus

paramétert peroxinitrittel kezelt HaCaT sejteken is. Azt találtuk, hogy HaCaT sejteken a peroxinitrittel kiváltott sejthalál magán viseli az apoptózis jellegzetességeit is, amint azt a megnövekedett kaszpáz-3 aktivitás és DNS fragmentáció is jelez (8. ábra). Peroxinitrittel kezelt HaCaT sejteken 3-AB jelenlétében kissé fokozódott DNS fragmentációt, és lényegében változatlan kaszpáz aktivitást mértünk. A 3-AB önmagában nem okozott sem kaszpáz aktivációt, sem DNS fragmentációt.

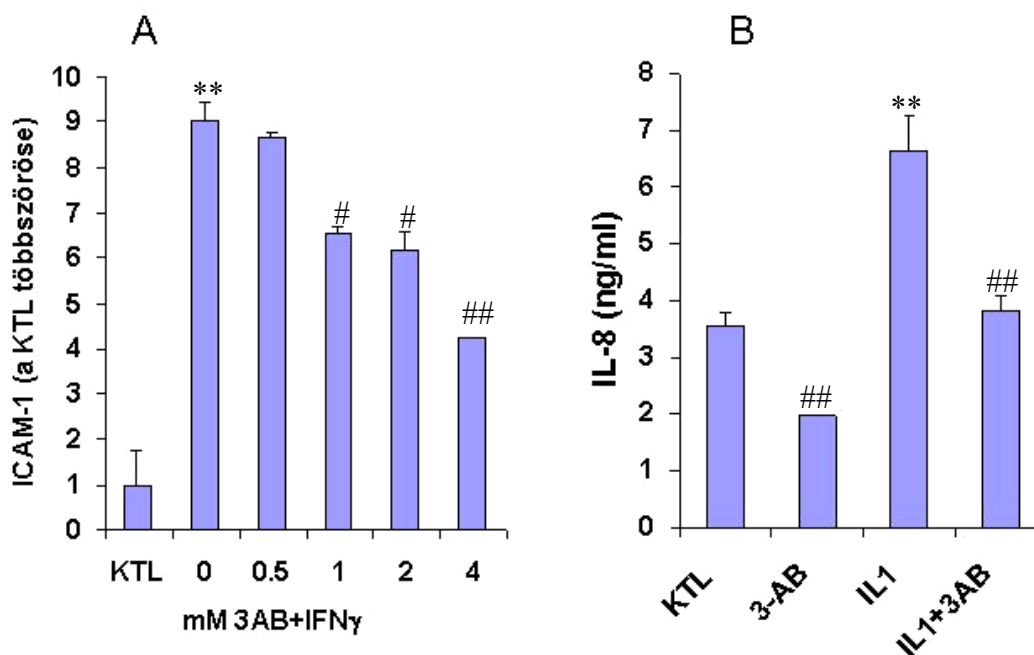


8. ábra Kaspáz aktivitás (A) és DNS fragmentáció (B) peroxinitrittel kezelt HaCaT sejtekben.

IV.4.C. A PARP szerepe az ICAM-1 expresszió szabályozásában és az IL-8 termelődésben

Human rekombináns interferon- γ (30 ng/ml) kezelés hatására a sejtfelszíni ICAM-1 expressziója kilencszeresére növekedett (9. ábra). Az interferon- γ -val stimulált ICAM-1 expressziót a PARP gátló 3-AB dóziszfüggően gátolta. A PARP inhibitor legmagasabb koncentrációja (4 mM) 50 %-kal csökkentette az ICAM-1 expressziót. Ismert továbbá, hogy szérumban tartalmú médiumban a HaCaT sejtek spontán termelnek IL-8-at (Stein és mtsai, 1997). Mi azt találtuk, hogy az IL-1 β növelte a HaCaT sejtek IL-8 termelését. PARP gátlás (4mM 3-

AB) hatására mind a spontán, mind az IL-1 β által stimulált IL-8 termelés gátolható volt, ami azt jelzi, hogy a PARP-nak szerepe van az IL-8 expresszió szabályozásában (9. ábra).



9. ábra. 3-aminobenzamid hatása HaCaT sejtek ICAM-1 expressziójára és IL-8 termelésére.

IV.5. Haemorrhágiás sokk modell

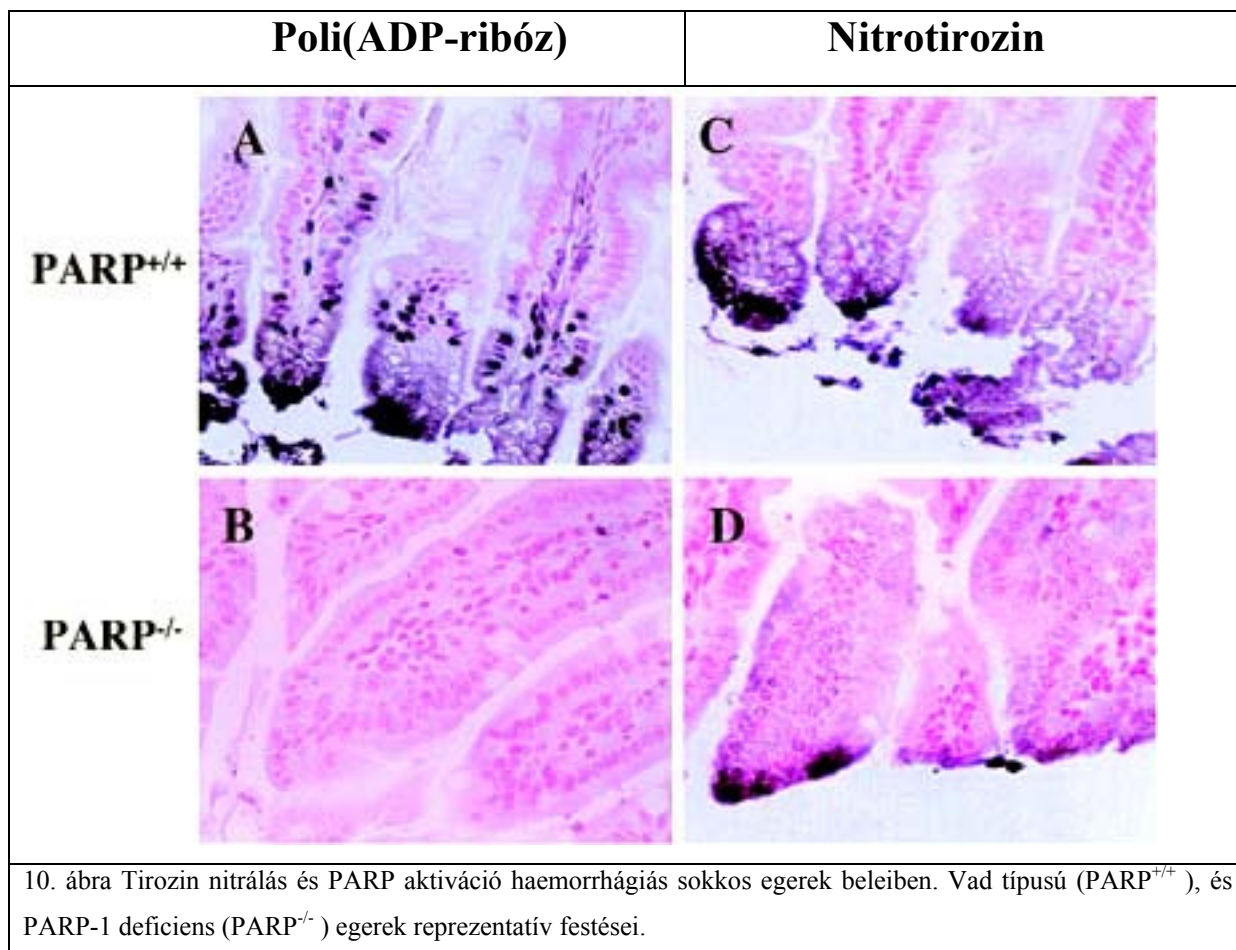
A haemorrhágiás sokk állatmodelljében Dr. Lucas Liaudet az I. táblázatban összefoglalt megfigyeléseket tette:

I. táblázat

VIZSGÁLT PARAMÉTER	PARP ^{+/+}	PARP ^{-/-}	SZIGNIFIKÁNS ELTÉRÉS
Vérnyomás a 30 perces véreztetést követően (Hgmm)	46 $\pm$ 2	46 $\pm$ 1	nincs
A kívánt vérnyomás eléréséhez levett vérmennyiség (ml/kg)	22,9 $\pm$ 2,1 (30 percnél)	22,7 $\pm$ 1,5 (30 percnél)	nincs
	24,1 $\pm$ 2,8 (75 percnél)	25,4 $\pm$ 1,6 (75 percnél)	nincs
Túlélés (perc)	149 $\pm$ 23	277 $\pm$ 16	van
Vérnyomásesés a reszuszcitáció után	rapid	lassú	van
Aortagyűrűk kontraktilitása	jelentősen csökkent	enyhén csökkent	van
Aortagyűrűk relaxációja	nem szignifikánsan csökkent	nem szignifikánsan csökkent	nincs
Bélpermeabilitás fokozódása (nl/perc/cm ²)	68,1 $\pm$ 7,8	13,7 $\pm$ 2,4	van

IV.5.A. HS okozta tirozin nitráció és PARP aktiváció a bélben

Dr. Liaudet eredményei igazolják, hogy a PARP aktivitásnak szerepe van a HS által kiváltott keringésösszeomlás, béldiszfunkció és érkontraktilitás csökkenés kialakulásában. A PARP aktivációt közvetlen módon igazolandó hisztokémiai vizsgálatokat végeztünk. HS-on és reszuszcitáción átesett (HS) és álkezelt (kontroll) $PARP^{+/+}$ és $PARP^{-/-}$ egerek vékonybeléből paraffinba ágyazott metszeteket készítettünk. A HS csoportban immunhisztokémiai módszerrel PAR-t tudtunk kimutatni a $PARP^{+/+}$ egerek bélmintáiban, ami PARP aktivációt jelez (10. ábra). A legintenzívebb PAR festődést a károsodott bélbolyhok csúcsán lehetett látni, ahol egyrészt az epithel sejtek magja festődött intenzíven, de a stroma sejtek is erős festődést adtak. A HS-en átesett $PARP^{-/-}$ egereknél ill. a kontroll csoportokban nem tudtuk a PARP aktivitást detektálni (10. ábra).



Jelentős tirozin nitrálást is ki tudtunk mutatni a HS-en átesett egerek belében a $PARP^{+/+}$ csoportban, legintenzívebben a károsodott mikrovillusok csúcsi részein (10. ábra). Nitrotirozin festődést kaptunk a $PARP^{-/-}$ csoportban is, de kevésbé intenzívet, és itt a bélbolyhok morfológiája csak enyhén károsodott. A kontroll csoportokban nem volt festődés.

IV.6. Diabétesz modell

A streptozotocinnal (STZ) kiváltott diabéteszes kísérletek klinikai részét (érfunkciós vizsgálatok) Dr. Francisco Garcia Soriano végezte. Kísérleti eredményeit a II. táblázatban foglalom össze:

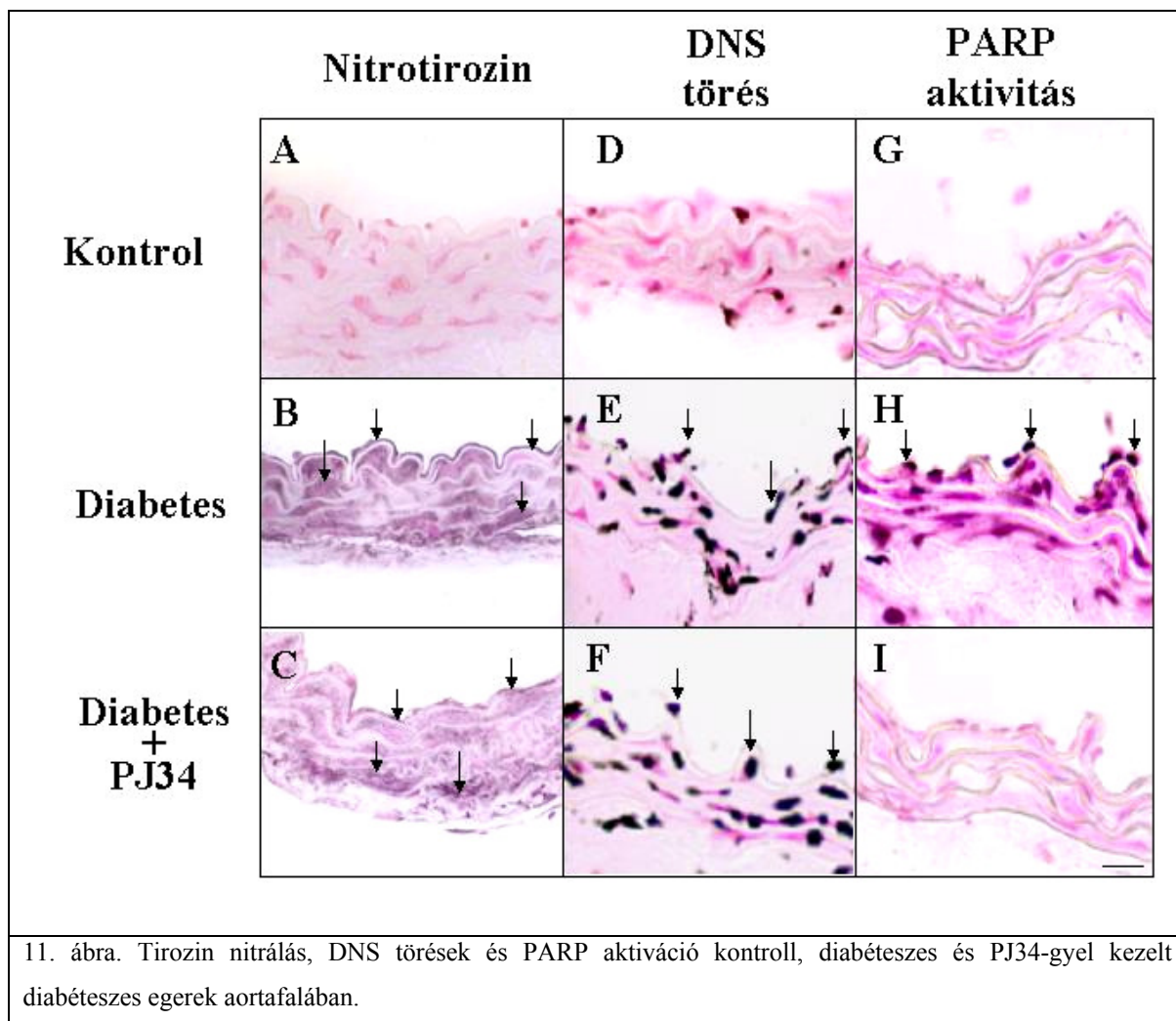
II. táblázat

VIZSGÁLT PARAMÉTER	STZ	STZ+PJ-34	SZIGNIFIKÁNS ELTÉRÉS
STZ kezelést követő hyperglycaemia dinamikája	azonos	azonos	nem
A pancreas inzulin tartalmának csökkenése a STZ után 8 héttel	95,8%	94,1%	nem
Hemoglobin glikáció fokozódása	75%	81%	nem
Aortagyűrűk acetilkolin által kiváltott relaxációja	jelentősen csökkent	normális	igen
Aortagyűrűk fenilefrinnel kiváltott kontraktilitása	jelentősen csökkent	enyhén csökkent	igen
Aortagyűrűk nátrium nitroprussziddal kiváltott relaxációja	normális	normális	nem

IV.6.A. A PARP aktiváció szerepe diabéteszes érendothel diszfunkcióban.

Dr. Soriano eredményei igazolják, hogy a PARP aktivitásnak jelentős szerepe van a diabéteszes érfunkcióromlás kialakulásában. Az enzim aktivációjának igazolására és a peroxinitrit lehetséges szerepének alátámasztására az alábbi kísérleteket végeztük. Diabéteszes egerek aortáiból készült metszeteken immunhisztokémiai módszerrel intenzív nitro tirozin festődést kaptunk, ami arra utal, hogy ezekben a diszfunkciós erekben peroxinitrit termelődött (11. ábra). A PARP gátlószerral (PJ-34) kezelt állatok ereiben is találtunk pozitív festődést. A kontroll metszetekben nem tudtunk festődést kimutatni.

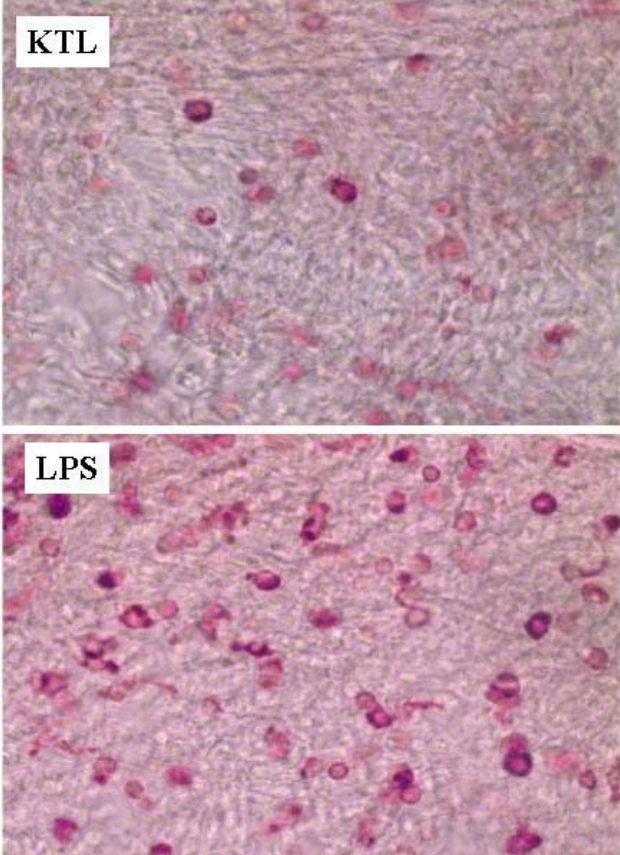
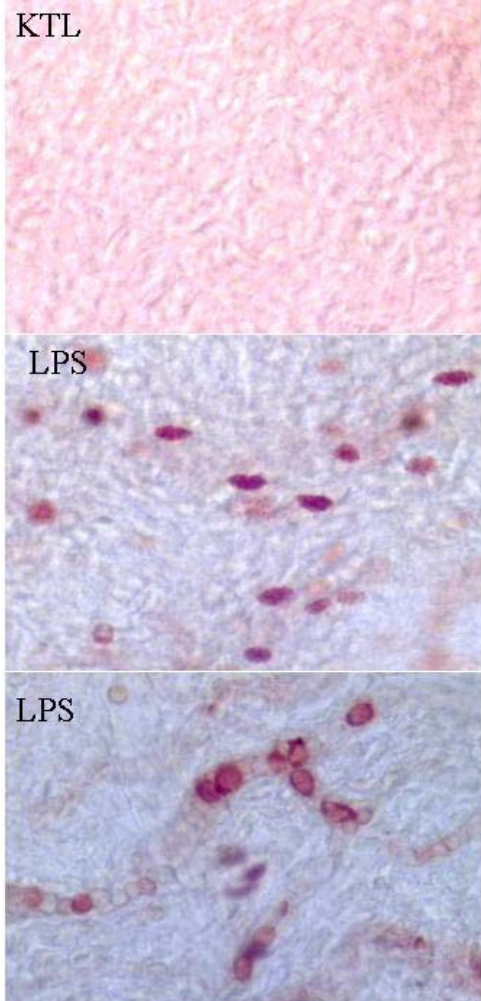
Mivel a nitro tirozin nagy valószínűséggel peroxinitrit hatására keletkezik, ami DNS töréseket okoz, megvizsgáltuk, hogy ki tudunk-e mutatni DNS töréseket diabéteszes aortákban. TUNEL festéssel nagyszámú DNS törést kaptunk a diabéteszes és a PARP inhibitorral kezelt aorta metszetekben is (11. ábra).



A PARP aktivitás kimutatását PARP enzimhisztokémiai eljárással végeztük, amit e kísérletsorozat során fejlesztettünk ki. Diabéteszes állatok ereiben intenzív festődést találtunk, de a PARP gátlószerezrel kezelt diabéteszes állatok aortájában nem volt PARP aktivitásra utaló festődés (11. ábra).

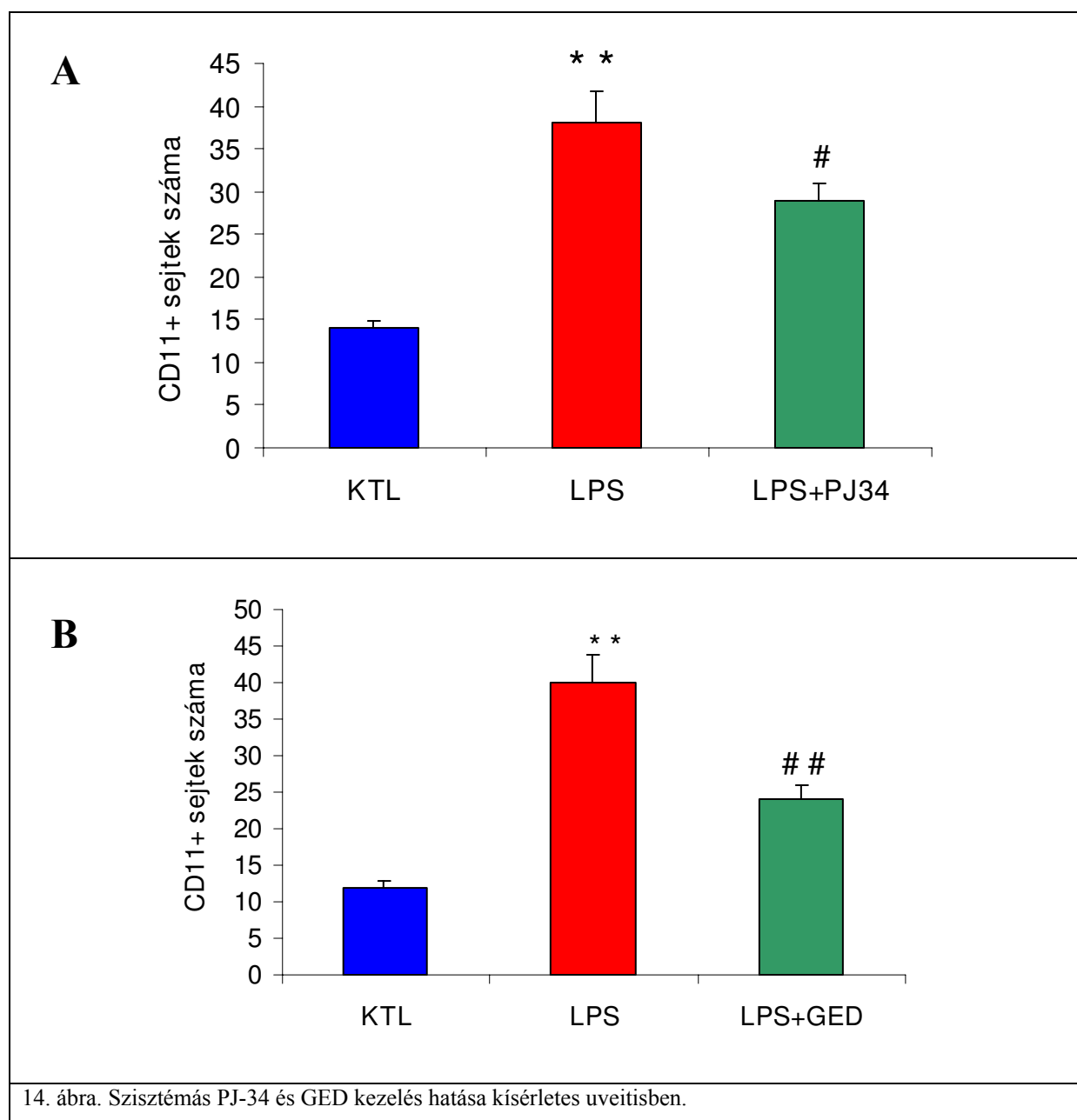
IV.7. Kísérletes uveitis modell

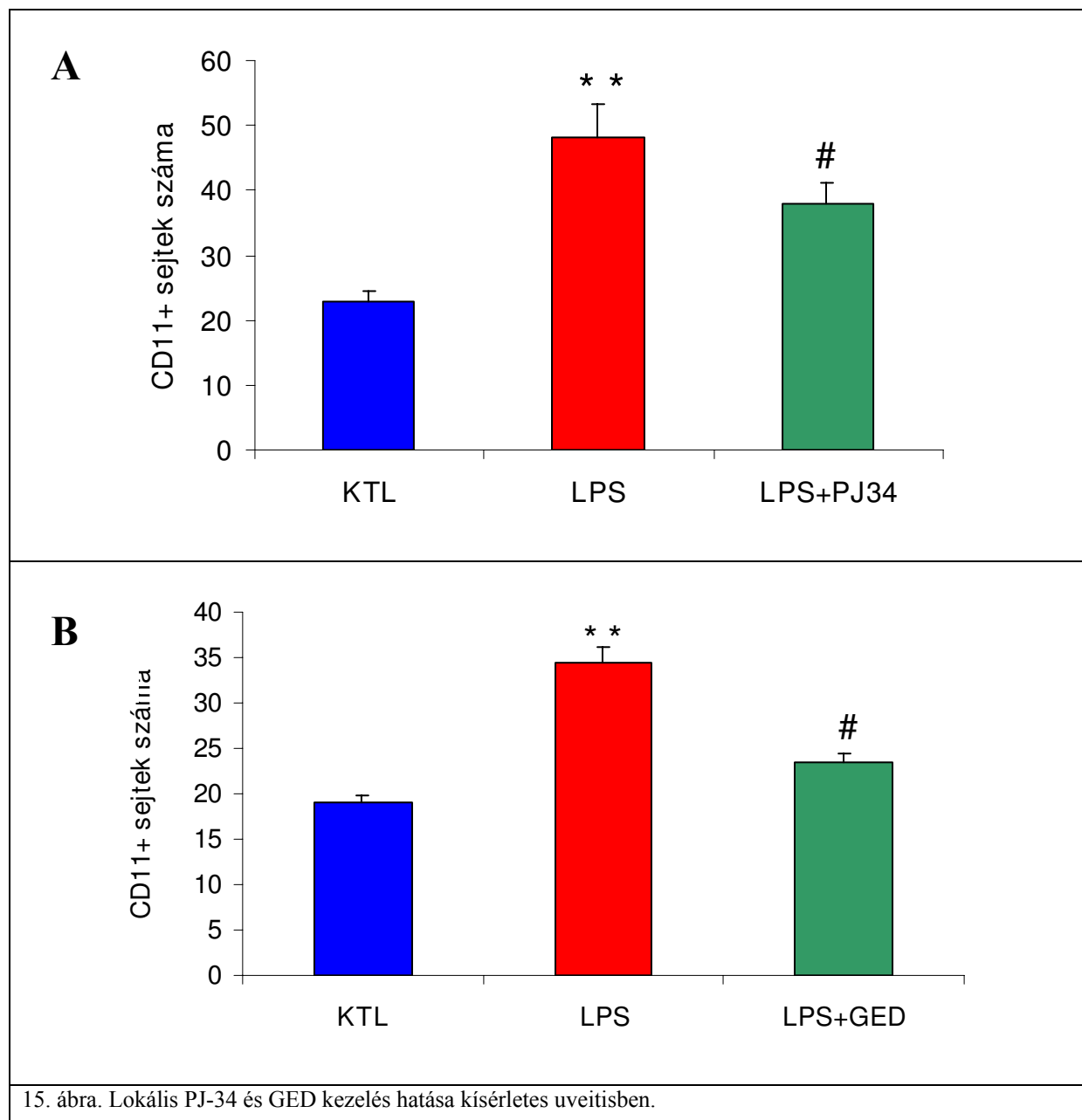
A gyulladásos sejteket anti-CD11 felhasználásával mutattuk ki. Az endotoxinnal kezelt állatok íriszeiben nagyszámú gyulladásos sejt migrációját figyeltük meg (12. ábra).

	
12. ábra CD11⁺ sejtes infiltráció endotoxinnal (LPS) kezelt patkányok íriszeiben	13. ábra Poli(ADP-ribóz) kimutatása az íriszben. (Egy kontroll kép és két uveitisből származó íriszterület képe.)

Megvizsgáltuk, hogy történik-e PARP aktiváció ebben a gyulladás modellben (13. ábra). A PARP aktivitás kimutatását az enzim végtermékének, a poli(ADP-ribóz)-nak a detektálásával végeztük, anti-poli(ADP-ribóz) primer ellenanyag használatával, a fent leírt immunhisztokémiai módszerrel. Endotoxin (LPS) hatására nagyszámú pozitívan festődő sejtet tudtunk kimutatni főleg az erek vetületeiben, míg a kontroll íriszekben nem kaptunk festődést (13. ábra). A vaszkuláris lokalizáció jelenthet endotheliális festődést, de az is lehetséges, hogy az érpályán belüli mononukleáris sejtek aktivációját kíséri fokozott poli-ADP-riboziláció.

Két farmakológiai kísérletet is végeztünk ebben a modellben. Megvizsgáltuk az indukálható nitrogén monoxid szintetáz (iNOS) gátlószereinek a GED-nek és a PARP inhibitor PJ-34-nek a hatását a CD11⁺ sejtek migrációjára. Mindkét kezelést orálisan (14. ábra) illetve lokálisan (szemcseppben) (15. ábra) is alkalmaztuk. A PARP inhibitorral (10 mg/kg PJ-34) és az iNOS gátlószerral (10 mg/kg GED) kezelt állatok íriszében az anti-CD11-vel festődő sejtek száma szignifikánsan csökkent. A szignifikáns csökkenés mind az orális, mind a lokális kezelés esetén egyaránt megfigyelhető volt (14. és 15. ábra).





V. Megbeszélés

V.1. A peroxinitrit→DNS károsodás→PARP aktiváció útvonal szerepe a bőrben

Ismeretes az irodalomból, hogy exogén peroxinitrit hatására a bőrben nitráció következik be a fehérjék tirozil oldalláncain (Beckman és Koppenol, 1996). A peroxinitrit PARP aktiváló hatásának ismeretében kísérletileg igazoltuk, hogy az exogén peroxinitrit PARP aktivációt vált ki a bőrben.

Célunk volt annak megvizsgálása is, hogy a peroxinitrit→DNS károsodás→PARP aktiváció útvonal működik-e bőrgyulladásban is. Vizsgálatunk tárgyaként a kontakt hiperszenzitivitási reakciót választottuk, melynek komplex pathomechanizmusa két részből áll (Grabbe és Schwarz, 1998). Az első fázisban a bőrre kent lipofil anyag (a mi modellünkben az oxazon) a bőr fehérjéit hapténizálva immunválaszt vált ki (szenzibilizálás). A szenzibilizálás természetesen más úton (pl. az antigén orális bejutását követően) is megtörténhet. Ily módon szenzitizált egyénben a hapténnek a bőrrel történő érintkezése egy késői típusú hiperszenzitivitási reakció formájában megvalósuló gyulladást vált ki (effektor fázis). Kísérleteinkben kimutattuk, hogy a CHS effektor fázisában kifejezett tirozin nitráció alakul ki az epidermiszben. A szövetben kimutatott nitrotirozin valószínűleg az in vivo termelődő peroxinitrit indikátorának tekinthető. A másik fő tirozin nitrálási mechanizmus, a granulocyták myeloperoxidáz aktivitása révén valósulhat meg (Sampson és mtsai, 1998), de ez CHS-ben nem tűnik jelentősnek, mivel a bőrben levő, nagyszámú neutrofil granulocitát tartalmazó mikroabszcesszusok nem festődtek nitrotirozinra. Az infiltráló sejtekkel ellentétben, a keratinociták mutatták a legkifejezettebb nitrotirozin festődést, ami azt mutatja, hogy a bőrben CHS folyamán a peroxinitrit elsődleges célpontjai a keratinociták. A fokozott tirozin nitráció valószínűleg a gyulladással citokinek által indukált fokozott iNOS aktiváció és szuperoxid túltermelés következtében jön létre. Az iNOS által szintetizált NO és a szuperoxid reakciója során peroxinitrit keletkezik, ami a tirozint nitrálja. Az oxidatív stresszállapotot valószínűsíti a nagyszámú DNS törés jelenléte a keratinocitákban és az infiltráló sejtekben, amint azt TUNEL módszerrel kimutattuk. A peroxinitritről korábban már leírták, hogy számos sejttypusban, így humán keratinocitákban is, DNS károsodást okoz (Spencer és mtsai, 1996, Szabó, 1996a,b). Mivel a peroxinitrit apoptózist okozhat, elvileg nem zárható ki, hogy a TUNEL-pozitív sejtek apoptotikusak, hiszen a TUNEL festést széles körben alkalmazzák apoptotikus sejtek detektálására. Az eljárás tulajdonképpen a DNS szabad 3'-OH végeit ismeri fel, ami egyszálú és dupla szálú DNS törésekben is létrejön. A TUNEL technikát ezért használják egyszálú DNS kimutatására is (Didier és mtsai, 1996, Ahmani és Ong, 1999, Jung és mtsai, 2000, Mihm és mtsai, 2000,

Shen és Ong 2000). Sőt napjainkban azt is leírták, hogy a proteináz K kezelés (mely az általunk használt TUNEL kit protokoljának is része) fokozza az egyszálú DNS törések kimutatását nem apoptotikus sejtekben (Gal és mtsai, 2000). Rendszerünkben úgy gondoljuk, hogy egyszálú DNS törések felelősek a legtöbb TUNEL pozitivitásért, mivel a TUNEL-pozitív sejtmagok túlnyomó többsége nem mutat apoptotikus morfológiát. Továbbá a legtöbb TUNEL-pozitív sejt negatívan festődik p85-PARP-ra (a 116 kDa-os PARPból az apoptózis során, kaszpázok által történő hasítással keletkező fragmentumra). Továbbá azt találtuk, hogy a gyulladásos gócok körül a keratinociták majdnem 100%-a TUNEL-pozitív, ami egy valószínűtlenül magas apoptotikus arány lenne.

Az intenzív DNS károsodás ismeretében nem meglepő, hogy PARP aktivációt is ki tudtunk mutatni enzimhisztokémiai módszerrel. Az enzim aktivációja különösen az epidermis bazális rétegében volt szembetűnő, míg a felszínes, differenciált sejtek nem festődtek. Ennek a különbségnek a vizsgálata elvezethet a sejtek oxidatív stresszérzékenységét meghatározó tényezők megismeréséhez. Lehet ugyan, hogy csupán arról van szó, hogy a bazális sejtek jobban ki vannak téve a dermisből származó ROI/RNI hatásainak, de a DNS törés diffúz eloszlása ennek ellentmondani látszik. Valószínűbbnek tartjuk, hogy a bazális réteg proliferálódó sejtjei a gyorsabb metabolizmus, eltérő kalcium homeosztázis, a csökkent antioxidáns védelem, vagy egyéb nem ismert tényező miatt érzékenyebbek az oxidatív stresszre. Minazonáltal ennek a jelenségnek a vizsgálata további kísérleteket igényel.

Vizsgáltuk a peroxinitrit HaCaT sejtekre gyakorolt hatását és a PARP szerepét a HaCaT sejtek halálában. Ismert, hogy a nitrogén monoxid (a peroxinitrit egyik prekursora) fokozza a HaCaT sejtek proliferációját (Stallmeyer és mtsai, 1999). Ezzel szemben, jelen munkánkban azt találtuk, hogy az alacsony koncentrációjú peroxinitrit antiproliferatív hatású, tovább erősítve azt a megállapítást, hogy az NO és a peroxinitrit sejtekre gyakorolt hatásai különbözőek lehetnek. Az NO és a peroxinitrit gyakran ellentétes sejtes hatásainak alapja az eltérő kémiai szerkezetben, eltérő reaktivásban, és az eltérő targetmolekula spektrumában rejlik. Nagyobb koncentrációban a peroxinitrit a citotoxikus hatásának bizonyult. Korábbi megfigyelésekkel összhangban (Szabó és mtsai, 1998, Virág és mtsai, 1998a, 1998b) a PARP gátlószerek sejtvédő hatását figyeltük meg peroxinitrittel kezelt HaCaT sejteken. A 3-AB citoprotektív hatása az apoptózist nem befolyásolta, hiszen a kaszpáz aktiváció és a DNS fragmentáció nem csökkent. Éppen ellenkezőleg, a 3-AB enyhén fokozta a peroxinitrit által indukált apoptotikus DNS fragmentációt. Ez nem a 3-AB citotoxikus hatásának a következménye, hisz a 3-AB önmagában nem citotoxikus, és nem okoz kaszpáz aktivációt és DNS fragmentációt sem. Az oxidatív hatásoknak kitett sejtekben a 3-AB jelenlétében mért

emelkedett apoptotikus paraméterek, korábbi megfigyelésekkel összhangban (Virág és mtsai, 1998a, Filipovic és mtsai, 1999, Ha és Snyder, 1999), valószínűleg a PARP apoptózis-nekrózis kapcsoló hatásával magyarázható. A PARP gátlók antinekrotikus hatásának in vivo gyulladáscsökkentő hatása lehet, mert megvédi a szöveteket a sejttartalom kiáramlásának gyulladáskeltő hatásától.

CHS-ben és más gyulladásos bőrbetegségekben a PARP befolyásolja a keratinocita aktivációt is. Ismert, hogy a keratinociták számos humorális faktort, citokineket és kemokineket, köztük IL-8-at is termelnek. Az IL-8 felelős a neutrofil granulocitáknak a gyulladás helyére történő mozgósításáért. A gyulladás során végbemenő sejtes infiltráció szabályozásában az adhézións molekuláknak (pl. ICAM-1) is fontos szerepük van. Az a megfigyelésünk, hogy a HaCaT sejtek IL-8 termelését és ICAM-1 expresszióját csökkentette a PARP gátló 3-aminobenzamid, jelentősséggel bírhat a PARP gátlás gyulladásgátló hatásának megértésében (Zingarelli és mtsai, 1998). A gyulladás mediátorainak (pl. kemokinek és adhézións molekulák) expresszióját az NF κ B nevű transzkripciós faktor is szabályozza (Baeuerle és Baltimore, 1996). Ismert, hogy a PARP-1 az NF κ B aktiváció kofaktora (Oliver és mtsai, 1999) ami magyarázatot szolgáltat arra, hogy a PARP gátlása csökkenti az IL-8 termelődését és az ICAM-1 expresszióját. Ennek ellentmondani látszik, hogy jelen ismereteink szerint a PARP-1 és az NF κ B fehérjék fizikai asszociációja felelős a PARP-1 transzkripciót moduláló aktivitásáért, amihez az enzim aktivitása nem szükséges. Ezért lehetséges, hogy a PARP gátlók más útvonalak (pl. AP-1?, NF-AT?) befolyásával fejtik ki transzkripciós szabályozó hatásukat.

Egy másik gyulladásos bőrmallban is kimutattuk a PARP aktivációját. Mustár olajat kenve a bőrre, immunhisztokémiai módszerrel poli(ADP-ribóz)-t mutattunk ki főleg az epidermisz bazális rétegében. Bár az nem teljesen világos, hogy mi aktiválja a PARP-ot a mustár olaj hatására létrejött vezikulákban. Az egyik lehetséges mechanizmus az kénmustár által alkilált DNS direkt PARP aktiváló hatása. A kénmustárral kezelt bőrben kifejezett tirozin nitráció is kimutatható, ami valószínűleg peroxinitrit jelenlétére utal. Ez az eredmény összhangban van azzal a korábbi megfigyeléssel, mely szerint a mustár olajjal kezelt bőrben emelkedett NO termelés mutatható ki. Lehetséges, hogy ebben a mallban az intrakután keletkező peroxinitritnek szerepe van a PARP aktiváció kialakulásában. Egyre több cikkben írnak iNOS expresszióról bőrgyulladás különböző formáiban, ami arra utal, hogy ezekben az állapotokban az intrakután termelődő peroxinitrit aktiválhatja a PARP-ot a bőr különböző sejteiben.

V.2. PARP aktiváció diabéteszes endotheliopathiában

A cukorbetegség életminőségét főleg az alapbetegség szövődményei, s ezen belül is elsősorban az érszövődmények (makro- és mikroangiopathia) határozzák meg. A diabéteszes vasculopathia pathomechanizmusában már korábban ismert volt a kóros szerepe, és tudott volt, hogy a hyperglycaemia érdiszfunkciót kiváltó hatásai részben az endothelsejteken keresztül érvényesül (Brownlee, 2001). A hyperglycaemia három, látszólag egymástól független útvonalon keresztül fejti ki kóros hatását az érendothelre: a glükózból keletkező AGE (advanced glycation endproducts) révén, a glükóz által kiváltott protein kináz C aktiváción keresztül és az aldóz reduktáz útvonal fokozódása által. Brownlee munkacsoportja mutatta ki, hogy a szabad gyökök és reaktív intermedierek egy közös kapcsolódási pontot jelentenek a hyperglycaemia endotheliopathiás hatásának kiváltásában (Nishikawa és mtsai 2000). Eredményeik szerint a hyperglycaemia ROI termelést indukál az endothelsejteken, és a ROI útvonal blokkolása (pl. a mitokondriális elektronszállító rendszer vagy az oxidatív foszforiláció gátlásával, illetve szuperoxid diszmutáz transzfekciójával) meggátolja mindhárom kóros szignálútvonal aktivációját (Nishikawa és mtsai, 2000).

A mi munkacsoportunk eredményei egy új, de szintén az oxidatív stressz által aktivált útvonal, a PARP aktiváció szerepére hívják fel a figyelmet. Munkatársam, Francisco Garcia Soriano eredményei igazolják, hogy a hyperglycaemia endotheliális diszfunkciót kiváltó hatásai jelentős részben a fokozott poli(ADP-ribóz) metabolizmus révén érvényesülnek. Az általunk végzett szövettani vizsgálatok, és az endothelsejteken végzett kísérletek további információkkal szolgáltak a PARP aktiváció mechanizmusára vonatkozóan. A hyperglycaemiás állatokból származó érpreparátumok intenzív nitrotirozin festődése alapján valószínűsíthető, hogy peroxinitrit is képződik a diabéteszes állatok ereinek falában. Az endothelsejtek által expresszált eNOS mellett hyperglycaemia hatására iNOS is megjelenhet és így jelentős mennyiségű NO képződhet, ami a fokozott mitokondriális szuperoxid termeléssel együtt kedvező körülményeket teremthet a peroxinitrit képződés számára. A tenyésztett endothelsejteken végzett PARP aktivitás méréseink is arra utalnak, hogy mind NO mind szuperoxid termelés szükséges a hyperglycaemia maximális PARP aktivációt okozó hatásához, hiszen mind a SOD+kataláz, vagy a SOD mimetikus MnTBAP, mind pedig az NO gyökfogó cPTIO és a cNOS gátlószerek szignifikánsan és jelentős mértékben gátolták a hyperglycaemia PARP aktiváló hatását.

Az oxidatív stressz és a PARP aktiváció közötti „hiányzó láncszem”, a DNS törés igazolására is végeztünk kísérleteket. A hyperglycaemiás állatokból származó

érpreparátumokban TUNEL módszerrel jelentős számú DNS törést tudtunk kimutatni. A TUNEL pozitív magok 90% fölötti aránya, valamint e magok apoptotikus morfológiájának hiánya alapján valószínű, hogy a TUNEL assay nem kettős, hanem egyszálú DNS törést jelez a metszeteinkben.

V.3. PARP aktiváció haemorrhágiás sokkban

A baleseti trauma a fejlett országokban a vezető halálokok között szerepel. A súlyos trauma egyik legveszélyesebb szövődménye a jelentős vérvesztés, ami a keringés összeomlásához, sokkhoz vezet. A sokk összetett pathomechanizmusában egyértelműen fontos szerep jut az oxidatív stressznek (Salvemini és Cuzzocrea, 2002). Számos kísérletes munka igazolja az oxigénből keletkező szabad gyökök és reaktív intermedierek fokozott termelődését sokkos állapotban. A különböző antioxidáns stratégiák hatásossága alapján valószínűsíthető a ROI kóroki szerepe is a haemorrhágiás sokkban (Salvemini and Cuzzocrea, 2002). A reaktív nitrogéntartalmú intermedierek (RNI) alapmolekulájának, a nitrogén monoxidnak a HS-ben játszott esetleges szerepére úgyszintén számos adat utal. Különösen az indukálható nitrogén monoxid szintetáz (iNOS) kóroki szerepe valószínűsíthető HS-ban, amint azt az iNOS specifikus gátlószerek (L-NIL, MEG) sokkellenes hatásai jelzik (Tsukuda és mtsai, 2000, Zingarelli és mtsai, 1997). A ROI és RNI együttes termelődése joggal vetette fel a peroxinitrit képződés lehetőségét is HS-ban. A HS patkánymodelljében megfigyelt fokozott dihidrorodamin 123 oxidáció további megerősítést nyújtott ehhez a feltételezéshez (Szabó és mtsai 1995). A nagyfokú oxidatív stressz és különösképpen a peroxinitrit képződés alapján már korábban felvetődött a PARP aktiváció és a következményes sejtenenergetikai „katasztrófa” kóroki szerepe is (Szabó, 1996b). A poli-ADP-riboziláció gátlószerei valóban jelentősen javították mind a túlélést, mind a szervfunkciókat a HS állatmodelljeiben (Virág és Szabó, 2002).

Jelen vizsgálatainkban további, közvetlen bizonyítékokat szereztünk ennek az útvonalnak a működéséről HS-ban. A HS-ben történő peroxinitrit termelődést nitro tirozin immunhisztokémiai kimutatásával igazoltuk, míg a PARP aktivációját poli(ADP-ribóz) immunhisztokémiával mutattuk ki. A PARP^{-/-} állatok védeltsége a HS okozta túléléssel és bélpermeabilitással szemben arra utal, hogy a PARP aktivációnak valóban kóroki szerepe van a HS pathomechanizmusában. Ezek az eredmények jó egyezésben vannak korábbi farmakológiai tanulmányokkal is (Virág és Szabó, 2002).

V.4. PARP aktiváció kísérletes uveitisben

A kísérletes autoimmun uveitis immunogén szemfehérjékkel történő immunizálással váltják ki (Shimizu és mtsai, 1999). Hasonló gyulladás váltható ki a szemben bakteriális lipopoliszacharid (LPS) intraplantáris alkalmazásával. Mi ez utóbbi módszert alkalmazva jelentős CD11⁺ sejt infiltrációt váltottunk ki Lewis patkányok íriszében. A gyulladásos infiltrációt mind az iNOS gátlószer GED, mind a PARP gátló hatású PJ-34 szignifikánsan csökkentette. Ezek az eredményeink felvetik annak a lehetőségét, hogy kísérletes uveitisben is működik az NO → ONOO⁻ → PARP aktiváció útvonal. Irodalmi forrásokból tudjuk, hogy iNOS expresszió valóban bekövetkezik kísérletes uveitisben (Shimizu és mtsai, 1999). Szintén leírtak tirozin nitrációt is, ami peroxinitrit termelődést jelez (Wu és mtsai, 1997, Shimizu és mtsai, 1999). Az is ismeretes, hogy nem szelektív NOS gátló kezelés gyulladáscsökkentő hatású kísérletes uveitisben (Goureau és mtsai, 1995). Felvetődik a kérdés, hogy vajon milyen mechanizmussal járulhat hozzá a peroxinitrit az uveitis kialakulásához. Liversidge és mtsai (2002) kimutatták, hogy a NOS által termelt NO peroxinitrit képződéséhez vezet kísérletes uveitisben, és az ily módon képződött peroxinitrit a fotoreceptorok apoptózisát váltja ki. Érdekes módon ezt nem a peroxinitrit közvetlen citotoxikus hatásával találták összefüggésbe hozhatónak, hanem a peroxinitritnek a FAS/FAS ligand apoptotikus útvonalat serkentő hatásával (Liversidge és mtsai, 2002). A mi vizsgálati eredményeink mind az NO/ONOO⁻ mind a PARP esetében a gyulladásos sejtek migrációjának szerepét hangsúlyozzák. Ezek a hatások, megítélésünk szerint, valószínűleg az adhézis molekulák szintjén jutnak érvényre. Ismeretes ugyanis, hogy a peroxinitrit képes adhézis molekulák indukciójára neutrophil granulocytákon (Zouki és mtsai, 2001), a PARP-1 pedig a korábban részletezett NFκB koaktivátor funkciója révén szabályozza e folyamatot. A peroxinitrit IL-8 termelést kiváltó hatását is leírták, melynek révén fokozott neutrophil kemotaxist stimulálhat (Filep és mtsai, 1998). Mindazonáltal mind a NOS gátlás, mind pedig a PARP gátlás uveitisre kifejtett hatásának mechanizmusa további vizsgálatokat igényel.

V.5. Az oxidatív stressz által kiváltott PARP aktiváció, mint terápiás beavatkozások lehetséges célpontja

Felvetődik a kérdés, hogy vajon az általunk vizsgált peroxinitrit → DNS törés → PARP aktiváció útvonal milyen terápiás beavatkozások lehetőségét kínálja sokkos, gyulladásos betegségekben. Korábbi munkák sokrétű bizonyítékokkal szolgáltak egyrészt a PARP aktiváció bekövetkezését, másrészt a PARP gátlásnak a különböző gyulladásos, reperfüziós

betegségek szövet- és szervfunkciókat kedvezően befolyásoló hatásait illetően (Virág és Szabó, 2002). Azt gondoljuk, hogy a PARP inhibitorok megvédhetik a sejteket az oxidatív stressz okozta funkciózavartól és citotoxikus hatástól a sejtek energiakészletének megőrzése révén. Az irodalomban gyakran említik az NF κ B aktiváció PARP gátlószerekkel történő esetleges blokkolásának a jelentőségét is, mint a PARP gátlás kedvező farmakológiai hatásának egyik lehetséges momentumát (Virág és Szabó, 2002). Igaz, hogy számos, a gyulladásban fontos molekula (citokinek, kemokinek adhézis molekulák) termelődése csökkenthető PARP gátlószerek és a PARP-1 genetikai ablációja (PARP-1 knock out egerek) révén. Ennek hátterében a PARP knock out egerek esetén bizonyosan szerepet játszik a csökkent NF κ B aktiváció (Oliver és mtsai, 1999). Egyre elfogadottabb viszont az a nézet, hogy a PARP-1 NF κ B koaktivátor funkciójához nem szükséges a polimeráz enzimaktivitása, így a PARP gátlószerek hasonló hatásai valószínűleg más útvonalon keresztül érvényesülnek.

A PARP gátlószerek terápiás alkalmazásának kapcsán joggal merül fel a kezelés karcinogenitásának veszélye. A poli-ADP-ribóziláció DNS hibajavításban betöltött szerepe alapján a mutációk számának fokozódására és daganatképződésre számíthatunk krónikus PARP gátló kezelés esetén. Léteznek irodalmi adatok az indukálható daganatok számának fokozódására PARP-1 hiányos állatokban (Tsutsumi és mtsai, 2001, Tong és mtsai, 2003), azonban hasonlót még nem írtak le gátlószer kezelés esetében. Éppen ellenkezőleg, léteznek biztató kísérletes bizonyítékok arra vonatkozóan, hogy PARP gátlószerek csökkentik a tumor promotor vegyületek hatásait (Borek és mtsai, 1984, Troll és mtsai, 1990). Ezt a kérdést nyilvánvalóan részletesen meg kell vizsgálni, mielőtt PARP gátlószerek széleskörű klinikai kipróbálására sor kerül. (Jelenleg már folynak az Egyesült Államokban 1. fázisú klinikai tesztek PARP gátlószerekkel.). Míg a PARP gátlószerek krónikus alkalmazása esetén különösen nagy súllyal esik latba az esetleges karcinogenitás kérdése, némileg más a helyzet a közvetlen életveszélyt jelentő betegségek, mint például a stroke és a szívinfarktus esetében. Ezekben a kórképekben az állatkísérletes eredmények alapján olyan nagy fokú, más beavatkozáshoz nem hasonlítható terápiás eredmény várható a PARP gátlástól, ami a terápiás haszon/kockázat arány mérlegelésekor nem lehet figyelmen kívül hagyni.

Újabb eredmények alapján a poli(ADP-ribóz) katabolizmus kulcsenzimjének a PARG-nak a gátlása is a PARP gátlószerekhez hasonló citoprotektív és stroke-védő hatású (Ying és Swanson, 2000, Ying és mtsai, 2001). A PARG gátlás genomi integritásra kifejtett hatásait eddig még nem vizsgálták, de lehetséges, hogy oxidatív stresszel jellemezhető betegségekben a PARG gátlással a PARP gátláshoz hasonló terápiás eredmények érhetők el egy attól

különböző mellékhatás spektrum mellett. A glikohidroláz új, potens gátlószereinek és a PARG hiányos egereknek folyamatban lévő létrehozása valószínűleg hamarosan választ ad erre az izgalmas kérdésre.

Az oxidatív stressz kutatásának reneszánsza az utóbbi évtizedekben előtérbe hozta az antioxidánsok terápiás alkalmazásának lehetőségeit különböző betegségekben. A DNS károsító gyökök semlegesítésével az antioxidánsok csökkentik a PARP aktivációt kiváltó stimulus intenzitását, és emellett védelmet nyújtanak az oxidatív stressz egyéb, nem PARP függő szövetkárosító hatásaival (lipid peroxidáció, protein oxidáció és nitrálás, stb) szemben is. A peroxinitrit in vivo képződésének és erős oxidáns hatásainak kimutatásával felmerült az igény a peroxinitrit célzott semlegesítésére. A peroxinitrit semlegesítését célzó próbálkozások közül kiemelendő a szeléntartalmú antioxidánsok (pl. ebszelén) (Arteel és mtsai, 1999) valamint az átmeneti fémeket (vas, mangán) tartalmazó porfirin származékok sikeres kipróbálása különböző gyulladásos folyamatok, diabétesz, diabéteszes endotheliopathia, doxorubicin okozta szívkárosodás állatmodelljeiben (Salvemini és mtsai, 1998, Mabley és mtsai, 2002, Szabó és mtsai, 2002). Az átmeneti fémeket tartalmazó porfirinszerű vegyületek újszerű antioxidánsok, amennyiben a peroxinitrit lebomlását katalizálva (PDC, peroxynitrite decomposition catalysts), nem veszítik el PDC képességüket, és újabb és újabb peroxinitrit molekulák semlegesítését képesek elvégezni.

A peroxinitrit okozta PARP aktivációt célba vevő terápiás eljárások bizonyos bőrbetegségekben is sikerrel kecsegtethetnek. Kiemelendő a Stevens-Johnson szindróma és a toxikus epidermális nekrolízis, mint a keratinociták nekrozisával és fokozott iNOS expresszióval járó kórképek (Lerner és mtsai, 2000), melyekben elméletileg mind a PDC, mind a PARP gátlószert kezelésként eredményes lehet. Nemrégiben napégésben mutatták ki a PARP aktiváció kóroki szerepét (Farkas és mtsai, 2002). Ezen kívül a bőrben igen gyakori gyulladásos betegségek, mint pl. a CHS is megfontolandó lehetőségek a PDC illetve a PARP gátló kezelések számára.

VI. Konklúzió

1. CHS-ben a keratinocitákban tirozin nitrálás, DNS törések és PARP aktiváció jön létre.
2. A peroxinitrit PARP- aktivációt okoz a bőrben.
3. A HaCaT sejtekben a peroxinitrit apoptózist indukál, amit kaszpáz aktiváció és DNS fragmentáció jellemez.
4. Nagyobb koncentrációban a peroxinitrit nekrozist okoz a HaCaT sejtekben
5. A peroxinitrit PARP- aktivációt okoz HaCaT sejtekben.
6. A keratinocitákban a PARP-nak szerepe van a citokin indukálta Il-8 termelés és ICAM-1 expresszió szabályozásában.
7. HS-ban tirozin nitrálás és PARP aktiváció következik be a bélhámsejtekben és a bélbolyhok strómájában, ami valószínűleg szerepet játszik a HS-ben megfigyelt bélpermeabilitás fokozódásban.
8. A diabéteszes egerek ereiben tirozin nitrálás, DNS törések és PARP aktiváció történik.
9. A poli-ADP-riboziláció PJ-34-gyel történő gátlása csökkenti a CD11 pozitív sejtek (neutrofil granulocyták) extravazációját experimentális uveitisben.
10. A peroxinitrit által kiváltott poli-ADP-riboziláció ígéretes terápiás célpontot jelenthet gyulladásos és ischaemia-reperfúzió alapuló betegségekben.

VII. Irodalom

- Ahmadi A, Ong SC (1999) Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa. *Exp Zool* **284**:696-704.
- Althaus FR, Hofferer L, Kleczkowska H E, Malanga M, Naegeli H, Panzeter P L and Realini C A (1994) Histone Shuttling by Poly ADP-Ribosylation. *Mol Cell Biochem* **138**: 53-59.
- Alvarez B, Rubbo H, Kirk M, Barnes S, Freeman B A, Radi R. (1996) Peroxynitrite-dependent tryptophan nitration. *Chem Res Toxicol* **9**: 390-396.
- Ame JC, Rolli V, Schreiber V, Niedergang C, Apiou F, Decker P, Muller S, Hoger T, Menissier-De M J and De Murcia G (1999) PARP-2, A Novel Mammalian DNA Damage-Dependent Poly(ADP-Ribose) Polymerase. *J Biol Chem* **274**: 17860-17868.
- Aoki K, Maruta H, Uchiumi F, Hatano T, Yoshida T and Tanuma S (1995) A Macrocircular Ellagitannin, Oenothien B, Suppresses Mouse Mammary Tumor Gene Expression Via Inhibition of Poly(ADP-Ribose) Glycohydrolase. *Biochem Biophys Res Commun* **210**: 329-337.
- Ariumi Y, Masutani M, Copeland T D, Mimori T, Sugimura T, Shimotohno K, Ueda K, Hatanaka M and Noda M (1999) Suppression of the Poly(ADP-Ribose) Polymerase Activity by DNA-Dependent Protein Kinase in Vitro. *Oncogene* **18**: 4616-4625.
- Arteel GE, Briviba K, Sies H. (1999) Protection against peroxynitrite. *FEBS Lett* **445**:226-30.
- Baeuerle PA, Baltimore D. (1996) NF-kappa B: ten years after. *Cell* **87**:13-20
- Bakondi E, Bai P, Szabó E, Hunyadi J, Gergely P, Szabó C and Virág L (2002) Detection of Poly(ADP-ribose) Polymerase Activation in Oxidatively Stressed Cells and Tissues Using Biotinylated NAD Substrate. *J.Histochem.Cytochem.* **50**: 91-98.
- Bauer PI, Farkas G, Buday L, Mikala G, Meszaros G, Kun E and Farago A (1992) Inhibition of DNA Binding by the Phosphorylation of Poly ADP-Ribose Polymerase Protein Catalysed by Protein Kinase C. *Biochem Biophys Res Commun* **187**: 730-736.
- Bauer PI, Farkas G, Mihalik R, Kopper L, Kun E, Farago A. (1994) Phosphorylation of poly(ADP-ribose)polymerase protein in human peripheral lymphocytes stimulated with phytohemagglutinin. *Biochim Biophys Acta* **1223**:234-9.
- Beckman J S. Oxidative damage and tyrosine nitration from peroxynitrite. (1996) *Chem ResToxicol* **9**: 836-844.
- Beckman JS, Beckman T W, Chen J, Marshall P A and Freeman B A (1990) Apparent Hydroxyl Radical Production by Peroxynitrite: Implications for Endothelial Injury From Nitric Oxide and Superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 1620-1624.
- Beckman JS, Koppenol WH (1996) Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* **271(5 Pt 1)**:C1424-37.

- Berger NA, Sims J L, Catino D M and Berger S J (1983) Poly(ADP-Ribose) Polymerase Mediates the Suicide Response to Massive DNA Damage: Studies in Normal and DNA-Repair Defective Cells. *Princess Takamatsu Symp* **13**: 219-226.
- Berger SJ, Sudar D C and Berger N A (1986) Metabolic Consequences of DNA Damage: DNA Damage Induces Alterations in Glucose Metabolism by Activation of Poly (ADP-Ribose) Polymerase. *Biochem Biophys Res Commun* **134**: 227-232.
- Bergeron MJ, Leclerc S, Laniel M A, Poirier G G and Guerin S L (1997) Transcriptional Regulation of the Rat Poly(ADP-Ribose) Polymerase Gene by Sp1. *Eur J Biochem* **250**: 342-353.
- Berlett BS, Levine RL, Stadtman ER. (1998) Carbon dioxide stimulates peroxynitrite-mediated nitration of tyrosine residues and inhibits oxidation of methionine residues of glutamine synthetase: both modifications mimic effects of adenylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:2784-9.
- Berry DM, Williams K and Meckling-Gill K A (2000) All Trans Retinoic Acid Induces Apoptosis in Acute Promyelocytic NB4 Cells When Combined With Isoquinolinediol, a Poly(ADP-Ribose) Polymerase Inhibitor. *Leuk Res* **24**: 307-316.
- Bhatia M, Kirkland J B and Meckling-Gill K A (1995) Modulation of Poly(ADP-Ribose) Polymerase During Neutrophilic and Monocytic Differentiation of Promyelocytic (NB4) and Myelocytic (HL-60) Leukaemia Cells. *Biochem J* **308**: 131-137.
- Bhatia M, Kirkland J B and Meckling-Gill K A (1996) Overexpression of Poly(ADP-Ribose) Polymerase Promotes Cell Cycle Arrest and Inhibits Neutrophilic Differentiation of NB4 Acute Promyelocytic Leukemia Cells. *Cell Growth Differ* **7**: 91-100.
- Bonfoco E, Krainc D, Ankarcrona M, Nicotera P and Lipton S A (1995) Apoptosis and Necrosis: Two Distinct Events Induced, Respectively, by Mild and Intense Insults With N-Methyl-D-Aspartate or Nitric Oxide/Superoxide in Cortical Cell Cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 7162-7166.
- Borek C, Morgan WF, Ong A, Cleaver JE. (1984) Inhibition of malignant transformation in vitro by inhibitors of poly(ADP-ribose) synthesis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **81**:243-247.
- Boulikas T (1990) Poly(ADP-Ribosylated) Histones in Chromatin Replication. *J Biol Chem* **265**: 14638-14647.
- Brochu G, Duchaine C, Thibeault L, Lagueux J, Shah G M and Poirier G G (1994) Mode of Action of Poly(ADP-Ribose) Glycohydrolase. *Biochim Biophys Acta* **1219**: 342-350.
- Brownlee M. (2001) Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* **414**:813-20.
- Burkle A (2001) Physiology and Pathophysiology of Poly(ADP-Ribosyl)ation. *Bioessays* **23**: 795-806.
- Cervellera MN and Sala A (2000) Poly(ADP-Ribose) Polymerase Is a B-MYB Coactivator. *J Biol Chem* **275**: 10692-10696.

- Chang WJ and Alvarez-Gonzalez R (2001) The Sequence-Specific DNA Binding of NF-Kappa B Is Reversibly Regulated by the Automodification Reaction of Poly (ADP-Ribose) Polymerase 1. *J Biol Chem* **276**: 47664-47670.
- Chatterjee S, Cheng M F, Trivedi D, Petzold S J and Berger N A (1989) Camptothecin Hypersensitivity in Poly(Adenosine Diphosphate-Ribose) Polymerase-Deficient Cell Lines. *Cancer Commun* **1**: 389-394.
- Chatterjee S, Cheng M F and Berger N A (1990a) Hypersensitivity to Clinically Useful Alkylating Agents and Radiation in Poly(ADP-Ribose) Polymerase-Deficient Cell Lines. *Cancer Commun* **2**: 401-407.
- Chatterjee S, Trivedi D, Petzold S J and Berger N A (1990b) Mechanism of Epipodophyllotoxin-Induced Cell Death in Poly(Adenosine Diphosphate-Ribose) Synthesis-Deficient V79 Chinese Hamster Cell Lines. *Cancer Res* **50**: 2713-2718.
- Cherney BW, Midura R J and Caplan A I (1985) Poly(ADP-Ribose) Synthetase and Chick Limb Mesenchymal Cell Differentiation. *Dev Biol* **112**: 115-125.
- Chi NW and Lodish H F (2000) Tankyrase Is a Golgi-Associated Mitogen-Activated Protein Kinase Substrate That Interacts With IRAP in GLUT4 Vesicles. *J Biol Chem* **275**: 38437-38444.
- Coppola S, Nosseri C, Maresca V and Ghibelli L (1995) Different Basal NAD Levels Determine Opposite Effects of Poly(ADP-Ribosyl)Polymerase Inhibitors on H2O2-Induced Apoptosis. *Exp Cell Res* **221**: 462-469.
- Cotton S A, Herrick A L, Jayson M I, Freemont A J. (1999) Endothelial expression of nitric oxide synthases and nitrotyrosine in systemic sclerosis skin. *J Pathol* **189**: 273-278.
- Crow J P, Beckman J S. (1995) Reactions between nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: footprints of peroxynitrite in vivo. *Adv Pharmacol* **34**: 17-43.
- Crow J P, Ischiropoulos H. (1996) Detection and quantitation of nitrotyrosine residues in proteins: in vivo marker of peroxynitrite. *Methods Enzymol* **269**:185-194.
- Crowley CL, Payne C M, Bernstein H, Bernstein C and Roe D (2000) The NAD⁺ Precursors, Nicotinic Acid and Nicotinamide Protect Cells Against Apoptosis Induced by a Multiple Stress Inducer, Deoxycholate. *Cell Death Differ* **7**: 314-326.
- D'Amours D, Sallmann F R, Dixit V M and Poirier G G (2001) Gain-of-Function of Poly(ADP-Ribose) Polymerase-1 Upon Cleavage by Apoptotic Proteases: Implications for Apoptosis. *J Cell Sci* **114**: 3771-3778.
- Dantzer F, Nasheuer H P, Vonesch J L, De Murcia G and Menissier-De M J (1998) Functional Association of Poly(ADP-Ribose) Polymerase With DNA Polymerase Alpha-Primase Complex: a Link Between DNA Strand Break Detection and DNA Replication. *Nucleic Acids Res* **26**: 1891-1898.
- Dantzer F, de La Rubia G, Menissier-De M J, Hostomsky Z, De Murcia G and Schreiber V (2000) Base Excision Repair Is Impaired in Mammalian Cells Lacking Poly(ADP-Ribose) Polymerase-1. *Biochemistry* **39**: 7559-7569.

Davidovic L, Vodenicharov M, Affar E B and Poirier G G (2001) Importance of Poly(ADP-Ribose) Glycohydrolase in the Control of Poly(ADP-Ribose) Metabolism. *Exp Cell Res* **268**: 7-13.

Deliconstantinos G, Villiotou V, Stavrides J C. (1995) Release by ultraviolet B (UVB) radiation of nitric oxide (NO) from human keratinocytes: a potential role for nitric oxide in erythema production. *Br J Pharmacol*. **114**: 1257-1265.

Deliconstantinos G, Villiotou V, Stavrides J C. (1996a) Alterations of nitric oxide synthase and xanthine oxidase activities of human keratinocytes by ultraviolet B radiation. Potential role for peroxynitrite in skin inflammation. *Biochem Pharmacol* **51**: 1727-1738.

Deliconstantinos G, Villiotou V, Stavrides J C. (1996b) Increase of particulate nitric oxide synthase activity and peroxynitrite synthesis in UVB-irradiated keratinocyte membranes. *Biochem J* **320**: 997-1003.

Deliconstantinos G, Villiotou V, Stavrides J C. (1996c) Nitric oxide and peroxynitrite released by ultraviolet B-irradiated human endothelial cells are possibly involved in skin erythema and inflammation. *Exp Physiol* **81**:1021-1033.

de Murcia G., Jongstra-Bilen J, Ittel M.-E, Mandel P, and Delain E (1983). Poly(ADP-ribose) polymerase auto-modification and interaction with DNA: electron microscopic visualization. *EMBO J*. **2**: 543-548.

de Murcia G, Huletsky A, Lamarre D, Gaudreau A, Pouyet J, Daune M and Poirier G G (1986) Modulation of Chromatin Superstructure Induced by Poly(ADP-Ribose) Synthesis and Degradation. *J Biol Chem* **261**: 7011-7017.

de Murcia G and Menissier de Murcia J (1994) Poly(ADP-Ribose) Polymerase: a Molecular Nick-Sensor. *Trends Biochem Sci* **19**: 172-176.

de Murcia G, Schreiber V, Molinete M, Saulier B, Poch O, Masson M, Niedergang C and Menissier de Murcia J (1994) Structure and Function of Poly(ADP-Ribose) Polymerase. *Mol Cell Biochem* **138**: 15-24.

de Murcia JM, Niedergang C, Trucco C, Ricoul M, Dutrillaux B, Mark M, Oliver F J, Masson M, Dierich A, LeMeur M, Walztinger C, Chambon P and De Murcia G (1997) Requirement of Poly(ADP-Ribose) Polymerase in Recovery From DNA Damage in Mice and in Cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 7303-7307.

de Rojas-Walker T, Tamir S, Ji H, Wishnok JS, Tannenbaum SR. (1995) Nitric oxide induces oxidative damage in addition to deamination in macrophage DNA. *Chem Res Toxicol* **8**:473-7

Didier M, Bursztajn S, Adamec E, Passani L, Nixon RA, Coyle JT, Wei JY, Berman SA (1996) DNA strand breaks induced by sustained glutamate excitotoxicity in primary neuronal cultures. *J Neurosci* **16**:2238-50.

Doucet-Chabeaud G, Godon C, Brutesco C, De Murcia G and Kazmaier M (2001) Ionising Radiation Induces the Expression of PARP-1 and PARP-2 Genes in Arabidopsis. *Mol Genet Genomics* **265**: 954-963.

- Durkacz BW, Lunec J, Grindley H, Griffin S, Horner O and Simm A (1992) Murine Melanoma Cell Differentiation and Melanogenesis Induced by Poly(ADP-Ribose) Polymerase Inhibitors. *Exp Cell Res* **202**: 287-291.
- Ehrlich W, Huser H and Kroger H (1995) Inhibition of the Induction of Collagenase by Interleukin-1 Beta in Cultured Rabbit Synovial Fibroblasts After Treatment With the Poly(ADP-Ribose)-Polymerase Inhibitor 3-Aminobenzamide. *Rheumatol Int* **15**: 171-172.
- Eiserich J P, Cross C E, Jones A D, Halliwell B, van der Vliet A. (1996) Formation of nitrating and chlorinating species by reaction of nitrite with hypochlorous acid. A novel mechanism for nitric oxide-mediated protein modification. *J Biol Chem* **271**: 19199-19208.
- Eiserich J P, Hristova M, Cross C E, et al. (1998) Formation of nitric oxide-derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils. *Nature* **391**: 393-397.
- Eliasson MJ, Sampei K, Mandir A S, Hurn P D, Traystman R J, Bao J, Pieper A, Wang Z Q, Dawson T M, Snyder S H and Dawson V L (1997) Poly(ADP-Ribose) Polymerase Gene Disruption Renders Mice Resistant to Cerebral Ischemia. *Nat Med* **3**: 1089-1095.
- Endres M, Scott G, Namura S, Salzman A L, Huang P L, Moskowitz M A and Szabó C (1998) Role of Peroxynitrite and Neuronal Nitric Oxide Synthase in the Activation of Poly(ADP-Ribose) Synthetase in a Murine Model of Cerebral Ischemia-Reperfusion. *Neurosci Lett* **248**: 41-44.
- Estevez AG, Radi R, Barbeito L, Shin JT, Thompson JA, Beckman JS (1995) Peroxynitrite-induced cytotoxicity in PC12 cells: evidence for an apoptotic mechanism differentially modulated by neurotrophic factors *J Neurochem* **65**:1543-50.
- Exley R, Gordon J and Clemens M J (1987) Induction of B-Cell Differentiation Antigens in Interferon- or Phorbol Ester-Treated Daudi Cells Is Impaired by Inhibitors of ADP-Ribosyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**: 6467-6470.
- Farkas B, Magyarlaki M, Csete B, Nemeth J, Rablóczy G, Bernath S, Literati Nagy P, Sumegi B. (2002) Reduction of acute photodamage in skin by topical application of a novel PARP inhibitor. *Biochem Pharmacol* **63**:921-32
- Faro R, Toyoda Y, McCully J, Jagtap P, Szabó E, Virág L, Bianchi C, Levitsky S and Szabó C (2002) Protective Effect on Regional Myocardial Function and Infarct Size Induced by PJ34: a Novel Poly (ADP-Ribose) Synthetase Inhibitor. *Ann Thorac Surg*. **73**:575-581
- Filep JG, Beauchamp M, Baron C, Paquette Y. (1998) Peroxynitrite mediates IL-8 gene expression and production in lipopolysaccharide-stimulated human whole blood. *J Immunol* **161**:5656-62.
- Filipovic DM, Meng X, Reeves WB (1999) Inhibition of PARP prevents oxidant-induced necrosis but not apoptosis in LLC-PK1 cells. *Am J Physiol* **277(3 Pt 2)**:F428-36.
- Fiorillo C, Pace S, Ponziani V, Nediani C, Perna AM, Liguori P, Cecchi C, Nassi N, Donzelli GP, Formigli L, Nassi P. (2002) Poly(ADP-ribose) polymerase activation and cell injury in the course of rat heart heterotopic transplantation. *Free Radic Res* **36**:79-87.

Francis GE, Gray D A, Berney J J, Wing M A, Guimaraes J E and Hoffbrand A V (1983) Role of ADP-Ribosyl Transferase in Differentiation of Human Granulocyte-Macrophage Progenitors to the Macrophage Lineage. *Blood* **62**: 1055-1062.

Fridovich I. (1999) Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen? *Ann N Y Acad Sci* **893**:13-18.

Gal I, Varga T, Szilagyí I, Balázs M, Schlammadinger J, Szabó G Jr (2000) Protease-elicited TUNEL positivity of non-apoptotic fixed cells. *J Histochem Cytochem*, **48**:963-70.

Germain M, Affar E B, D'Amours D, Dixit V M, Salvesen G S and Poirier G G (1999) Cleavage of Automodified Poly(ADP-Ribose) Polymerase During Apoptosis. Evidence for Involvement of Caspase-7. *J Biol Chem* **274**: 28379-28384.

Ghibelli L, Nosseri C, Coppola S, Maresca V and Dini L (1995) The Increase in H₂O₂-Induced Apoptosis by ADP-Ribosylation Inhibitors Is Related to Cell Blebbing. *Exp Cell Res* **221**: 470-477.

Giorgio S, Linares E, Capurro M, de Bianchi A G, Augusto O. (1996) Formation of nitrosyl hemoglobin and nitrotyrosine during murine leishmaniasis. *Photochem Photobiol* **63**: 750-754.

Go Y M, Patel R P, Maland M C, et al. (1999) Evidence for peroxynitrite as a signaling molecule in flow-dependent activation of c-Jun NH(2)-terminal kinase. *Am J Physiol* **277**: H1647-1653.

Goldfarb RH, Marton A, Szabó E, Virág L, Glock D, Mc Carthy R, Parillo J E and Szabó C (2002) Protective Effect of a Novel, Potent Inhibitor of Poly (ADP-Ribose) Synthetase in a Porcine Model of Severe Bacterial Sepsis. *Crit Care Med.* **30**:974-980.

Goureau O, Bellot J, Thillaye B, Courtois Y, de Kozak Y. (1995) Increased nitric oxide production in endotoxin-induced uveitis. Reduction of uveitis by an inhibitor of nitric oxide synthase. *J Immunol* **154**:6518-23.

Gow A J, Duran D, Malcolm S, Ischiropoulos H. (1996a) Effects of peroxynitrite-induced protein modifications on tyrosine phosphorylation and degradation. *FEBS Lett* **385**: 63-66.

Gow A, Duran D, Thom S R, Ischiropoulos H. (1996b) Carbon dioxide enhancement of peroxynitrite-mediated protein tyrosine nitration. *Arch Biochem Biophys* **333**: 42-48.

Grabbe S, Schwarz T. (1998) Immunoregulatory mechanisms involved in elicitation of allergic contact hypersensitivity. *Immunol Today* **19**:37-44.

Greenacre S A, Evans P, Halliwell B, Brain S D. (1999) Formation and loss of nitrated proteins in peroxynitrite-treated rat skin in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* **262**: 781-786.

- Groves JT (1999) Peroxynitrite: reactive, invasive and enigmatic. *Curr Opin Chem Biol* **3**:226-35.
- Guittet O, Ducastel B, Salem J S, et al. (1998) Differential sensitivity of the tyrosyl radical of mouse ribonucleotide reductase to nitric oxide and peroxynitrite. *J Biol Chem* **273**: 22136-22144.
- Gunther M R, Hsi L C, Curtis J F, et al. (1997) Nitric oxide trapping of the tyrosyl radical of prostaglandin H synthase-2 leads to tyrosine iminoxyl radical and nitrotyrosine formation. *J Biol Chem* **272**: 17086-17090.
- Guo TL, Miller M A, Datar S, Shapiro I M and Shenker B J (1998) Inhibition of Poly(ADP-Ribose) Polymerase Rescues Human T Lymphocytes From Methylmercury-Induced Apoptosis. *Toxicol Appl Pharmacol* **152**: 397-405.
- Ha HC, Snyder SH (1999) Poly(ADP-ribose) polymerase is a mediator of necrotic cell death by ATP depletion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:13978-82.
- Hassa PO, Covic M, Hasan S, Imhof R and Hottiger M O (2001) The Enzymatic and DNA Binding Activity of PARP-1 Are Not Required for NF-Kappa B Coactivator Function. *J Biol Chem* **276**: 45588-45597.
- Hatekayama K, Nemoto Y, Ueda Y and Hayashi O (1986) Purification and Characterization of Poly(ADP-Ribose) Glycohydrolase. Different Modes of Action on Large and Small Poly(ADP-Ribose). *J Biol Chem* **261**: 14902-14911.
- Hattori Y, Nishigori C, Tanaka T, et al. (1996) 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine is increased in epidermal cells of hairless mice after chronic ultraviolet B exposure. *J Invest Dermatol* **107**: 733-737.
- Hauschildt S, Scheipers P and Bessler W G (1991) Inhibitors of Poly (ADP-Ribose) Polymerase Suppress Lipopolysaccharide-Induced Nitrite Formation in Macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* **179**: 865-871.
- Hauschildt S, Scheipers P, Bessler W G and Mulsch A (1992) Induction of Nitric Oxide Synthase in L929 Cells by Tumour-Necrosis Factor Alpha Is Prevented by Inhibitors of Poly(ADP-Ribose) Polymerase. *Biochem J* **288**: 255-600.
- Heller B, Wang Z Q, Wagner E F, Radons J, Burkle A, Fehsel K, Burkart V and Kolb H (1995) Inactivation of the Poly(ADP-Ribose) Polymerase Gene Affects Oxygen Radical and Nitric Oxide Toxicity in Islet Cells. *J Biol Chem* **270**: 11176-11180.
- Herceg Z, Wang ZG (1999) Failure of poly(ADP-ribose) polymerase cleavage by caspases leads to induction of necrosis and enhanced apoptosis. *Mol Cell Biol* **19**: 5124-5133.
- Hinshaw D B, Lodhi I J, Hurley L L, Atkins K B, Dabrowska M I. (1999) Activation of poly [ADP-Ribose] polymerase in endothelial cells and keratinocytes: role in an in vitro model of sulfur mustard-mediated vesication. *Toxicol Appl Pharmacol* **156**: 17-29.
- Hiromatsu Y, Sato M, Yamada K and Nonaka K (1992) Nicotinamide and 3-Aminobenzamide Inhibit Recombinant Human Interferon-Gamma-Induced HLA-DR Antigen

Expression, but Not HLA-A, B, C Antigen Expression, on Cultured Human Thyroid Cells. *Clin Endocrinol (Oxf)* **36**: 91-95.

Homburg S, Visochek L, Moran N, Dantzer F, Priel E, Asculai E, Schwartz D, Rotter V, Dekel N and Cohen-Armon M A (2000) Fast Signal-Induced Activation of Poly(ADP-Ribose) Polymerase: a Novel Downstream Target of Phospholipase c. *J Cell Biol* **150**: 293-307.

Ischiropoulos H, Zhu L, Chen J, et al. (1992) Peroxynitrite-mediated tyrosine nitration catalyzed by superoxide dismutase. *Arch Biochem Biophys* **298**: 431-437.

Jagtap P, Soriano F G, Virág L, Liaudet L, Mabley J, Szabó E, Hasko G, Marton A, Lorigados C B, Gallyas F, Sumegi B, Huang H, Hoyt D G, Southan G J and Szabó C (2002) Novel Phenanthridinone Inhibitors of Poly(ADP-Ribose) Synthetase: Potent Cytoprotective and Anti-Shock Agents. *Crit Care Med*.**30**:1071-1082.

Jonsson GG, Jacobson E L and Jacobson M K (1988a) Mechanism of Alteration of Poly(Adenosine Diphosphate-Ribose) Metabolism by Hyperthermia. *Cancer Res* **48**:4233-4239.

Jonsson GG, Menard L, Jacobson E L, Poirier G G and Jacobson M K (1988b) Effect of Hyperthermia on Poly(Adenosine Diphosphate-Ribose) Glycohydrolase. *Cancer Res* **48**: 4240-4243.

Jung M, Davis WP, Taatjes DJ, Churg A, Mossman BT (2000) Asbestos and cigarette smoke cause increased DNA strand breaks and necrosis in bronchiolar epithelial cells in vivo. *Free Radic Biol Med* **28**:1295-9.

Kaminker PG, Kim S H, Taylor R D, Zebarjadian Y, Funk W D, Morin G B, Yaswen P and Campisi J (2001) TANK2, a New TRF1-Associated Poly(ADP-Ribose) Polymerase, Causes Rapid Induction of Cell Death Upon Overexpression. *J Biol Chem* **276**: 35891-35899.

Kanai Y, Tanuma S and Sugimura T (1981) Immunofluorescent Staining of Poly(ADP-Ribose) in Situ in HeLa Cell Chromosomes in the M Phase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**: 2801-2804.

Kaufmann SH, Desnoyers S, Ottaviano Y, Davidson N E and Poirier G G (1993) Specific Proteolytic Cleavage of Poly(ADP-Ribose) Polymerase: an Early Marker of Chemotherapy-Induced Apoptosis. *Cancer Res* **53**: 3976-3985.

Kawaichi M, Ueda K and Hayaishi O (1981) Multiple Autopoly(ADP-Ribosyl)ation of Rat Liver Poly(ADP-Ribose) Synthetase. Mode of Modification and Properties of Automodified Synthetase. *J Biol Chem* **256**: 9483-9489.

Kickhoefer VA, Siva A C, Kedersha N L, Inman E M, Ruland C, Streuli M and Rome L H (1999) The 193-KD Vault Protein, VPARP, Is a Novel Poly(ADP-Ribose) Polymerase. *J Cell Biol* **146**: 917-928.

Kickhoefer VA, Vasu S K and Rome L H (1996) Vaults Are the Answer, What Is the Question? *Trends Cell Biol* **6**: 174-178.

Kim JW, Kim K, Kang K and Joe CO (2000a) Inhibition of Homodimerization of Poly(ADP-Ribose) Polymerase by Its C-Terminal Cleavage Products Produced During Apoptosis. *J Biol Chem* **275**: 8121-8125.

Kim JW, Won J, Sohn S and Joe CO (2000b) DNA-Binding Activity of the N-Terminal Cleavage Product of Poly(ADP-Ribose) Polymerase Is Required for UV Mediated Apoptosis. *J Cell Sci* **113**: 955-961.

Klaidman LK, Mukherjee S K, Hutchin T P and Adams J D (1996) Nicotinamide As a Precursor for NAD⁺ Prevents Apoptosis in the Mouse Brain Induced by Tertiary-Butylhydroperoxide. *Neurosci Lett* **206**: 5-8.

Klotz L O, Schieke S M, Sies H, Holbrook N J. (2000) Peroxynitrite activates the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway in human skin primary fibroblasts. *Biochem J* **352 Pt 1**: 219-225.

Kong S K, Yim M B, Stadtman E R, Chock P B. (1996) Peroxynitrite disables the tyrosine phosphorylation regulatory mechanism: Lymphocyte-specific tyrosine kinase fails to phosphorylate nitrated cdc2(6-20)NH₂ peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 3377-3382.

Kuhn D M, Aretha C W, Geddes T J. (1999a) Peroxynitrite inactivation of tyrosine hydroxylase: mediation by sulfhydryl oxidation, not tyrosine nitration. *J Neurosci.* **19**:10289-94.

Kuhn D M, Geddes T J. (1999b) Peroxynitrite inactivates tryptophan hydroxylase via sulfhydryl oxidation. Coincident nitration of enzyme tyrosyl residues has minimal impact on catalytic activity. *J Biol Chem* **274**:29726-32.

Kumari SR, Mendoza-Alvarez H and Alvarez-Gonzalez R (1998) Functional Interactions of P53 With Poly(ADP-Ribose) Polymerase (PARP) During Apoptosis Following DNA Damage: Covalent Poly(ADP-Ribosyl)ation of P53 by Exogenous PARP and Noncovalent Binding of P53 to the M(r) 85,000 Proteolytic Fragment. *Cancer Res* **58**: 5075-5078.

Kuo ML, Chau Y P, Wang J H and Shiah S G (1996) Inhibitors of Poly(ADP-Ribose) Polymerase Block Nitric Oxide-Induced Apoptosis but Not Differentiation in Human Leukemia HL-60 Cells. *Biochem Biophys Res Commun* **219**: 502-508.

Lazebnik YA, Kaufmann S H, Desnoyers S, Poirier G G and Earnshaw W C (1994) Cleavage of Poly(ADP-Ribose) Polymerase by a Proteinase With Properties Like ICE. *Nature* **371**: 346-347.

Leduc Y, Lawrence J J, De Murcia G and Poirier G G (1988) Cell Cycle Regulation of Poly(ADP-Ribose) Synthetase in FR3T3 Cells. *Biochim Biophys Acta* **968**: 275-282.

Leist M, Single B, Castoldi A F, Kuhnle S and Nicotera P (1997a) Intracellular Adenosine Triphosphate (ATP) Concentration: a Switch in the Decision Between Apoptosis and Necrosis. *J Exp Med* **185**: 1481-1486.

Leist M, Single B, Kunstle G, Volbracht C, Hentze H and Nicotera P (1997b) Apoptosis in the Absence of Poly-(ADP-Ribose) Polymerase. *Biochem Biophys Res Commun* **233**: 518-522.

- Leist M, Single B, Naumann H, Fava E, Simon B, Kuhnle S and Nicotera P (1999) Inhibition of Mitochondrial ATP Generation by Nitric Oxide Switches Apoptosis to Necrosis. *Exp Cell Res* **249**: 396-403.
- Lelli JLJ, Becks L L, Dabrowska M I and Hinshaw D B (1998) ATP Converts Necrosis to Apoptosis in Oxidant-Injured Endothelial Cells. *Free Radic Biol Med* **25**: 694-702.
- Lerner LH, Qureshi AA, Reddy BV, Lerner EA. (2000) Nitric oxide synthase in toxic epidermal necrolysis and Stevens-Johnson syndrome. *J Invest Dermatol.*; **114**:196-9.
- Liaudet, L., Pacher, P., Virág, L., Soriano, F. G., Hasko, G., and Szabó, C. (2002) Activation of poly(ADP-ribose) polymerase is a central mechanism of lipopolysaccharide-induced acute pulmonary inflammation. *Am.J.Respir.Crit.Care Med.* **165**:372-7.
- Lieberthal W, Menza S A and Levine J S (1998) Graded ATP Depletion Can Cause Necrosis or Apoptosis of Cultured Mouse Proximal Tubular Cells. *Am J Physiol* **274**: F315-F327.
- Lin W, Ame J C, Aboul-Ela N, Jacobson E L and Jacobson M K (1997) Isolation and Characterization of the cDNA Encoding Bovine Poly(ADP-Ribose) Glycohydrolase. *J Biol Chem* **272**: 11895-11901.
- Lin KT, Xue JY, Nomen M, Spur B, Wong PY (1995) Peroxynitrite-induced apoptosis in HL-60 cells. *J Biol Chem* **270**:16487-90.
- Lindahl T, Satoh M S, Poirier G G and Klungland A (1995) Post-Translational Modification of Poly(ADP-Ribose) Polymerase Induced by DNA Strand Breaks. *Trends Biochem Sci* **20**: 405-411.
- Liversidge J, Dick A, Gordon S. (2002) Nitric oxide mediates apoptosis through formation of peroxynitrite and Fas/Fas-ligand interactions in experimental autoimmune uveitis. *Am J Pathol* **160**:905-16.
- Lyons RJ, Deane R, Lynch D K, Ye Z S, Sanderson G M, Eyre H J, Sutherland G R and Daly R J (2001) Identification of a Novel Human Tankyrase Through Its Interaction With the Adaptor Protein Grb14. *J Biol Chem* **276**: 17172-17180.
- Ma Q, Baldwin K T, Renzelli A J, McDaniel A and Dong L (2001) TCDD-Inducible Poly(ADP-Ribose) Polymerase: A Novel Response to 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin. *Biochem Biophys Res Commun* **289**: 499-506.
- Ma XL, Lopez BL, Liu GL, Christopher TA, Ischiropoulos H (1997) Peroxynitrite aggravates myocardial reperfusion injury in the isolated perfused rat heart. *Cardiovasc Res* **36**:195-204,
- Mabley JG, Liaudet L, Pacher P, Southan GJ, Salzman AL, Szabó C. (2002) Part II: Beneficial Effects of the Peroxynitrite Decomposition Catalyst FP15 in Murine Models of Arthritis and Colitis. *Mol Med.* **8**:581-90.
- MacMillan-Crow L A, Crow J P, Thompson J A. (1998) Peroxynitrite-mediated inactivation of manganese superoxide dismutase involves nitration and oxidation of critical tyrosine residues. *Biochemistry* **37**: 1613-1622.

- Malanga M, Pleschke J M, Kleczkowska H E and Althaus F R (1998) Poly(ADP-Ribose) Binds to Specific Domains of P53 and Alters Its DNA Binding Functions. *J Biol Chem* **273**: 11839-11843.
- Mallozzi C, Di Stasi A M, Minetti M. (1999) Activation of src tyrosine kinases by peroxynitrite. *FEBS Lett* **456**: 201-206.
- Masson M, Niedergang C, Schreiber V, Muller S, Menissier-De M J and De Murcia G (1998) XRCC1 Is Specifically Associated With Poly(ADP-Ribose) Polymerase and Negatively Regulates Its Activity Following DNA Damage. *Mol Cell Biol* **18**: 3563-3571.
- Masutani M, Nozaki T, Watanabe M, Ochiya T, Hasegawa F, Nakagama H, Suzuki H and Sugimura T (2001) Involvement of Poly(ADP-Ribose) Polymerase in Trophoblastic Cell Differentiation During Tumorigenesis. *Mutat Res* **477**: 111-117.
- Mazen A, Menissier-De Murcia J, Molinete M, Simonin F, Gradwohl G, Poirier G and De Murcia G (1989) Poly(ADP-Ribose) Polymerase: a Novel Finger Protein. *Nucleic Acids Res* **17**: 4689-4698.
- McMenamin PG, Crewe J. (1995) Endotoxin-induced uveitis. Kinetics and phenotype of the inflammatory cell infiltrate and the response of the resident tissue macrophages and dendritic cells in the iris and ciliary body. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **36**:1949-59.
- Meisterernst M, Stelzer G and Roeder R G (1997) Poly(ADP-Ribose) Polymerase Enhances Activator-Dependent Transcription in Vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 2261-2265.
- Miesel R, Kurpisz M and Kroger H (1995) Modulation of Inflammatory Arthritis by Inhibition of Poly(ADP Ribose) Polymerase. *Inflammation* **19**: 379-387.
- Mihm MJ, Jing L, Bauer JA (2000) Nitrotyrosine causes selective vascular endothelial dysfunction and DNA damage. *J Cardiovasc Pharmacol* **36**:182-7.
- Miwa M and Sugimura T (1971) Splitting of the Ribose-Ribose Linkage of Poly(Adenosine Diphosphate Ribose) by a Calf Thymus Extract. *J Biol Chem* **246**: 6362-6364.
- Miwa M, Tanaka M, Matsushima T and Sugimura (1974) Purification and Properties of Glycohydrolase From Calf Thymus Splitting Ribose-Ribose Linkages of Poly(Adenosine Diphosphate Ribose). *J Biol Chem* **249**: 3475-3482.
- Molinete M, Vermeulen W, Burkle A, Menissier-De M J, Kupper J H, Hoeijmakers J H and De Murcia G (1993) Overproduction of the Poly(ADP-Ribose) Polymerase DNA-Binding Domain Blocks Alkylation-Induced DNA Repair Synthesis in Mammalian Cells. *EMBO J* **12**: 2109-2117.
- Morioka K, Tanaka K, Nokuo T, Ishizawa M and Ono T (1979) Erythroid Differentiation and Poly(ADP-Ribose) Synthesis in Friend Leukemia Cells. *Gann* **70**: 37-46.
- Mukherjee SK, Klaidman L K, Yasharel R and Adams J D J (1997) Increased Brain NAD Prevents Neuronal Apoptosis in Vivo. *Eur J Pharmacol* **330**: 27-34.

- Nagele A (1995) Poly(ADP-Ribosyl)ation As a Fail-Safe, Transcription-Independent, Suicide Mechanism in Acutely DNA-Damaged Cells: a Hypothesis. *Radiat Environ Biophys* **34**: 251-254.
- Nicotera P, Leist M and Ferrando-May E (1998) Intracellular ATP, a Switch in the Decision Between Apoptosis and Necrosis. *Toxicol Lett* **102-103**: 139-142.
- Nicotera P, Leist M and Ferrando-May E (1999) Apoptosis and Necrosis: Different Execution of the Same Death. *Biochem Soc Symp* **66**: 69-73.
- Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, Yorek MA, Beebe D, Oates PJ, Hammes HP, Giardino I, Brownlee M. (2000) Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* **404**:787-90.
- Nishio A, Nakanishi S, Doull J and Uyeki E M (1983) Enhanced Chondrocytic Differentiation in Chick Limb Bud Cell Cultures by Inhibitors of Poly(ADP-Ribose) Synthetase. *Biochem Biophys Res Commun* **111**: 750-759.
- Oh-hashi K, Maruyama W, Yi H, Takahashi T, Naoi M, Isobe K. (1999) Mitogen-activated protein kinase pathway mediates peroxynitrite-induced apoptosis in human dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Biochem Biophys Res Commun* **263**: 504-509.
- Oka J, Ueda K, Hayaishi O, Komura H and Nakanishi K (1984) ADP-Ribosyl Protein Lyase. Purification, Properties and Identification of the Product. *J Biol Chem* **259** : 986-995.
- Oliver FJ, Menissier-De MJ, Nacci C, Decker P, Andriantsitohaina R, Muller S, de La Rubia G, Stoclet JC, De Murcia G. (1999) Resistance to endotoxic shock as a consequence of defective NF-kappaB activation in poly (ADP-ribose) polymerase-1 deficient mice. *EMBO J*. **18**:4446-4454.
- Ormerod A D, Copeland P, Hay I, Husain A, Ewen S W. (1999) The inflammatory and cytotoxic effects of a nitric oxide releasing cream on normal skin. *J Invest Dermatol* **113**: 392-397.
- Pacher P, Liaudet L, Soriano F G, Mabley J, Szabó E and Szabó C (2002) The Role of Poly(ADP-Ribose) Polymerase in the Development of Myocardial and Endothelial Dysfunction in Diabetes Mellitus. *Diabetes*. **51**:514-521.
- Palomba L, Sestili P, Cattabeni F, Azzi A and Cantoni O (1996) Prevention of Necrosis and Activation of Apoptosis in Oxidatively Injured Human Myeloid Leukemia U937 Cells. *FEBS Lett* **390**: 91-94.
- Palomba L, Sestili P, Guidarelli A, et al. (2000) Products of the phospholipase A(2) pathway mediate the dihydrorhodamine fluorescence response evoked by endogenous and exogenous peroxynitrite in PC12 cells. *Free Radic Biol Med* **29**: 783-789.
- Park SD, Kim C G and Kim M G (1983) Inhibitors of Poly(ADP-Ribose) Polymerase Enhance DNA Strand Breaks, Excision Repair, and Sister Chromatid Exchanges Induced by Alkylating Agents. *Environ Mutagen* **5**: 515-525.

- Payne CM, Crowley C, Washo-Stultz D, Briehl M, Bernstein H, Bernstein C, Beard S, Holubec H and Warneke J (1998) The Stress-Response Proteins Poly(ADP-Ribose) Polymerase and NF-KappaB Protect Against Bile Salt-Induced Apoptosis. *Cell Death Differ* **5**: 623-636.
- Pellat-Deceunynck C, Wietzerbin J and Drapier J C (1994) Nicotinamide Inhibits Nitric Oxide Synthase mRNA Induction in Activated Macrophages. *Biochem J* **297**: 53-58.
- Perrin D, Koppenol W H. (2000) The quantitative oxidation of methionine to methionine sulfoxide by peroxynitrite. *Arch Biochem Biophys* **377**:266-72.
- Prendergast RA, Iliff CE, Coskuncan NM, Caspi RR, Sartani G, Tarrant TK et al. (1998) T cell traffic and the inflammatory response in experimental autoimmune uveoretinitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **39**: 754-62.
- Qu Z, Fujimoto S and Taniguchi T (1994) Enhancement of Interferon-Gamma-Induced Major Histocompatibility Complex Class II Gene Expression by Expressing an Antisense RNA of Poly(ADP-Ribose) Synthetase. *J Biol Chem* **269**: 5543-5547.
- Radi R, Beckman J S, Bush K M, Freeman B A. (1991a) Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J Biol Chem* **266**: 4244-4250.
- Radi R, Beckman J S, Bush K M, Freeman B A. (1991b) Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch Biochem Biophys* **288**: 481-487.
- Ran Z, Rayet B, Rommelaere J and Faisst S (1999) Parvovirus H-1-Induced Cell Death: Influence of Intracellular NAD Consumption on the Regulation of Necrosis and Apoptosis. *Virus Res* **65**: 161-174.
- Rastl E and Swetly P (1978) Expression of Poly(Adenosine Diphosphate-Ribose) Polymerase Activity in Erythroleukemic Mouse Cells During Cell Cycle and Erythropoietic Differentiation. *J Biol Chem* **253**: 4333-4340.
- Rawlingson A, Greenacre S A, Brain S D. (2000) Generation of peroxynitrite in localised, moderate temperature burns. *Burns* **26**: 223-227.
- Ray SD, Sorge C L, Kamendulis L M and Corcoran G B (1992) Ca(++)-Activated DNA Fragmentation and Dimethylnitrosamine-Induced Hepatic Necrosis: Effects of Ca(++)-Endonuclease and Poly(ADP-Ribose) Polymerase Inhibitors in Mice. *J Pharmacol Exp Ther* **263**: 387-394.
- Richardson DS, Allen P D, Kelsey S M and Newland A C (1999) Effects of PARP Inhibition on Drug and Fas-Induced Apoptosis in Leukaemic Cells. *Adv Exp Med Biol* **457**: 267-279.
- Salgo M G, Stone K, Squadrito G L, Battista J R, Pryor W A. (1995) Peroxynitrite causes DNA nicks in plasmid pBR322. *Biochem Biophys Res Commun* **210**: 1025-1030.

- Sallmann FR, Vodenicharov M D, Wang Z Q and Poirier G G (2000) Characterization of SPARP-1. An Alternative Product of PARP-1 Gene With Poly(ADP-Ribose) Polymerase Activity Independent of DNA Strand Breaks. *J Biol Chem* **275**: 15504-15511.
- Salvemini D, Wang ZQ, Stern MK, Currie MG, Misko TP. (1998) Peroxynitrite decomposition catalysts: therapeutics for peroxynitrite-mediated pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:2659-63.
- Salvemini D, Cuzzocrea S. (2002) Oxidative stress in septic shock and disseminated intravascular coagulation. *Free Radic Biol Med* **33**:1173-85.
- Sampson JB, Ye Y, Rosen H, Beckman JS. (1998) Myeloperoxidase and horseradish peroxidase catalyze tyrosine nitration in proteins from nitrite and hydrogen peroxide. *Arch. Biochem. Biophys.* **356**:207-213.
- Schieke S M, Briviba K, Klotz L O, Sies H. (1999) Activation pattern of mitogen-activated protein kinases elicited by peroxynitrite: attenuation by selenite supplementation. *FEBS Lett* **448**: 301-303.
- Schreiber V, Hunting D, Trucco C, Gowans B, Grunwald D, De Murcia G and de Murcia J M (1995) A Dominant-Negative Mutant of Human Poly(ADP-Ribose) Polymerase Affects Cell Recovery, Apoptosis, and Sister Chromatid Exchange Following DNA Damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 4753-4757.
- Shacter E, Beecham EJ, Covey JM, Kohn KW, Potter M. (1988) Activated neutrophils induce prolonged DNA damage in neighboring cells. *Carcinogenesis* **9**:2297-304
- Shall S and De Murcia G (2000) Poly(ADP-Ribose) Polymerase-1: What Have We Learned From the Deficient Mouse Model? *Mutat Res* **460**:1-15.
- Sharp C, Warren A, Oshima T, Williams L, Li JH, Alexander JS. (2001) Poly ADP ribose-polymerase inhibitors prevent the upregulation of ICAM-1 and E-selectin in response to Th1 cytokine stimulation. *Inflammation* **25**:157-63.
- Shen H, Ong C (2000) Detection of oxidative DNA damage in human sperm and its association with sperm function and male infertility. *Free Radic Biol Med* **28**:529-36.
- Shieh WM, Ame J C, Wilson M V, Wang Z Q, Koh D W, Jacobson M K and Jacobson E L (1998) Poly(ADP-Ribose) Polymerase Null Mouse Cells Synthesize ADP-Ribose Polymers. *J Biol Chem* **273**: 30069-30072.
- Shimizu K, Wu GS, Sultana C, Kalra VK, Rao NA. (1999) Stimulation of macrophages by retinal proteins: production of reactive nitrogen and oxygen metabolites. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **40**:3215-23
- Shimokawa T, Masutani M, Nagasawa S, Nozaki T, Ikota N, Aoki Y, Nakagama H and Sugimura T (1999) Isolation and Cloning of Rat Poly(ADP-Ribose) Glycohydrolase: Presence of a Potential Nuclear Export Signal Conserved in Mammalian Orthologs. *J Biochem (Tokyo)* **126**: 748-755.

Shiokawa D, Maruta H and Tanuma S (1997) Inhibitors of Poly(ADP-Ribose) Polymerase Suppress Nuclear Fragmentation and Apoptotic-Body Formation During Apoptosis in HL-60 Cells. *FEBS Lett* **413**: 99-103.

Simbulan-Rosenthal CM, Rosenthal D S, Hilz H, Hickey R, Malkas L, Applegren N, Wu Y, Bers G and Smulson M E (1996) The Expression of Poly(ADP-Ribose) Polymerase During Differentiation-Linked DNA Replication Reveals That It Is a Component of the Multiprotein DNA Replication Complex. *Biochemistry* **35**: 11622-11633.

Simbulan-Rosenthal CM, Rosenthal D S, Luo R and Smulson M E (1999) Poly(ADP-Ribosyl)ation of P53 During Apoptosis in Human Osteosarcoma Cells. *Cancer Res* **59**: 2190-2194.

Simbulan-Rosenthal CM, Ly D H, Rosenthal D S, Konopka G, Luo R, Wang Z Q, Schultz P G and Smulson M E (2000) Misregulation of Gene Expression in Primary Fibroblasts Lacking Poly(ADP-Ribose) Polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 11274-11279.

Simbulan-Rosenthal CM, Rosenthal D S, Luo R B, Samara R, Jung M, Dritschilo A, Spoonde A and Smulson M E (2001) Poly(ADP-Ribosyl)ation of P53 in Vitro and in Vivo Modulates Binding to Its DNA Consensus Sequence. *Neoplasia* **3**: 179-188.

Smith S (2001) The World According to PARP. *Trends Biochem Sci* **26**: 174-179.

Smith S and de Lange T (2000) Tankyrase Promotes Telomere Elongation in Human Cells. *Curr Biol* **10**: 1299-1302.

Smith S, Giriat I, Schmitt A and de Lange T (1998) Tankyrase, a Poly(ADP-Ribose) Polymerase at Human Telomeres. *Science* **282**: 1484-1487.

Smulson ME, Simbulan-Rosenthal C M, Boulares A H, Yakovlev A, Stoica B, Iyer S, Luo R, Haddad B, Wang Z Q, Pang T, Jung M, Dritschilo A and Rosenthal D S (2000) Roles of Poly(ADP-Ribosyl)ation and PARP in Apoptosis, DNA Repair, Genomic Stability and Functions of P53 and E2F-1. *Adv Enzyme Regul* **40**: 183-215.

Soriano FG, Liaudet L, Szabó E, Virág L, Mabley J, Pacher P and Szabó C (2002) Resistance Against Acute Septic Peritonitis in Poly(ADP-Ribose) Polymerase Deficient Mice. *Shock* **17**:286-292.

Sugiura M, Fram R, Munroe D and Kufe D (1984) DNA Strand Scission and ADP-Ribosyltransferase Activity During Murine Erythroleukemia Cell Differentiation. *Dev Biol* **104**: 484-488.

Spencer JP, Wong J, Jenner A, Aruoma OI, Cross CE, Halliwell B (1996) Base modification and strand breakage in isolated calf thymus DNA and in DNA from human skin epidermal keratinocytes exposed to peroxynitrite or 3-morpholiniosydnonimine. *Chem Res Toxicol*, **9**:1152-8.

Stallmeyer B, Kampfer H, Kolb N, Pfeilschifter J, Frank S. (1999) The function of nitric oxide in wound repair: inhibition of inducible nitric oxide-synthase severely impairs wound reepithelialization. *J Invest Dermatol* **113**:1090-8.

Stein M, Bernd A, Ramirez-Bosca A, Kippenberger S, Holzmann H (1997) Measurement of anti-inflammatory effects of glucocorticoids on human keratinocytes in vitro. Comparison of normal human keratinocytes with the keratinocyte cell line HaCaT. *Arzneimittelforschung* **47**:1266-70.

Stepien K, Zajdel A, Wilczok A. et al. (2000) Dopamine-melanin protects against tyrosine nitration, tryptophan oxidation and Ca(2+)-ATPase inactivation induced by peroxynitrite. *Biochim Biophys Acta* **1523**:189-95.

Szabó C. (1996a) DNA strand breakage and activation of poly-ADP ribosyltransferase: a cytotoxic pathway triggered by peroxynitrite. *Free Radic.Biol.Med.*; **21**:855-869.

Szabó C (1996b) The Pathophysiological Role of Peroxynitrite in Shock, Inflammation, and Ischemia-Reperfusion Injury. *Shock* **6**: 79-88.

Szabó C (1998) Potential Role of the Peroxynitrate-Poly(ADP-Ribose) Synthetase Pathway in a Rat Model of Severe Hemorrhagic Shock. *Shock* **9**: 341-344.

Szabó, C (ed) (2000) Cell death: the role of PARP. CRC Press, Boca Raton, FL.

Szabó C and Dawson V L (1998) Role of Poly(ADP-Ribose) Synthetase in Inflammation and Ischaemia-Reperfusion. *Trends Pharmacol Sci* **19**: 287-298.

Szabó C, Salzman AL, Ischiropoulos H. (1995) Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123 occurs in early stages of endotoxic and hemorrhagic shock and ischemia-reperfusion injury. *FEBS Lett* **372**:229-32

Szabó C, Virág L, Cuzzocrea S, Scott GS, Hake P, O'Connor MP, Zingarelli B, Salzman A, Kun E. (1998) Protection against peroxynitrite-induced fibroblast injury and arthritis development by inhibition of poly(ADP-ribose) synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*. **95**:3867-3872.

Szabó C, Mabley JG, Moeller SM, Shimanovich R, Pacher P, Virág L, Soriano FG, Van Duzer JH, Williams W, Salzman AL, Groves JT. (2002) Part I: Pathogenetic Role of Peroxynitrite in the Development of Diabetes and Diabetic Vascular Complications: Studies With FP15, A Novel Potent Peroxynitrite Decomposition Catalyst. *Mol Med.* **8**:571-80.

Tanaka Y, Koide S S, Yoshihara K and Kamiya T (1987) Poly (ADP-Ribose) Synthetase Is Phosphorylated by Protein Kinase C in Vitro. *Biochem Biophys Res Commun* **148**: 709-717.

Tanaka Y, Yoshihara K, Tohno Y, Kojima K, Kameoka M and Kamiya T (1995) Inhibition and Down-Regulation of Poly(ADP-Ribose) Polymerase Results in a Marked Resistance of HL-60 Cells to Various Apoptosis-Inducers. *Cell Mol Biol (Noisy -le -grand)* **41**: 771-781.

Taniguchi T, Nemoto Y, Ota K, Imai T and Tobari J (1993) Participation of Poly(ADP-Ribose) Synthetase in the Process of Norepinephrine-Induced Inhibition of Major Histocompatibility Complex Class II Antigen Expression in Human Astrocytoma Cells. *Biochem Biophys Res Commun* **193**: 886-889.

Tanuma SI, Enomoto T and Yamada M A (1978) Changes in the Level of Poly ADP-Ribosylation During a Cell Cycle. *Exp Cell Res* **117**: 421-430.

Tanuma S, Yagi T and Johnson G S (1985) Endogenous ADP Ribosylation of High Mobility Group Proteins 1 and 2 and Histone H1 Following DNA Damage in Intact Cells. *Arch Biochem Biophys* **237**: 38-42.

Tentori L, Turriziani M, Franco D, Serafino A, Levati L, Roy R, Bonmassar E and Graziani G (1999) Treatment With Temozolomide and Poly(ADP-Ribose) Polymerase Inhibitors Induces Early Apoptosis and Increases Base Excision Repair Gene Transcripts in Leukemic Cells Resistant to Triazene Compounds. *Leukemia* **13**: 901-909.

Tentori L, Balduzzi A, Portarena I, Levati L, Vernole P, Gold B, Bonmassar E and Graziani G (2001a) Poly (ADP-Ribose) Polymerase Inhibitor Increases Apoptosis and Reduces Necrosis Induced by a DNA Minor Groove Binding Methyl Sulfonate Ester. *Cell Death Differ* **8**: 817-828.

Tentori L, Portarena I, Bonmassar E and Graziani G (2001b) Combined Effects of Adenovirus-Mediated Wild-Type P53 Transduction, Temozolomide and Poly (ADP-Ribose) Polymerase Inhibitor in Mismatch Repair Deficient and Non-Proliferating Tumor Cells. *Cell Death Differ* **8**: 457-469.

Tewari M, Quan L T, O'Rourke K, Desnoyers S, Zeng Z, Beidler D R, Poirier G G, Salvesen G S and Dixit V M (1995) Yama/CPP32 Beta, a Mammalian Homolog of CED-3, Is a CrmA-Inhibitable Protease That Cleaves the Death Substrate Poly(ADP-Ribose) Polymerase. *Cell* **81**: 801-809.

Tien M, Berlett B S, Levine RL, Chock P B, Stadtman E R. (1999) Peroxynitrite-mediated modification of proteins at physiological carbon dioxide concentration: pH dependence of carbonyl formation, tyrosine nitration, and methionine oxidation. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**:7809-14.

Tong WM, Hande MP, Lansdorp PM and Wang ZQ (2001) DNA Strand Break-Sensing Molecule Poly(ADP-Ribose) Polymerase Cooperates With P53 in Telomere Function, Chromosome Stability, and Tumor Suppression. *Mol Cell Biol* **21**: 4046-4054.

Tong WM, Ohgaki H, Huang H, Granier C, Kleihues P, Wang ZQ. (2003) Null Mutation of DNA Strand Break-Binding Molecule Poly(ADP-ribose) Polymerase Causes Medulloblastomas in p53(-/-) Mice. *Am J Pathol* **162**:343-52.

Tramontano F, Malanga M, Farina B, Jones R and Quesada P (2000) Heat Stress Reduces Poly(ADPR)Polymerase Expression in Rat Testis. *Mol Hum Reprod* **6**: 575-581.

Troll W, Garte S, Frenkel K. (1990) Suppression of tumor promotion by inhibitors of poly(ADP)ribose formation. *Basic.Life Sci.* **52**:225-32.

Trucco C, Oliver F J, De Murcia G and Menissier-De Murcia J (1998) DNA Repair Defect in Poly(ADP-Ribose) Polymerase-Deficient Cell Lines. *Nucleic Acids Res* **26**: 2644-2649.

Tsukada K, Hasegawa T, Tsutsumi S, Katoh H, Kuwano H, Miyazaki T, Yamamoto Y. (2000) Effect of uric acid on liver injury during hemorrhagic shock. *Surgery* **127**:439-46

- Tsutsumi M, Masutani M, Nozaki T, Kusuoka O, Tsujiuchi T, Nakagama H, Suzuki H, Konishi Y, Sugimura T. (2001) Increased susceptibility of poly(ADP-ribose) polymerase-1 knockout mice to nitrosamine carcinogenicity. *Carcinogenesis* **22**:1-3.
- Um S C, Suzuki S, Toyokuni S, Uchida K, Hiai H, Nishimura Y. (1999) Formation of 4-hydroxy-2-nonenal-modified proteins and 3-nitro-L- tyrosine in rat island skin flaps during and after ischemia. *Ann Plast Surg* **42**: 293-298.
- Uppu R M, Squadrito G L, Pryor W A. (1996) Acceleration of peroxynitrite oxidations by carbon dioxide. *Arch Biochem Biophys* **327**: 335-343.
- Viner RI, Williams TD, Schoneich C. (1999) Peroxynitrite modification of protein thiols: oxidation, nitrosylation, and S-glutathiolation of functionally important cysteine residue(s) in the sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase. *Biochemistry* **38**:12408-15.
- Virág L, Kerekgarto C, Fachet J. (1995) A simple, rapid and sensitive fluorimetric assay for the measurement of cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol Methods* **185**:199-208.
- Virág L, Scott G S, Cuzzocrea S, Marmer D, Salzman A L and Szabó C (1998a) Peroxynitrite-Induced Thymocyte Apoptosis: the Role of Caspases and Poly (ADP-Ribose) Synthetase (PARS) Activation. *Immunology* **94**: 345-355.
- Virág L, Salzman A L and Szabó C (1998b) Poly(ADP-Ribose) Synthetase Activation Mediates Mitochondrial Injury During Oxidant-Induced Cell Death. *J Immunol* **161**: 3753-3759.
- Virág L and Szabó C (2001) Purines Inhibit Poly(ADP-Ribose) Polymerase Activation and Modulate Oxidant-Induced Cell Death. *FASEB J* **15**: 99-107.
- Wang ZQ, Auer B, Stingl L, Berghammer H, Haidacher D, Schweiger M and Wagner EF (1995) Mice Lacking ADPRT and Poly(ADP-Ribosyl)ation Develop Normally but Are Susceptible to Skin Disease. *Genes Dev* **9**: 509-520.
- Wang ZQ, Stingl L, Morrison C, Jantsch M, Los M, Schulze-Osthoff K and Wagner E F (1997) PARP Is Important for Genomic Stability but Dispensable in Apoptosis. *Genes Dev* **11**: 2347-2358.
- Watanabe N, Miura S, Zeki S, Ishii H. (2001) Hepatocellular oxidative DNA injury induced by macrophage-derived nitric oxide. *Free Radic Biol Med* **30**:1019-28
- Watson AJ, Askew J N and Benson R S (1995) Poly(Adenosine Diphosphate Ribose) Polymerase Inhibition Prevents Necrosis Induced by H₂O₂ but Not Apoptosis. *Gastroenterology* **109**: 472-482.
- Watts JA, Grattan R M, Whitlow B S and Kline J A (2001) Activation of Poly(ADP-Ribose) Polymerase in Severe Hemorrhagic Shock and Resuscitation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001 Aug ;281 (2):G498 -506 **281**: G498-G506.
- Wesierska-Gadek J, Schmid G and Cerni C (1996) ADP-Ribosylation of Wild-Type P53 in Vitro: Binding of P53 Protein to Specific P53 Consensus Sequence Prevents Its Modification. *Biochem Biophys Res Commun* **224**: 96-102.

Wesierska-Gadek J and Schmid G (2001) Poly(ADP-Ribose) Polymerase-1 Regulates the Stability of the Wild-Type P53 Protein. *Cell Mol Biol Lett* 2001 ;6 (2):117 -40 **6**: 117-140.

Wu GS, Zhang J, Rao NA. (1997) Peroxynitrite and oxidative damage in experimental autoimmune uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **38**:1333-9

Yamada K, Miyajima E and Nonaka K (1990) Inhibition of Cytokine-Induced MHC Class II but Not Class I Molecule Expression on Mouse Islet Cells by Niacinamide and 3-Aminobenzamide. *Diabetes* **39**: 1125-1130.

Ying W, Seigny M B, Chen Y and Swanson R A (2001) Poly(ADP-Ribose) Glycohydrolase Mediates Oxidative and Excitotoxic Neuronal Death. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 12227-12232.

Ying W and Swanson R A (2000) The Poly(ADP-Ribose) Glycohydrolase Inhibitor Gallotannin Blocks Oxidative Astrocyte Death. *Neuroreport* **11**: 1385-1388.

Yu SW, Wang H, Poitras MF, Coombs C, Bowers WJ, Federoff HJ, Poirier GG, Dawson TM, Dawson VL. (2002) Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. *Science* **297**:259-63.

Zhang J (1997) Use of biotinylated NAD to label and purify ADP-ribosylated proteins. *Methods Enzymol*; **280**:255-65.

Zhang H, Joseph J, Feix J, Hogg N, Kalyanaraman B. (2001) Nitration and oxidation of a hydrophobic tyrosine probe by peroxynitrite in membranes: comparison with nitration and oxidation of tyrosine by peroxynitrite in aqueous solution. *Biochemistry* **40**:7675-86.

Ziegler M and Oei S L (2001) A Cellular Survival Switch: Poly(ADP-Ribosyl)ation Stimulates DNA Repair and Silences Transcription. *Bioessays* **23**: 543-548.

Zingarelli B, Ischiropoulos H, Salzman AL, Szabó C. (1997) Amelioration by mercaptoethylguanidine of the vascular and energetic failure in haemorrhagic shock in the anesthetised rat. *Eur J Pharmacol* **338**:55-65

Zingarelli B, Salzman A L and Szabó C (1998) Genetic Disruption of Poly (ADP-Ribose) Synthetase Inhibits the Expression of P-Selectin and Intercellular Adhesion Molecule-1 in Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury. *Circ Res* 83: 85-94.

Zouki C, Zhang SL, Chan JS, Filep JG. (2001) Peroxynitrite induces integrin-dependent adhesion of human neutrophils to endothelial cells via activation of the Raf-1/MEK/Erk pathway. *FASEB J* **15**:25-27.

VIII. Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt témavezetőimnek, Hunyadi János professzor úrnak és Dr. Virág Lászlónak szeretném köszönetemet kifejezni a munkámhoz nyújtott segítségükért.

Nagyon hálás vagyok Dr. Szabó Csabának, hogy a munka INOTEK Pharmaceuticals-nél végzett jelentős részéhez a feltételeket biztosította, és a kísérletek tervezésében, kiértékelésében segítséget nyújtott. Dr. Szabó Csabának és feleségének Dr. Marton Anitának az Egyesült Államokbeli tartózkodásunkat megkönnyítő sok-sok segítségért is ezúton mondok köszönetet.

A szövettani vizsgálatokhoz a haemorrhagiás sokk modellből és a diabéteszes érdiszfunkció modellből származó mintákat Dr. Lucas Liaudet és Dr. Francisco Garcia Soriano bocsájtották rendelkezésemre. A kísérletes uveitisben az állatok beinjekciózását Dr. Jon Mabley és Dr. Galelaldin Abdelkarim végezte. Kollégáimnak e segítségükért és a jó hangulatú közös munkáért tartozom köszönettel.

A disszertáció megírása alatt szüleim sok esetben gyermekfelügyelettel biztosították az íráshoz szükséges nyugalmat, amit - csakúgy mint folytonos támogatásukat - ezúton is hálásan köszönök.

IX. Összefoglalás

A poli-ADP-ribóziláció egy olyan poszttranszlációs fehérje módosítási reakció melynek sokszínű biológiai funkciója a DNS hibajavítástól, a kromatinszerkezet, a replikáció, a transzkripció szabályozásán át a telomerhossz regulációjáig terjed. A reakciót poli(ADP-ribóz) polimeráz (PARP) enzimek katalizálják és lényege a NAD^+ nikotinamidra és ADP-ribózra történő hasítása, s az ADP-ribóz megfelelő akceptor fehérjéken történő polimerizációja. A legjobban ismert PARP-1 enzim DNS töréseket érzékelve aktiválódik és a legtöbb (ADP-ribóz) polimert saját magára, valamint hisztonokra, replikációs és transzkripció faktorokra transzferálja. Oxidatív stresszállapotokban a PARP-1 túlzott aktivációja a NAD^+ és az ATP depléciója révén a sejt halálát okozza. Ennek a folyamatnak a gátlása jelentős védelmet nyújt a gyulladásban, reperfúzióban és sokban megfigyelhető szövetkárosodással szemben. Ezekben a kórfolyamatokban a PARP aktiváció egyik legvalószínűbb stimulusa a peroxinitrit (ONOO^-) nevű reaktív intermedier ami a nitrogén monoxid és a szuperoxid reakciójában keletkezik. Jelen munkánk során, kimutattuk a peroxinitrit termelődését jelző nitro tirozin jelenlétét és a PARP aktivációját kontakt hiperszenzitivitásból származó egér bőrmintákban, haemorrhagiás sokkból származó vékonybélmeteszetekben, diabéteszes egerek aortáiban és autoimmun uveitisben. A kontakt hiperszenzitivitás és a diabéteszrel összefüggő érdiszfunkció esetében a peroxinitrit termelődés és a PARP aktiváció közötti “hiányzó láncszemet”, a DNS töréseket is igazoltuk. A kísérletes uveitisben megvizsgáltuk az indukálható nitrogén monoxid szintetáz gátló GED és a PARP gátló PJ-34 hatását is, és azt találtuk, hogy mindkét kezelés jelentősen gátolta a CD11^+ gyulladásos sejtek migrációját az íriszbe. Amint azt munkatársaink Dr. Liaudet és Dr. Soriano eredményei igazolják, a PARP PJ-34-gyel történő gátlása (diabéteszes érdiszfunkció modellben) illetve a PARP-1 enzim hiánya (haemorrhagiás sokkban) szignifikánsan csökkentette a szövetkárosodást e két állatmodellben is. A peroxinitrit bőrsejtekre kifejtett hatásainak jobb megértése céljából kísérleteket végeztünk HaCaT sejteken is, melyek során azt találtuk, hogy a PARP 3-aminobenzamiddal történő gátlása csökkentette a citokin-stimulált IL-8 és ICAM-1 (intercelluláris adhéziós molekula-1) expressziót, a peroxinitrit citotoxikus hatását, de az apoptózis paramétereit (kaspáz aktiváció, DNS fragmentáció) nem. Eredményeink alapján a peroxinitrit által kiváltott PARP aktiváció ígéretes terápiás célpontot jelenthet oxidatív stresszel jellemzett betegségekben.

X. Summary

Poly-ADP-ribosylation is a posttranslational protein modification with pleiotropic biological functions ranging from the regulation of DNA repair, chromatin structure, replication, transcription to telomere length. The reaction catalyzed by poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) enzymes involves the cleavage of NAD^+ into nicotinamide and ADP-ribose and the polymerization of the latter on acceptor proteins. PARP-1, the best characterized PARP enzyme is a DNA nick sensor attaching most $(\text{ADP-ribose})_n$ polymers on itself as well as to histones, replication and transcription factors. In oxidative stress situation, overactivation of PARP-1 consumes NAD^+ and ATP and leads to cell death. Inhibition of this pathway provided protection from tissue injury in various forms of inflammation, reperfusion injury and shock. In these pathophysiological processes, one of the likely triggers of PARP activation is peroxynitrite (ONOO^-), a powerful oxidant formed in the reaction of nitric oxide and superoxide. In our present work we have detected nitrotyrosine (the footprint of peroxynitrite) and PARP activation in murine models of contact hypersensitivity (skin), hemorrhagic shock (small intestine), diabetic endothelial dysfunction (aorta rings) and autoimmune uveitis (iris). In contact hypersensitivity and in diabetic endothelial dysfunction we have also detected DNA breaks as the “missing link” between peroxynitrite production and PARP activation. Furthermore, in the experimental uveitis model we have investigated the effect of GED (inhibitor of inducible nitric oxide synthase) and PJ-34 (PARP inhibitor) and found that both treatments significantly reduced CD11^+ inflammatory cell migration to the iris. Inhibition of PARP with PJ-34 or genetic ablation of PARP-1 also provided significant protection from tissue injury in diabetic endothelial dysfunction and hemorrhagic shock, respectively (experiments carried out by L. Liaudet and F.G. Soriano). We have also done cell culture experiment in order to gain insight into the cellular effects of peroxynitrite in the skin. In HaCaT keratinocytes PARP inhibition by 3-aminobenzamide significantly reduced cytokine-induced IL-8 and ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) production and peroxynitrite-induced cytotoxicity without decreasing apoptotic parameters (caspase activation and DNA fragmentation).

Our data provide further support for the idea that peroxynitrite-induced PARP activation may represent a lucrative target for pharmacological intervention in various disease conditions in which oxidative stress plays a predominant role.

XI. Közlemények

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Szabó É**, Virág L, Bakondi E, Gyüre L, Haskó G, Bai P, Hunyadi J, Gergely P, Szabó C Peroxynitrite production, DNA breakage and poly(ADP-ribose) polymerase activation in a mouse model of oxazolone-induced contact hypersensitivity. *J. Invest. Dermatol.* 117(1):74-80, 2001.
IF: 4,539
2. Virág L, **Szabó É**, Bakondi E, Bai P, Gergely P, Hunyadi J, Szabó C: Nitric oxide – peroxynitrite - poly(ADP-ribose) polymerase pathway in the skin (Minireview) *Exp. Dermatol* 11:189-202, 2002
IF: 2,434
3. Soriano FG, Virág L, Jagtap P, **Szabó É**, Mabley JG, Liaudet L, Marton A, Hoyt DG, Murthy KGK, Salzman AL, Southan GJ, Szabó C: Diabetic endothelial dysfunction: the role of poly (ADP-ribose) polymerase activation. *Nature Medicine*, 7:108-113, 2001
IF: 27,905
4. Liaudet L, Soriano FG, **Szabó É**, Virág L, Mabley JG, Salzman AL, and Szabó C. Protection against hemorrhagic shock in mice genetically deficient in poly(ADP-ribose) polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97(18):10203-8, 2000
IF:10,789
5. Mabley JG, Jagtap P, Perretti M, Getting SJ, Salzman AL, Virág L, **Szabó É**, Soriano FG, Liaudet L, Abdelkarim GE, Haskó G, Marton A, Southan GJ, Szabó C: Anti-inflammatory effects of a novel, potent inhibitor of poly (ADP-ribose) polymerase *Inflamm. Res.* 50:561-569, 2001.
IF 1,56

Egyéb közlemények

6. Szabó G, Bahrle S, Stumpf N, Sonnenberg K, **Szabó E**, Pacher P, Csont T, Schulz R, Dengler TJ, Liaudet L, Jagtap PG, Southan GJ, Vahl CF, Hagl S, Szabó C. Poly(ADP-Ribose) polymerase inhibition reduces reperfusion injury after heart transplantation. *Circ Res.* Jan 11;90(1):100-6, 2002
IF:9,213
7. Pacher P, Liaudet L, Soriano FG, Mabley JG, **Szabó E**, Szabó C. The role of poly(ADP-ribose) polymerase activation in the development of myocardial and endothelial dysfunction in diabetes. *Diabetes.* 51(2):514-21, 2002
IF:7,700
8. Soejima K, Traber L.D, Schmalstieg FC, Hawkins H, Jodoin J.M., Szabó C, **Szabó É**, Virág L, Salzman AL, and Traber DL: Role of nitric oxide in vascular permeability after combined burns and smoke inhalation injury *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 163(3), 745-752, 2001
IF: 5,443

9. Goldfarb RD, Marton A, Szabó E, **Virág L**, Salzman AL, Glock D, Akhter I, McCarthy R, Parrillo JE, Szabó C. Protective effect of a novel, potent inhibitor of poly(adenosine 5'-diphosphate-ribose) synthetase in a porcine model of severe bacterial sepsis. *Crit. Care. Med* 30:974-980, 2002
IF: 3,824
10. Jagtap P, Soriano FG, **Virág L**, Liaudet L, Mabley J, Szabó E, Haskó G, Marton A, Lorigados CB, Gallyas F. Jr, Sümegi B, Hoyt DG, Baloglu E, VanDuzer J, Salzman AL, Southan GJ, Szabó C. Novel phenanthridinone inhibitors of poly (adenosine 5'-diphosphate-ribose) synthetase: Potent cytoprotective and antishock agents. *Crit. Care. Med* 30: 1071-1082, 2002,
IF: 3,824
11. Liaudet L, **Szabó É**, Timashpolsky L, Virág L, Cziráki A, Szabó C. Suppression of poly (ADP-ribose) polymerase activation by 3-aminobenzamide in a rat model of myocardial infarction: long-term morphological and functional consequences. *Br J Pharmacol.* 133(8):1424-30, 2001
IF: 3,689
12. Soriano FG, Liaudet L, **Szabó E**, Virág L, Mabley JG, Pacher P, Szabó C: Resistance to acute septic peritonitis in poly(ADP-ribose) polymerase-1-deficient mice. *Shock* 17(4):286-92, 2002
IF:2,785
13. Bakondi E, Bai P, **Szabó É**, Hunyadi J, Gergely P, Szabó C, and Virág L: Detection of poly(ADP-ribose) polymerase activation in oxidatively stressed cells and tissues by using biotinylated NAD substrate *J. Histochem. Cytochem.* 50:91-98, 2002
IF: 2,61
14. Faro R, Toyoda Y, McCully JD, Jagtap P, **Szabó É**, Virág L, Bianchi C, Levitsky S, Szabó C, and Sellke FW Myocardial protection by PJ34, a novel potent poly (ADP-ribose) synthetase inhibitor. *Ann. Thor. Surg.* 73(2):575-581, 2002. IF: 1,828
15. Páldeák, L., **Szabó, É.**, Hunyadi, J.: A Várady-féle minisebészeti metodikával szerzett tapasztalataink. *Bőrgyógy. Ven. Szle.* 71: 45-47 1995.
16. **Szabó É.**, Krompecher K., Páldeák L., Molnár Cs., Hunyadi J.: Kongenitális lympoedema komplex kezelése. *Bőrgyógy. Ven. Szle.* 72:241-245. 1996.
17. **Szabó É.**, Szép I., Erdei I., Szincsák N., Páldeák L., Hunyadi J., Juhász I.: Tapasztalataink hűtőgél égési elsősegélyben történő alkalmazásáról. *Magyar Mentésügy* 4:53-59. 1998.
18. **Szabó É**, Páldeák L, Kósa Á, Hunyadi J: Curiosin additív kezelés ulcus cruris transzplantációja során. *Érbetegségek* 1998.
19. Péter Z, Berczi C, **Szabó É**: A bimbó areola komplexum superomedialis nyélen való elforgatása redukciós mellplasztikáknál. *Magyar Sebészet* 54, 383-386, 2001.

1. Marton A, **Szabó É**, Virág L, Salzman A, Glock D, McCarthy R, Parrillo JE, Szabó C, Goldfarb RD: Protective effects of a novel inhibitor of poly(ADP-ribose)synthetase in a porcine model of peritonitis *FASEB J.* A950, 2001.
2. **Szabó É**, Kern TS, Virág L, Mabley J, Szabó C: Evidence for poly(ADP-ribose)polymerase activation in the diabetic retina *FASEB J.* A942, 2001.
3. Liaudet L, Virág L, **Szabó É**, Szabó C: Localization of poly(ADP-ribose)polymerase (PARP) activation in a rat model of miocardial reperfusion injury. *FASEB J.* A570, 2001.
4. Virág L, Jagtap P, Mabley J, **Szabó É**, Haskó G, Hoyt D, Salzman A, Southan G, Soriano FG, Liaudet L, Szabó C: Cytoprotective effects of novel phenanthridinone inhibitors of poly(ADP-ribose)polymerase. *FASEB J.* A567, 2001.
5. **Szabó É**, Virág L, Szabó C: Pole of peroxinitrite-induced poly(ADP-ribose) polymerase activation in keratinocytes: implications for contact hypersensitivity. *FASEB J.* A242, 2001.
6. Mabley J, Virág L, Jagtap P, **Szabó É**, Prendergast R, Perretti M, Getting S, Szabó C: Effects of a novel poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitor in rodent models of local inflammation. *FASEB J.* A242, 2001.
7. Szabó C, Soriano FG, Virág L, Jagtap P, **Szabó É**, Mabley J, Liaudet L, Marton A, Salzman A: Diabetic endothelial dysfunction: the role of poly(ADP-ribose) polymerase activation. *FASEB J.* A215, 2001.
8. Virág L, Soriano FG, Jagtap P, Mabley J, **Szabó É**, Liaudet L, Hoyt D, Murthy K, Salzman A, Southan G, Szabó C: Role of poly(ADP-ribose) polymerase activation in the pathogenesis of endothelial injury induced by high glucose in vitro. *FASEB J.* A216, 2001.
9. **Szabó É**, Bakondi E, Bai P, Hunyadi J, Gergely P, Szabó C, Virág L: Regulation of oxidative stress-induced cytotoxicity in HaCaT keratinocytes. *JEADV (J. Eur. Acad. Dermatol. Venerol)* 15(Suppl 2), 2001.