

Egyetemi Doktori (Ph. D.) Értekezés Tézisei

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

Dr. Szabó Éva

**Debreceni Egyetem, Orvos- és Egészségtudományi Centrum
Bőrgyógyászati Klinika**

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

2003

Bevezetés

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. Az általuk katalizált reakció során az enzimek a NAD⁺ -ot ADP-ribózra és nikotinamidra hasítják, majd az ADP-ribóz egységeket megfelelő adapter fehérjék glutamát oldalláncaihoz kapcsolva azokból hosszú elágazó láncú (ADP-ribóz)_n polimereket szintetizálnak. 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 polimert a poli(ADP-ribóz) glikohidroláz (PARG) és az ADP-ribozil protein liáz gyorsan lebontja. A polimer féléletidejét kevesebb mint egy percre becsülik, ami a poli(ADP-ribóz) szintetizáló és lebontó enzimek összehangolt működésére utal.

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 megtalálható. A PARP-1 a sejtmag egyik legnagyobb mennyiségben előforduló fehérjéje. A 116 kDa méretű enzim három fő domént tartalmaz. Az N-terminális végén elhelyezkedő DNS kötő doménban két cinkujj motívum található, míg a katalitikus domént az enzim C-terminális végén találjuk. 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 enzimek között az aminosav szekvencia szintjén 92%-os homológia van. A katalitikus doménban 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 DNS károsodást felismerő és jelző enzim, ami egyszálú és kétszálú DNS törések hatására aktiválódik. 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-riboziláláció egyik legfontosabb célfehérjéje 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, 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. transzkripciós faktorok, DNS javító enzimek és adapter fehérjék poli-ADP-ribozilációját is kimutatták. (pl. NF- κ B, TEF-1, B-MYB, MCAT-1, DNS-PK, p53).

A poli-ADP-riboziláció biológia szerepe, különös tekintettel a sejthalálra

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 sejtfunciót, többek között pl. a kromatinszerkezetet, a replikációt, transzkripciót, a proliferációt és a sejthalált is szabályozza. Jelen munkánk szempontjából különösen fontos a PARP-1-nek a sejthalált és a transzkripciót befolyásoló hatása

A PARP aktivációt először Berger munkacsoportja hozta összefüggésbe a DNS károsító ágensek citotoxikus hatásával. Az általuk megalkotott sejtöngyilkossági 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 analízisét. Az utóbbi években a

poli-ADP-riboziláció kutatás egyik központi kérdésévé vált, hogy a PARP aktiváció milyen típusú sejthalált vált ki. 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 apoptózis révén elhaló sejtekre jellemző a kompakt morfológia, kromatin kondenzáció, a plazmamembrán épségének megőrzése és az apoptotikus sejteknek a fagociták által történő gyors eliminációja. A PARP-1 és a sejthalál viszonyának tanulmányozására rányomta a bélyegét az, hogy a PARP-1 volt az apoptózis egyik fő végrehajtó rendszerének, a kaszpázoknak az egyik elsőként azonosított szubsztrátja. 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 apoptosis ATP igényes lépéseire. Míg a PARP-1 apoptózisban betöltött szerepe ellentmondásos, egyre inkább elfogadott az a nézet, hogy a PARP aktiváció révén megvalósuló sejttöngyilkosság onkózis formájában zajlik le. 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. Az a kifejezett védő hatás, ami aktív PARP hiányában számos gyulladásmodellben és reperfüziós károsodásban megfigyelhető, legalábbis részben magyarázható a PARP gátlás antionkotikus hatásával. A másik fő mechanizmus a gyulladásos mediátorok expressziójának transzkripciós gátlása lehet.

A PARP szerepe a génexpresszió szabályozásában

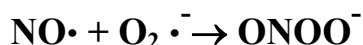
A poli-ADP riboziláció transzkripcióban betöltött szerepére számos kísérleti adat utal. A PARP transzkripciós aktivitásának egyik komponense a kromatinszerkezet és funkció szabályozása. A poli-ADP-riboziláció negatív

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. Ezen túlmenően kimutatták, hogy a PARP-1 részt vesz a preiniciációs komplex képződésében és számos transzkripció faktor koaktivátora. Ezek közül kiemelendő a gyulladásos mediátorok (adhéziós molekulák, citokinek, iNOS) expresszióját szabályozó NF-κB jelentősége.

Peroxinitrittel stimulált poli-ADP-riboziláció különböző kórfolyamatokban

Az utóbbi két évtizedben a szabadgyök biológia és medicina felvirágzása során számos nagy népcsoportot érintő betegségben vált egyértelművé a reaktív oxigén és nitrogén tartalmú intermedierek (ROI és RNI), s ezen belül a peroxinitrit kóroki szerepe. Mivel vizsgálataink egyik súlyponti kérdése a peroxinitrit által kiváltott PARP aktiváció, ezért itt röviden ismertetem a peroxinitrit képződését és hatásait.

A peroxinitrit a NO és a szuperoxid anion reakciója során keletkezik. A peroxinitrit keletkezését a szuperoxid és/vagy a nitrogén monoxid túltermelődése elősegíti. Kis mennyiségű szuperoxid folyamatosan keletkezik a mitokondriális légzési lánc működése során és a NADPH oxidázok és a xantin oxidázok is termelik. Az egyetlen ismert biomolekula, amely hatékonyan versenyezhet a szuperoxid diszmutázzal a szuperoxidért, a nitrogén monoxid. Joseph Beckman 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. Bár a peroxinitrit nem szabadgyök, hisz nincs párosítatlan elektronja, mégis reaktívabb azoknál a molekuláknál, amelyekből

keletkezik. A peroxinitrit reakcióba lép tiolokkal, lipid peroxidációt okoz, DNS töréseket hoz létre, jelátviteli útvonalakat aktivál vagy gátol. A fehérjéket oxidáció és/vagy tirozin/triptofán nitrálás révén inaktiválhatja.

A peroxinitrit és a PARP aktiváció a bőr és egyéb szervek kórélettanában

Bőr homogenizátumból Western blottal vagy ELISA-val számos betegségben (égésben, krónikus UVB sugárzás után, egér leishmaniasisban, szisztémás szklerózisban) mutattak ki nitro tirozint, mint az in vivo peroxinitrit termelődés bizonyítékát. A PARP aktiváció szerepét a bőrben eddig csupán napégésben és kénmustár expozícióban vetették fel.

Az ischaemia-reperfúziós (szívinfarktus, stroke) és a gyulladásos folyamatok, a diabétesz, a traumák és a sokk is olyan állapotok, melyekben a PARP-1 aktiváció történik. 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, peroxinitrit és nitroxil anionok hatására következik be. A poli-ADP-ribosiláció farmakológiai gátlása jelentősen javítja az illető betegségmodellekben a legfontosabb klinikai és laboratóriumi paramétereket (infarktus terület, túlélés, sejthalás mértéke, 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-reperfúziós és gyulladásos betegségmodellekben. E kedvező hatások a sejthalál gátlásával és a gyulladásos mediátorok transzkripciójának gátlásával magyarázhatók.

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 hiperszenzitivitási (CHS) reakció során?
2. Kimutatható-e DNS törés és PARP aktiváció CHS-ben?
3. Milyen mechanizmussal történik a peroxinitrit által kiváltott citotoxicitás HaCaT keratinocita sejteken?
4. Történik-e PARP- aktiváció a peroxinitrittel kezelt HaCaT sejtekben?
5. Van-e szerepe a poli-ADP-ribozilációnak 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-riboziláció gátlása a gyulladásos sejtek extravazációját kísérletes uveitisben.

Módszerek

Kontakt hiperszenzitivitási modell (CHS) és in vivo peroxinitrit kezelés

Az egerek szenzitizálását a leborotvált hasfalán végeztük 100 µl 2%-os oxazolonnal. (CHS csoport). A kontrol csoport állatait 100 µl oldószerrel (aceton : olíva olaj = 4:1) kezeltünk. Hét nap múlva mind a kontrol, mind a CHS állatok mindkét fülét 20 µl 0,5%-os oxazolonnal bekenve váltottuk ki a gyulladásos reakciót. Huszonnégy óra múlva a füleket eltávolítottuk és formalinba tettük, illetve fagyasztó médiumban lefagyasztottuk.

Kísérletes uveitis modell

Tíz Lewis patkányt 0127:B8 szerotípusú E. coli-ból származó lipopoliszachariddal (LPS) kezeltünk (150 µg/állat, subcutan a jobb talpba

fecskendezve). A kontroll állatok a talpba fiziológiás sóoldatot kaptak. Tizenhét órával az LPS beadása után az elülső szemcsarnokban kialakult gyulladás (uveitis anterior) fokát az íriszben levő CD11⁺ sejtek száma jelezte.

Nitrotirozin kimutatása

A nitrotirozint immunhisztokémiai eljárással mutattuk ki nyúl poliklonális antinitrotirozin ellenanyaggal (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY). Az immunreaktivitást kecskében termelt biotinált anti nyúl-IgG másodlagos ellenanyaggal és avidin-biotin peroxidáz komplex-szel (ABC) mutattuk ki, Mindkét reakcióhoz Vektor Elite kit-et (Vector Laboratories, Burlingame, CA) használtunk. A színreakciót nikkel-DAB szubsztráttal hívtuk elő.

DNS törések és szöveti PARP aktiváció kimutatása

A DNS töréseket a kereskedelemben kapható TUNEL kittel (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN) mutattuk ki a gyártó utasításait követve. A szöveti PARP aktivációt két módszerrel igazoltuk: 1) Paraffinba ágyazott metszeteken az enzim végtermékét, a poli(ADP-ribóz)-t mutattuk ki immunhisztokémiai módszerrel egér monoklonális anti-poli(ADP-ribóz) (Alexis, San Diego, CA) segítségével. 2) Fagyasztott metszetekben a PARP aktivitást PARP enzimhisztokémiai reakcióval mutattuk ki szubsztrátként biotinált NAD⁺-ot, detektálásra streptavidinnel konjugált peroxidázt használva.

Sejtprolifерáció, citotoxicitás és PARP aktivitás vizsgálata

A HaCaT sejtek proliferációját kereskedelmi forgalomban kapható ELISA-val mértük (Amersham, Pharmacia Biotechnology, Piscataway, NJ), mely a BrDU beépülésén és ELISA-ban történő meghatározásán alapul. A citotoxicitást kolorimetriás MTT teszttel határoztuk meg. A PARP aktivitást a standard ³H-NAD inkorporációs assayvel mértük.

Kaspáz aktivitás és DNS fragmentáció meghatározása

A kaspáz aktivitást a fluorogen tetrapeptid-amino-4-metilkumarin konjugátum (DEVD-AMC) hasításával fluorimetriásan mértük. A DNS fragmentációt kereskedelmi forgalomban kapható ELISA kittel (Roche

Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN) mértük, ami a citoplazma hisztonokkal asszociált DNS fragmentumainak mérésén alapszik.

ICAM-1 expresszió és interleukin-8 (IL-8) meghatározása

HaCaT sejteket 30 ng/ml (300 U/ml) rekombináns humán interferon- γ -val (R&D Systems, Minneapolis, MN) stimuláltunk 24 órán át. A sejteket FITC-cel jelölt monoklonális anti-human ICAM-1 ellenanyaggal (Pharmingen, San Diego, CA) festettük, majd 1%-os paraformaldehidben fixáltuk. A mintákat FACSCalibur áramlási citométerrel (Becton Dickinson, San Diego, Ca) analizáltuk. Az IL-8 termelés vizsgálatához a sejteket 24 órán át 20 ng/ml humán rekombináns IL-1 β -val (R&D Systems, Minneapolis, MN) stimuláltunk. A médiumból az IL-8 mennyiségét szendvics ELISA rendszerben mértük (R&D Systems, Minneapolis, MN).

Eredmények és megbeszélés

Mustár-olaj által kiváltott tirozin nitrálás és PARP aktiváció a bőrben

Mustár olajat kenve a bőrre, immunhisztokémiai módszerrel vizsgáltuk a nitrotirozin jelenlétét (anti-nitrotirozin ellenanyag) és a PARP aktivációt [anti-poli(ADP-ribóz) ellenanyag]. Érdekes módon bár a nitrotirozin az epidermis teljes vastagságában kimutatható volt, PARP aktivációt csupán az epidermisz bazális rétegében észleltünk. Lehetséges, hogy ebben a modellben az intrakután keletkező peroxinitritnek szerepe van a PARP aktiváció kialakulásában.

Késői típusú hiperszenzitivitási reakcióban szerzett eredményeink.

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 füléből készült metszeteken immunhisztokémiai módszerrel kimutatható a nitrotirozin jelenléte, míg a kontroll (nem szenzitizált) állatokban nem. A keratinociták tirozin nitrációja a gyulladásos gócokban (mikroabscessusokban) volt a legintenzívebb. 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. A PARP aktivitást PARP enzimhisztokémiai módszerrel detektáltuk. Míg a kontroll metszeteken nem találtunk PARP aktivitást, a CHS-ben erős festődést kaptunk a keratinocitákban és különböző dermalis sejtekben is.

A peroxinitrit antiproliferatív és citotoxikus hatása HaCaT keratinocitákon: a PARP aktiváció szerepe

A peroxinitrit dózis függő sejtproliferáció gátlást és citotoxicitást okozott. Az alacsonyabb peroxinitrit koncentrációknál megfigyelhető proliferáció gátlásban a PARP aktiváció valószínűleg nem játszik jelentős szerepet, mivel a 3-aminobenzamidnak (3-AB) 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 szignifikánsan gátolt. A citoprotektív hatás nem járt együtt az apoptotikus paraméterek csökkenésével, tehát a PARP aktiváció citotoxikus hatása nem apoptózis formájában valósult meg.

A PARP szerepe a keratinocita aktivációban

Human rekombináns interferon- γ (30 ng/ml) kezelés hatására kilencszeres sejtfelszíni ICAM-1 expresszió növekedés következett be. A PARP gátló 3-AB az interferon- γ indukálta ICAM-1 expressziót dóziszfüggően befolyásolta. Ismert, hogy szérum tartalmú médiumban a HaCaT sejtek spontán termelnek IL-8-at. Mi azt találtuk, hogy az IL-1 β növelte a HaCaT sejtek IL-8 termelését. PARP gátlás hatására mind a spontán, mind az IL-1 β által stimulált IL-8 termelődés gátolható volt, ami azt jelzi, hogy a PARP-nak szerepe van az IL-8 expresszió szabályozásában.

A peroxinitrit → DNS károsodás → PARP aktiváció útvonal szerepe a bőrben

A két gyulladásmodellben a szöveti nitrotirozin in vivo peroxinitrit termelődést jelez. A keratinociták mutatták a legkifejezettebb nitrotirozin festődést, ami azt mutatja, hogy a bőrben a peroxinitrit elsődleges célpontjai a keratinociták. A fokozott tirozin nitrálódás valószínűleg a gyulladásos citokinek által indukált iNOS expresszió és fokozott szuperoxid túltermelődés 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. 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. Valószínűnek 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.

A HaCaT sejteken kapott eredmények és előzetes kísérleteink alapján a PARP gátlás valószínűleg kedvezően befolyásolja a CHS vagy a kénmustár által kiváltott gyulladást. Egy ilyen kedvező farmakológiai hatás háttérében a sejtek életképességének javítása és a keratinocita aktiváció (adhéziós molekulák, kemokinek) gátlása állhat.

Haemorrhágiás sokk (HS)_okozta tirozin nitráció és PARP aktiváció a bélben

A vérzéses sokk összetett pathomechanizmusában egyértelműen fontos szerep jut az oxidatív stressznek. A különböző antioxidáns stratégiák hatásossága alapján valószínűsíthető a ROI kóroki szerepe is a hemorrhágiás sokkban. A reaktív nitrogén tartalmú 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. A ROI/RNI együttes termelődése joggal vetette fel a peroxinitrit képződés és a PARP aktiváció lehetőségét is HS-ban.

HS-on és reszuszcitáción átesett (HS) valamint álkezelt (kontrol) PARP^{+/+} és PARP^{-/-} egerek vékonybeléből paraffinba ágyazott metszeteket készítettünk. A HS csoportban immunhisztokémiai módszerrel poli(ADP-ribóz)-t (PAR) tudtunk kimutatni a PARP^{+/+} egerek bélmintáiban, ami PARP aktivációt jelez. 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 aktivációt detektálni. Jelentős tirozin nitrációt is ki tudtunk mutatni a HS-en átesett egerek belében a PARP^{+/+} csoportban, legintenzívebben a károsodott bolyhok csúcsi részein. Nitrotirozin festődést kaptunk a PARP^{-/-} csoportban is, de kevésbé intenzívet, és a bélbolyhok morfológiája ebben a csoportban csak enyhén károsodott. A PARP^{-/-} állatok védettsége a HS okozta mortalitással és bélpermeabilitással szemben (Dr. Lucas Liaudet eredményei) arra utal, hogy a PARP aktivációnak valóban szerepe van a HS pathomechanizmusában.

A PARP aktiváció szerepe diabeteszes érendothel diszfunkciójában.

A diabéteszes vasculopathia pathomechanizmuában már korábbról ismert volt a hyperglycaemia kóroki szerepe, és hogy ez a hatás részben az endothelsejteken keresztül érvényesül. A hyperglycaemia három, látszólag egymástól független útvonalon keresztül fejti ki kóros hatását az érendothelre: a) a glükózból keletkező AGE (advanced glycation endproducts) révén, b) a glükóz által kiváltott protein kinase C aktiváción keresztül és c) 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. Eredményeik szerint a hyperglycaemia ROI termelést indukál az endothelsejteken, és a ROI útvonal blokkolása (a mitokondriális elektronszállító rendszer vagy az oxidatív

foszforiláció gátlásával, illetve szuperoxid diszmutáz transzfekciójával) meggátolja mindhárom kóros szignálútvonal aktivációját.

A mi munkacsoportunk eredményei egy új, de szintén az oxidatív stressz és főleg a peroxinitrit által aktivált útvonal, a PARP aktiváció szerepére hívják fel a figyelmet. Diabéteszes egerek aortáiból készült metszeteken immunhisztokémiai módszerrel intenzív nitro tirozin festődést kaptunk, ami arra utal, hogy ezekben a diszfunkciós ereken peroxinitrit termelődött. A PARP gátlószerrel (PJ-34) kezelt állatok ereiben is találtunk pozitív festődést. TUNEL festéssel nagyszámú DNS törést kaptunk a diabéteszes és a PARP inhibitorral kezelt aorta metszetekben is. A PARP aktivációját enzim hisztokémiai módszerrel végeztük. Diabéteszes állatok ereiben intenzív festődést találtunk, de a PARP gátlószerrel kezelt diabéteszes állatok aortájában nem volt PARP aktivitásra utaló festődés.

Munkatársam, Dr. Francisco Soriano eredményei igazolják, hogy a hyperglycaemia endotheliális diszfunkciót kiváltó hatásai jelentős részben a fokozott poli-ADP-ribóziláció révén érvényesülnek (A PJ-34 jelentősen javította az érfunkciókat). A hyperglycaemiás állatokban 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 peroxinitrit a DNS törés-PARP aktiváció-NAD⁺/ATP depléción útvonalon ronthatja az endothelsejtek funkcióit.

Kísérletes uveitis modell

A kísérletes autoimmun uveitist szemfehérjéjével történő immunizálással váltják ki. Hasonló gyulladás váltható ki a szemben bakteriális lipopoliszacharid (LPS) intraplantáris alkalmazásával. Mi ez utóbbi módszert alkalmazva jelentős CD11⁺ sejtes 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 $\text{NO} \rightarrow \text{ONOO}^- \rightarrow \text{PARP}$ aktiváció útvonal. Irodalmi forrásokból tudjuk, hogy iNOS expresszió valóban bekövetkezik kísérletes uveitisben, és leírtak tirozin nitrációt is, ami peroxinitrit termelődést jelez. Nekünk sikerült PARP aktivációt is kimutatni, ami főleg az erek vetületében volt számottevő.

Konklúzió

1. CHS-ben a keratinocitákban tirozin nitrálás, DNS törések és PARP aktiváció mutatható ki.
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 citokinekkal stimulált 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 kísérletes uveitisben.
10. A peroxinitrit által kiváltott poli-ADP-riboziláció ígéretes terápiás célpontot jelenthet gyulladásos és ischaemia-reperfúzió alapuló betegségekben.

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: The 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(1):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. Goldfarb RD, Marton A, **Szabó É**, 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
7. Jagtap P, Soriano FG, Virág L, Liaudet L, Mabley J, **Szabó É**, 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
8. Faro R, Toyoda Y, McCully JD, Jagtap P, **Szabó E**, 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.* 73:575-581, 2002.

IF: 1,828

9. 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

10. 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.* 133:1424-30, 2001.

IF: 3,689

11. 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, 745-752, 2001.

IF: 5,443

12. Soriano FG, Liaudet L, **Szabó É**, Virág L, Mabley JG, Pacher P, Szabó C: Resistance to acute septic peritonitis in poly(ADP-ribose) polymerase-1-deficient mice. *Shock* 17:286-92, 2002.

IF:2,785

13. Pacher P, Liaudet L, Soriano FG, Mabley JG, **Szabó É**, Szabó C. The role of poly(ADP-ribose) polymerase activation in the development of myocardial and endothelial dysfunction in diabetes. *Diabetes.* 51:514-21, 2002.

IF:7,700

14. Szabó G, Bahrle S, Stumpf N, Sonnenberg K, **Szabó É**, 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.* 90:100-6, 2002.

IF:9,213