

Egyetemi doktori (Ph. D.) értekezés tézisei

**A poli-ADP-riboziláció szerepe
a DNS károsodás által kiváltott sejthalálban
és a bőr gyulladásos folyamataiban**

Hegedűs Csaba

Témavezető: Dr. Virág László



**Debreceni Egyetem
Orvos- és Egészségtudományi Centrum
Orvosi Vegytani Intézet
2008**

1. BEVEZETÉS

1.1. A poli(ADP-ribóz) metabolizmus

A PARP enzimcsalád legjobban tanulmányozott tagja a **PARP-1** [poli(ADP-ribóz) polimeráz-1] (EC 2.4.2.30), mérete 116 kDa. Ez az enzim az egyik legnagyobb mennyiségben megtalálható sejtmagi fehérje, mely a nukleoplazmában fordul elő, sejtosztódáskor a centroszómában és a kromoszómákon lokalizálódik. Széleskörűen elterjedt és konzervált enzim az eukarióták között.

A PARP-1 főleg egy- vagy kétszálú DNS törés hatására aktiválódik, homodimereket alkot, és a DNS-törésekhez kapcsolódik. Az aktivált PARP a NAD^+ -ot ADP-ribózra és nikotinamidra hasítja, majd az ADP-ribóz részt a megfelelő akceptor fehérjék glutamát oldalláncához csatolja és elágazó, néhány PAR egységtől akár 200 egységnyi hosszúságú polimereket szintetizál. Az aktivációt követő polimerszintézis után az automodifikáció következtében a PARP gátolt állapotba kerül. A polimereket a poli(ADP-ribóz) glikohidroláz (PARG) az ADP-ribozil hidroláz 3 (ARH3) és az ADP-ribozil protein liáz enzimek távolítják el.

A PARP-1-nek szerepe van a genomi integritás fenntartásában, a replikációban, a génexpresszió, a kromatinszerkezet és differenciáció szabályozásában és a sejthalálban.

1.2. A PARP-1 enzim szerepe a sejthalálban

A sejtek elhalásának több típusát különböztetjük meg: alapvetően morfológiai jellemzők alapján beszélünk apoptózisról, nekrozisról és autofágiáról. A PARP aktivációt a DNS károsító szerek citotoxikus hatásával először Berger és munkatársai hozták összefüggésbe („PARP öngyilkosság”

modell). Eszerint a PARP aktiváció hatására a sejt NAD^+ készlete a PAR szintézis miatt lecsökken. A NAD^+ képződés ATP igényes, így elfogy a sejt ATP készlete. Az ATP hiánya gátolja az ATP igényes folyamatokat, a NAD^+ hiánya pedig a mitokondriális elektrontranszportláncot állítja le, ami a mitokondriális membránpotenciál összeomlásához vezet. A fenti folyamatok eredményeképpen sejt diszfunkció, végül sejtpusztulás következik be. A poli-ADP-riboziláció és a nekrotikus sejthalál kapcsolata függ a sejttípustól és az adott sejt metabolikus állapotától.

Egy másik elképzelés szerint a PARP-1 túlzott aktivációja során keletkező ADP-ribóz polimerek indukálják az apoptózis indukáló faktor (AIF) transzlokációját a mitokondriumból a sejtmagba, ami DNS fragmentációt és sejthalált okoz. A polimerek önmagukban is citotoxikus hatásúak lehetnek, citotoxikus hatásuk a polimer méretének növekedésével fokozódik.

Az apoptózis legtöbb formájához a PARP nem szükséges, azonban hasítása nélkülözhetetlen az apoptózis zavartalan lezajlásához. A PARP szerepet játszik az autofágia folyamataiban is. Hatása sejttípus- és stimulusfüggést mutat.

1.3. A poli-ADP-riboziláció főbb stimulusai

A fokozott poli-ADP-riboziláció főbb stimulusai lehetnek: UV sugárzás, radioaktív sugárzás, topoizomeráz mérgek, oxidatív stressz és a DNS alkilálószerrek.

Reaktív oxigén/nitrogén intermedierek [pl.: szuperoxid anion-gyök ($\text{O}_2^{\bullet-}$), a hidrogén-peroxid (H_2O_2), a hidroxil gyök (OH^{\bullet}), a nitrogén-monoxid (NO^{\bullet}) és a peroxinitrit (ONOO^-)] termelődését tapasztalták például gyulladásoz folyamatokban, sugárzásnak kitett sejtes és szöveti rendszerekben, ischaemia-reperfundált szívben, májban, vesében és agyban.

Többféleképpen is képesek károsítani a szöveteket: a DNS törésen kívül gátolják a mitokondriális légzési lánc folyamatát, lipid peroxidációt okoznak, ioncsatornák működését gátolják, és fehérjéket oxidálnak.

Az alkilálószerke [metil-metán-szulfonát, N-metil-N'-nitro-N-nitrozoguanidin (MNNG), nitrogén- és kénmustár] elsősorban a DNS nukleofil csoportjait támadják meg. Legalább 12-féle alkilált bázist vagy foszfortriésztert hoznak létre, melyek közül legjelentősebb az O⁶-alkilguanin. Ezek a módosítások hibás bázispárosodáshoz, vagy DNS töréshez vezethetnek, mutációkat okozhatnak, valamint zavart szenvedhet a transzkripció, a replikáció és a rekombináció. Az alkilálószerke reakcióba lépnek a fehérjék tiolcsoportjaival is, károsítva azok funkcióját. Ezen az elven működik az alkilcsoportok eltávolítását végző O⁶-metilguanin metiltranszferáz enzim is, mely a metilcsoport átvételekor irreverzibilisen inaktiválódik („öngyilkos enzim”). Az utóbbi években több eredmény utal arra, hogy az MNNG nem csupán egy laboratóriumban alkalmazott vegyület, megtalálható például a dohányfüstben és a jól átsütött húsokban is.

1.4. Protein kinázok szerepe a PARP-1 enzim működésének szabályozásában

Több protein kinázzról kimutatták, hogy képes befolyásolni a PARP-1 aktivitását fehérje-fehérje kölcsönhatás, vagy foszforiláció által. A foszforiláció hatása egyaránt lehet aktiváló (ERK 1/2, JNK1, AMPK), illetve gátló (PKC, DNA-PK) hatású.

A protein kináz C enzimcsaládba szerin/treonin specifikus protein kinázok tartoznak, melyek számos sejtípus különböző jelátviteli folyamataiban játszanak szerepet. Alapvető szerepük van például a sejtproliferáció, az apoptózis és a citoskeleton átrendeződés szabályozásában. Jelenleg 12 PKC izoenzimet ismerünk, melyeket kofaktorigényük alapján

három alcshaládba sorolnak. Az egyes izoformák eltérnek aktivációjukban, szöveti megoszlásukban és szubsztrátspecificitásukban. A PKC-k inaktív állapotban a citoplazmában található, aktivációjuk során reverzibilisen membránhoz kötődnek. Aktiválódásukhoz - alcshaládtól függően - foszfatidil-szerin, diacil-glicerol és Ca^{2+} szükséges.

Irodalmi adatok alapján a PKC *in vitro* foszforilálja a PARP-1-et. A foszforiláció a PARP aktivitásának és DNS-kötésének gátlását okozza, míg a PARP DNS-hez való kötődése gátolja a foszforilációt.

1.5. A PARP-1 szerepe gyulladáshoz vezető folyamatokban

A PARP patofiziológiás szerepét számos gyulladáshoz vezető betegségmodellben igazolták: streptozotocin-indukált diabetes, zymosan-indukált vaszkuláris rendellenesség, endotoxin indukálta sepsis sokk. Irodalmi adatok alapján a PARP-1 két, a gyulladáshoz vezető mediátorok expressziójában kulcsszerepet játszó transzkripciós faktor (NF κ B és az AP-1) aktivitását is fokozza. A PARP gátlása csökkenti a granulocita infiltrációt és az iNOS expresszióját (ezáltal a reaktív nitrogén intermedierek keletkezését). A PARP-1 az NF κ B mindkét alegységével kölcsönhat, azonban az NF κ B-függő géneknek csak egy része (iNOS, TNF α) PARP-1 függő, valamint bizonyos esetekben a PARP-1 szerepét más specifikus koaktivátorok vehetik át, valószínűleg sejt- és stimulus-függő módon.

1.6. A PARP aktiváció lehetséges szerepe a bőr kóreléttanában

Kimutatták, hogy több bőrbetegség (napégés után kialakuló eritéma, kontakt hiperszenzitivitási reakció, psoriasis) kialakulásában is fontos szerepet játszanak a reaktív oxigén/nitrogén intermedierek. A nitrogén monoxid (NO) a bőrben különböző fiziológiás folyamatokban játszik szerepet, a keringés

szabályozásától a melanogenezisig. Azonban feleslegben termelődve - szuperoxiddal egyesülve - peroxinitritet képez, ami sokk, gyulladás és ischaemia-reperfúzió során szöveti károsodást okoz. Az NO sorsa attól függ, hogy a sejt aktuális fiziológiai állapota mennyire kedvez a peroxinitrit képződésének. A peroxinitrit DNS törést okoz, ami PARP-aktivációhoz vezet, a PARP túlzott aktivációja pedig sejtpusztulást eredményez. A kontakt hiperszenzitivitás (CHS) effektor fázisában keratinocitákban és Langerhans sejtekben az iNOS expressziójának emelkedését tapasztalták, ezért valószínűsíthető, hogy CHS reakció során az NO hozzájárul a szöveti sérüléshez. Az NO jelenléte azonban nem minden kórállapotban negatív a szervezet számára. A sebgyógyulás során termelődő NO hozzájárul a folyamathoz, sőt iNOS deficiens egereken elhúzódó sebzáródást tapasztaltak. A bőr különböző gyulladással járó folyamataiban keletkező peroxinitrit PARP-aktivációt okozhat. A szerzők CHS reakcióban is kimutatták a PARP-aktivációját, ezen kívül az UVB sugárzásnak kitett bőrben is megfigyelhető peroxinitrit-termelődés. Az aktív PARP - az NFκB-t aktiválva - gyulladással járó mediátorok képződéséhez vezet, a PARP-gátlása csökkenti a gyulladást, ezáltal előnyös nem fertőző gyulladással járó folyamatokban: napégés okozta eritéma, CHS.

2. CÉLKITŰZÉS

Munkánk során az alábbi három témakör köré csoportosítottuk kérdéseinket.

A poli-ADP-riboziláció szerepének vizsgálata az MNNG által kiváltott citotoxicitásban

1. Citotoxikus-e az MNNG timocitákon?
2. Hogyan befolyásolja a poli-ADP-riboziláció az MNNG által kiváltott sejthalál lefolyását?
3. Van-e szerepe a szekunder oxidatív stressznek az MNNG citotoxikus hatásában?

A protein kináz C szerepének vizsgálata az MNNG által kiváltott citotoxicitás szabályozásában

1. Van-e szerepe a protein kináz C - nek az MNNG által kiváltott citotoxicitás szabályozásában?
2. Befolyásolja-e a protein kináz C a PARP-1 enzim működését?

A PARP-1 szerepének vizsgálata a kontakt hiperszenzitivitás gyulladós folyamataiban

1. Van-e szerepe a PARP aktivációnak a CHS folyamataiban?
2. Van-e szerepe a PARP aktivációnak irritatív dermatitisben?

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. *Állatkísérletek*

Az állatkísérletek az Amerikai Egyesült Államok Egészségügyi Intézete (NIH) által kiadott „Útmutató laboratóriumi állatok gondozásáról és használatáról” című ajánlások figyelembevételével történtek. A kezelési protokollokat az Intézményi Állatkísérleti Bizottság jóváhagyta. Az állatokat minden esetben igény szerinti táplálék és vízfelvétel valamint 12 órás megvilágítási ciklusok mellett, 21-23 °C-on tartottuk. Az állatok megérkezése után 3-7 napot hagytunk az alkalmazkodáshoz.

3.1.1. *Timocita preparálás*

Hat-nyolc hetes hím C57BL6 egerek tímuszát használtuk kísérleteinkben. Az állatokat széndioxid belélegeztetéssel túllaltattuk, majd a mellkas megnyitása után kivágtuk a tímuszt. A tímuszt dróthálón préseltük át, így nyertünk önálló sejtekből álló timocita preparátumot. A sejteket RPMI-1640 médiumban tartottuk, melyet 10% főtális borjúsavóval egészítettünk ki. A sejteket 37 °C-on, 5% CO₂ atmoszférában tartottuk.

3.1.2. *Kontakt hiperszenzitivitás vizsgálata*

Borotvált hasi bőrfelületen 100-100 µl oxazolonnal (0,2 m/v %, aceton:oliva olaj 1:4 arányú elegyében oldva) szenzitizáltuk az állatokat. Egy héttel a szenzitizáció után az egereket i.p. kezeltük PJ34 (10 mg/kg, PBS-ben oldva) PARP-inhibitorral. Ezt követően 10-10 µl oxazolont kentünk az állatok mindkét fülének mindkét oldalára. A fülek vastagságát 24 óra elteltével mértük meg, és szövetmintát vettünk további vizsgálatok céljából.

3.1.3. *Irritatív dermatitis vizsgálata*

Az állatok mindkét fülének mindkét oldalára 10-10 µl PMA-t (forbol-mirisztát-acetát, 0,05 m/v%, acetonban oldva) kentünk. Ezt követően az egereket i.p. kezeltük PJ34 (10 mg/kg, PBS-ben oldva) PARP inhibitorral. Hat óra elteltével megmértük a fülek vastagságát és szövetmintát vettünk további vizsgálatok céljából.

3.2. *Nitrogén-monoxid felszabadulás detektálása*

A nitrogén-monoxid mennyiségét fluorimetriás DAF-2 módszerrel mértük. Eredményeinket fluorimetriásan detektáltuk (EX: 485 nm, EM: 527 nm). A nitrogén-monoxid termelődését a nitrit és nitrát mennyiségének detektálásával is nyomon követtük, melyek vizes oldatban a nitrogén-monoxid stabil végtermékei. A nitrit és nitrát együttes koncentrációját Griess-Ilosvay reakcióban detektáltuk. Az abszorbanciát 550 nm-en mértük.

3.3. *Nitrotirozin kimutatása immunfluoreszcencia segítségével*

A sejteket jéghideg, 95%-os etanolban fixáltuk. A rehidráció PBS-ben történt. A fedőlemezeket kecskeszérummal blokkoltuk. Ezt követően mintáinkat egy éjszakán át inkubáltuk poliklonális anti-nitrotirozin ellenanyaggal (1:300). A fedőlemezeket biotinilált, kecskében termeltetett, anti-nyúl IgG antitesttel inkubáltuk (1:200, 1 h, szobahőmérséklet). Mintákat streptavidin-AlexaFluor 488 konjugátummal inkubáltuk, majd fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk.

3.4. *Western blot*

A tirozin nitrálódás, az iNOS expresszió, a poli(ADP-ribóz) akkumuláció detektálása, a PARP foszforilációjának meghatározása (IP

mintákból) és a PKC izoformák azonosítása Western blot módszerrel történt. A primer antitesteket 1% tejport tartalmazó TBST-ben oldottuk, egy éjszakán át inkubáltuk mintáinkat. A torna-peroxidázzal jelölt szekunder antitestekkel való inkubáció 1 órán át történt. Eredményeinket kemilumineszcencia előhívó oldattal, röntgenfilmen tettük láthatóvá.

3.5. *Egyszálú DNS törések kimutatása*

A DNS töréseket comet assay-vel mutattuk ki. Az eljárás a károsodott DNS azon tulajdonságán alapszik, hogy könnyebben hurkolódik ki és mozdul el elektromos erőterben, mint az ép DNS. A maganyag károsodás hatására üstökösszerűen elnyúlik (innen az eljárás neve), míg az ép DNS a sejt eredeti helyén marad. A sejteket agarózba ágyasztuk, lizáltuk, majd elektromos erőterbe helyeztük. A DNS-t etidium bromiddal (10 µg/ml) tettük láthatóvá. Eredményeinket fluoreszcens mikroszkópiával detektáltuk és egy vizuális értékelési rendszer segítségével értelmeztük.

3.6. *Radioaktív PARP aktivitásmérés*

A sejt-lizátumok PARP-aktivitását a $^3\text{H-NAD}^+$ TCA-val kicsapható fehérjefrakcióba való beépülésének mérésével határoztuk meg. A sejteket 20 percig MNNG-vel kezeltük, majd a médiumot 0,5 ml aktivitásmérő pufferre cseréltük, mely 0,5 µCi/ml $^3\text{H-NAD}^+$ -ot tartalmazott. Harminc perc elteltével a sejtfehérjéket jég hideg 50%-os TCA-val kicsaptuk. A csapadékot 2% SDS/0,1 N NaOH oldatban szolubilizáltuk. A beépült radioaktivitást folyadékszintillációs számlálóval mértük meg.

3.7. *A mitokondriális membrán depolarizációjának és a szuperoxid termelődésének kimutatása*

A mitokondriális membránpotenciál változását áramlási citometriával vizsgáltuk, FACS-Calibur citométeren, 3,3'-dihexiloxakarbocianin-jodiddal [DiOC₆(3)] festett sejtekben.

A mitokondriális szuperoxid termelést szintén áramlási citometriával határoztuk meg hidroetidium (HE) felhasználásával (2 µM, 15 perc, 37 °C), amit a szuperoxid erősen fluoreszkáló etidiummá alakít.

3.8. *Kaspáz-3 aktivitás mérése*

Hat órával az MNNG kezelés megkezdése után lizáltuk a timocitákat. A lizátumokhoz 1:1 arányban reakciópuffert adtunk, amely 50 µM-os végkoncentrációban tartalmazta az aminometil-kumarinnal konjugált tetrapeptid kaspáz szubsztrátot (DEVD-AMC), mellyel 1 órán át inkubáltuk. Eredményeinket fluorimetriásan detektáltuk (EX: 390 nm, EM: 460 nm).

3.9. *A DNS fragmentáció kimutatása (DNS létra képződése)*

Az internukleoszomális DNS fragmentációt agaróz gélelektroforézissel mutattuk ki. Két százalékos agaróz gél-t öntöttünk, majd a gél megszilárdulása után a fésű feletti részt levágtuk. Az üres részbe 1% agaróz gél-t öntöttünk. A sejteket mintapufferrel elegyítve vittünk fel a géltre. Az elektroforézist követően a gél-t 2 µg/ml etidium bromiddal festettük meg.

3.10. *Citotoxicitás meghatározása (propidium jodid felvétel)*

Az MNNG kezelés által kiváltott sejtpusztulást propidium jodid (PI) felvétellel határoztuk meg. A timocitákat 2,5 µg/ml PI oldattal festettük 15 percen át, majd PBS-sel végzett mosás után áramlási citometriával analizáltuk

a mintákat. A citotoxicitást a következő képlet segítségével számítottuk: $100 \times (T-C)/(100-C)$, ahol a T a PI pozitív sejtek százalékát jelenti a mintákban, míg a C a kontroll mintában a PI pozitív sejtek arányát.

3.11. *Citotoxicitás meghatározása (MTT redukciós módszer)*

Az MNNG kezelés hatását a sejtek életképességére 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium-bromid (MTT) redukciós módszerrel is vizsgáltuk. Mivel szuszpenziós sejtekkel dolgoztunk, a kezelések elvégzése után a sejteket Eppendorf csövekbe gyűjtöttük, centrifugáltuk, majd a médium leszívása után azokat dimetil-szulfoxidban (DMSO) vettük fel.

3.12. *Immunprecipitáció*

A PARP-1 foszforilációjának detektálását immunprecipitációval végeztük. A kezelések elvégzése után a sejteket lizáltuk, majd szonikáltuk. Mintáinkat *Sepharose - protein A* gyanta hozzáadásával előtisztítottuk. Az immunprecipitáció PARP elleni antitesttel és *Sepharose-protein A* gyantával történt. Ezután foszfoszerin elleni antitesttel Western blotot végeztünk. A vizsgálatot foszfoszerin elleni antitesttel immunprecipitálva és PARP elleni antitesttel Western blotot végezve is elvégeztük.

3.13. *PKC izoformák lokalizációjának vizsgálata immunfluoreszcenciával*

A sejteket poli-lizinnel bevont lemezekben immobilizáltuk. Etanolos fixálást követően vizsgálatainkhoz a Western blot módszernél is használt PKC elleni antitesteket alkalmaztuk. Immunfluoreszcens jelölésre FITC-cel konjugált szekunder antitesteket használtunk. A sejtmagokat DAPI-val festettük. A felvételeket Zeiss LSM 510 META konfokális mikroszkóppal készítettük.

3.14. *In vitro foszforiláció*

Tisztított PARP-1 enzimet foszforiláltunk tisztított cPKC enzimek elegyével (α , β és γ izoformák keveréke), HEPES tartalmú assay pufferben. A PKC elegy végkoncentrációja 0.1 $\mu\text{g/ml}$ volt. Az enzimet CaCl_2 és foszfatidil-szerin – diolein micellák hozzáadásával aktiváltuk. Mintánként 5 μl ATP elegyet használtunk [0,998 mM ATP és 20-szorosára hígított ^{32}P -ATP (270 CPM/pmol)]. SDS-poliakrilamid gélelektroforézist követően eredményeinket autoradiográfiával detektáltuk.

3.15. *Metalloproteináz zimográfia*

A szövetmintákat TNC pufferben homogenizáltuk. A fehérjekoncentrációt Bradford módszerével határoztuk meg. A homogenizátumokat ezután 2X SDS mintapufferrel kevertük össze, majd 7,5 μg fehérjét vittünk fel zselatin vagy kazein zimográfias gélekre. A géleket a futtatás után renaturáltuk, majd az aktív proteínázok előhívását egy éjszakán át végeztük előhívó pufferben. Az emésztetlen szubsztrátot Brilliant Blue festékkel festettük meg. Bizonyítandó, hogy az emésztés után megjelenő sávok Ca^{2+} -függő proteázoknak felelnek meg, replikátum géleket Ca^{2+} -mentes pufferben (20 mM EDTA) hívtunk elő.

3.16. *Peroxidáz aktivitás mérése*

Cryochrome Blue matrix-ba ágyazott szövetekből 6 μm vastagságú szeleteket vágunk. A reakciópufferben 10 percen át inkubáltuk mintáinkat. Egy órán át, szobahőmérsékleten háttérfestést végeztünk Nuclear Fast Red-del. A tárgylemezeket desztillált vízzel mostuk, majd dehidráltuk és lefedtük.

3.17. Citokin expresszió vizsgálata ELISA módszerrel

Az egérfülekéből készült lizátumokban citokinek (TNF α , IL-1 β) és kemokinek (MIP-1 α , MIP2) expresszióját vizsgáltuk ELISA kitek (R&D System, Minneapolis, MN) segítségével. Vizsgálatainkat a kitek protokolljai alapján végeztük.

3.18. Mieloperoxidáz aktivitás mérése

Az egérfüleket homogenizálása után a mieloperoxidáz aktivitás mérését 1 mM hidrogén-peroxid jelenlétében végeztük, TMB szubsztráttal. Az MPO aktivitást 650 nm-en, fotometriásan detektáltuk. Eredményeinket fehérjetartalomra vonatkoztattuk.

3.19. Statisztikai analízis

Minden kísérletet legalább három alkalommal végeztünk el különböző napon. A szignifikancia meghatározására a Student *t* tesztet alkalmaztuk, és a $p < 0,05$ értékeket tekintettük szignifikánsnak. A comet assay statisztikai analíziséhez a Mann és Whitney - féle *U*-tesztet használtuk.

4. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS

4.1. MNNG kezelés hatására bekövetkező tirozin nitrálás és PARP aktiváció vizsgálata

4.1.1. Az MNNG által okozott sejtpusztulás és PARP aktiváció tanulmányozása

Más sejttípusok esetében már ismert volt, hogy az MNNG aktiválja a DNS törés - PARP aktiváció útvonalat, ezért megvizsgáltuk, hogy rendelkezik-e hasonló hatással timocitákon. Az MNNG már viszonylag alacsony koncentrációban alkalmazva is jelentős mértékű nekrotikus sejtpusztulást (PI felvétel) eredményezett, ami a PARP gátlószerekkel és a tiolos antioxidánsokkal kivédhető volt.

A PARP gátlása tehát csökkentette a nekrotikus sejtpusztulást, viszont ezzel egyidejűleg fokozta az apoptotikus sejthalált. Alacsony MNNG koncentráció alkalmazása esetén emelkedett kaszpáz aktivitást és - internukleoszómális DNS fragmentációt mértünk, míg magasabb MNNG koncentrációk hatására mindkét paraméter csökkenését tapasztaltuk. PJ-34-gyel történő előkezelés ellensúlyozta az MNNG hatását. Az MNNG PARP aktivációt okozott timocitákban, ami mind a tiolos antioxidánsokkal, mind pedig a PARP inhibitorral gátolható volt.

4.1.2. DNS törés és mitokondriális paraméterek vizsgálata MNNG-vel kezelt timocitákban

Az alkalmazott antioxidánsok védelmet nyújtottak az MNNG által okozott DNS törések ellen is, míg a PARP inhibitor PJ34 a DNS törést nem befolyásolta.

Korábbi vizsgálataink alapján a peroxinitrit, vagy hidrogén-peroxid által indukált nekrotikus sejthalált mitokondriális változások is kísérik, mint például a mitokondriális membrán depolarizációja, szekunder szuperoxid termelés és a mitokondrium szerkezeti sérülése. Ezenkívül azt is bizonyították, hogy ezeket a változásokat timocitákban a PARP aktivációja okozza. MNNG kezelés hatására hasonló mitokondriális változásokat tapasztaltunk, mint korábban, az oxidatív stressznek kitett timocitákon.

4.1.3. Az MNNG-ből felszabaduló NO hatásainak vizsgálata

Több megfigyelés is bizonyítja azt a lehetőséget, miszerint az MNNG bomlása reaktív intermedierek termelődéséhez vezet. Az MNNG molekula tartalmaz egy nitrozo csoportot, ezért elképzelhetőnek tartottuk, hogy a szerves nitrozo-vegyületekhez hasonlóan az MNNG bomlása során is keletkezhet nitrogén-monoxid. Az MNNG vizes oldatában koncentrációfüggő nitrit/nitrát termelődést tapasztaltunk, ami az MNNG-ből történő NO felszabadulásra utal. Eredményeinket az NO-specifikus DAF-2 nevű, fluorogén próbával erősítettük meg. A fenti adatok alapján feltételezhető, hogy az MNNG-ből NO szabadul fel, ami szuperoxiddal egyesülve peroxinitritet képez MNNG-vel kezelt timocitákban.

A peroxinitrit nitrálni képes a fehérjék tirozin és triptofán oldalláncait, valamint a DNS guanin bázisait. Az MNNG-vel kezelt sejtek erős immunopozitivitást mutattak nitrotirozinra, amely dózis- és időfüggést mutatott. A keletkező peroxinitrit - legalább részben - felelős lehet az MNNG citotoxikus hatásáért.

Az MNNG kezelés hatására nem indukálódott az iNOS timocitákban. Eredményeink arra utalnak, hogy az endogén NO termelésnek nincs szerepe a folyamatban.

4.1.4. Az intracelluláris és az extracelluláris GSH eltávolításának hatása az MNNG által kiváltott citotoxicitásra

Vizsgálatainkban az intracelluláris glutation depléciója szignifikáns védelmet nyújtott az MNNG citotoxikus hatásával szemben, ami azt jelzi, hogy a GSH/GST rendszer az MNNG bioaktivációját szolgálja az általunk vizsgált sejtekben. Kísérleti körülményeink között az exogén tiolok valószínűleg az MNNG extracellulárisan történő detoxifikációjának révén fejtik ki citoprotektív hatásukat. Ezt támasztja alá az a vizsgálatunk is, amelyben a tiolokat az MNNG kezelés előtt kimostuk a sejtek tápfolyadékából. Ebben az esetben nem tapasztaltunk citoprotektív hatást. A tiolok védőhatása tehát nem bizonyítja, hogy az MNNG toxicitásának háttérében szabadgyökök által közvetített mechanizmus áll.

4.1.5. A szuperoxid, a nitrogén monoxid és a peroxinitrit szerepének vizsgálata az MNNG citotoxikus hatásában

Eredményeink alapján valószínűsíthető, hogy mind a peroxinitrit, mind pedig az MNNG citotoxikus hatásában szerepe van a PARP aktivációjának. Ezért megvizsgáltuk, hogy szerepet játszik-e a peroxinitrit az MNNG citotoxikus hatásában. Feltevésünk mellett szól a tiolos antioxidánsok védőhatása az MNNG által okozott DNS töréssel és citotoxicitással szemben. Ismert viszont, hogy a GSH és a NAC a reaktív oxigén – és nitrogén intermedierek (ROI és RNI) mellett az alkil gyökök befogására is képesek, ezért megvizsgáltuk specifikus ROI és RNI inhibitorok hatását is. A kísérletben alkalmazott sejtpermeábilis szuperoxid-diszmutáz, kataláz, cPTIO (NO scavenger) és FP-15 (peroxinitrit bomlását katalizáló porfirinszármazék) egyike sem volt képes gátolni az MNNG által okozott DNS törést és citotoxicitást. Ezek alapján elmondható, hogy az MNNG nem ROI/RNI

termelődés révén okozza a DNS-törést, a PARP-aktivációt és a sejtpusztulást. Nitrogén-monoxid, reaktív oxigén intermedierek és peroxinitrit képződik ugyan az MNNG-vel kezelt sejtekben, azonban ezek nem befolyásolják az MNNG által okozott DNS-törést és sejthalált timociták esetében.

4.2. A protein kináz C szerepe az MNNG által kiváltott citotoxicitás szabályozásában

Irodalmi adatok szerint a PARP 1 több kináznak (AMPK, DNA-PK, JNK, PKC) is szubsztrátja lehet. *In vitro* vizsgálatok alapján a PKC képes a PARP-1 foszforilációjára.

Western blot módszerrel kimutattuk, hogy egér timocitákban az összes általunk vizsgált PKC izoforma (α , β_1 , β_2 , δ , ϵ , ζ , θ , μ) expresszálódik. Megerősítettük a PARP-1 PKC általi *in vitro* foszforilációját is.

4.2.1. A PKC aktiváció hatása az MNNG által kiváltott PARP aktivációra

MNNG-vel kezelve a timocitákat, korábbi eredményeinknek megfelelően, jelentős mértékű PARP aktivációt tapasztaltunk, melyet megakadályozott a PARP gátlószer PJ34 egyidejű alkalmazása. A PKC aktivátor PMA-val (forbol-12-mirisztát-13-acetát) történt előkezelés hatására az MNNG-indukálta PARP aktiváció gátlását tapasztaltuk. Ezzel összhangban, a keletkező ADP-ribóz polimerek mennyiségének szignifikáns csökkenését tapasztaltuk a PMA-val kezelt sejtekben. A PMA PARP-gátló hatása különböző mértékben ellensúlyozható volt PKC inhibitorok alkalmazásával.

4.2.2. A PKC aktiváció hatása az MNNG által kiváltott citotoxicitásra

A PKC aktivátor és a gátlószerek a PARP-aktivációra kifejtett hatásokkal összhangban a sejthalált is befolyásolják. A PARP-aktivitás PMA-kezelés hatására történő gátlása - a PARP inhibitorokhoz hasonlóan - véd a nekrotikus sejtpusztulás ellen, egyúttal a sejthalált az apoptotikus útvonalakra tereli. A PMA hatását csökkenteni tudtuk az alkalmazott PKC inhibitorokkal (GF109203X, Gö6976). Hasonló megfigyeléseket tettünk az érett limfoid populációt képviselő splenocitákon is, viszont Jurkat T limfoid sejtvonalon és adherens sejteken (A549 tüdőepitél sejtvonal, HaCaT keratinocita sejtvonal) a jelenséget nem tudtuk kimutatni. Ezek alapján elmondható, hogy eredményeink kiterjeszthetők érettebb limfoid sejtekre is, viszont transzformált sejtvonalakra nem.

4.2.3. A PKC aktiváció hatása az MNNG indukálta DNS törésre

Sem a PMA, sem pedig a PKC inhibitorok nem befolyásolták az MNNG hatására létrejövő DNS törést. Pozitív kontrollként glutationt (GSH) használtunk, mely a 4.1. fejezetben leírtaknak megfelelően megakadályozta az MNNG által kiváltott DNS törést. Ezek az eredmények megerősítik azt a feltevésünket, miszerint a PKC nem a PARP aktivációhoz vezető folyamatokat, hanem magát a PARP aktivációt befolyásolja.

4.2.4. A PARP-1 PKC általi foszforilációjának vizsgálata

A PMA kezelés hatására a PARP-1 foszforilációját tapasztaltuk, amit az alkalmazott PKC inhibitorok csökkentettek. Eredményeink alapján tehát a PKC sejtes rendszerben is képes a PARP-1 foszforilációjára, aktivitásának gátlására, s ezáltal citoprotektív hatású. Ez a felfedezés számos, a PKC, a PARP és a sejthalál területén megjelent eredményt megmagyaráz. Számos

korábbi cikkben különböző stimulusok (oxidánsok, proinflammatorikus citokinek) által indukált sejthalál meggátolható volt a PKC-t aktiváló forbolészterekkel, ráadásul a PKC overexpressziója gátolja a sejtpusztulást. Számos esetben a PKC inhibitorok fokozzák a sejthalált. A PKC ezen kívül véd a miokardiális infarktussal szemben, amelyben a miokardiális nekrosis a PARP-1 túlaktiváció következménye. Eredményeink alapján valószínűsíthetjük, hogy a PARP-1 aktivitásának szabályozása is részét képezi a PKC sejthalál regulációjában betöltött szerepének. Emellett a PARP PKC általi szabályozása a sejt más jelátviteli folyamataiban is szerepet játszhat. Például humán endotél sejteken az IGF-1 indukálta VEGF expresszió a PKC általi foszforiláció hatására gátlódó PARP-aktivitástól függ.

Érdemes megjegyeznünk, hogy fibroblasztokban és humán monocitákban a PKC a PARP-1 aktivációját okozta. A fenti ellentmondást okozhatja például a sejttípusok és a kísérleti körülmények különbözősége. Az is lehetséges, hogy a PMA a PARP enyhe aktivációját okozza, ami PARP-1 automodifikációjához vezet, amiről ismert, hogy az enzim gátlását okozza. Ezt követően az MNNG által indukált DNS-törés csupán enyhe PARP aktivációt okoz, a PARP így nem tud túlaktiválódni és nekrozist okozni. Ennek a feltételezésnek az igazolása azonban további vizsgálatokat igényel.

A PARP és a PKC viszonyával kapcsolatos megfigyelések szerint a PARP is képes módosítani a PKC aktivitását. Ráadásul, a PARP befolyásolja a MARCKS (myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate) fehérjék tulajdonságait is, melyek a PKC enzimek fontos szubsztrátjai.

4.2.5. A PKC útvonal indirekt stimulációjának hatása a PARP-aktivításra

A PKC jelátviteli útvonalának indirekt stimulációja (pl.: aktivált timocitákban és splenocitákban) szintén a PARP gátlásához vezetett.

Klasszikus PKC-k sejtbeli elhelyezkedését vizsgálva a PKC β_1 nukleáris transzlokációját tapasztaltuk. A többi vizsgált PKC izoforma (α , β_2 , δ , ϵ , ζ , θ , μ) lokalizációjában nem tapasztaltunk változást. A fenti adatok alapján valószínűleg a PKC β_1 közvetítheti a PARP-1 gátlását aktivált timocitákban és splenocitákban, melyet PKC inhibitorokkal végzett vizsgálataink is megerősítenek.

Eredményeink tehát a PARP-1 aktivitásának PKC általi szabályozását mutatják egér timocitákon. Elsőként vizsgáltuk a PKC-re ható aktiváló-, illetve gátlószerek hatását MNNG-indukálta nekrozisban. Vizsgálataink alapján a PKC (legalább részben) a PARP aktivitásának szabályozásán keresztül játszik szerepet a sejthalál modulálásában timocitákon.

4.3. A PARP-1 szerepe a kontakt hiperszenzitivitás gyulladós folyamataiban

A kontakt hiperszenzitivitás (CHS) egy késői típusú hiperszenzitivitási reakció. A CHS reakció két részre osztható: szenzitizációs fázisra és effektor fázisra. Utóbbiban fontos szerepet játszik a proinflammatorikus citokinek termelődése, limfociták és granulociták infiltrációja, melyhez erős oxidatív stressz társul. Irodalmi adatok alapján a poli(ADP-ribóz) polimeráz (PARP) gátlása, vagy a PARP-1 gén kiütése jelentősen csökkenti a gyulladós reakciókat (colitis, arthritis, uveitis). Jelen vizsgálataink arra irányultak, hogy feltárjuk a poli-ADP-riboziláció szerepét CHS-ben.

4.3.1. PARP gátlószer hatása a neutrofil infiltrációra

A PARP gátlásának hatására csökken az ödémaképződés (fűlvastagodás) és az inflammatorikus sejtek migrációja a gyulladós területre. Különböző gyulladásokban, így a CHS-ben is reaktív oxigén – és nitrogén intermedierek (ROI és RNI) keletkeznek. Ezek az intermedierek stimulálhatják a DNS-törés - PARP-aktiváció útvonalat, amely részt vesz az endotél diszfunkció kialakításában. Mivel a legtöbb reaktív intermediert az infiltráló granulociták termelik, ezek gyulladós területre történő migrációjának gátlásával csökken a ROI/RNI mennyisége. Eredményeink (peroxidáz festés, MPO aktivitás) valóban azt mutatják, hogy a PARP gátlásának hatására csökken a granulociták kilépése a keringésből.

4.3.2. Citokin expresszió és MMP aktiváció CHS-ben

Korábbi vizsgálataink szerint a PARP-1 - az NF κ B transzkripciós faktor koaktivátoraként - citokinek expresszióját szabályozza különböző gyulladós modellekben. A MIP-1 α (a neutrofil granulociták egyik legfontosabb kemoattraktánsa) és más proinflammatorikus citokinek/kemokinek (MIP-2, TNF α , IL-1 β) indukcióját figyeltük meg oxazolon kezelés hatására, ezek szintjét a PJ-34 kezelés mérsékelte.

A mátrix metalloproteinázok (MMP) is gyulladós mediátornak tekinthetők, mivel az MMP inhibitorok gyulladáscsökkentő hatását bizonyították számos gyulladós modellben, így CHS-ben is. Az MMP-k az infiltráló sejtek mozgását segítik az extracelluláris mátrixban. Az MMP9 expressziója proinflammatorikus citokinekkal (TNF α , IL-1 β) indukálható, termelésére több sejttípus is képes. Az MMP-k aktivitását szöveti metalloproteináz inhibitorok (TIMP-ek) ellensúlyozzák. A szenitizált egerek mintáiban a mátrix-metalloproteináz (MMP) expressziójának és aktivitásának

emelkedését tapasztaltuk, ami a PJ-34 kezelés hatására lecsökkent. Az MMP inhibitor TIMP2 esetében ellentétes változásokat tapasztaltunk. Mivel az MMP-expressziót az NF κ B szabályozza, az MMP9 expressziójának PARP-inhibitorok általi gátlása is a PARP koaktivátor szerepének következménye. Eredményeink alapján elmondható, hogy a PARP aktivitás szerepet játszik a gyulladás kifejlődésében CHS-ben. A PARP több ponton modulálja a gyulladásos reakciókat: fokozza a leukocita migrációt, a gyulladásos citokinek és kemokinek termelődését, valamint fokozza az MMP-k expresszióját.

4.3.3. A PARP aktiváció szerepe irritatív dermatitisben

Bőrfelülettel érintkező haptének nem antigén-specifikus irritatív dermatitist is indukálhatnak. Megvizsgáltuk a PJ34 hatását a PMA által kiváltott fülvastagodásra. A PMA kisebb mértékű duzzanatot okozott, mint az oxazonon. A PARP inhibitor szignifikánsan - bár a CHS-ben tapasztalható képest kisebb mértékben - csökkentette a fülek duzzanatát, és gátolta a sejtes infiltrációt. Eredményeink arra utalnak, hogy a PARP mind az antigén által kiváltott, immunmediált gyulladást, mind a nem antigén-specifikus általános gyulladásos útvonalakat modulálja.

5. KONKLÚZIÓK

A poli-ADP-riboziláció szerepének vizsgálata az MNNG által kiváltott citotoxicitásban

1. Az MNNG citotoxikus hatású timocitákon.
2. A PARP enzimnek átkapcsoló szerepe van az MNNG által kiváltott sejthalálban.
3. Tiolos antioxidánsok védelmet nyújtanak az MNNG által kiváltott citotoxicitással, DNS-töréssel és PARP-aktivációval szemben.
4. Az MNNG bomlása során NO szabadul fel.
5. Az NO a sejtben keletkező szuperoxiddal peroxinitritet képez, ami tirozin nitrálódást okozhat.
6. Az MNNG citotoxikus hatásában nem játszik szerepet sem az NO, sem a szuperoxid, sem pedig az ezek egyesüléseként keletkező peroxinitrit.

A protein kináz C szerepének vizsgálata az MNNG által kiváltott citotoxicitás szabályozásában

1. A PKC *in vitro* és *in vivo* is foszforilálja a PARP-1-et.
2. A protein kináz C gátolja a PARP-1-et egér timocitákban.
3. A protein kináz C aktivációja a PARP-1 gátlásán keresztül csökkenti az MNNG citotoxikus hatását.

A PARP-1 szerepének vizsgálata a kontakt hiperszenzitivitás gyulladással összefüggő folyamataiban

1. A PARP szerepet játszik a CHS során kialakuló ödémaképződés, a neutrofil infiltráció, citokin expresszió és az MMP aktiváció folyamataiban.

2. A PARP irritatív dermatitisben is befolyásolja a duzzanat és neutrofil infiltráció mértékét. Tehát a PARP mind az antigén által kiváltott, immunmediált gyulladást, mind a nem antigén-specifikus általános gyulladásos útvonalakat modulálja.

6. KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA

Az értekezéshez felhasznált közlemények:

Csaba Hegedűs, Petra Lakatos, Gábor Oláh, Balázs Tóth, István Kovács, Szabolcs Gergely, Éva Szabó, Tamás Bíró, Csaba Szabó, László Virág (2008): Protein kinase C protects from DNA damage-induced necrotic cell death by inhibiting poly(ADP-ribose) polymerase-1 *FEBS Letters FEBS Lett.* **582(12)**:1672-1678. **IF.: 3,26**

Bai P*, **Hegedűs Cs***, Erdélyi K, Szabó E, Bakondi E, Gergely Sz, Szabó Cs, Virág L (2007): Protein tyrosine nitration and poly(ADP-ribose) polymerase activation in N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine-treated thymocytes: implication for cytotoxicity. *Toxicol Lett.* 170 (2007) 203–213 ***első szerzők** **IF.:2.83**

Bai P*, **Hegedűs Cs***, Szabó É*, Gyüre L, Bakondi E, Brunyánszki A, Gergely S, Szabó C and Virág L (2008): Poly(ADP-ribose) polymerase mediates inflammation in a mouse model of contact hypersensitivity. *J. Invest. Dermatol.* 2008 Jul 17. PMID: 18633442 ***első szerzők** **IF.: 4.83**

Az értekezéshez kapcsolódó előadások:

Bai P., Erdélyi K., Bakondi E., **Hegedűs Cs.**, Gergely P., Szabó Cs., Virág L. Peroxinitrit lehetséges szerepe az N-metil-N-nitro-N-nitrozoguanin (MNNG) kiváltotta citotoxicitásban. (Magyar Biokémiai Egyesület Jelátviteli Konferenciája, Sopron, 2004)

Bai, P., Erdélyi, K., Bakondi, E., **Hegedűs, C.**, Gergely, P., Szabó, C., Virág, L.: Potential role of peroxynitrite in the poly(ADP-ribose) polymerase-mediated cytotoxicity caused by the alkylating agent N-methyl-N-nitro-N-

nitrosoguanidine in thymocytes. (Poly[ADP-ribosyl]ation in Health and Disease, FEBS Advanced Course, Debrecen, 2003)

Egyéb előadások:

Hegedűs Csaba, Lakatos Petra, Kovács Katalin, Kovács István, Kónya Krisztina, Pazurik István, Patonay Tamás, Gergely Pál, Virág László: Citoprotektív és antioxidáns hatású vegyületek azonosítása HTS (high throughput screening) módszerrel (38. Membrán-Transzport Konferencia, 2008, Sümeg)

Az értekezéshez kapcsolódó poszterek:

Hegedűs Csaba, Lakatos Petra, Bai Péter, Kovács István, Virág László (2008): A protein kináz C (PKC) szerepének vizsgálata az MNNG által kiváltott citotoxicitás szabályozásában (MBKE Konferenciája, Szeged, Magyarország)

Éva Szabó, Péter Bai, **Csaba Hegedűs** and László Virág (2008): poly(ADP-ribose) polymerase mediates inflammation in a mouse model of contact hypersensitivity (MDT és MMKE IX. Kozmetológiai Kongresszus – DUDG Német-magyar Bőrgyógyászati Társaság közös Kongresszusa, Budapest, Magyarország)

Hegedűs C., Gergely S., Bai P., Erdelyi K., Virág L (2006): A protein kináz C (PKC) moduláló szerepe az N-metil-N'-nitro-N-nitrozoguanidin (MNNG) által kiváltott, poli(ADP-ribóz) polimeráz (PARP) - függő citotoxicitásban. (MBKE Konferenciája, Pécs, Magyarország)

Hegedűs C., Gergely S., Bai P., Erdelyi K., Virág L (2006): A protein kináz C és a poli(ADP-ribóz) polimeráz szerepe az MNNG által kiváltott

citotoxicitás szabályzásában. (Sejtanalitikai konferencia, Budapest, Magyarország)

Bai, P., Erdélyi, K., Bakondi, E., **Hegedűs, C.**, Gergely, P., Szabó, C., Virág, L. (2004): The possible role of peroxynitrite production in the N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanin (MNNG) induced cytotoxicity. Peroxynitrite '04 (Konstanz, Németország)

Egyéb poszterek

Lakatos Petra, **Hegedűs Csaba**, Kovács István, Kovács Katalin, Virág László (2008): Antioxidáns, citoprotektív, citotoxikus anyagok szűrése high-throughput (HTS) technikával (MBKE Konferenciája, Szeged, Magyarország)

Erdélyi Katalin, Bai Péter, **Hegedűs Csaba**, Gergely Pál, Virág László (2008): Poli(ADP-ribóz) polimerek és a poli(ADP-ribóz) glikohidroláz sejthalálban való lehetséges szerepének vizsgálata A549 sejtekben (MBKE Konferenciája, Szeged, Magyarország)

Hegedűs Cs., Kovács I., Lakatos P., Kovács K., Kónya K., Pazurik I., Patonay T., Virág L. (2007): HTS (high throughput screening) eljárások alkalmazása: kémiai, biokémiai és sejthalapú módszerek (MBKE Konferenciája, Debrecen, Magyarország)