

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

A poli-ADP-riboziláció és a hidrogén-peroxid központi szerepe az osteogén differenciációban és a dohányfüst toxikus hatásaiban

Kovács Katalin

Témavezető: Dr. Virág László



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2014

1. TARTALOMJEGYZÉK

1. TARTALOMJEGYZÉK.....	2
2. RÖVIDÍTÉSEK.....	5
3. BEVEZETÉS	6
3.1. A poli(ADP-ribóz) polimeráz enzimeszalád	6
3.2. A poli(ADP-ribóz) metabolizmus	11
3.2.1. A poli(ADP-ribóz) polimer szintézise	11
3.2.2. A PAR polimer lebontása.....	14
3.3. PARP-1 aktivációt kiváltó hatások	15
3.3.1. DNS-törés.....	15
3.3.2. Egyéb („alternatív”) PARP-1 aktiváló mechanizmusok.....	16
3.4. A PARiláció fiziológiai szerepe és patofiziológiai jelentősége.....	16
3.4.1. DNS hibajavítás és a genom integritás fenntartása	16
3.4.2. A PARP-1 szerepe a sejthalál útvonalak szabályozásában.....	21
3.4.3. A génexpresszió és differenciáció szabályozása	25
3.4.4. A PARiláció patofiziológiai jelentősége, a PARP-1 gátlás terápiai lehetőségei	29
3.5. A dohányfüst által okozott oxidatív károsodás.....	30
3.6. Mesenchymalis őssejtek (MSC, mesenchymal stem cells) és az osteogén differenciáció jellemzése	34
4. CÉLKITŰZÉSEK.....	37
4.1. Célkitűzések I.....	37
4.2. Célkitűzések II.	37
5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	38
5.1. Anyagok.....	38
5.2. Módszerek	38
5.2.1. Sejttenyésztés	38
5.2.2. Cigarettafüst kivonat (CSE) készítése	39
5.2.3. May-Grünwald-Giemsa festés.....	39
5.2.4. Kolóniaképző képesség meghatározása.....	39
5.2.5. Viabilitási assay (MTT redukciós assay)	40
5.2.6. LDH aktivitás mérése	40
5.2.7. Mitokondriális membránpotenciál mérése.....	41

5.2.8. Sejtproliferáció mérése - ECIS (Electric Cell-substrate Impedance Sensing)	41
5.2.9. PAR és AIF kimutatása immunfluoreszcens festéssel.....	41
5.2.10. Western blot	42
5.2.11. Comet assay.....	42
5.2.12. Intracelluláris szuperoxid ($O_2^{\cdot-}$) detektálása és mérése	43
5.2.13. Hidrogén-peroxid (H_2O_2) detektálása	44
5.2.14. PARP-1 és PARG stabil csendesítése SAOS-2 osteosarcoma sejtvonalban	44
5.2.15. Humán chorion eredetű mesenchymalis őssejtek (cMSC sejtek) izolálása	44
5.2.16. cMSC sejtek fenotipizálása és funkcionális jellemzése	45
5.2.17. Statisztikai kiértékelés.....	47
6. EREDMÉNYEK.....	48
6.1. A poli-ADP-ribosziláció mint túlélési mechanizmus a dohányfüst által kiváltott sejthalálban.....	48
6.1.1. A cigarettafüst kivonat toxikus hatásai A549 sejtekre.....	48
6.1.2. CSE kezelés hatása a PAR akkumulációra	49
6.1.3. PARP-1 és PARG csendesítés hatásának vizsgálata a CSE által indukált sejthalálban	51
6.1.4. A PARP-1 és a PARG szerepe a CSE által kiváltott DNS károsodás javításában..	53
6.1.5. CSE kezelés hatására intracellulárisan képződő ROS mérése	53
6.1.6. Szuperoxid és hidrogén-peroxid szerepének vizsgálata a CSE által kiváltott PARP aktivációban és sejthalálban.....	55
6.2. Hidrogén-peroxid által indukált poli-ADP-ribosziláció szabályozó szerepe az osteogén differenciáció során bekövetkező sejthalálban.....	57
6.2.1. Chorionális mesenchymalis őssejtek (cMSC) fenotipizálása és funkcionális jellemzése.....	57
6.2.2. Reaktív oxigén vegyületek (ROS) keletkezése szükséges a SAOS-2 sejtek csontirányú differenciációjához	59
6.2.3. Az osteogén differenciáció során a PAR akkumuláció korrelációt mutat a ROS képződéssel	61
6.2.4. A differenciáció során keletkező hidrogén-peroxidnak szerepe van a sejthalálban	62
6.2.5. A PARP-1 és a PARG stabil csendesítése SAOS-2 sejtekben.....	63
6.2.6. A PARP-1 és a PARG szabályozza a SAOS-2 sejtek csontirányú differenciációját	66
6.2.7. A poli-ADP-ribosziláció szabályozza a csontirányú differenciáció során bekövetkező sejthalált SAOS-2 sejtekben és mesenchymalis őssejtekben	67
7. DISZKUSSZIÓ	70

7.1. A poli-ADP-riboziláció szabályozó szerepe a cigarettafüst által kiváltott sejthalálban	70
7.2. Hidrogén-peroxid által indukált poli-ADP-riboziláció szabályozó szerepe az osteogén differenciáció során bekövetkező sejthalálban	73
8. KONKLÚZIÓK.....	77
9. IRODALOMJEGYZÉK	78
10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	100
11. ÖSSZEFOGLALÁS	101
12. SUMMARY	102
13. PUBLIKÁCIÓS LISTA.....	103

2. RÖVIDÍTÉSEK

A magyarra csak nehézkesen fordítható kifejezések angolul szerepelnek.

AIF: apoptózis indukáló faktor	JNK: c-Jun N-terminális kináz
ALP: alkalikus foszfatáz	LDH: laktát-dehidrogenáz
ARH3: ADP-ribozil hidroláz 3	MSC: mesenchymalis őssejtek
ATM: ataxia telangiectasia mutated	NAD ⁺ : nikotinamid-adenin dinukleotid
ATP: adenzin-trifoszfát	NER: nukleotid excíziós DNS javítás
BAL: B aggressive lymphoma	NFκB: nukleáris faktor kappa B
BER: bázis excíziós DNS javítás	NHEJ: non-homologous end joining
BMP: csont morfogén fehérje	NLS: nukleáris lokalizációs szignál
BRCT: BRCA1 C terminális domén	NOX: NADPH oxidáz
CAT: kataláz	PAR: poli(ADP-ribóz)
COPD: chronic obstructive pulmonary disease	PARG: poli(ADP-ribóz) glikohidroláz
CSE: cigarettafüst kivonat	PARP: poli(ADP-ribóz) polimeráz
DDB2: damaged DNA binding protein 2	PCR: polimeráz láncreakció
DMMB: dimetil-metilénkék	PEG: polietilén-glikol
DMSO: dimetil-szulfoxid	RNS: reaktív nitrogén intermedierek
Dnmt1: DNS metiltranszferáz 1	ROS: reaktív oxigén intermedierek
ECIS: Electric Cell-substrate Impedance Sensing	Runx2: Runt-related transcription factor 2
FBS: főtális borjúsavó	SDS: nátrium-dodecíl-szulfát
GPX: glutation peroxidáz	SOD: szuperoxid dizmutáz
GSH: redukált glutation	TBARS: tiobarbiturát reaktív anyag
HBSS: Hank's balanced salt solution	TNF-α: tumor nekrosis faktor alfa
IFN: interferon	TRF1: telomeric repeat binding factor-1
IL: interleukin	WGR: triptofán-glicin-arginin domén
	XRCC1: X-ray repair cross-complementing protein 1

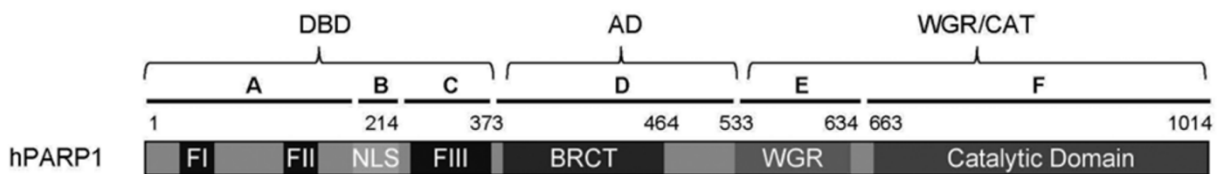
3. BEVEZETÉS

3.1. A poli(ADP-ribóz) polimeráz enzimcsalád

A poli(ADP-ribóz) polimerázok (PARP-ok, más néven ADP-ribozil transzferázok, ARTD-k) jellemzően eukariótákban és kivételesen egyes prokariótákban előforduló enzimek, melyek akceptor fehérjék ADP-ribozilációját katalizálják (Vyas et al., 2013). A poli-ADP-riboziláció kutatása az 1960-as években indult. Ekkor fedezték fel, hogy egy sejtmagban található enzim NAD^+ felhasználásával nukleinsavszerű molekula, poli(ADP-ribóz) [PAR] szintézisére képes (Chambon et al., 1963; Nishizuka et al., 1967). Ez az enzim a poli(ADP-ribóz) polimeráz, későbbi nevén PARP-1, sokáig az egyetlen ismert tagja volt a fehérjecsaládnak. Ma a PARP enzimcsaládnak 17 tagja ismert, a fehérjecsalád tagjait külön gén kódolja, de mindegyikük tartalmazza a konzervált, 50 aminosavból álló, PARP-okra jellemző szekvenciát (PARP signature sequence) a katalitikus doménon belül (Amé et al., 2004; Kim et al., 2005). Ez a PARP-okra jellemző szekvencia a gerincesek körében 100%-os homológiát mutat (Virág és Szabó, 2002). Az enzimcsalád tagjait doménszerkezetük és az aminosavszekvencia hasonlóságai alapján több alcshaládba sorolják, különböző munkacsoportok különböző besorolást használnak (Otto et al., 2005; Vyas et al., 2013; Hottiger et al. 2010).

A humán PARP-1fehérjét kódoló gén az 1-es kromoszómán található, a fehérje 1014 aminosavból áll, molekulatömege 113 kDa (Meyer et al., 2006; Amé et al., 2004). Az enzim felépítésére három fő szerkezeti elem jellemző: a DNS-kötő domén (DBD, 1-374 aminosavak), az automodifikációs domén (375-525 aminosavak) és a katalitikus domén (526-1014 aminosavak) (Langelier et al., 2008). Az N terminális részen található DNS-kötő domén két Zn-ujj domént tartalmaz, melyek különböző DNS struktúrákhoz kötődnek. Ezen felül a DNS kötő doménben található még egy nukleáris lokalizációs szignál (NLS) és egy kaszpáz-3 hasítóhely (DEVD: Asp-Glu-Val-Asp) (Virág és Szabó, 2002; Langelier et al., 2008). Egy harmadik Zn-ujj motívum meglétét is leírták az N-terminális részen, de ez önmagában nem kötődik a DNS-hez, hanem az enzim DNS általi aktiválódásához szükséges (Langelier et al., 2011; Tao et al., 2008). Az automodifikációs doménon belül egy BRCT domén (BRCA1 C terminális domén) található, mely gyakran előfordul a DNS hibajavításban szereplő és a sejtciklust szabályozó enzimekben (Virág és Szabó, 2002). A BRCT domén felelős a fehérje-fehérje kölcsönhatásokért a PARP-1 és a DNS hibajavító enzimek illetve egyéb kölcsönható fehérjék között (Langelier et al., 2008). A fehérje C-terminális részéhez közel található egy erősen konzervált WGR (triptofán-glicin-arginin) domén, melynek pontos funkciója még nem

tisztázott, de nélkülözhetetlen a PARP-1 aktivációjához. Újabb kutatások alapján valószínűleg a domének közötti kölcsönhatásban van szerepe (Langelier és Pascal, 2013). A katalitikus domén a molekula C-terminális végén helyezkedik el. Ez az eukarióták körében erősen konzervált régió, mely a NAD^+ szubsztrát megkötéséért és a polimer szintéziséért felelős (Virág és Szabó, 2002). A humán PARP-1 doménszerkezetét az 1. ábra mutatja. A PARP-1 szerepet játszik a DNS hibajavításban, a sejtciklus ellenőrzésében, a transzkripció szabályozásában, a sejthalál útvonalak szabályozásában és számos egyéb folyamatban (Meyer et al., 2006).



1. ábra A humán PARP-1 doménszerkezete (Altmeyer et al., 2009 nyomán)

Az enzim három fő doménből épül fel: DNS-kötő domén (DBD), automodifikációs domén (AD) és katalitikus domén (WGR/CAT). Az N terminális részen található DNS-kötő domén három Zn-ujj domént, egy nukleáris lokalizációs szignált (NLS) és egy kaszpáz-3 hasítóhelyet tartalmaz. Az automodifikációs doménen belül egy BRCT domén található, melynek szerepe van a fehérje-fehérje kölcsönhatásokban a PARP-1 és a DNS hibajavító enzimek illetve egyéb kölcsönható fehérjék között. A fehérje C-terminális részéhez közel található WGR domén a domének közötti kölcsönhatásban fontos. A katalitikus domén (CAT) a NAD^+ szubsztrát megkötéséért és a polimer szintéziséért felelős.

A PARP-2 felfedezéséhez az vezetett, hogy PARP-1 knockout egerekből származó embrionális fibroblasztokban DNS függő PARP aktivitást sikerült kimutatni (Shieh et al., 1998; Amé et al., 1999). A PARP-2 a fehérjecsalád másik olyan tagja, mely nagymértékben aktiválódik DNS törés hatására, de aktivitása csupán 10 %-át teszi ki a teljes PARP aktivitásnak. A PARP-2 fehérje 570 aminosavból áll, molekulatömege 65 kDa, a kódoló gén a 14-es kromoszómán található (Amé et al. 1999). A fehérje doménszerkezete hasonló a PARP-1-éhez, de nem tartalmaz automodifikációs domént (ettől függetlenül képes automodifikációra), katalitikus doménje 69 %-os hasonlóságot mutat a PARP-1 katalitikus doménjével (Amé et al., 2004). Az N terminális domén felelős a DNS kötésért, és nukleáris lokalizációs szignált tartalmaz. A PARP-1-gyel ellentétben a PARP-2 nem DNS törésekhez, hanem a nukleotid hiányos részekhez „gap”-ekhez kötődik. További fontos különbség, hogy a PARP-1 leginkább a H1 hisztonokat, a PARP-2 pedig a H2B hisztonokat ADP-ribozilálja. A két enzim tehát különböző DNS szerkezetekhez és eltérő kromatin struktúrákhoz kötődik, ennek megfelelően a DNS hibajavításban betöltött szerepük is eltérő (Schreiber et al., 2006). A PARP-1 és a PARP-2 együttes jelenlétére és aktivitására van szükség a hatékony bázis

kivágásos DNS javításhoz (BER) (Schreiber et al., 2002). A mindkét génre knockout egerek (*parp-1^{-/-} parp-2^{-/-}*) életképtelenek, az egyedfejlődés korai stádiumában elpusztulnak, ami azt jelzi, hogy a poli-ADP-ribozilációnak kiemelkedő szerepe van a korai embriogenezisben is (Amé et al., 2004). A PARP-2 enzim szerepét kimutatták ezen felül a spermioenezisben (Dantzer et al., 2006), adipocita differenciációban (Bai et al., 2007) valamint transzkripció regulátorként szerepel az energia metabolizmusban (Bai et al., 2012).

A PARP-3 enzim a DNS függő PARP-ok harmadik tagja, kódoló génje a 3-as kromoszómán található, a fehérje molekulatömege 67 kDa. Két különböző splice variánsa van, egyik 533, másik 540 aminosavból áll. Az enzim a centroszóma egyik fő alkotóeleme, a leány centriolumokban lokalizálódik, ott kölcsönható partnere a PARP-1. A PARP-3 a mitózisban és a sejtciklus szabályozásában vesz részt, overexpressziójának hatására a sejtek G1/S fázisban megrekedtek (Augustin et al., 2003).

A vault PARP (vPARP, PARP-4) génje a 13-as kromoszómán található, a fehérje 1724 aminosavból épül fel, molekulatömege 193 kDa, ez az enzimes család legnagyobb molekulatömegű tagja. Eredetileg a citoszolikus ribonukleoprotein partikulumok, vault-ok alkotójaként írták le, tisztított vault-okban ADP-ribozilálja saját magát és az MVP-t (major vault protein) (Kickhoefer et al., 1999). A vPARP egy része a sejtmagban a mitotikus orsóban helyezkedik el (Kickhoefer et al., 1999), így feltételezhetően a ribonukleoprotein partikulumoktól független szerepe is lehet a sejtben (Liu et al., 2004).

A tankiráz-1 (TRF1 interacting, ankyrin-related ADP-ribose polymerase) enzimet, más néven PARP-5a-t, a humán TRF1 (telomeric repeat binding factor-1) kölcsönható partnereként írták le először (Smith et al., 1998). A kódoló gén a 8-as kromoszómán található (Zhu et al., 1998), a fehérje 1327 aminosavból áll, molekulatömege 142 kDa. Ez az enzim volt a PARP enzimes család másodikként leírt tagja (Meyer et al., 2006). A kromoszómák telomer régiójában lokalizálódik, középső doménjében 24 ankyrin ismétlődés található, mely a fehérje-fehérje kölcsönhatásokban játszik szerepet (Smith et al., 1998). Az enzim C terminális része a PARP-1 katalitikus doménjével mutat homológiát. A rekombináns tankiráz PARP aktivitással rendelkezik *in vitro*, és ADP-ribozilálja mind a TRF1-et, de maga a tankiráz is akceptor fehérjeként szolgálhat (Smith et al., 1998), így az ADP-ribozilációnak szerepe lehet a telomeráz aktivitás szabályozásában. A tankiráz sejtciklustól függően a citoplazmában is jelen van, és a MAPK (mitogen activated protein kinase) általi foszforiláció növeli ADP-ribozilációs aktivitását (Chi és Lodish, 2000). Így a PARP-1-től és PARP-2-től eltérően a tankiráz nem a DNS törések hatására aktiválódik, hanem aktivitását a foszforilációs állapota befolyásolja.

A tankiráz-2 (PARP-5b) génje a 10-es kromoszómán található, a fehérje 1166 aminosavból áll, molekulatömege 127 kDa. Szekvenciája 85 %-ban megegyezik a tankiráz-1 szekvenciájával (Amé et al., 2004). Eredetileg a Grb14 (Growth factor receptor-bound protein 14) adapter molekula kölcsönható partnereként írták le (Lyons et al., 2000), mely a citoplazmában, a Golgi apparátushoz kötődve található. Így feltehetőleg a vezikuláris transzportban van szerepe. A fehérje overexpressziója kaszpáz-független sejthalált indukál (Kaminker et al., 2001). A tankiráz-1 és -2 többféle sejtkompartimentben jelen van, mindkettőnél jellemző motívum az ankyrin szekvenciák és a SAM (sterile alpha motif) domén megléte, melyekkel több fehérjéből álló komplexek létrehozására képesek. Így scaffold fehérjeként fontos szerepük lehet, a PARP domén jelenléte pedig ADP-ribosziláció révén szabályozási lehetőséget biztosít a nagy fehérje komplexek kialakulása illetve disszociációja során (De Rycker et al., 2003). Amé et al. (2004) egy harmadik tankirázt is azonosított (tankiráz-3), de mások szerint ez a tankiráz-2 trunkált verziója vagy allélvariánsa (Otto et al., 2005).

A TiPARP (PARP-7) génje a 3-as kromoszómán található, a fehérje 657 aminosavból áll, molekulatömege 76 kDa. Egérsejtekben fedezték fel, 2,3,7,8-tatraklorodibenzol-p-dioxán (TCDD) kezelés hatására nagymértékben nőtt az expressziója, nevét is innen kapta: TCCD inducible PARP (Ma et al., 2001). A TiPARP szerepe tisztázatlan, szerepe lehet a T-sejtes immunválaszban és a tumorképződésben (Amé et al., 2004), patkány RM1 génnel mutatott homológia alapján feltételezik hatását a memória kialakulásában (Matsuo et al., 2000), mások szerint a glükoneogenezisben van szerepe (Diani-Moore et al., 2010).

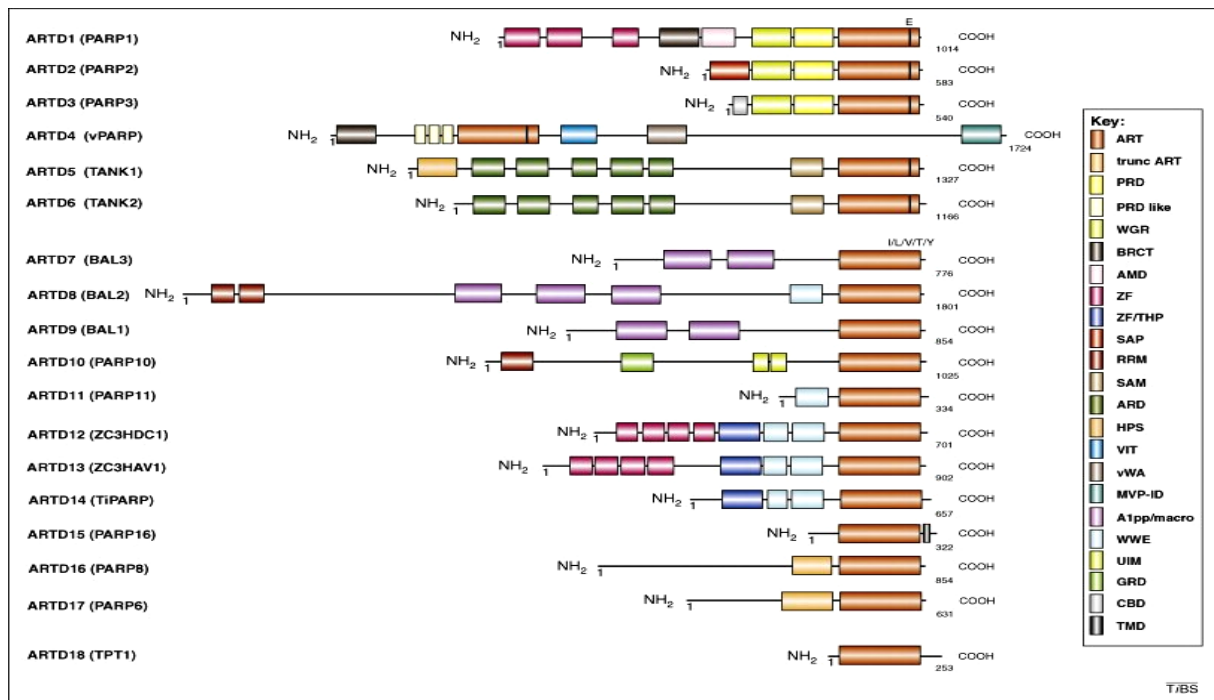
Az enzimes család többi tagja kevésbé jellemzett, szerepük kevésbé tisztázott. Néhány PARP enzim (PARP-6, -8, -11 és -16) funkciója alig ismert. Egyes PARP-okban a jellegzetes katalitikus domén mellett változatos domének jelennek meg, ami arra enged következtetni, hogy biológiai funkciójuk szerteágazó (Amé et al., 2004). Leggyakoribb a WWE domén előfordulása, öt PARP enzimből, a PARP-7, PARP-11, PARP-12 (ZC3HDC1), PARP-13 (ZC3HAV1) és PARP-14 enzimből fordul elő (Amé et al., 2004). A domén az elnevezését a leginkább konzervált aminosavjairól (triptofán (W) és glutamát (E)) kapta. A WWE domén egy PAR k öt motívum, a domént tartalmazó tizenkét humán fehérje leginkább két funkcionális csoportba tartozik: az ubiquitinációhoz illetve a PARilációhoz kapcsolódó fehérjék csoportjába. A domén előfordulása utalhat a poli-ADP-ribosziláció és az ubiquitinálás közötti funkcionális kapcsolatra (Wang et al., 2012). További kapcsolatra utal az ubiquitinációval az, hogy a PARP-10 UIM (Ubiquitin Interacting Motif) szekvenciát tartalmaz (Amé et al., 2004). A PARP-10 megtalálható a sejtmagban és a citoplazmában is,

míg egy része a nukleoluszokban helyezkedik el. Ez utóbbi CDK-2 általi foszforiláció révén aktiválódik, és feltételezhetően szerepet játszik a sejtproliferációban (Chou et al., 2006).

A PARP enzimek egy külön csoportját képezik a makroPARP-ok (vagy BAL-PARP-ok). A PARP-9 (BAL1), PARP-14 (BAL2) és PARP-15 (BAL3) sorolható ide (Cho et al., 2009; Vyas et al., 2013), melyek szerkezetében kettő (PARP-9 és -15) vagy akár három (PARP-14) tandem elhelyezkedő makrodomén is található. Ezek közül elsőként a PARP-9-et írták le, mely magas szintű expressziót mutatott diffúz nagy B sejt lymphoma betegekben (innen a BAL, B aggressive lymphoma elnevezés) (Aguilar et al., 2000). A PARP-14-et ezenkívül fokális adhézions molekulaként is leírták (Vyas et al., 2013). A makrodomének széleskörű előfordulása és erősen konzervált szekvenciája alapján feltételezhető, hogy alapvető sejtfolyamatokban tölthet be szerepet (Allen et al., 2003). Néhány makrodoménról kimutatták, hogy képes kölcsönhatásba lépni az ADP-ribózzal és a poli-ADP-ribózzal is, így ez a motívum is PAR kötő modulként tartható számon (Ahel et al., 2009; Gottschalk et al., 2009; Karras et al., 2005).

A PARP-7, -8 és -13 egy Zn-ujj motívumot tartalmaz, a PARP-12 három Zn-ujj domént, de ezek különböznek a PARP-1-ben található Zn-ujj doménektől. A PARP-10 és PARP-15 RRM motívumot (RNA recognition motif) tartalmaz, mely számos RNS kötő fehérjében megtalálható, így például a heterogén nukleáris ribonukleoproteinekben (hnRNP), az alternatív splicing szabályozásában szereplő fehérjékben és a kis nukleáris ribonukleoproteinekben (snRNP) (Amé et al., 2004). A PARP-13 (ZC3HAV1, ZAP) szerepét leírták a virális génextpresszió gátlásában (Guo et al., 2004). A TPT1 (TRPT1, tRNS 2'-foszfo-transzferáz-1, ARTD18) enzimet is a PARP-ok közé sorolják (Hottiger et al., 2009). Ez a NAD^+ függő enzim a tRNS splicingjában vesz részt, ADP-ribóz 1''-2'' ciklikus foszfátot szintetizál (Spinelli et al., 1998; Steiger et al., 2005).

A különböző PARP enzimek a fent említett domének segítségével képesek specifikus kölcsönhatásokat létrehozni más jelátviteli útvonalakban szereplő fehérjékkel. Érdekes jellemzője az enzimes családnak továbbá az is, hogy egymással valamint a PAR polimerrel is képesek kölcsönhatásba lépni, mely még sokszínűbbé és egyben bonyolultabbá teszi a PARiláció hatásmechanizmusát a sejtválasz során (Amé et al., 2004). A poli(ADP-ribóz) polimeráz enzimes család tagjainak doménszerkezetét az 2. ábra mutatja.



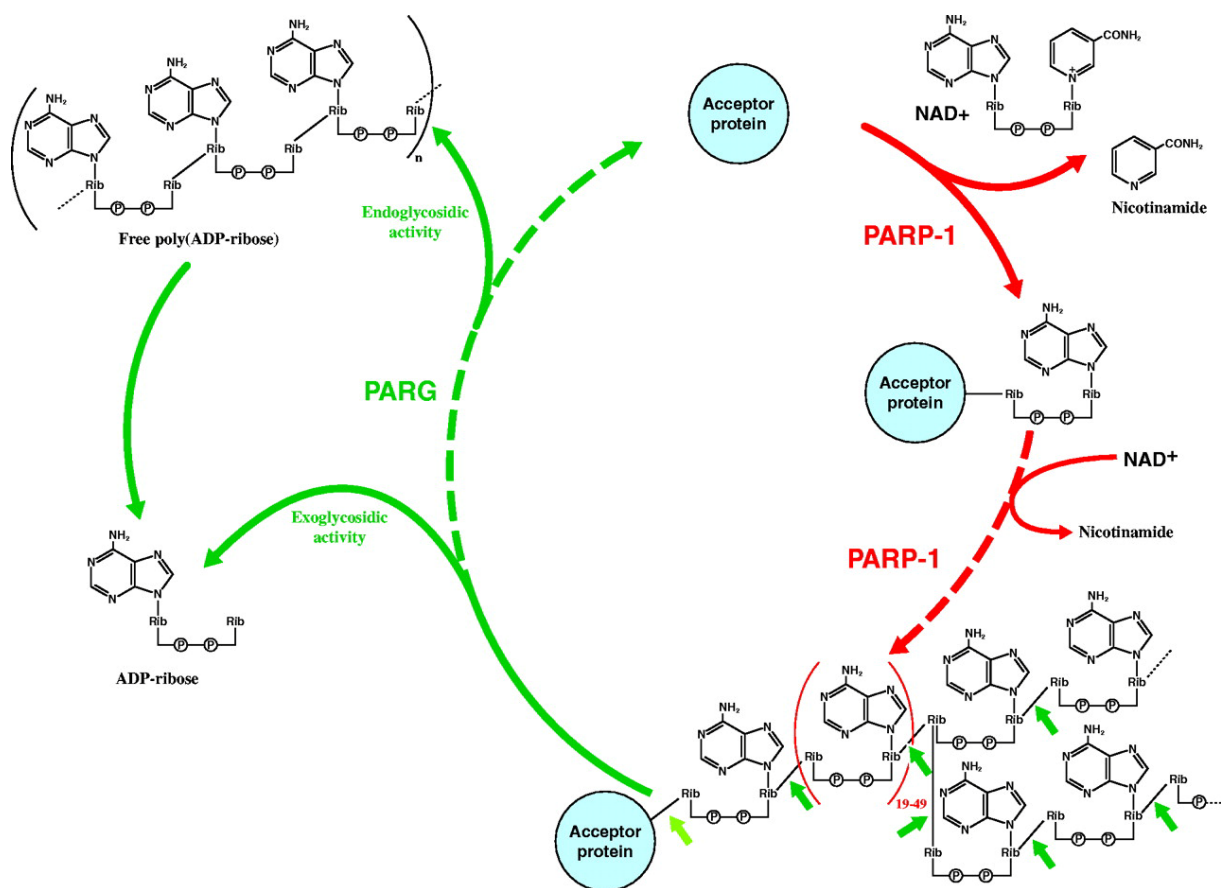
2. ábra A poli(ADP-ribóz) polimeráz enzimsalád doménszerkezete és javasolt egységes nomenklatúrája (Hottiger et al., 2010 nyomán)

ART: A PARP enzimsalád minden tagjára jellemző, a molekula C-terminális végén elhelyezkedő katalitikus domén az eukarióták körében erősen konzervált régió, a NAD^+ szubsztrát megkötéséért és a polimer szintéziséért felelős. Ezen felül a PARP-okban számos egyéb domén található, melyek közül az alább felsoroltak a leggyakoribbak. PRD: PARP szabályozó domén (PARP regulatory domain). WGR: triptofán-glicin-arginin domén. BRCT: BRCA1 karboxi-terminális domén. ZF: Zn-ujj domén. RRM: RNS felismerő motívum. SAM: sterile alpha motif. ARD: ankyrin repeat domain. HPS: hisztidin-prolin-szerin régió. WWE: PAR kötő motívum (triptofán (W) és glutamát (E)). UIM: ubiquitin interaction motif. GRD: glycine-rich domain.

3.2. A poli(ADP-ribóz) metabolizmus

3.2.1. A poli(ADP-ribóz) polimer szintézise

Az ADP-riboziláció egy filogenetikailag ősi reakciómechanizmus, mely négy fő csoportra osztható: mono-ADP-riboziláció, poli-ADP-riboziláció, ADP-ciklizáció és O-acetil-ADP-ribóz képzése (Hassa et al., 2006). A poli-ADP-riboziláció (PARiláció) olyan poszttranszlációs proteinmódosítás, melyet a poli(ADP-ribóz) polimeráz (PARP) enzimek katalizálnak. A PARP-ok és így a PARiláció az élesztők kivételével minden eukarióta élőlényben előfordulnak, bár néhányan beszámoltak arról, hogy poli-ADP-riboziláció-szerű reakciók lejátszódnak archaebaktériumokban is, annak ellenére, hogy az archae genomban eddig nem találtak poli(ADP-ribóz) enzimek kódolásáért felelős géneket (Hassa et al., 2006; Faraone-Mennela et al., 1998).



3. ábra A PAR metabolizmusa (Rouleau et al., 2004 nyomán)

A PARP-1 a NAD⁺-ot nikotinamidra és ADP-ribózra bontja, majd az ADP-ribóz egységeket kovalensen kapcsolja megfelelő akceptor fehérjékhez. A poli(ADP-ribóz) szintézisének három lépése (piros nyilakkal jelezve): (1) az akceptor fehérje mono-ADP-ribozilációja, (2) elongáció (3) a polimer elágazódása 20-50 ADP-ribóz egységenként. A negatív töltésű PAR polimer féléletideje rövid a PARG enzim általi gyors lebontásnak köszönhetően (zöld nyilak).

A PARP-ok az aktivációt követően NAD⁺-ot használnak szubsztrátként, azt nikotinamidra és ADP-ribózra bontják, majd az ADP-ribóz egységeket kovalensen kapcsolják megfelelő akceptor fehérjékhez, és elágazó homopolimereket szintetizálnak. A reakció reverzibilis, a polimerek lebontását a poli(ADP-ribóz) glikohidroláz (PARG), az ADP-ribozil hidroláz 3 (ARH3) és az ADP-ribozil protein liáz végzi (Bürkle és Virág, 2013). A PARP-1 aktivációjának első lépéseként az enzim az egyik Zn-ujj doménjével a DNS-hez kötődik. Ez elősegíti a DNS-kötő és a katalitikus domén közötti kölcsönhatást az enzim dimerizációja révén. Ennek következtében a konformációváltozás következik be a katalitikus doménen belül, ami megnöveli az enzim affinitását a NAD⁺ iránt, és a PARP gyors automodifikációja következik be az automodifikációs domén meghatározott oldalláncain. Ezt további ADP-ribóz egységek beépülése révén a polimer hosszabbítása követi (Altmeyer et al., 2009; Hassa et al, 2006). A PAR polimerek metabolizmusát a 3. ábra mutatja be.

A PARP-1 szerkezetében megtalálható három cink-ujj motívum szerepe eltérő a különböző DNS károsodások felismerésében és az enzim aktivációjában. Az N-terminális legközelebb eső cink-ujj (FI) meglehetősen elengedhetetlen az enzim aktivációjához. A második cink-ujj doménnek (FII) nagyobb az affinitása a szabad DNS végződésekhöz, így az egyszálú DNS-törésekhez való specifikus kötődésben játszik szerepet (Ikejima et al., 1990; Gradwohl et al., 1990; Langelier és Pascal, 2013). A harmadik cink-ujj (FIII) motívum a DNS-kötő domén és a katalitikus domén kölcsönhatásához szükséges és a PARP-1 dimerizációját segíti elő (Langelier et al., 2008).

Az enzim által szintetizált polimerekben az ADP-ribóz egységek ribóz-ribóz 1'-2' glikozidos kötéssel kapcsolódnak egymáshoz (Hassa et al., 2006). A polimerek hosszúsága a néhány egységnyitől akár 200 egységnyiig is terjedhet (Virág és Szabó, 2002), 20-50 egységenként található elágazásokkal. Az elágazó polimerek szerkezete meglehetősen komplex (Hassa et al., 2006), Minaga és Kun (1983) vizsgálatai alapján bizonyos típusú polimer láncok helikális szerkezetet mutathatnak.

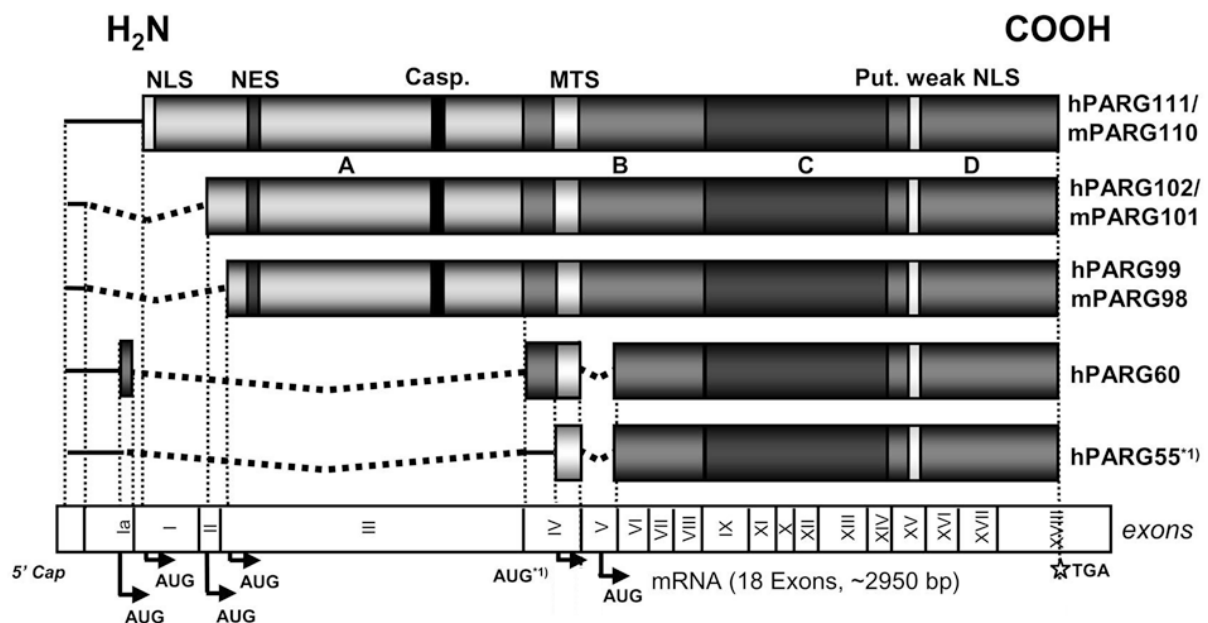
Poli-ADP-ribozilációs akceptor helyként a fehérjék glutamát, aszpartát és lizin oldalláncai szerepelhetnek (Ogata et al., 1980; Suzuki et al., 1986; Altmeyer et al., 2009). *In vivo* körülmények között a legnagyobb mennyiségben előforduló PARilált fehérje maga a PARP-1. Az auto-poli-ADP-riboziláció az enzim gátlását eredményezi, így szabályozó szerepe van (Virág és Szabó, 2002). Több más fehérje is szolgálhat akceptor fehérjeként a PARiláció során, eddig több mint 200 sejtmagi fehérjét találtak, melyhez *in vitro* körülmények között kovalensen kapcsolódhat a PAR (Hassa et al., 2006). Ilyen target fehérjék lehetnek a hisztonok (Tanuma et al., 1985), transzkripció faktorok, a DNS replikációban és a jelátviteli folyamatokban részt vevő fehérjék, többek között az NFκB (Oliver et al., 1999), a p53 (Wesierska-Gadek et al., 1996; Mendoza-Alvarez és Alvarez-Gonzalez, 2001), a topoizomeráz I (Afriat et al., 2013) és a topoizomeráz II (Scovassi et al., 1993), DNS ligázok (Ohashi et al., 1983), DNS polimerázok (Yoshihara et al., 1985) és DNS függő protein kinázok (Ariumi et al., 1999). Az ADP-ribóz egységek mérete és negatív töltése miatt a PARiláció jelentős mértékben befolyásolja a célfehérjék fiziko-kémiai tulajdonságait, ezáltal azok stabilitását, aktivitását és kölcsönhatásait.

A konstitutív PAR szintje stimulálatlan sejtekben általában alacsony, lebomlása lassú, féléletideje 7,7 h. Mitotikus stimulusok vagy DNS törés hatására azonban a PARP aktivitás és a polimer mennyisége 10-500-szorosára nő, miközben a NAD⁺ szintje csökken. A genotoxikus stressz hatására szintetizálódott polimer lebomlása sokkal gyorsabb, féléletideje kevesebb, mint 1 perc (Wielckens et al., 1983; D'Amours et al., 1999).

3.2.2. A PAR polimer lebontása

A poli-ADP-riboziláció reverzibilis, dinamikus folyamat, a polimerek féléletideje meglehetősen rövid, lebomlásuk a szintézis kezdete után szinte azonnal elkezdődik, ami arra utal, hogy a poli(ADP-ribóz) metabolizmusban részt vevő enzimek szigorú szabályozás alatt állnak (Virág és Szabó, 2002; Hassa et al., 2006).

Elsősorban a PARG végzi a polimer lebontását, központi szerepét az is igazolja, hogy a gén inaktiválása a PAR felhalmozódása révén egerekben korai embrionális letalitást okoz (Koh et al., 2004).



4. ábra A PARG enzimek vázlatos doménszerkezete (Meyer et al., 2007 nyomán, módosítva) Alternatív splicing révén a kódoló génről többféle mRNS, így több fehérje izoforma képződik. A PARG-111 izoforma mellett humán sejtekben megtalálható egy 102 és egy 99 kDa molekulatömegű izoforma is. Emellett a PARG-60 és -55 is önálló izoformának bizonyult, mely utóbbi a PARG-60 alternatív transzlációs iniciációja révén expresszálódik.

A PARG a lineáris és az elágazó polimerek hidrolízisét egyaránt katalizálja, elsősorban exoglikozidáz aktivitása révén, bár rendelkezik endoglikozidáz aktivitással is (Braun et al., 1994). A PARP-okkal ellentétben a PARG enzimet egyetlen gén kódolja, génje a 10-es kromoszómán helyezkedik el. Alternatív splicing révén a fehérjének legalább négy izoformája létezik, melyeknek sejten belüli megoszlása eltérő. A teljes hosszúságú PARG-111 izoforma a sejtmagban található, a rövidebb PARG-102, PARG-99 pedig a citoszóban (Meyer-Ficca et al., 2004). Leírták egy 60 kDa molekulatömegű, katalitikusan aktív forma jelenlétét is, melyet korábban csupán a nagyobb méretű PARG izoformákból létrejött

proteolitikus fragmentnek vélték (Meyer et al., 2006). Később igazolták, hogy a PARG-60 egy a sejtmagban és a mitokondriumban található önálló izoforma. Ezen felül beszámoltak egy mitokondriális PARG-55 módosulatról is, mely a PARG-60 alternatív translációs iniciációja révén expresszáldik (Meyer et al., 2007). A PARG mRNS splice variánsokat és a fehérjék szerkezetét a 4. ábra mutatja.

Az ADP-ribozil hidroláz 3 (ARH3) egy 39 kDa molekulatömegű fehérje, mely szerkezetileg alapvetően különbözik a PARG-tól, azonban a katalitikus domén felépítésében mutat némi hasonlóságot és képes a poli(ADP-ribóz) polimert ADP-ribóz monomerekké bontani (Oka et al., 2006). A mitokondriális PAR lebontását elsősorban az ARH3 enzim végzi (Niere et al., 2012).

3.3. PARP-1 aktivációt kiváltó hatások

3.3.1. DNS-törés

Korábban a PARiláció „központi dogmája” az volt, hogy a PARP-1 DNS károsodás hatására aktiválódik. Így az UV sugárzás, radioaktív sugárzás, oxidatív stressz és a DNS alkilálószeres PARP-1 aktivációt és PAR polimer szintézist indukálnak. Éppen ezért a kutatások során sejtes modellekben PARP-1 aktiválására általánosan elterjedt volt a reaktív oxigén/nitrogén intermedierek (ROS/RNS) valamint DNS alkiláló szerek használata (Bürkle és Virág, 2013).

A ROS/RNS vegyületek közvetlenül okoznak DNS törést és ezzel együtt PARP aktivációt. A vegyületsoport tagjai közül a PARiláció kapcsán leginkább a hidrogén-peroxid (H_2O_2), a hidroxil gyök ($\bullet OH$), a szuperoxid ($\bullet O_2^-$) és a peroxinitrit ($ONOO^-$) hatását tanulmányozták.

A DNS alkilálószeres alkalmazása széles körben elterjedt a daganat kemoterápiában. A hatásmechanizmusuk felderítésére alkalmazott két klasszikus vegyület az MNNG (*N*-metil-*N'*-nitro-*N*-nitrozoguanidin) és az MMS (metil-metán-szulfonát). Az alkiláló szerek közvetett módon, a hibajavító rendszer közreműködésével aktiválják a PARP-ot úgy, hogy a DNS bázisait nukleofil szubsztitúciós reakció révén metilcsoport hozzáadásával módosítják, a metilált bázisokat a DNS glikozilázok eltávolítják, majd az AP (apurin/apirimidin) endonukleáz hasítja a DNS-t és egy nick-et hoz létre, ami a PARP-ot aktiválja (Wyatt és Pittman, 2006).

A DNS-törés által indukált PARP aktiváció érdekes vonatkozása, hogy a transzkripció során a topozomeráz II β által létrehozott kétszálú DNS törések PARP-1 aktivációt

indukáltak. A két enzim között lévő kapcsolat alapján így feltételezhető, hogy a PARP-1-nek szerepe van a transzkripció szabályozásában (Ju és Rosenfeld, 2006).

3.3.2. Egyéb („alternatív”) PARP-1 aktiváló mechanizmusok

Számos vizsgálat bizonyítja, hogy a génexpresszióval kapcsolatos kromatin szerkezeti átrendeződései révén a PARP-1 DNS törés hiányában is aktiválódhat. A DNS meghajlása és egyéb nem-B-DNS struktúrák (egyszálú régiók, az úgynevezett kruciform struktúrák, hajtű szerkezetek) is PARP-1 aktivációt okoznak (Lonskaya et al., 2005).

A protein kinázok általi foszforiláció is szabályozhatja a PARP-1 aktivitását. A foszforiláció lehet aktiváló hatású, mint például az ERK 1/2 (Kauppinen et al., 2006) és a JNK1 (Zhang et al., 2007) esetén. A foszforiláció gátló hatását írták le a PKC esetén (Hegedűs et al., 2008). Leírták a PARP-1 acetilációt (Hassa et al., 2005) illetve mono-ADP-ribozilációt (Loseva et al., 2010) általi aktivációját is. A jelátviteli útvonalakban szereplő fehérjék kovalens módosítás nélkül, közvetlen fehérje-fehérje kölcsönhatás révén is befolyásolhatják a PARP-1 aktivitását (Cohen-Armon et al., 2007). A különböző poszttranszlációs módosítások nem csak a PARP-1 aktivitását, hanem az egyéb fehérjékkel való kölcsönhatását is módosítják (Hassa et al., 2005).

3.4. A PARiláció fiziológiai szerepe és patofiziológiai jelentősége

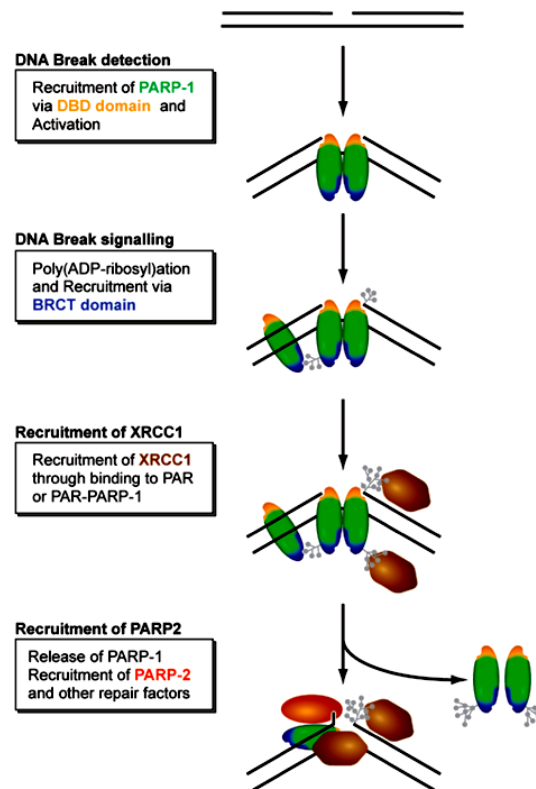
3.4.1. DNS hibajavítás és a genom integritás fenntartása

Az örökítőanyagot kódoló DNS stabilitásának és integritásának megőrzése alapvető fontosságú a szervezet egészsége szempontjából. A DNS-t folyamatosan éri olyan intracelluláris (a normál metabolizmus termékei) és extracelluláris (ionizáló sugárzás, kémiai ágensek) hatások, melyek módosíthatják a kémiai állapotát, így mutációkat, kromoszóma rendellenességeket, sejthalált vagy betegségeket okozhatnak (Robert et al., 2013). A DNS hibáinak gyors detektálása és azok javítása elengedhetetlen. Már a PARiláció korai leírásánál (Chambon et al., 1963) említést tettek arról, hogy a reakciót katalizáló enzim DNS-függő módon működik. Később számos tanulmányban bizonyították, hogy a PARP-1 gátlása érzékenyíti a sejteket a genotoxikus ártalmakra (Küpper et al., 1995; Ding és Smulson, 1994). A PARP-1^{-/-} egerek életképesek és fertilisek, normál fenotípust mutatnak, DNS károsító hatásokra azonban sokkal érzékenyebbek a vad típusú egereknél. A PARP-1^{-/-} egerek esetén genotoxikus stressz hatására nagyobb a mortalitás, fokozódik a testvér kromatidák

kicszerélődésének mértéke és a kromoszómatörések száma (de Murcia et al., 1997; Trucco et al., 1998). Érdekes módon súlyos DNS károsodás esetén a PARiláció ellenkező hatást válthat ki. A nagymértékű PARP aktivitás ugyanis NAD^+ és következményes ATP deplációhoz vezet, és a sejt energiakészleteinek kimerülése miatt károsodnak a sejtek. Ez esetben a PARP inhibitorok a sejtek túlélését segítik elő (Berger et al., 1983).

A PARP-1-nek szerepe van az egyszálú DNS-törés javításában, a BER javítómechanizmusban, a homológ rekombinációban, a nem-homológ DNS végek összekapcsolásában (NHEJ, non-homologous end joining) és a nukleotid kivágásos hibajavításban (NER, nucleotide excision repair) (Robert et al., 2013). Mortusewitz et al., (2007) modellje szerint a PARP-1 a DNS-kötő doménon keresztül a DNS-töréshez kötődik, dimerizálódik és auto-poli-ADP-ribozilálódik. A polimerekhez „második hullámban” további PARP molekulák kötődhetnek BRCT doménjük révén, melyet további PAR szintézis követ. A PAR polimerek egyrészt hozzájárulnak a kromatin szerkezet fellazulásához, másrészt nagy affinitású kötőhelyek biztosításával egyfajta kihorgonyzó felületet nyújtanak a hibajavításban szereplő enzimek számára, így tulajdonképpen egy multiprotein hálózat alapját képezik. Az auto-poli-ADP-riboziláció inaktíválja a PARP-1-et, mely ezt követően leválik a DNS-ről, helyet adva a hibajavítást végző enzimeknek (Mortusewitz et al., 2007). A hibajavító enzimkomplex kialakulásának egyszerűsített modelljét az 5. ábra szemlélteti. A fehérje komplex kialakulása során a DNS hibajavításban részt vevő fehérjék egy része kovalens módon PARilálódhat, más része a PAR-kötő domének segítségével nem-kovalens kötéssel kapcsolódik a polimerekhez. Egyre bővül azon motívumok száma, melyekről igazolták, hogy nagy affinitással képesek kötődni a PAR polimerekhez. Ide sorolható a PAR-kötő motívum (PBM, PAR-binding motif), a glicin- és arginingazdag domén (GAR, glycine and arginine-rich domain), az RNS-kötő domén (RBD, RNA-binding domain), a makrodomén, a PAR-kötő cink-ujj (PBZ, PAR-binding zinc finger) és a WWE domén (Krietsch et al., 2013). Nem tisztázott azonban az, hogy ezek a fehérjék pontosan hogyan koordinálódnak a komplexben. A PAR lebontása révén a komplex szétesik, így elindulhatnak a hibajavítási folyamat következő lépései (Robert et al., 2013; Gibson és Kraus, 2012). A PARG enzim aktivitása és a polimerek lebontása szintén elengedhetetlen a hatékony DNS hibajavításhoz. A 110 kDa sejtmagi PARG izoforma hiányában az egerek fokozottan érzékenyek voltak az alkiláló szerekre és a γ -sugárzásra (Cortes et al., 2004). Szubletális dózisú H_2O_2 hatására a PARG csendesített sejtekben szintén csökkent a DNS hibajavítás hatékonysága (Erdélyi et al., 2009). Mind a PAR képződése mind pedig a lebontása, illetve ezek megfelelő dinamikája, vagyis a PARP és a PARG összehangolt működése szükséges a hatékony DNS hibajavításhoz.

A báziskivágásos DNS hibajavítás (BER) az elsődleges javítómechanizmus a sérült bázisok és az egyszálú DNS törések javításában. A folyamat során specifikus DNS glikozilázok eltávolítják a módosított bázisokat, az AP endonukleázok hasítják a foszfodiészter kötést és egy egyszálú DNS törést, nick-et hoznak létre. Ez a továbbiakban a short-patch repair (egyetlen nukleotid cseréje), vagy a long-patch repair mechanizmussal (több nukleotid cseréje) javítódik.



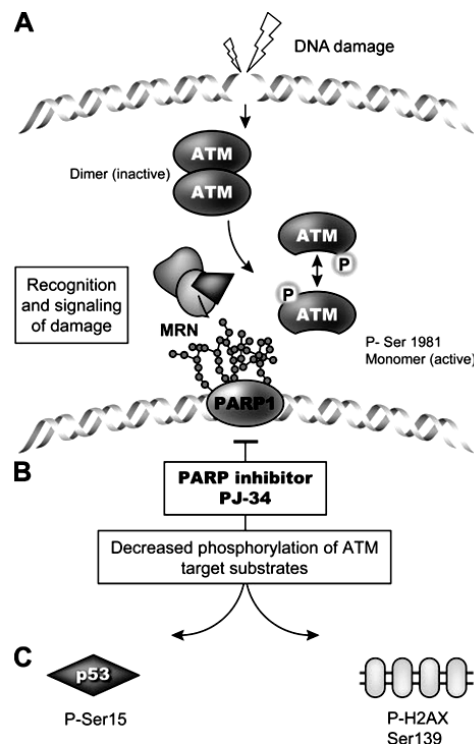
5. ábra DNS-törés érzékelése és a BER hibajavító enzimkomplex kialakulása PARiláció révén (Mortusewitz et al., 2007)

A PARP-1 a DNS-kötő doménen keresztül a DNS-töréshez kötődik, dimerizálódik és auto-poli-ADP-ribozilálódik. A polimerekhez újabb PARP-1 molekulák kötődhetnek BRCT doménjük révén, melyet további PAR szintézis követ. A PAR polimerek egyrészt hozzájárulnak a kromatin szerkezet fellazulásához, másrészt nagy affinitású kötőhelyek biztosításával kihorgonyzó felületet nyújtanak a hibajavításban szereplő enzimek számára. Az auto-poli-ADP-riboziláció inaktíválja a PARP-1-et, mely ezt követően leválik a DNS-ről, helyet adva a hibajavítást végző enzimeknek. A PARP-2 szerepét is leírták a BER hibajavításban, de másféle kinetikával kötődik a sérült DNS-hez és a hibajavítás későbbi folyamataiban vesz részt.

A PARP-1 szerepét leginkább a long-patch mechanizmus során sikerült közvetlen bizonyítékokkal alátámasztani. Kölcsönhatást mutattak ki a PARP-1 és az XRCC (a BER rendszer adapter fehérjéje) valamint az Aprataxin között. Kimutatták, hogy a PARP-1 szabályozza többek között a DNS polimeráz β , a DNS ligáz III, a condensin és a 8-oxoguanin

DNS glikoziláz (OGG1) aktivitását, és így meghatározó szerepe van a DNS hibajavításban (Lavrik et al., 2001; Prasad et al., 2001; El-Kamisy et al., 2003; Heale et al., 2006; Harris et al., 2009; Noren Hooten et al., 2011). Ezzel szemben más munkacsoportok vizsgálatai alapján a PARP-1 hiánya nem csökkenti a BER mechanizmus hatékonyságát. A csökkent PAR szintézis inkább más sejtfolymatokra tett hatása miatt érzékenyítheti a sejteket a genotoxikus stresszre (Vodenicharov et al., 2000). Ström munkacsoportja szerint a PARP inhibitorokkal elért csökkent mértékű hibajavítás magyarázható azzal, hogy a gátlószer jelenlétében a PARP-1 a DNS végekhez kötődve marad, akadályozva ezzel a hibajavítás további lépéseit (Ström et al., 2011). Ugyanez a munkacsoport írta le az XRCC1 és a PARP-1 közötti szintetikus letalitást, az XRCC1 deficiens sejtek ugyanis hiperérzékenyek a PARP gátlószerrel való kezelésre.

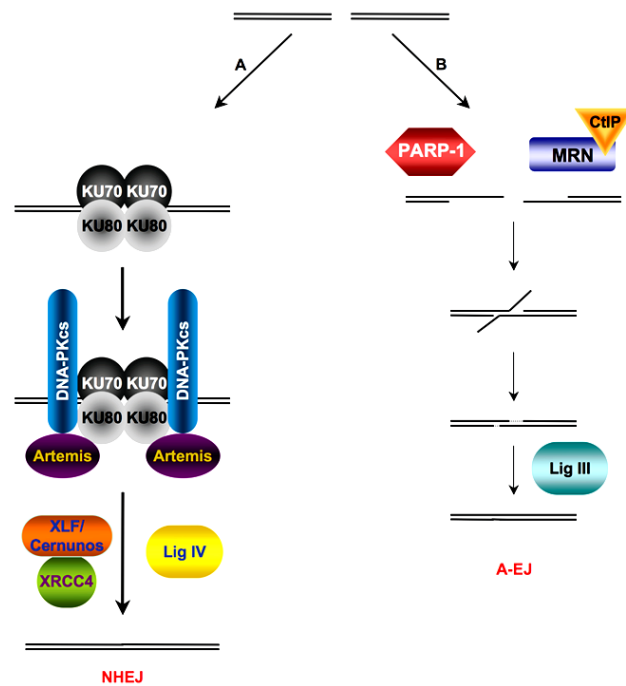
A PARP-1 szerepét leírták a kétszálú DNS-törés javításában is, mely kétféle mechanizmussal játszódhat le, homológ rekombinációval vagy NHEJ mechanizmussal. A homológ rekombináció során igazolták, hogy a PARP-1 aktiválja az ATM (ataxia telangiectasia mutated) kinázt, mely foszforilálja a javítórendszer fehérjéit (6. ábra).



6. ábra ATM- és PAR-függő jelátviteli útvonalak összefüggése (Haince et al., 2007 nyomán) (A) Az ATM és a PARP-1 DNS törések hatására aktiválódik. (B) A PAR polimerek akkumulációja vagy az ATM kináz aktivitását fokozza, vagy a targetfehérjék könnyebb hozzáférhetőségét teszi lehetővé, így befolyásolja az ATM funkcióját és a targetfehérjék foszforilációját. (C) A csökkent PAR akkumuláció csökkenti az ATM-függő foszforilációt.

A PARP-1 hiánya vagy gátlása következtében csökkent a p53, az SMC (structural maintenance of chromosomes) és γ H2AX ATM -függő foszforilációja (Haince et al., 2007). A folyamat során a PARiláció fontos szerepére utal a PARP-1 (vagy PARP-2) és ATM dupla knockout egerek embrionális letalitása is (Huber et al., 2004).

Kimutatták a PARP-1 szerepét az alternatív NHEJ (A-NHEJ) mechanizmusban is. A PARP-1 a Ku fehérjékkel vetélkedik a szabad DNS végekért. A Ku nagyobb affinitással kötődik a DNS-hez, így az NHEJ klasszikus útvonalában (C-NHEJ) akadályozza a PARP-1 kötődését. A PARP-1 és az A-NHEJ útvonal akkor kap szerepet, amikor a klasszikus útvonal faktorai (különösen a Ku) nem állnak rendelkezésre kellő mennyiségben. A folyamatban a PARP-1 és a DNS ligáz III szerepel (7. ábra), valamint kimutatták a DNS-függő protein kináz katalitikus alegységének poli-ADP-riboziláció általi aktiválódását, mely a hibajavítás további folyamatait indítja el (Wang et al., 2006).



7. ábra Az NHEJ (nem homológ DNS végek összekapcsolása) és az alternatív NHEJ lépései (Grabarz et al., 2012 nyomán)

Az NHEJ mechanizmus során a Ku70/Ku80 heterodimer kötődik a szabad DNS végekhez és elősegíti a hibajavítást. Az alternatív NHEJ (az ábrán A-EJ) mechanizmus független a Ku fehérjétől, a folyamatban PARP-1 és a DNS ligáz III szerepét írták le.

A legtöbb duplaszálú DNS-törés javításában részt vevő fehérje nagy része vagy csak a homológ rekombinációban, vagy csak az NHEJ mechanizmusban szerepel. Vannak azonban olyanok is, melyek mindkét útvonalban részt vesznek, ilyen például az MRN (Mre11/Rad50/NBS1) komplex, a BRCA1, a hiszton H2AX, az ATM, a DNS-függő protein kináz katalitikus alegysége (DNA-PKcs) és a PARP-1 is. A javítómechanizmus módja függ a

sejtciklustól és feltehetően a mindkét útvonalban szereplő faktoroknak, vélhetőleg a PARP-1-nek is szabályozó szerepük van a DNS hibajavítás útvonalának eldöntésében (Shrivastav et al., 2008; Grabarz et al., 2012).

A NER hibajavító mechanizmusban a PARP-1 szerepe nem teljesen tisztázott. A NER az UV által okozott DNS károsodások (főként timin-dimerek és 6-4 fotoproduktumok) javításának mechanizmusa. A folyamatban több mint 30 fehérje vesz részt, melyek a DNS károsodás helyén eltávolítanak egy 20-30 nukleotidnyi egyszálú szakaszt, majd az ép szálát templátként használva kijavítják a sérülést. A NER-nek két altípusa van: a transzkripció kapcsolt NER (TC-NER, transcription coupled NER), mely a transzkripcióra kerülő régiók hibajavítását végzi, és a konstitutívan aktív, teljes genomra kiterjedő NER (GG-NER, global genome NER). Ez utóbbi során a DDB2 (damaged DNA binding protein 2) kulcsfontosságú a sérülések felismerésében. Kimutatták a PARP-1 kölcsönhatását a DDB2 fehérjével a DNS károsodás helyén. A folyamatban a DDB2 aktiválja a PARP-1-et, ugyanakkor ez az egyik targetfehérje a PARiláció során. A PARP-1csendesítése vagy farmakológiai gátlása csökkentette a hibajavítás hatékonyságát (Robu et al., 2013; Pines et al., 2012; Luijsterburg et al., 2012).

A PARilációnak a programozott DNS károsodásban is szerepe van, így a PARP-1 szabályozó szerepet tölt be a B és T sejtek érésében, és a spermioenezisben (Robert et al., 2013).

3.4.2. A PARP-1 szerepe a sejthalál útvonalak szabályozásában

Számos vizsgálat bizonyította, hogy a PARP-1-nek szerepe van a DNS hibajavításban, így genotoxikus stressz során segíti a sejtek túlélését. Súlyos DNS károsodás esetén azonban a PARiláció ellenkező hatást válthat ki. A PARP-1 aktivációt a sejthalállal először Berger és munkacsoportja hozta összefüggésbe. A nagymértékű PARP aktivitás ugyanis NAD^+ deplációhoz vezet. Így a NAD^+ függő metabolikus útvonalak (glikolízis és mitokondriális légzési lánc) működése, ezzel együtt az ATP termelés csökken, és a sejt energiakészleteinek kimerülése miatt károsodnak a sejtek (Berger-féle „öngyilkossági modell”). Ez esetben a PARP-1 gátlása kedvezően hat a sejtek túlélésére (Berger et al., 1983). A csökkent NAD^+ szint központi szerepét támasztja alá, hogy a PARP-1 függő sejthalál során a citromsav-ciklus szubsztrátjai vagy extracelluláris NAD^+ hozzáadása az energetikai folyamatok javítása által segítette a sejtek túlélését (Ying et al., 2002; Erdélyi et al., 2009; Alano et al., 2010).

A későbbiekben a PARP-1 szerepét több sejthalál útvonalban igazolták. Az apoptotikus sejthalál egyik fő biokémiai jellemzője a hasított PARP megjelenése. Apoptózis

során a PARP-1-et a kaszpáz-3 vagy a kaszpáz-7 egy 24 kDa (N terminális, DNS kötő domént tartalmazó) és egy 89 kDa molekulatömegű (C terminális) fragmentre hasítja (Kauffmann et al., 1993). A hasítás révén a DNS-kötő és a katalitikus domén elválik egymástól, így az enzim inaktiválódik. A C-terminális fragmentum gátolja a PARP-1 homodimerizációját és a PARP aktivációt. Az N-terminális darab megtartja DNS-kötő képességét, de gátolja a hasítatlan PARP-1 katalitikus aktivitását (Kim et al., 2000; D'Amours et al., 2001). Az apoptózis mechanizmusában elengedhetetlen lépés a PARP-1 inaktiválódása. Ennek szerepe az lehet, hogy gátolja a PARP aktivációt a későbbi DNS fragmentáció során, így megakadályozza az ATP depléciót és a nekrozist (Herceg és Wang, 1999). Többen vizsgálták, hogy a PARP-1-nek van-e szabályozó szerepe is az apoptózis korai, kaszpáz aktivációt megelőző szakaszában. Az inhibitorok alkalmazása ellentmondásos eredményekre vezetett. Bizonyos esetekben a PARP-1 gátlása gátolta az apoptózist (Shiokawa et al., 1997), más esetekben fokozta (Ray et al., 1992; Payne et al., 1998), vagy nem módosította a folyamatot (Watson et al., 1995). Több munkacsoport eredménye azt mutatta, hogy a PARP-1 knockout és vad típusú egerekből származó sejtek nem mutattak különbséget sem az extrinsic, sem az intrinsic apoptózisban (Wang et al., 1997; Virág et al. 1998; Oliver et al., 1998). Összességében a PARP-1 hasítása elengedhetetlen az apoptózishoz, de maga a PARP-1 nem játszik meghatározó szerepet a folyamatban.

Általánosan elfogadott nézet, hogy a PARP-1-nek kulcsszerepe van a nekroptózis során (Virág et al., 2013). Virág és mtsai. kimutatták, hogy nagy koncentrációjú oxigén és nitrogén intermedierek a PARP-1 nagymértékű aktivációja miatt nekrozist váltottak ki, míg a PARP inhibitorok jelenléte illetve a gén kiütése a sejthalál módját az apoptózis felé tolta el. Amellett, hogy igazolták a PARP-1 szerepét a nekrozisban, elsőként mutattak rá a nekrozis szabályozott voltára (Virág et al., 1998a,b). A továbbiakban több munkacsoport igazolta ezt a hipotézist különböző modellekben (Filipovic et al., 1999; Ha és Snyder, 1999; Tentori et al., 2001). Osztódó sejtekben oxidatív stressz és kemoterápiás szerek által kiváltott sejthalál során kimutatták, hogy a PARP-1 indukálja a nekrozist. Valószínűleg a PARP-1 aktivitása miatti NAD^+ szint csökkenés révén a RIP1 (receptor-interacting protein 1), a TRAF2 (tumor necrosis factor receptor-associated factor 2), majd a JNK (c-Jun N-terminal kinase) aktiválódása váltja ki a mitokondriális membrán depolarizációt és az AIF (apoptosis inducing factor) transzlokációját a mitokondriumból a sejtmagba (Xu et al., 2006). Az AIF egy 62 kDa molekulatömegű NADH oxidáz, melynek nagy része a mitokondriális intermembrán térben található, a belső membránhoz kötötten. Az AIF hasítását a kalpainok végzik, az így keletkező 57 kDa hasított forma mitokondriumokból való kijutását a Bax (Bcl-2-associated X protein)

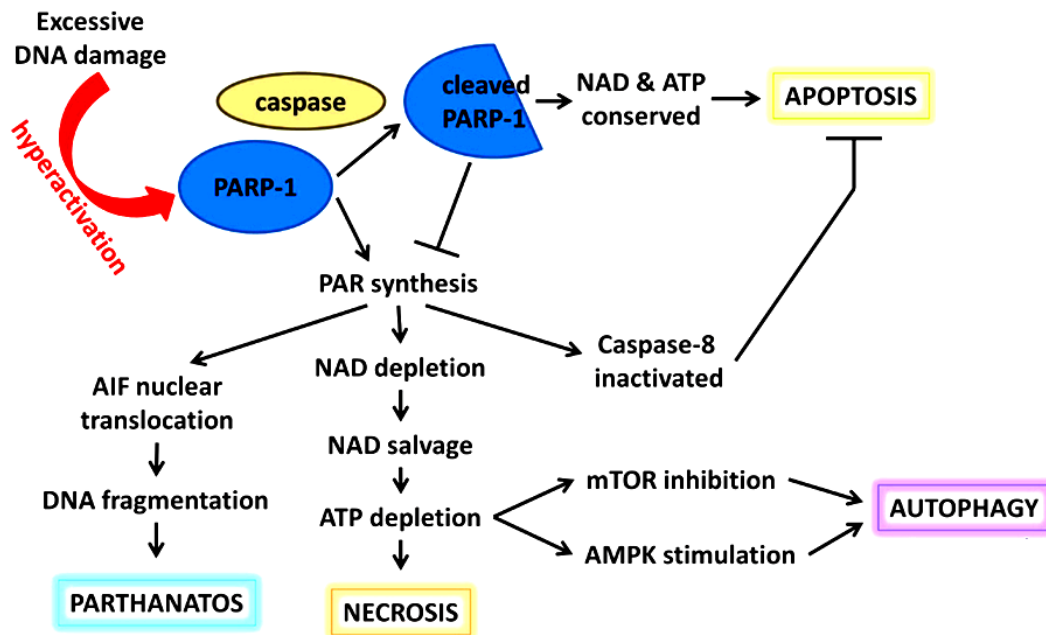
segíti elő. Az AIF tartalmaz egy nukleáris lokalizációs szignálszekvenciát (NLS) is, így a citoplazmába kerülő AIF a sejtmagba transzlokálódik, ahol a ciklofilin-A-val és a H2AX-szel komplexet képezve kromatin kondenzációt, DNS degradációt indukál (Moubarak et al., 2007; Delavallée et al., 2011). Egyes vizsgálatok szerint a p53-nak is szerepe van a PARP-1 által indukált nekrozisban, de a pontos molekuláris mechanizmus még nem tisztázott (Elkholi és Chipuk, 2014). Érdekes módon a TNFR1 (TNF Receptor-1) által kiváltott nekrozisban (melyben a RIP1 szintén központi szerepet játszik) a PARP-1aktivációja a jelátviteli útvonal egy későbbi eseménye, és nincs szabályozó funkciója (Delavallée et al., 2011; Sosna et al., 2012).

A parthanatos egy olyan különálló kaszpáz-független sejthalálforma, melyben a PAR polimerek felhalmozódása indukál sejthalált. Kortikális neuronokban mutatták ki, hogy *in vitro* szintetizált PAR polimerek bejuttatása sejtekbe a polimerek méretétől és komplexitásától függő mértékben sejthalált indukált. A PARG enzim overexpressziója, a polimerek elleni neutralizáló ellenanyag valamint a polimerek előkezelése foszfodiészteráz vagy PARG enzimmal csökkentette a sejthalál mértékét, így maga a polimer bizonyult „toxikusnak”. A parthanatos során szintén kulcsfontosságú tényező a PARP-1 nagymértékű aktivációja, de nem a sejtek NAD⁺ illetve ATP szintjének csökkenése a sejthalál elsődleges oka (Andrabi et al., 2006). Parthanatos során az AIF kijutása nem kalpain-függő, és a teljes, 62 kDa fehérje transzlokációját figyelték meg (Wang et al., 2009). Kimutatták, hogy az AIF kis része (20%) a mitokondrium külső membránjához kapcsolódik a citoszolikus oldalon, és ennek gyors transzlokációja a sejtmagba elegendő a sejthalál kiváltásához (Yu et al., 2009). A PAR polimerek nagy affinitással képesek az AIF C-terminális doménjéhez kötődni, ez valószínűleg az AIF konformáció változását idézi elő és csökkenti az affinitását a mitokondriális membránhoz, így az gyorsan a citoszolba kerülhet. Nem tisztázott, hogy a PAR akceptor fehérjéhez kötötten vagy szabad PAR formában jut ki a sejtmagból, de a PAR-AIF kötődés szükséges az AIF transzlokációjához, a PAR kötésben részt vevő oldalláncok mutációja ugyanis meggátolta a PAR kötődését, az AIF transzlokációt és a sejthalált (Wang et al., 2011). A PARP-1 és az AIF szabályozó szerepet játszik mind a nekrozisban, mind a parthanatosban, az előbbit főként osztódó sejtekben mutatták ki, ahol a glikolitikus útvonal a meghatározó, míg az utóbbit leginkább neuronokban igazolták (Wang et al., 2009).

Tápanyaghiány, DNS károsodás, oxidatív stressz és különböző patofiziológias körülmények esetén a sejtekben autofágia indulhat el, melyre morfológiailag jellemző a citoplazmatikus vakuolumok kialakulása, ahol a makromolekulák és sejtorganelumok lebontása és újrahasznosítása zajlik. Az autofágiát egyrészt egy kaszpáz-független

sejthalálformaként írták le, mely szerepet játszik a *D. melanogaster* egyedfejlődésében (Berry és Baehrecke, 2007), illetve bizonyos tumorsejtek pusztulása során, különösen az apoptózist szabályozó molekulák (Bax, Bak, kaszpázok) hiányában (Fazi et al., 2008). Másrészt viszont egyre inkább úgy tartják, hogy az autofágiának citoprotektív szerepe van, és kedvezőtlen körülmények között segítheti a sejtek túlélését az oxidatív károsodott sejtalkotók lebontásával és az energiaháztartás helyreállításával (Liu és Leonardo, 2007; Kroemer és Levine, 2008; Galluzzi et al., 2012). Kimutatták, hogy a tápanyaghiányos körülmények között képződő reaktív oxigén intermediereknek, különösen a hidrogén-peroxidnak szabályozó szerepe van a folyamatban és elengedhetetlen az autofágia indukciójához (Scherz-Shouval et al., 2007). A PARP-1 szerepét kimutatták tápanyaghiánnyal indukált autofágia során, ahol a PARP-1 aktivációt valószínűleg a képződött ROS által okozott DNS-törés váltotta ki. A PARP-1 hiánya vagy gátlása késleltette az autofágiát és fokozta az apoptózis mértékét (Rodríguez-Vargas et al., 2012). Különösen nagy hangsúlyt kaphat az autofágia és annak gátlása tumorsejtekben, hiszen ez egy gyakran aktiválódó túlélési mechanizmus a kemoterápia vagy sugárkezelés esetén. PARP-1^{-/-} sejtekben és PARP inhibitorok jelenlétében doxorubicin kezelés hatására kisebb volt az autofágia mértéke, mint a vad típusú sejtekben (Munoz-Gámez et al., 2009). MCF-7 sejtekben az autofágia gátlása növelte az apoptózis mértékét, ami arra utal, hogy tumoros sejtekben ez egy túlélést segítő mechanizmus (Yoon et al., 2012).

Igazolták a PARP-1 szabályozó szerepét a nekroptózisban, a parthanatosban és az autofágiában. Nem tisztázott azonban, hogy hogyan befolyásolja az extrinsic és intrinsic apoptotikus útvonalakat. Nem vizsgálták szerepét egyéb sejthalál folyamatokban, mint például az entosis, a mitotikus katasztrófa, az anoikis és a piroptosis. Mivel a PARP-1 rendelkezik DNS-től független funkcióval is, nem zárható ki, hogy olyan sejthalál útvonalakban is szerepel, melyek nem közvetlenül a DNS károsodáshoz kapcsolódnak (pl. mitotikus katasztrófa).



8. ábra A poli(ADP-ribóz) polimeráz „molekuláris kapcsoló” szerepe (Weaver és Yang, 2013 nyomán, módosítva)

A PARP-1 túlzott mértékű aktivációja NAD^+ és ATP depléciónhoz vezethet. A PAR polimer szintjének megemelkedése kiválthat nekrozist, autofágiát vagy parthanatost. A PARiláció inaktíválja a kaszpáz-8-at, így gátolja az apoptotikus jelátviteli folyamatokat. Ezzel szemben az aktivált kaszpázok hasítják a PARP-1-et, a hasított termék gátolja a hasítatlan PARP-1 katalitikus aktivitását, és a NAD^+ és ATP szint megőrzése mellett apoptózis indukálódik.

A PARP enzimesalád változatos sejtbeli előfordulása, illetve a PARiláció kapcsolata egyéb szabályozó fehérjékkel (kinázokkal, foszfatázokkal) és jelátviteli molekulákkal (kálcium szignalizáció elemei) felveti annak lehetőségét, hogy egyéb sejthalál útvonalakban is szerepet játszhat (Virág et al., 2013). Tekintve a PARP-1 sokrétű szerepét, úgy vélik, hogy egyfajta „molekuláris kapcsolóként” szolgál a különböző sejthalál útvonalak szabályozásában (8. ábra), és a sejthalál folyamatok kimenetele a DNS károsodás súlyosságától, a sejt energetikai állapotától és a PARiláció mértékétől függ (Weaver és Yang, 2013).

3.4.3. A génexpresszió és differenciáció szabályozása

Az egyedfejlődés, a sejtek differenciációja során és a különböző környezeti tényezők hatására meghatározott gének meghatározott időben aktiválódnak illetve kapcsolnak ki. Mindez több szinten zajló és szigorúan szabályozott folyamatok révén valósul meg. A transzkripció szintű szabályozásban alapvető tényező a kromatin szerkezete és hozzáférhetősége, az eukromatikus és heterokromatikus régiók dinamikus átrendeződése. A kromatinszerkezet és így a transzkripció szabályozható a hiszton fehérjék kovalens

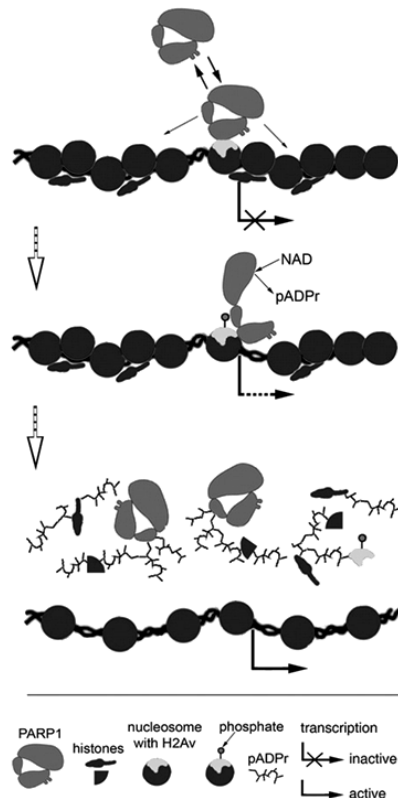
módosítása (acetiláció, metiláció) által, a nukleoszómákat összekötő H1 hiszton, a HP1 (heterochromatin-associated protein 1) illetve a PARP-1 kötődése révén (Kim et al., 2004).

A PARP-1 szerepét hosszú ideig leginkább a DNS hibajavításban és a sejthalálban vizsgálták. A sejtmagban a hisztonokon kívül a PARP-1 a legnagyobb mennyiségben előforduló fehérje, mely a sejt nyugalmi állapotában nagyrészt a kromoszómák mentén és nukleoluszokban, kromatinhoz kötődve található (Thomas és Tulin, 2013). Több kísérletben kimutatták, hogy a PARP-1 gátlása számos sejtípusban befolyásolja különböző stimulusokra adott génexpressziós mintázatot. Így például PARP-1 csendesítés hatására IFN- γ -val kezelt THP-1 sejtekben nőtt az MHC II expressziója (Qu et al., 1994), RAW sejtekben IFN- γ és LPS (lipopoliszacharid) stimuláció hatására a nikotinamid gátolta a NO szintáz expresszióját (Pellat-Deceunynck et al., 1994). A PARP-1 gátlása vagy a gén kiütése csökkentette a P-szelektin és az ICAM-1 (Intercellular adhesion molecule-1) expresszióját, és így ischemia reperfüziós modellben gátolta a neutrofil granulociták által okozott szöveti sérülést (Zingarelli et al., 1998). PARP-1 hiányos sejtekben csökken az NF- κ B által szabályozott gének transzkripciója, és a PARP-1 knockout egerek rezisztensek az LPS által indukált endotoxikus sokkra (Oliver et al., 1999).

A kromatinszerkezet és transzkripció PARP-1 általi szabályozásának lehetséges mechanizmusára két elmélet született. A PARP-1 egyrészt ADP-ribozilálhatja a kromatinhoz kötődő fehérjéket, így például a hisztonokat, és ez destabilizálja a kromatin komponensek kölcsönhatását a DNS-sel (Poirier et al., 1982; Aubin et al., 1983). Másrészt a PARP-1 autopolimerizációja vezethet a kromatin fellazulásához, hiszen *in vivo* körülmények között maga a PARP-1 a PARiláció elsődleges akceptor fehérjéje. Kimutatták, hogy a hisztonok és más kromatin fehérjék kovalensen PARilálódhatnak, de ez nem nélkülözhetetlen a kromatinszerkezet PARP-1 általi szabályozásához (Kim et al., 2004). Teljes proteom analízissel számos fehérjét azonosítottak, melyek nem-kovalens módon nagy affinitással kötődnek a PAR polimerekhez. Ezek a fehérjék hat nagy csoportba sorolhatók: a DNS hibajavításban, a DNS replikációban, a sejtciklus szabályozásában, a kromoszómaszerveződésben, a fehérje szintézisben és az mRNS metabolizmusban részt vevő fehérjék (Gagné et al., 2008). Kimutatták, hogy a nem-kovalens kölcsönhatást a fehérjék és a PAR polimerek között befolyásolja a polimerek hossza (Fahrer et al., 2007). A PARP-1 szabályozó szerepe tehát a sejtmagi folyamatokban alapvetően abból ered, hogy a kovalens vagy nem-kovalens módon módosított (PARilált) fehérjék disszociálnak a nukleinsavról. A fehérjék nukleinsavról való leválasztásában két hatás szerepelhet: az elektrosztatikus tasztítás a

negatív töltésű PAR polimer és a DNS/RNS között, valamint a DNS/RNS-kötő domének eltakarása (D'Amours et al., 1999).

A H1 hisztonhoz hasonlóan az enzimatikusan inaktív PARP-1 (NAD⁺ hiányában, automodifikáció nélkül) a kromatin kondenzációját, kompakt szerkezet kialakulását segíti elő. A PARP-1 és a H1 hasonló nukleoszóma kötő sajátosságokkal rendelkezik *in vitro*, de *in vivo* körülmények között eltérő szerepük van a génexpresszió irányításában. A H1 és a PARP-1 ugyanis verseng a nukleoszóma kötőhelyekért és eltérő nukleoszóma frakciókhoz illetve kromatin doménekhez kötődnek (Kim et al., 2004). A PARP-1 aktiválódása vezet a kromatin szerkezetének fellazulásához. Korábban az volt az elfogadott nézet, hogy a PARP-1 DNS károsodás hatására aktiválódik, később kimutatták, hogy DNS-törés hiányában is aktiválódhat az enzim. A jelenlegi modell szerint (9. ábra) a transzkripció során a nukleoszóma fehérjéi szabályozzák a PARP aktivitását (Kim et al., 2004). Kimutatták a PARP-1 szinte minden gén promoterénél jelen van, ahol aktív transzkripció zajlik, és kötődik a nukleoszóma hisztonjaihoz, legnagyobb affinitással a H3-hoz és H4-hez. A *Drosophylában* H2Av hiszton variáns (az emlős H2Ax és a H2Az homológja) a gének promoter régiójában található, és ez felelős a PARP-1 pozicionálásáért és aktiválódásáért, a PARP-1 ugyanis nagy affinitással kötődik a hiszton variánst tartalmazó nukleoszómákhoz, mert a H2A hiszton variánst tartalmazó nukleoszóma nyitottabb konfigurációjú, és így könnyebben hozzáférhetőek a H3 és H4 hisztonok. A H2A hiszton gátolja a PARP aktivitást. A H2Ax (illetve H2Av) foszforilációja szabályozza a PARP-1 aktivitását azáltal, hogy erősebb lesz a kötődés a PARP-1 C-terminálisa és a H4 között, a H4 kötődése pedig allostérikusan aktiválja a PARP-ot. A PAR polimerek negatív töltéseik révén megváltoztatják a nukleoszóma szerkezetét, egy nyitottabb konfiguráció létrejöttét, ezáltal a kromatin fellazulását segítik elő (Pinnola et al., 2007; Kotova et al., 2011; Thomas és Tulin, 2013).



9. ábra A PARP-1 H2Av általi szabályozásának modellje (Kotova et al., 2011 nyomán)

A H2Av variánst tartalmazó nukleoszómához nagy affinitással kötődik a PARP-1. A H2Av hiszton foszforilációja megváltoztatja a nukleoszóma konformációját és PARP-1 aktivációt vált ki. A PAR polimerek negatív töltéseik révén egy nyitottabb konfiguráció létrejöttét, ezáltal a kromatin fellazulását segítik elő.

A kromatin fellazításán kívül a PARP-1 a transzkripció szabályozásának egyéb lépéseiben is részt vesz. A PARiláció befolyásolja a hnRNP (heterogeneous nuclear ribonucleoproteins) mRNS-hez való kötődését, így a splicing szabályozásában is szerepe van (Ji és Tulin, 2009). A PARP-1 koregulátorként működve szabályozza a transzkripció faktorok kötődését a kromatinhoz. Bizonyos esetekben ehhez szükség van az enzim aktivitására, így például a HES (hairy and enhancer of split-1 transzkripció faktor) és Elk1 (ETS domain-containing protein) esetén (Ju et al., 2004; Cohen-Armon et al., 2007), más esetekben (pl. NFκB) nem szükséges a PARP-1 aktivitása, fehérje-fehérje kölcsönhatás révén valósul meg a szabályozó szerep (Hassa et al., 2001). A PARP-1 a DNS metilációt is befolyásolja, így a génexpresszió epigenetikus szabályozásában is szerepe van (Caiafa et al., 2009). A DNS metiltransferáz 1 (Dnmt1) két PAR-kötő doménje révén, nem-kovalens módon nagy affinitással kötődik a hosszú és elágazó PAR polimerekhez. A PAR polimerek megkötése gátolja a DNS metiltransferáz aktivitást (Reale et al., 2005). A PARP-1 ezen felül a Dnmt1 expresszióját is szabályozza úgy, hogy a PARilált PARP-1 a Dnmt1 promoteréhez

kötődve megakadályozza annak metilációját. A PARG overexpresszió a tumorsejtekre jellemző megváltozott DNS metilációt okozott, a megfelelő PAR szint, a PARP-1 és a PARG kiegyensúlyozott működése tehát szükséges a megfelelő DNS metilációs és génexpressziós mintázat kialakításához (Zampieri et al., 2009).

Számos differenciálódási folyamatban kimutatták a PARP-1 szerepét, így többek között a B-sejtek differenciációjában (Exley et al., 1987), a granulocita-makrofág progenitor sejtek makrofág irányú differenciációjában (Francis et al., 1983), csirke mesenchymális sejtek chondrocita irányú differenciációja során (Nakanishi és Uyeki, 1985; Zákány et al., 2007), a dendritikus sejtek érésében (Aldinucci et al., 2007) és a Th2 sejtek differenciációjában (Sambucci et al., 2013). Ezen felül szerepet játszik az angiogenezisben (Caldini et al., 2011), az adipogén differenciációban (Erener et al., 2012) és az embrionális őssejtek differenciációjában is (Gao et al., 2009).

3.4.4. A PARiláció patofiziológiai jelentősége, a PARP-1 gátlás terápiai lehetőségei

Kezdetben a PARP-1-gyel kapcsolatos vizsgálatokban annak DNS hibajavító szerepe kapott nagy hangsúlyt. A PARP-1 kutatása és a gátlószerek alkalmazása a daganatellenes terápiában így párhuzamosan fejlődött (Curtin és Szabó, 2013). Már 1980-ban kimutatták, hogy a 3-AB (3-aminobenzamid) a PARP-1 gátlása révén hatékonyan gátolta a DNS alkilálószer DMS (dimetil-szulfát) által okozott DNS törések javítását, így növelte a DMS citotoxicitását (Durkacz et al., 1980). Később több PARP gátlószert fejlesztettek ki, mely a klinikai kipróbálás fázisába jutott. Legtöbb esetben kombinált terápiában, más gyógyszerekkel (DNS metiláló szerekkel, topoizomeráz I gátlókkal) együtt, azok citotoxicitását fokozandó, alkalmazták a PARP gátlószereket. Bizonyos (pl. BRCA hiányos) daganattípusokban nem működik megfelelően a homológ rekombinációs DNS hibajavítás, így ezek a sejtek hiperérzékenyek a PARP gátlószerekre, melyek önmagukban sejthalált okoznak a megfelelő hibajavítási rendszer szinte teljes hiánya miatt (Bryant et al., 2005). A BRCA mutáns tumorokban a PARP gátlószerek monoterápiában való alkalmazása ígéretes (Curtin és Szabó, 2013).

Számos egyéb betegségben is leírták a PARP-1 gyors és elhúzódó aktiválódását, mely szövetkárosodáshoz, kóros folyamatokhoz vezet (Virág és Szabó, 2002). Kimutatták a PARiláció szerepét ischemia-reperfúziós modellben (Zingarelli et al., 1998; Liaudet et al., 2001), hemorrhágiás és szeptikus sokk esetén (Watts et al., 2001), diabetesben (Soriano et al., 2001), a doxorubicin által kiváltott szívelégtelenségben (Pacher et al., 2002) és gyulladási folyamatokban (Oliver et al., 1999; Bai et al., 2009). A PARP inhibitorok hatékonyak

lehetnek a gyulladás és a szöveti sérülések csökkentésében, a szervfunkciók javításában (Virág és Szabó, 2002).

3.5. A dohányfüst által okozott oxidatív károsodás

A dohányfüst egy több ezer vegyületből álló igen komplex és változó összetételű aeroszol, melyben az alkotóelemek dinamikusan oszlanak meg a részecske és a gáz fázis között (Thorne és Adamson, 2013; Wooten et al., 2006). A legújabb mérések szerint a cigarettafüstben lévő komponensek száma több mint 5600 (Perfetti és Rodgman, 2011), ebből 158 vegyület bizonyult toxikusnak, azon belül 45 vegyületet találtak, mely bizonyítottan vagy vélhetően karcinogén hatású (Fowles és Dybing, 2003). A policiklusos aromás hidrokarbonok (PAH), a nitrózaminok, az arzén, a kadmium és a króm karcinogén hatású lehet (Thorne és Adamson, 2013). A dohányfüst egyéb alkotók révén más megbetegedésekhez is hozzájárul. Így például az aldehideket (formaldehid, acetaldehid, akrilaldehid) a COPD (chronic obstructive pulmonary disease) kialakulásával hozták összefüggésbe. A cigarettafüst összetétele nagymértékben függ a dohány minőségétől és feldolgozásától, az égéstől, a cigaretta tervezésétől, annak formájától és a füstszűrőtől (Wooten et al., 2006; Roemer et al., 2012). A kísérleti körülmények között használt cigarettafüst kivonatok (CSE, cigarette smoke extract) fizikai és kémiai tulajdonságai és így biológiai hatásai is eltérőek lehetnek a kivonat készítésének módjától függően. Jelenleg még nem megoldott, de törekednek a dózis mérésére a teljes füst kivonatok *in vitro* kísérletekben való használatokor (Thorne és Adamson, 2013).

Legtöbb tanulmány a cigarettafüst által okozott sejthalált, a gyulladós folyamatokat, a DNS károsodást és az oxidatív stresszt vizsgálja, melyek együttesen vezetnek a dohányzás által okozott különböző betegségek kialakulásához. A dohányzás általános oxidatív stresszt kiváltó hatása révén szinte az egész szervezet működésére hat. A dohányfüst gátolja a sejtproliferációt és a sejtek regenerációs képességét, így késlelteti a gyomorfekély gyógyulását (Shin et al., 2002), hozzájárul az osteoporosis kialakulásához illetve az állapot romlásához (Liu et al., 2001). A CSE gátolja az eNOS (endotheliális nitrogén-monoxid szintáz) aktivitását, csökkenti a nitrogén-monoxid termelést, így az érrendszeri betegségek egyik rizikófaktora (Zhang et al., 2006; Ota et al., 1997; Imamura et al., 2007; Su et al., 1998). A dohányzás fokozza a myometrium kontraktilitását, így növeli a koraszülés kockázatát (Nakamoto et al., 2006).

A tüdőben a dohányzás által okozott sejthalál hozzájárul a COPD tünet együttes kialakulásához, azonban a sejthalál formáját és ezek relatív szerepét tekintve ellentmondásos eredményeket találunk az irodalomban. Az eltérések oka valószínűleg az, hogy a kísérleti

körülmények, az alkalmazott CSE koncentráció és a vizsgált sejttípusok különbözőek. CSE kezelés hatására apoptózist mutattak ki HFL-1 humán fibroblaszt sejtekben (Carnevali et al., 2003; Sugiura et al., 2007), A549 alveoláris epithelsejtekben (Jiao et al., 2006; Ramage et al., 2006), hBEC bronchialis epithel sejtekben (Tagawa et al., 2008). Más vizsgálatok szerint inkább a nekrozis jellemző (Kode et al., 2006), illetve adott sejttípusban a sejthalál módja lehet apoptózis vagy nekrozis, ami az alkalmazott CSE koncentrációtól függ (Ishii et al., 2001). Tüdőbiopsziákból származó humán primer fibroblaszt sejtek vizsgálata azt mutatta, hogy CSE kezelés hatására nagy egyéni variancia tapasztalható a különböző sejtek érzékenységében és a fibroblasztok apoptózisra való hajlamában. Ez magyarázhatja azt, hogy nem minden dohányzó emberben alakul ki emphysema (Bagloli et al., 2006). Az akut kezeléssel ellentétben a krónikus CSE kezelés mitokondriális mutációkat eredményezett, emellett csökkentette a sejtek apoptózisra való érzékenységét, így a dohányzás ártalmainak kitett szövetekben szelekciós nyomást jelenthet a tumoros elváltozások kialakulása során (Chang et al., 2010). Más vizsgálatban is kimutatták, hogy a CSE kezelés DNS károsodást okoz, de nem vezet apoptózishoz, így a potenciálisan onkogén mutációt hordozó sejtek túlélése lehetővé válik, ami szintén elősegíti a tumorok kialakulását (Liu et al., 2005). Az autofágia morfológiai és biokémiai paramétereit is sikerült kimutatni CSE kezelés hatására Beas-2b humán bronchiális epithelsejteken (Kim et al., 2008), COPD betegek mintáiban, dohányfüsttel kezelt egerekben és tüdőepithel sejtekben (Chen et al., 2008). Epithel sejtekben, fibroblasztokban és makrofágokban szintén autofágiát váltott ki a cigarettafüst kezelés, és a PARP-1 gátlása a SIRT1 aktiválásának révén csökkentette a cigarettafüst által kiváltott autofágia mértékét (Hwang et al., 2010).

A hosszútávú dohányzás másik következménye lehet a krónikus gyulladási folyamatok kialakulása és a csökkent védekezőképesség a légúti fertőzésekkel szemben. A jelenségben a neutrofil és eozinofil granulociták, a makrofágok és T-limfociták szerepét vizsgálták leginkább. A CSE által indukált proinflammatorikus citokintermelés tekintetében ellentmondásosak az eredmények. A legtöbb vizsgálat szerint a cigarettafüst hatására fokozódik az NF- κ B aktivitása és a neutrofil infiltrációt elősegítő IL-8 termelése *in vivo* és *in vitro* modellekben is (Richter et al., 2002; Lixuan et al., 2010; Mortaz et al., 2009; Mio et al., 1997; Yang et al., 2006; Kode et al., 2006; Li et al., 2007; Vassallo et al., 2008; Keatings et al., 1996). Más proinflammatorikus citokinek (így például az IL-1, IL-6, TNF- α) eséén azonban kevésbé egyértelmű a CSE hatása. Több esetben számoltak be arról, hogy a cigarettafüst ezen citokinek termelését is fokozta (Lixuan et al., 2010; Orosz et al., 2007; Kode et al., 2006;), ezzel ellentétben más modellekben az IL-8 szint emelkedése mellett a

többi citokin szintjének csökkenését mutatták ki (Kent et al., 2008; Mortaz et al., 2009). Így az IL-8 expresszió keresztül előidézi a gyulladásos sejtek kemotaxisát, és gátolja a veleszületett immunválaszt (Kent et al., 2008; Kulkarni et al., 2010). A citokintermelésre gyakorolt hatása révén a CSE befolyásolja az immunsejtek kórokozók által kiváltott reakcióját is. Kimutatták, hogy CSE jelenlétében csökken a pDC sejtek (plasmacytoid dendritikus sejtek) TLR-9 (Toll-like receptor 9) ligand által indukált TNF- α , IL-6 és IFN- α termelése, így csökken az antivirális immunvédekezés hatékonysága (Mortaz et al., 2009). *Streptococcus pneumoniae* fertőzés esetén egerekben cigarettafüst hatására csökkent a bakteriális clearance hatékonysága, alveoláris makrofágokban pedig csökkent a komplement mediált fagocitózis mértéke (Phipps et al., 2010). Bronchiális epithel sejtek esetén a dohányfüst kezelés csökkentette a barrierfunkciót és fokozta az allergénpenetráció mértékét (Gangl et al., 2009).

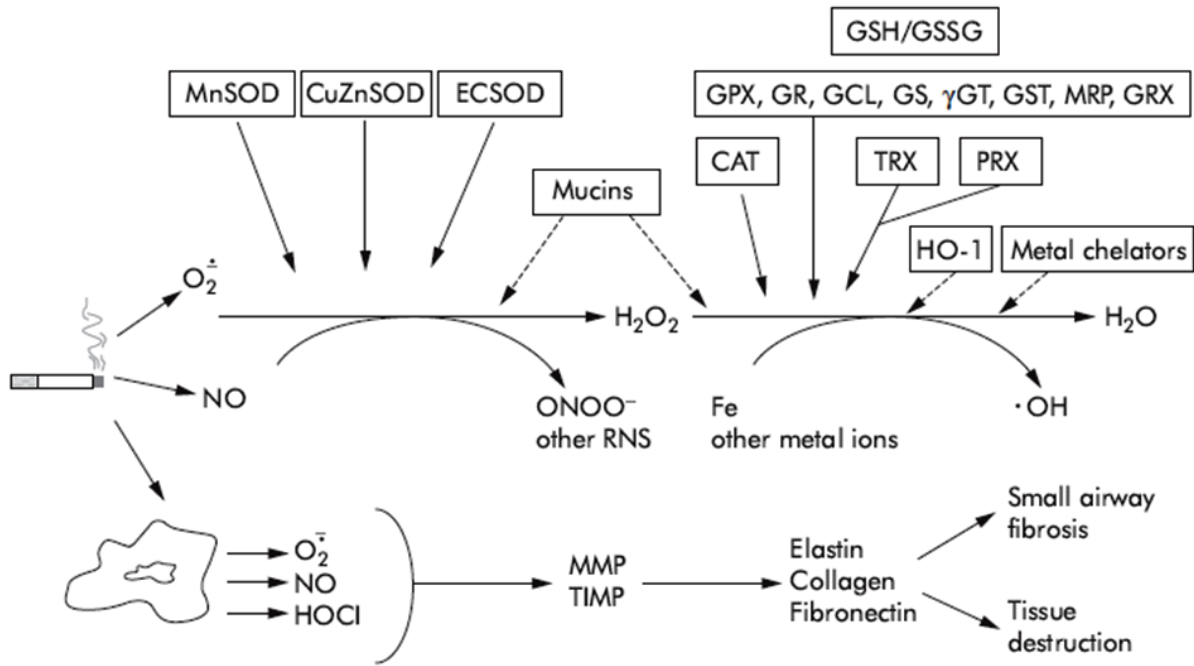
Habár a cigarettafüst számos karcinogén és egyéb ártalmas vegyületet tartalmaz, a kísérletes bizonyítékok arra utalnak, hogy a toxicitása nagyrészt az oxidatív stresszel kapcsolatos. A szabadgyökök jelenlétét a cigarettafüstben, az általuk okozott oxidatív károsodást több tanulmányban kimutatták, és összefüggésbe hozták az oxidatív stresszt a dohányzás által okozott megbetegedésekkel (Pryor et al., 1983; Church és Pryor, 1985; Zang et al., 1995). Mind a sejthalál folyamatokban, mind az immunsejtek citokintermelésének szabályozásában kulcsszerepe van a cigarettafüst által okozott oxidatív stressznek. Több vizsgálatban igazolták, hogy az antioxidánsok csökkentik a gyulladásos folyamatokat (Kulkarni et al., 2010) és védelmet jelentenek a sejtek túlélésében, így szerepet kaphatnak a különféle tünetegyüttesek kezelésében és megelőzésében (Kinnula, 2005; Onizawa et al., 2009; Kode et al., 2008; Panda et al., 2000).

A dohányfüst gázfázisa rövid élettartamú reaktív oxigéngyököket tartalmaz, főként szuperoxidot és nitrogén-monoxidot, melyek reakciójából az igen reaktív peroxinitrit képződhet. A részecskefázis ezzel szemben hosszabb élettartamú hidrokinonokban gazdag, melyek redox reakciókban további szuperoxid, hidrogén-peroxid és hidroxil gyök képzéséhez járulnak hozzá, így tartósan fennálló oxidatív stresszt eredményeznek (Aoshiba és Nagai, 2003; Church és Pryor, 1985). A hidrokinonok és a hidrogén-peroxid a sejtekbe jutva fehérjék, lipidek oxidatív módosítását idézik elő és DNS károsodást okozhatnak (Nishio és Watanabe, 1997; Asami et al., 1997; Liu et al., 2005; van der Vliet, 2006).

A tüdőben hatékony védekezési mechanizmus alakult ki a reaktív oxigénvegyületek ártalmatlanítására. A ciszteinben gazdag glikoproteinekből álló mucin jelentős szerepet játszik a légutak védelmének biztosításában, és mennyisége megnő oxidánsokkal való kezelés során (Baginski et al., 2006). A tüdőben a GSH (redukált glutation) szintén elsődleges fontosságú a

reaktív oxigénvegyületek eliminálásában. A légutak szöveteiben lipid- és vízdékony vitaminok is találhatóak, de ezek szerepe az oxidatív stresszben még nem tisztázott. A tüdőben emellett fontosak az antioxidáns enzimek és thiol fehérjék, melyek jellemzően sejt- illetve kompartment-specifikus elrendeződést mutatnak (Kinnula, 2005). A SOD enzimek (szuperoxid dizmutázok) a szuperoxid lebontását katalizálják, a citoszolikus CuZnSOD, a mitokondriális MnSOD és az extracelluláris ECSOD is nagy mennyiségben expresszálódik a tüdőben (Kinnula és Crapo, 2003). A hidrogén-peroxid lebontását végző, a peroxisomában elhelyezkedő kataláz (CAT), valamint egyéb, a GSH metabolizmushoz kapcsolódó enzimek szintén fontos szerepet játszanak. Ez utóbbi csoportba tartoznak a glutation peroxidázok (GPX), a glutation reduktáz (GR), a glutamát cisztein ligáz (GCL) és a glutation szintáz (GS). A katalázzal ellentétben a GPX enzimek nemcsak a hidrogén-peroxid, de a lipid-peroxidok lebontását is képesek katalizálni. A glutamát cisztein ligáz és a glutation szintáz megfelelő működése a GSH szintézis miatt fontos, míg a glutation reduktáz az „oxidált GSH” (GSSG) gyors redukálásában vesz részt (Kinnula, 2005). A hidrogén-peroxid eliminálásában tiol-tartalmú fehérjék is részt vesznek, humán sejtekben a tioredoxinok (TRX) és a tioredoxin reduktázok (TRR) szerepét írták le (Tiitto et al., 2003). Az oxidatív stresszben szerepet játszó 44 gén expressziójának vizsgálata során kimutatták, hogy 16 gén expressziója fokozódott a dohányzó emberekben a kontroll csoporthoz viszonyítva. A változás nagyrészt a GSH metabolizmus enzimeit érintette (Hackett et al., 2003).

A dohányzás által okozott megbetegedések hátteréről egyre inkább az az elfogadott álláspont, hogy alapvetően az oxidatív stresszre, illetve az oxidáns-antioxidáns egyensúly felborulására vezethetők vissza. A ROS/RNS vegyületek keletkezésének módját és az ezek eliminációjában részt vevő legfontosabb enzimeket a 10. ábra mutatja be.



10. ábra ROS/RNS vegyületek keletkezésének módja dohányzás során és ezek eliminációjában részt vevő legfontosabb enzimek (Kinnula, 2005 nyomán)

•O₂⁻: szuperoxid. H₂O₂: hidrogén-peroxid. •OH: hidroxil gyök. NO: nitrogén-monoxid. NOS: nitrogén-monoxid szintáz. HOCl: hipoklórossav. ONOO⁻: peroxinitrit. RNS: reaktív nitrogén intermedierek. MMP: mátrix metalloproteináz. TIMP: mátrix metalloproteináz szöveti inhibitor. SOD: szuperoxid dizmutáz. GPX: glutation peroxidáz. GR: glutation reduktáz. GSH: redukált glutation. GCL: glutamát cisztein ligáz. GST: glutation-S-transzferáz. GSSG: oxidált glutation. GS: glutation szintáz. γGT: γ-glutamil-transzpeptidáz. MRP: multidrug resistance protein. TRX: tioredoxin. PRX: peroxiredoxin. GRX: glutaredoxin. CAT: kataláz. HO-1: hem-oxigenáz-1.

3.6. Mesenchymalis őssejtek (MSC, mesenchymal stem cells) és az osteogén differenciáció jellemzése

A mesenchymalis őssejtek az egyedfejlődés korai szakaszában megjelenő, de a felnőtt szervezetben is jelenlévő non-hematopoetikus multipotens sejtek, melyek képesek önmegeújulásra és többféle irányú differenciációra (Chamberlain et al., 2007). Először a csontvelőben írták le a mesenchymalis őssejtek jelenlétét (Friedenstein et al., 1976), de számos más szövetben is megtalálhatóak, így izolálhatóak neonatális szövetekből (a placenta bizonyos részei, köldökzsinór) és felnőtt szövetekből (zsírszövet, csontvelő, perifériás vér) (Hass et al., 2011). Az ISCT (International Society for Cellular Therapy) állásfoglalása alapján (Dominici et al., 2006) őssejtnek tekintjük azokat a sejteket, melyek

- adherensek

- felszínükön CD105, CD73 és CD90 antigének jelen vannak, de nem hordoznak semmilyen vérbéna ő- és elődsejtekre, illetve a különböző véresejtfejlődési sorokra jellemző felszíni markert (CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79 α és CD19, HLA -DR)
- csont-, porc- és zsírsejteké egyaránt képesek differenciálódni.

Multipotens jellegüknel fogva a mesenchymalis őssejtek felhasználása ígértesnek tőnik a regeneratív orvoslásban. Megfelelő stimulusok hatására az őssejtek adott sejtípussá képesek differenciálódni, így segítve a szöveti regenerálódást és a szervfunkciók javulását. A differenciációs folyamatok több lépésben zajlanak le. Első lépésben a multipotens MSC sejtek elköteleződnek a differenciáció irányába, az elköteleződést a megfelelő „mester” transzkripciós regulátorok szelektív expressziója irányítja. Ilyen kulcsfontosságú transzkripciós regulátor a MyoD az izom, PPAR β a zsír, Sox9 a porc és Runx2 a csont irányú differenciáció során. A csontirányú differenciáció irányába elköteleződött osteoprogenitor sejtekben a proliferációs stádiumot követően a mitotikus fázisból kilépve fokozódik az alkalikus foszfatáz, a csont szialoprotein (BSP, bone sialoprotein) és az I. típusú kollagén expressziója, melynek révén létrejön az extracelluláris kollagénben gazdag mátrix. Ezt az extracelluláris mátrix mineralizációjában fontos gének (osteokalcin, osteopontin, kollagenáz) expressziójának növekedése követi, így a mátrix a hidroxipatit kristályok kirakódása révén mineralizálódik (Jensen et al., 2010). Az osteogén differenciációban többféle szignalizációs kaszkád szerepét írták le, köztük a β -katenin függő Wnt jelátviteli út vonalat (D’Alimonte et al., 2013), a Hedgehog szignalizációt (James et al., 2010), és a NELL-1 jelátviteli út vonalat (James et al., 2012). Ezen felül több más jelátviteli út vonal is befolyásolhatja a differenciációt, így például a BMP (bone morphogenic protein) jelátviteli út (Lamplot et al., 2013) és az IGF (inzulin-szerű növekedési faktor) szignalizáció (Giustina et al., 2008). Több vizsgálatban találtak azt, hogy az oxidatív stressz és a hypoxia is hatással van a differenciációs folyamatokra. A mesenchymalis őssejtek ugyanis szöveti körülmények között hypoxiás mikrokörnyezetben találhatóak, így a standard tenyésztési körülmények önmagukban oxidatív stresszt jelentenek, mely befolyásolja a sejtek proliferációs kapacitását és differenciációs képességét is (Hass et al., 2011). Több vizsgálatban a ROS vegyületek szerepét a differenciációban, ezzel kapcsolatban ellentmondásos eredményeket találunk. Egyes megfigyelések szerint a ROS vegyületek gátolják az osteogén differenciációt (Chen et al., 2008; Arai et al., 2007), míg mások eredményei éppen azt bizonyítják, hogy a képződő ROS elősegíti azt. Kimutatták, hogy a NOX4 által termelt szuperoxid szabályozza a BMP2 expressziót és elősegíti a differenciációt (Mandal et al., 2011), és vannak eredmények a szuperoxid kalcifikációt fokozó szerepére is (Sutra et al., 2008).

Az őssejtek mellett a SAOS-2 osteosarcoma sejtek is nagyon jó modellt nyújtanak az csont irányú differenciáció késői stádiumainak tanulmányozásához, melyekben differenciáló stimulusok hatására szintén mineralizált extracelluláris mátrix képzése figyelhető meg. Vizsgálataink során a legfontosabb eredményeket mindkét sejt típusban igyekeztünk megerősíteni.

A PARiláció szerepét számos differenciálódási folyamatban kimutatták, szükséges a kromatin fellazításához és közvetlenül szabályozza egyes transzkripciós faktorok kötődését a kromatinhoz. Eddig nem vizsgálták viszont, hogy az osteogén differenciáció transzkripciós szintű szabályozását bármilyen módon befolyásolja-e a PARP-1 aktivitás. Ezen felül kimutatták, hogy az osteoblast sejtek nagy része elpusztul a végső differenciációs állapot elérése előtt (Javed et al., 2010). Mivel a PARP-1-nek többféle sejthalál útvonalban bizonyították a szerepét, szerettük volna megvizsgálni, hogy van-e szabályozó funkciója a csontirányú differenciációban.

4. CÉLKITŰZÉSEK

4.1. Célkitűzések I.

A dohányzás által okozott károsodások alapvetően az oxidatív stresszre, illetve az oxidán-antioxidáns egyensúly felborulására vezethetők vissza. A cigarettafüstben jelen lévő illetve a sejtválasz során keletkező ROS/RNS vegyületeknek a DNS-re és egyéb sejtalkotókra tett káros hatásait számos vizsgálatban leírták, de a DNS károsodás érzékelése és a hibajavító mechanizmusok kevés figyelmet kaptak. A PARP-1 kulcsfontosságú szerepet játszik a DNS-törések érzékelésében és a hibajavító mechanizmusok elindításában, valamint a sejthalál folyamatok szabályozásában. Vizsgálataink során az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

1. Aktiválódik-e a PARP-1 CSE kezelés hatására A549 sejtekben?
2. Mi a szerepe a PARP-1-nek a CSE által kiváltott sejthalál szabályozásában?

4.2. Célkitűzések II.

A mesenchymalis őssejtek és a SAOS-2 sejtek csont irányú differenciációjához számos gén szabályozott expressziója szükséges. A PARP-1 kulcsszerepet játszik a genom integritásának fenntartásában, a kromatinszerkezet és a transzkripció szabályozásában. Vizsgálataink során az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

1. Van-e az oxidatív stressznek szerepe az MSC sejtek csontirányú differenciációjában?
2. Hogyan befolyásolja a PARP-1 az osteogén differenciációs folyamatokat?

5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

5.1. *Anyagok*

Az RPMI 1640 médiumot, a penicillin-streptomycin oldatot, az L-glutamint, az FBS-t és a molekulaméret markereket a Biocentertől (Szeged, Magyarország) vásároltuk. A 0,22 µm szűrőket, a DMSO-t, a Triton X-100 oldatot, az etanolt, a metanolt, a Trist, a Tris-HCl-t, a glicerolt, a maratott tárgylemezeket, a NaCl-ot, a II. típusú kollagenázt, az izopropanolt és a puromycint a VWR-től (Debrecen, Magyarország) szereztük be. Az LDH kitet a Roche-tól (Budaörs, Magyarország), a biotinilált anti-egér IgG-t a Vector Laboratories-től, a 2-merkaptóetanolt a Reanal-tól (Budapest, Magyarország), a May-Grünwald és a Giemsa oldatot a Finomvegyyszer Szövetkezettől (Budapest, Magyarország), a formalint a Molar Chemicals-től (Budapest, Magyarország), az anti-AIF antitestet a Cell Signalingtől (Danvers, MA, USA), a Super Signal West Pico reagenst, az anti-egér IgG – Alexa Fluor 546 és az anti-nyúl IgG - Alexa Fluor 488 konjugátumot, a Streptavidin-Alexa Fluor 488 konjugátumot, a propidium-jodidot, a MitoSOX Redet, az Ampex Redet, a dihidroetidiumot, a CD45, CD73, CD105, IgG1 és IgG2a ellenanyagot a Life Technologies-től (Budapest, Magyarország), az agarózt, a poliakrilamidot és a nitrocellulóz membránt a Bio-Rad-tól (Budapest, Magyarország) vásároltuk. A Tripszin-EDTA oldatot, az MTT-t, a JC-1-et, a brómfenol-kéket, a DAPI-t, a proteáz inhibitorokat, a PMSF-et, a SOD-ot, a katalázt, a PEG-SOD-ot, PEG-katalázt, a pLKO.1-puro vektort, a DMEM médiumot, a Histopaque-1077 oldatot, az antibiotikum-antimikotikum oldatot, a dexametazont, az aszkorbinsav-2-foszfátot, a β -licerol-foszfátot, a D3 vitamint, az Alizarin vörös festéket, a dimetil-metilénkéket, a nátrium-piruvát oldatot, az ITS premix oldatot, a prolint, az Oil Red O festéket, az indometacint és az IBMX-et a Sigma Aldrich-től (St. Louis, MO, USA) vásároltuk. A Steriflip szűrőket a Merck Kft-től (Budapest, Magyarország), az inzulin oldatot az Eli Lilly Nederland B.V. cégtől (Hollandia), a CD90, CD34 és HLA-G ellenanyagot a Soft Flow Hungary Kft-től, a vWF ellenanyagot a Leica Biosystems cégtől (Newcastle, UK) szereztük be.

5.2. *Módszerek*

5.2.1. *Sejtenyésztés*

Az A549 tüdőepithel sejteket RPMI 1640 médiumban tenyésztettük, melyet 10% FBS-sel (főtális borjúsérum), 2 mM L-glutaminnal, 100 U/ml penicillinnel és 100 µg/ml streptomycinnel egészítettünk ki. A humán cMSC sejtek tenyésztéséhez 1 g/l glükóz tartalmú

DMEM médiumot használtunk, melyet szintén 10% FBS-sel, 2 mM L-glutaminnal, 100 U/ml penicillinnel és 100 µg/ml streptomycinnel egészítettünk ki. A sejteket 37 °C-on, 5% CO₂ tartalom mellett tartottuk.

5.2.2. Cigarettafüst kivonat (CSE) készítése

A cigarettafüst kivonatot Su, Y. és mtsai (1998) módszere szerint készítettük, némi módosítással. 1 szál 100 mm hosszúságú, filter nélküli cigarettát (10 mg kátrány, 0,8 mg nikotin, 10 mg szén-monoxid) meggyújtottunk, és vákuum segítségével 5 perc alatt a füstjét átbuborékkoltattuk 6 ml szérummentes tenyésztőmédiumon. A füst kivonatot átszűrtük 0,22 µm-es szűrőn, majd 10% FBS hozzáadásával kaptuk a 100%-osnak nevezett cigarettafüst kivonatot. Ezt a kivonatot sejtenyészítő médiummal hígítva kaptuk a kezeléshez használt különböző koncentrációjú (v/v%) oldatokat. A cigarettafüst kivonatot minden kísérlet előtt frissen készítettük.

5.2.3. May-Grünwald-Giemsa festés

A sejtek morfológiai változásait May-Grünwald-Giemsa festés segítségével vizsgáltuk. A sejteket 24 lyukú tenyésztőedényben fedőlemezen növesztettük. PBS pufferrel (1,059 mM KH₂PO₄, 155,172 mM NaCl, 2,966 mM Na₂HPO₄·7H₂O, pH 7,4) történő mosást követően a sejteket metanollal fixáltuk 20 percig -20 °C-on, majd desztillált vízzel mostuk, ezt követően pedig 30 percig inkubáltuk az előzőleg frissen készített May-Grünwald-Giemsa oldattal (1:10 May-Grünwald, 1:10 Giemsa, desztillált vízben). A festés után a fedőlemezeket háromszor mostuk desztillált vízzel, majd Zeiss Axiolab mikroszkóp (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) illetve Zeiss Axiocam digitális kamera segítségével készítettünk fotókat a mintákról.

5.2.4. Kolóniaképző képesség meghatározása

A sejtek klonogén aktivitásának mérését a már korábban leírt módszer (Erdélyi et al., 2009) módosított változatával végeztük. Tripszin-EDTA-val való emésztést követően a sejtekből 10⁴/ml sejtszuszpenziót készítettünk, majd különböző koncentrációjú füst kivonattal kezeltük 30 percig 37 °C-on. A füst kivonat eltávolítása és friss sejtenyészítő médium hozzáadása után a sejteket 6 lyukú tenyésztőedénybe raktuk 1x10² illetve 2,5x10³/lyuk sejtszámban. 10 napos tenyésztést követően a sejteket PBS-sel mostuk, 4%-os formaldehiddel

15 percig szobahőmérsékleten fixáltuk, majd hematoxilinnel festettük 10 percig. Alapos csapvizetes mosás és szárítás után megszámloltuk a sejtkolóniákat, a klonogén aktivitást %-ban kifejezve adtuk meg a $T/C \times 100$ képlet segítségével, ahol a T illetve C érték a kezelt illetve a kontroll sejtpopulációk kolóniáinak száma.

5.2.5. Viabilitási assay (MTT redukciós assay)

A sejtek viabilitását MTT redukciós assay segítségével határoztuk meg (Erdélyi et al., 2009). A sejteket 96 lyukú tenyésztőedényben növesztettük 10^4 /lyuk sejtszámban. A kezelést követően MTT oldatot adtunk a sejtekhez 0,5 mg/ml végkoncentrációban és 1 órán keresztül inkubáltuk őket. A felülúszó leszívása után a formazán kristályokat dimetil-szulfoxidban (DMSO) oldottuk (200 μ l/lyuk). Az abszorbanciát Multiskan MS Plate Reader (Labsystems, Vantaa, Finland) segítségével 590 nm-en mértük. A viabilitást a kontroll %-ában adtuk meg $A_t/A_c \times 100$ képlet segítségével, ahol A_t illetve A_c a kezelt illetve a kontroll minták abszorbanciája. Minden mérésnél 4 párhuzamost használtunk, a kísérleteket minimum háromszor ismételtük.

5.2.6. LDH aktivitás mérése

A plazmamembrán integritásának károsodását a plazmamembrán sérülése révén a citoplazmából a felülúszóba jutó LDH (laktát-dehidrogenáz) aktivitásának mérésével határoztuk meg. A mérést Cytotoxicity Detection Kit (Roche Applied Science, Budaörs, Magyarország) segítségével végeztük, a gyártó javaslatait követve. A sejteket 96 lyukú tenyésztőedényben növesztettük 10^4 /lyuk sejtszámban. A kezelés után a sejteket centrifugáltuk, majd 50 μ l felülúszót adtunk 50 μ l frissen készített reakcióelegyhez. 20 perc inkubáció után az abszorbanciát Multiskan MS Plate Reader (Labsystems, Vantaa, Finland) segítségével 492 nm-en mértük. A mérés során a megfelelő kezelő oldatok szolgáltak vakként, a sejttípusra jellemző maximális LDH aktivitást az 1% TritonX-100 segítségével lizált sejtek értéke adta meg. Az egyes kezelések esetén a citotoxicitás értékét a maximális LDH aktivitás százalékában adtuk meg. Minden mérésnél 4 párhuzamost használtunk, a kísérleteket minimum háromszor ismételtük.

5.2.7. Mitokondriális membránpotenciál mérése

A mitokondriális membrán depolarizáció mértékét JC-1 fluoreszcens festékekkel mértük. A JC-1 membránpermeábilis, kationos jellegű fluoreszcens festék, mely egészséges sejtek mitokondriumában aggregátumokat képezve vörös fluoreszcenciát mutat. A mitokondriális membránpotenciál csökkenése esetén azonban a citoplazmában marad monomer formában, mely zöld fluoreszcenciát mutat. Így a vörös/zöld fluoreszcencia arányának csökkenése a mitokondriális membrán depolarizációját jelzi. A sejteket 96 lyukú tenyésztőedényben növesztettük 10^4 /lyuk sejtszámban. A kezelés után kétszer mostuk a sejteket HBSS pufferrel (5,33 mM KCl, 0,441 mM KH_2PO_4 , 4,17 mM NaHCO_3 , 137,93 mM NaCl, 0,338 mM Na_2HPO_4 , 5 mM D-glükóz, pH7,4), majd 30 percig inkubáltuk 1 μM JC-1 oldattal. A vörös fluoreszcenciát $530_{\text{Ex}}/590_{\text{Em}}$ nm-en, a zöld fluoreszcenciát $485_{\text{Ex}}/538_{\text{Em}}$ nm hullámhosszon mértük Fluoroskan Ascent FL Plate Reader (Labsystems, Vantaa, Finland) segítségével. Minden mérésnél 4 párhuzamost használtunk, a kísérleteket minimum háromszor ismételtük.

5.2.8. Sejtproliferáció mérése - ECIS (Electric Cell-substrate Impedance Sensing)

Az ECIS (Applied BioPhysics Inc., Troy, NY, USA) készülékkel történő sejtproliferáció mérés alapja az, hogy az elektródok felszínén növesztett sejtek növelik az ellenállást, így a mért ellenállás arányos a sejtszámmal. A sejteket 8W10E+ elektródák felszínén növesztettük 3×10^4 sejt/lyuk sejtszámban, majd a kezelés ideje alatt 2 percenként 4000 Hz frekvencián mértük az ellenállást. A rezisztencia értékeket a kezdeti időpontra normalizálva tüntettük fel.

5.2.9. PAR és AIF kimutatása immunfluoreszcens festéssel

Az AIF kimutatását a már korábban leírtak szerint végeztük (Erdélyi et al., 2009), a PAR detektálása szintén a korábban leírtak szerint történt, azzal az eltéréssel, hogy a peroxidázzal konjugált második antitest helyett fluoreszcens detektálást alkalmaztunk. A sejteket 24-lyukú tenyésztőedényben fedőlemezen növesztettük. PBS-sel történő mosást követően a sejteket metanollal -20 °C-on 20 percig (PAR) vagy 4% formalinnal szobahőmérsékleten 15 percig (AIF) fixáltuk. PBS-sel végzett mosás után a sejteket BSA-val blokkoltuk (1% BSA, PBS Triton X-100-ban oldva), majd 2 órán át a blokkoló oldatban hígított primer ellenanyaggal inkubáltuk. Az anti-AIF ellenanyagot 1:200, az anti-PAR ellenanyagot 1:500 hígításban használtuk. PBS-Triton X-100 oldattal történő mosások után a fedőlemezeket 1 óráig szekunder ellenanyaggal inkubáltuk 1:500 hígításban (AIF esetén anti-

nyúl IgG - Alexa Fluor 488 konjugátum, PAR esetén biotinnal konjugált anti-egér IgG). Ezt követően a fedőlemezeket PBS-sel mostuk, majd PAR esetén Streptavidin-Alexa Fluor 488 konjugátumot adtunk a sejtekhez 30 percre 1:500 hígításban. A magokat PAR esetén 2 µg/ml DAPI-val, AIF esetén 5 µM propidium-jodiddal festettük. PAR festésnél Zeiss Axiolab mikroszkóp (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) illetve Zeiss AxioCam digitális kamera segítségével készítettünk fotókat a mintákról. AIF festésnél a fotókat Olympus FluoView 1000 (Olympus, Tokyo, Japan) konfokális mikroszkóppal készítettük.

5.2.10. Western blot

A PAR kimutatásához a Western blot analízist a már korábban leírtak szerint végeztük (Erdélyi et al., 2009). A sejteket 6 lyukú tenyésztőedényben növesztettük 5×10^5 /lyuk sejtszámban. A kezelések után háromszor mostuk a sejteket hideg PBS pufferrel, majd 100 µl hideg lízis pufferben [62.5 mM Tris-HCl (pH 6,8), 2% SDS, 10% glicerin, 715 mM 2-merkapto-etanol, 1 mM PMSF (fenilmetilszulfonil-fluorid), proteáz inhibitorok] kapartuk fel őket. Szonikálás, centrifugálás és forralás után minden mintából 25 µg fehérjét vittünk fel 8% SDS-poliakrilamid gélre. Elektroforézist követően a gélben lévő mintákat nitrocellulóz membránra transzferáltuk [transzfer puffer: 25 mM Tris/HCl (pH 8,3), 192 mM glicin, 0,02% (m/v) SDS és 20% (v/v) metanol] 100V feszültségen 90 percig. A membrán aspecifikus kötőhelyeit 5% zsírszegény tejpor oldattal blokkoltuk, melyet 0,01% Tween 20 tartalmú PBS-ben (PBSTw) oldottunk. PBSTw oldattal történő mosást követően a membránt primer ellenanyaggal inkubáltuk 2 órán keresztül, az ellenanyagot 1% tejport tartalmazó PBSTw-ben oldottuk, 1:500 hígításban. Újabb mosás után 1 óráig inkubáltuk a membránt a torna-peroxidázzal jelölt második antitesttel (anti-egér IgG, 1:5000 hígításban, 1% tejpor tartalmú PBSTw-ben oldva), ezután PBSTw, majd PBS pufferrel mostuk, hogy eltávolítsuk a nem kötődött ellenanyagot. Supersignal West- Pico kemilumineszcens szubsztrát (34087, Kvalitex) hozzáadása után a kemilumineszcens jelet FluorChem FC2 Imager készülék segítségével detektáltuk.

5.2.11. Comet assay

A DNS törés kimutatása alkalikus Comet assay segítségével történt. A kísérletet a már korábban leírtak szerint végeztük (Erdélyi et al., 2009). Az alkalikus Comet assay leginkább az egyszálú DNS törések kimutatására szolgál; a módszer azon alapul, hogy a károsodott DNS könnyebben mozdul el elektromos erőterben, mint az ép DNS, így a sejtek lízise és

elektroforézise után üstökös formájú struktúrát mutat. Maratott felszínű tárgylemezre 1% normál olvadáspontú agarózt rétegeztünk. A sejteket tripszin-EDTA-val emésztettük, szuszpendáltuk, majd 30 percig kezeltük különböző koncentrációjú cigarettafüst kivonattal. A DNS hibajavítás hatékonyságának vizsgálatához a sejteket kezelés után 1 óráig friss médiummal inkubáltuk. Ezt követően a sejteket 0,5% alacsony olvadáspontú agarózba kevertük és a tárgylemezre rétegeztük (10^5 sejt/lemez). A gél megszilárdulása után lízis következett 1 órán át $4\text{ }^\circ\text{C}$ -on [lízis puffer: 2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 10% (v/v) DMSO, 1% Triton X-100 (v/v), pH 10,0]. Az elektroforézist alkalikus oldatban (300 mM NaOH, 1 mM EDTA) végeztük 25 percig 380 mA áramerősséggel. Ezt követően a tárgylemezeket 10 percig ekvilibráltuk 0,4 M Tris pufferben (pH 7,4), majd a sejtmagokat 10 $\mu\text{g/ml}$ etidium-bromiddal festettük. Zeiss Axiolab mikroszkóp (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) illetve Zeiss AxioCam digitális kamera segítségével készítettünk felvételeket a mintákról, a kvantitatív kiértékelést CometScore software segítségével végeztük.

5.2.12. Intracelluláris szuperoxid ($\text{O}_2^{\cdot-}$) detektálása és mérése

Az intracelluláris szuperoxid termelést kétféle fluoreszcens próbával detektáltuk. A dihidroetidium az etidium bromid membránpermeábilis, redukált formája, melyet a szuperoxid 2-hidroetidiummá képes oxidálni, és oxidált formában a DNS-hez kötődve vörös fluoreszcenciát mutat. A MitoSOX Red mitokondriális szuperoxid indikátor szintén egy membránpermeábilis vegyület, mely gyorsan és szelektíven a mitokondriumokba jut, ahol a szuperoxid képes oxidálni, melynek következtében vörös fényt emittál. A sejteket 96 lyukú tenyésztőedényben növesztettük 2×10^4 /lyuk sejtszámban. A kezelést követően a sejteket kétszer mostuk HBSS pufferrel, majd 5 μM MitoSOX Red illetve 20 μM dihidroetidium oldattal inkubáltuk 30 percig. A fluoreszcenciát $530_{\text{Ex}}/590_{\text{Em}}$ nm hullámhosszon mértük Fluoroskan Ascent FL Plate Reader (Labsystems, Vantaa, Finland) segítségével. Minden mérésnél 4 párhuzamost használtunk, a kísérleteket minimum háromszor ismételtük. A mitokondriális szuperoxid termelődését MitoSOX Red-et használva vitális festéssel is ki tudtuk mutatni. Ennek során a sejteket 24 lyukú tenyésztőedényben, fedőlemezekben növesztettük. A kezelést követően kétszer mostuk a sejteket HBSS pufferrel, majd 5 μM MitoSOX Red oldattal 30 percig inkubáltuk. A fluoreszcens jelet Zeiss Axiolab mikroszkóp illetve Zeiss AxioCam digitális kamera segítségével detektáltuk.

5.2.13. Hidrogén-peroxid (H_2O_2) detektálása

Az intracellulárisan termelődő hidrogén-peroxidot Amplex Red segítségével mértük. Tormaperoxidáz jelenlétében a hidrogén-peroxid reagál az Amplex Red-del (10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine), és a reakció terméke, a rezorufin vörös fluoreszcenciát mutat. A sejteket 96 lyukú tenyésztőedényben növesztettük 2×10^4 /lyuk sejtszámban. A kezelést követően a sejteket kétszer mostuk HBSS-sel, majd 50 μ M Amplex Ultra Red és 0,1 U/ml tormaperoxidáz oldattal (HBSS-ben oldva) inkubáltuk 30 percig. A fluoreszcenciát 530_{Ex}/590_{Em} nm hullámhosszon mértük Fluoroskan Ascent FL Plate Reader (Labsystems, Vantaa, Finland) segítségével. A koncentráció értékeket H_2O_2 kalibrációs görbe segítségével számoltuk és fehérjetartalomra normáltuk. Minden mérésnél 4 párhuzamost használtunk, a kísérleteket minimum háromszor ismételtük.

5.2.14. PARP-1 és PARG stabil csendesítése SAOS-2 osteosarcoma sejtvonalban

A PARP-1 és a PARG stabil csendesítése SAOS-2 sejtekben lentivírus alapú módszerrel történt, ahogyan egy másik munka során A549 sejtek esetén (Erdélyi et al., 2009). A csendesítéshez PARP-1 illetve PARG specifikus short hairpin RNS-t (shRNS-t) tartalmazó pLKO.1-puro plazmidot használtunk (TRCN0000007929 illetve TRCN0000051307 Sigma Mission shRNS konstruktok). A kontroll sejtvonal esetén a plazmid nem tartalmazott gátló szekvenciát. A SAOS-2 sejteket a megfelelő plazmidot hordozó lentivírusokkal fertőztük 24 órán keresztül, a fertőzéshez alkalmazott vírustiter 10 MOI volt. A fertőzött sejtek szelekciójához 5 μ g/ml puomicint használtunk 48 órán keresztül.

5.2.15. Humán chorion eredetű mesenchymalis őssejtek (cMSC sejtek) izolálása

A humán mesenchymalis őssejtek izolálását etikai engedéllyel végeztük (engedély száma: DEOEC-RKEB-2946-2009). A császármetszésből származó placentákat a Debreceni Egyetem Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikájáról kaptuk. A placentákat HBSS pufferrel mostuk, hogy a vér nagy részét eltávolítsuk. Az amnion és a köldökzsinór eltávolítása után a cotyledonokat apró darabokra vágtuk, majd 270 U/ml II. típusú kollagenáz jelenlétében emésztettük 37 °C-on 2 óráig 100 rpm fordulatszámmal rázatva. Az így kapott szuszpenzióból az nagyobb méretű emésztetlen szövetdarabokat szűrővel távolítottuk el, majd további szűrés következett 100 μ m Steriflip vákumos szűrőkkel. A sejteket centrifugálás (4 °C, 10 perc, 1500 g) után HBSS pufferrel szuszpendáltuk, majd a Ficoll sűrűséggradiens centrifugálás segítségével választottuk el a vörösvértestektől. Az így kapott sejteket HBSS pufferrel való

mosás után sejtenyészítő médiumban szuszpendáltuk, majd 37 °C-on, 5% CO₂ tartalom mellett tenyésztettük.

5.2.16. cMSC sejtek fenotipizálása és funkcionális jellemzése

A placentából izolált sejtek fenotipizálását az ISCT (International Society for Cellular Therapy) ajánlása alapján végeztük.

cMSC sejtek jellemzése felszíni markereik alapján

A mesenchymalis őssejtekre jellemző sejtfelszíni antigének vizsgálatát FACS analízis segítségével végeztük. A sejteket tripszin-EDTA-val történő emésztés után HBSS pufferrel mostuk, majd HBSS-ben szuszpendáltuk és 30 percig jégen inkubáltuk az általunk vizsgált felszíni antigének (CD34, CD45, CD73, CD90, CD105, vWF, HLA-G) ellen termeltetett primer ellenanyaggal (10 µg/ml). Minden mérésnél használtunk izotípus kontrollokat (IgG1 és IgG2b). HBSS pufferrel történő mosás után a sejteket másodlagos ellenanyaggal (anti mouse IgG-Alexa 546, 1:500 hígításban) inkubáltuk 25 percig jégen. A nem kötődött ellenanyagokat mosással távolítottuk el, majd 1% formalin oldattal fixáltuk a sejteket (15perc, szobahőmérséklet). A fluoreszcencia intenzitást BD FACS Calibur áramlási citométeren mértük FL2 csatornán, az adatokat BD Multiset software segítségével értékeltük.

A differenciációs képesség ellenőrzése – osteogén differenciáció

Osteogén irányú differenciáció esetén a differenciáló médium összetétele: 1 g/l glükóztartalmú DMEM, 10% FBS, 2 mM L-glutamin, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 0,1 µM dexametazon, 50 µg/ml aszkorbinsav-2-foszfát, 10 mMβ⁻-glicerol-foszfát, 50 nM D3 vitamin. A sejteket 96 lyukú tenyésztőedényben növesztettük 1,5x10⁴ sejt/lyuk sejtszámban, majd differenciáltató médiumban tartottuk őket. Csont irányú differenciáció során a sejtek Ca²⁺ tartalmú extracelluláris mátrixot választanak ki, ennek kimutatására Alizarin vörös festést alkalmaztunk a differenciáció 7., 14. és 21. napján. A sejteket PBS-sel mostuk, majd metanollal fixáltuk 30 percig szobahőmérsékleten. A metanol eltávolítása után 5 percig szobahőmérsékleten hagytuk száradni, majd Alizarin Red S oldattal (40 mM, pH 4,27) festettük a mintákat szobahőmérsékleten 30 percig. Desztillált vízzel történő mosás majd szárítás után Zeiss Axiolab mikroszkóp illetve Zeiss Axiocam digitális kamera segítségével készítettünk fotókat a mintákról.

A differenciációs képesség ellenőrzése – chondrogén differenciáció

A chondrogén irányú differenciációs képesség ellenőrzése dimetil-metilénkék (DMMB) festéssel történt, ez a festési eljárás alkalmas az extracelluláris mátrix szulfatált glükózamino-glikán komponenseinek kimutatására. A differenciáló médium összetétele: 4,5 g/l glükóztartalmú DMEM, 2 mM L-glutamin, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 1 mM Na-piruvát, 10 ng/ml TGF-β1, ITS premix, 0,1 µM dexametazon, 50 µg/ml aszkorbinsav-2-foszfát, 40 µg/ml prolin. A sejteket tripszin-EDTA-val történő emésztés után differenciációs médiumban szuszpendáltuk, majd $2,5 \times 10^5$ sejt/lyuk sejtszámban V-aljú 96 lyukú tenyésztőedénybe helyeztük, és centrifugálással (10 perc, 800g) a tenyésztőedény aljára gyűjtöttük. A sejtek a differenciálódás során apró gömb alakú képződményt alakítottak ki. A differenciáció 7., 14. és 21. napján a gömböket PBS-sel történő mosás után 4% formalinban fixáltuk, majd paraffinba beágyazva metszettük. A metszeteket a paraffin kioldása után 30 percig szobahőmérsékleten 0,1% dimetil-metilénkéssel festettük, majd Zeiss Axiolab mikroszkóp illetve Zeiss Axiocam digitális kamera segítségével készítettünk fotókat a mintákról.

A differenciációs képesség ellenőrzése – adipogén differenciáció

Az adipogén irányú differenciációs képesség kimutatására Oil Red O festést alkalmaztunk, mellyel kimutathatók a differenciálódás során a citoplazmában felhalmozódó lipidcseppek. A sejteket 24 lyukú tenyésztőedényben fedőlemezekben tenyésztettük 10^5 sejt/lyuk sejtszámban. A 100% konfluencia elérése után két nappal indítottuk a differenciáltatást. A differenciáló médium összetétele: 4,5 g/l glükóztartalmú DMEM, 10% FBS, 2 mM L-glutamin, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 1 mM Na-piruvát, 1 µM dexametazon, 200 µM indometacin, 500 µM IBMX (3-izobutil-1-metilxantin), 10 µM inzulin. A differenciáció 7., 14. és 21. napján Oil Red O festéssel tettük láthatóvá a sejtekben felhalmozódó neutrális lipideket. A sejteket PBS-sel mostuk, majd 4% formalinnal 15 percig szobahőmérsékleten fixáltuk. A fixált sejteket desztillált vízzel történő mosás után 30 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk Oil Red O oldattal [0,5% (m/v) Oil Red O izopropanolban oldva, az így kapott oldat 6 térfogategységét 4 térfogategység desztillált vízzel elegyítettük (6:4 Oil Red O:dH₂O)]. Desztillált vízzel történő mosás után Zeiss Axiolab mikroszkóp illetve Zeiss Axiocam digitális kamera segítségével készítettünk fotókat a mintákról.

5.2.17. Real-time PCR

A relatív génexpresszió mértékének meghatározását real-time PCR segítségével végeztük. Az RNS izolálást TRI reagens segítségével végeztük. Reverz transzkripcióval 2 µg RNS-t írtunk át cDNS-sé High Capacity cDNA reverse transcription kit (Life Technologies) felhasználásával. A real-time kvantitatív PCR-t TaqMan assay-vel végeztük 7500 Fast Real-Time PCR készüléken (Applied Biosystems). A vizsgált gének relatív expressziójának meghatározásához GAPDH-t (gliceraldehid-3- foszfát dehidrogenáz) választottunk háztartási génként.

5.2.18. Statisztikai kiértékelés

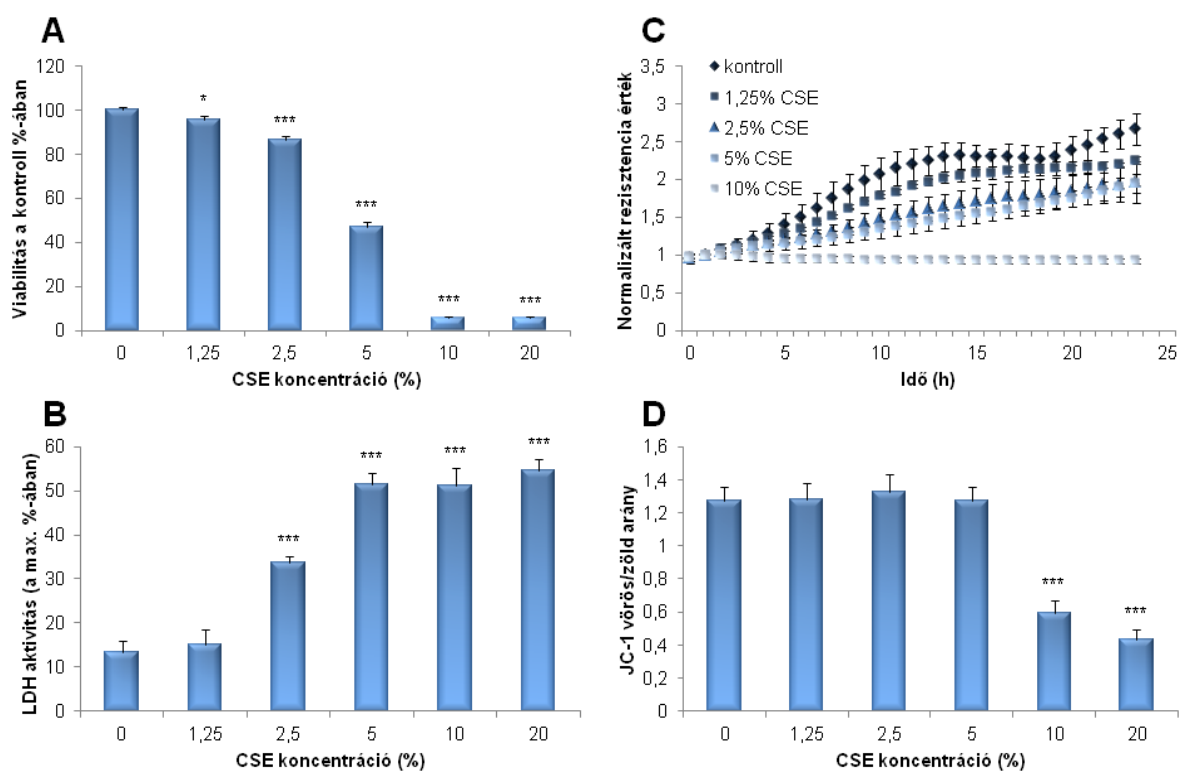
A statisztikai kiértékelést a dohányfüst hatásait vizsgáló kísérletek esetén egyutas Anova-val végeztük. Az osteogén differenciációval kapcsolatos eredmények kiértékelésénél t-próbát használtunk.

6. EREDMÉNYEK

6.1. A poli-ADP-ribóziláció mint túlélési mechanizmus a dohányfüst által kiváltott sejthalálban

6.1.1. A cigarettafüst kivonat toxikus hatásai A549 sejtekre

Az MTT assay eredményei alapján az A549 sejtek életképessége cigarettafüst kivonat kezelés hatására idő- és koncentrációfüggő módon csökkent (11. ábra A). A sejtek pusztulása során fokozott LDH aktivitást tudunk mérni a felülúszóban (11. ábra B), azaz sérült a plazmamembrán integritása, ami a nekrozis egyik jele. Az ECIS mérések során azt tapasztaltuk, hogy CSE kezelés jelentősen csökkentette a sejtek proliferációs képességét is (11. ábra C). Mitokondriális membrán depolarizációt azonban csupán a legmagasabb alkalmazott koncentrációk esetén tudunk kimutatni (11. ábra D).

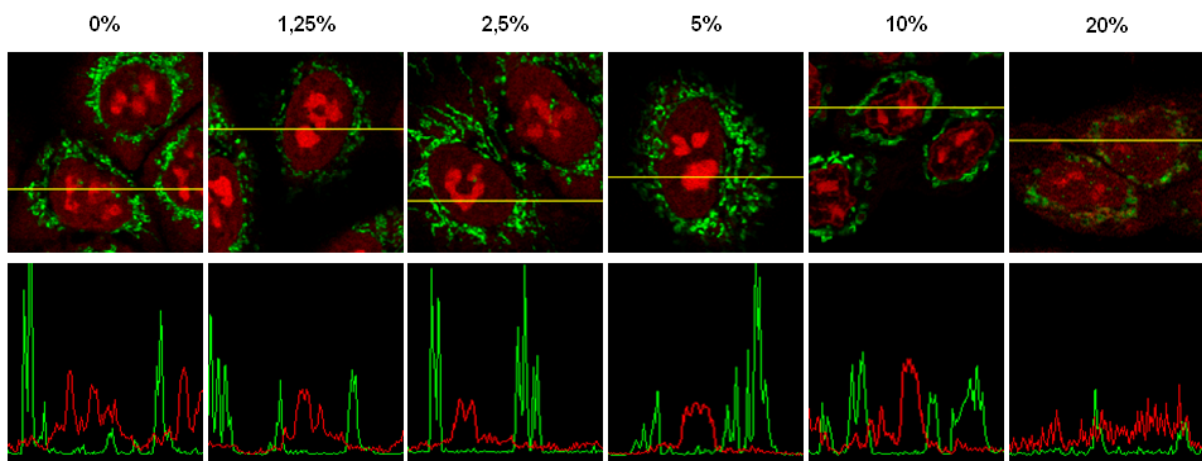


11. ábra CSE toxikus hatásai A549 sejtekre.

Az A549 sejteket 96 lyukú tenyésztőedényben növesztettük 10^4 sejt/lyuk sejtszámban, majd 24 óráig kezeltük a megadott koncentrációjú cigarettafüst kivonattal (A, B és D). (A) A sejtek viabilitásának mérése MTT redukciós assay segítségével, az értékeket a kontroll százalékában adtuk meg (öt független kísérlet átlaga \pm SE). (B) A sejtmembrán sérülésének mérése LDH aktivitás meghatározásával. Az egyes értékeket a maximális LDH aktivitás százalékában adtuk meg, három kísérlet átlaga \pm SE van feltüntetve. * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$. (C) A sejteket 8W10E+ elektródák felszínén növesztettük 3×10^4 sejt/lyuk sejtszámban, majd különböző koncentrációjú CSE kivonattal kezeltük, a kezelés ideje alatt ECIS készülék segítségével 2

percenként 4000 Hz frekvencián mértük az ellenállást. A rezisztencia értékeket a kezdeti időpontra normalizálva tüntettük fel (három minta átlaga \pm SD). (D) A JC-1 festék vörös/zöld fluoreszcencia arányának csökkenése a mitokondriális membrán depolarizációját jelzi (tíz kísérlet átlaga \pm SE). *** $P < 0,001$.

Jelentős AIF transzlokációt a legmagasabb koncentrációknál sem tapasztaltunk, az AIF nagyrészt sejtmagon kívüli lokalizációt mutatott, és AIF transzlokáció nem volt kimutatható (12. ábra).



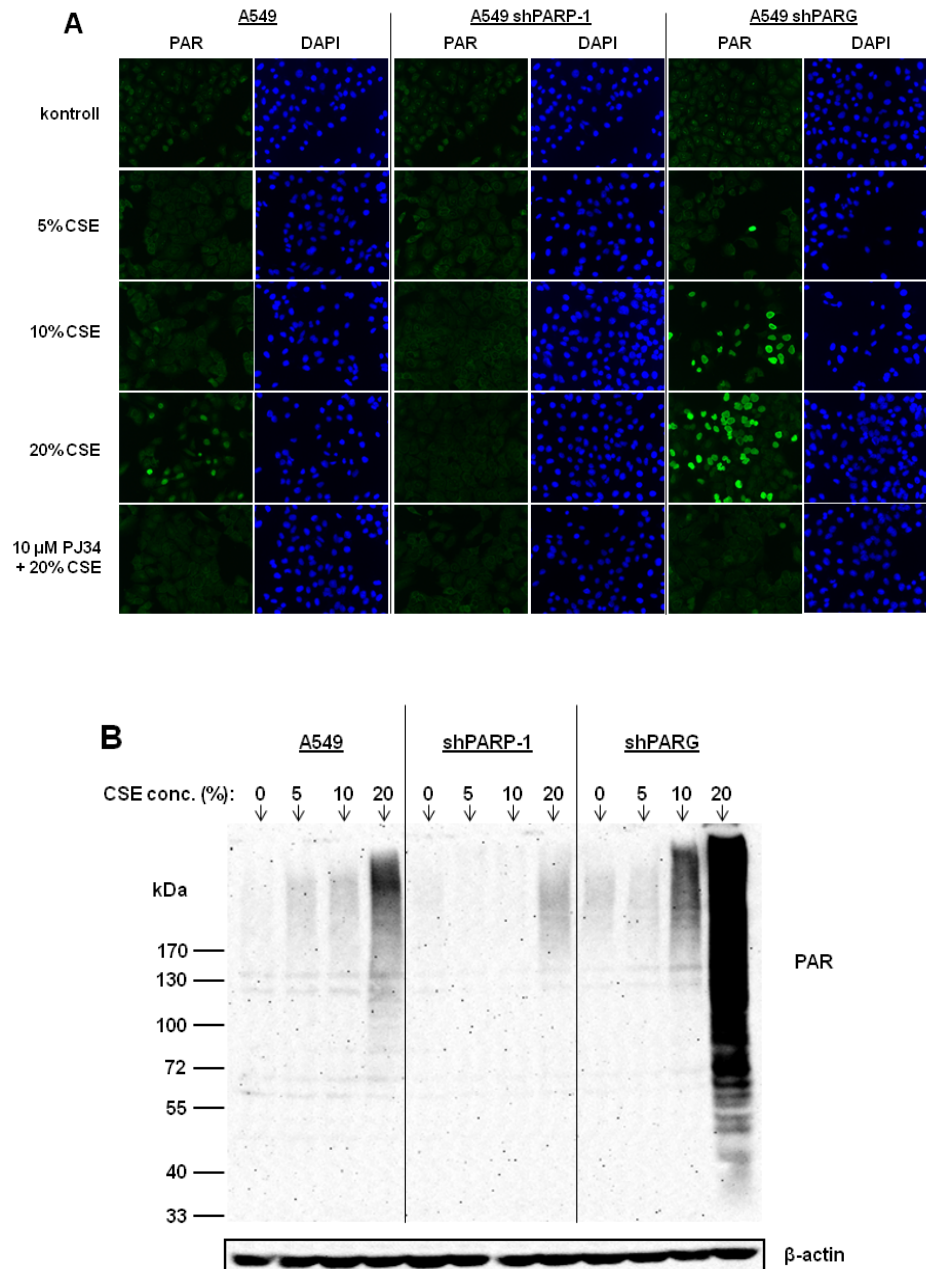
12. ábra AIF lokalizációja cigarettafüst kivonattal kezelt A549 sejtekben

A549 sejteket 24 óráig kezeltünk cigarettafüst kivonattal a megadott koncentrációkban, majd az AIF-et (zöld) immunfluoreszcenciával jelöltük, a sejtmagokat propidium-jodiddal (vörös) festettük. A hisztogramok mutatják a fluoreszcencia intenzitás eloszlását a képeken jelölt sávok mentén.

6.1.2. CSE kezelés hatása a PAR akkumulációra

Ahhoz, hogy a PARP-1 mint elsődleges PAR szintetizáló enzim, valamint a PARG mint elsődleges PAR lebontó enzim szerepét tisztázzuk a CSE által kiváltott sejthalálban, olyan A549 sejteket használtunk, melyekben lentivirális rendszerrel stabilan csendesítettük ezen enzimeket (shPARP-1 illetve shPARG sejtvonalak) (Erdélyi et al., 2009). A kontroll vektort tartalmazó A549 sejtekben CSE hatására kismértékű PAR akkumuláció mutatható ki immunfluoreszcenciával, míg a PARP-1 csendesített sejtekben - a várakozásnak megfelelően - PAR nem detektálható (13. ábra). PARG csendesítés esetén erőteljesebb a PAR akkumuláció, és kisebb CSE koncentráció esetén is detektálható. Az immunfluoreszcens festés specificitásának igazolására egy specifikus PARP gátlószert, a PJ34-et alkalmaztuk, mely gátolta a polimer képződést a CSE kezelés során. Western blot technikával is megerősítettük az immunfluoreszcenciával kapott eredményeket (13. ábra B), bár ez utóbbi

módszer esetén (a módszer érzékenyebb voltának köszönhetően) kismértékű PAR szignál a PARP-1 csendesített sejtekben is jelen volt, jelezve, hogy a csendesítés hatékonysága nem 100%.



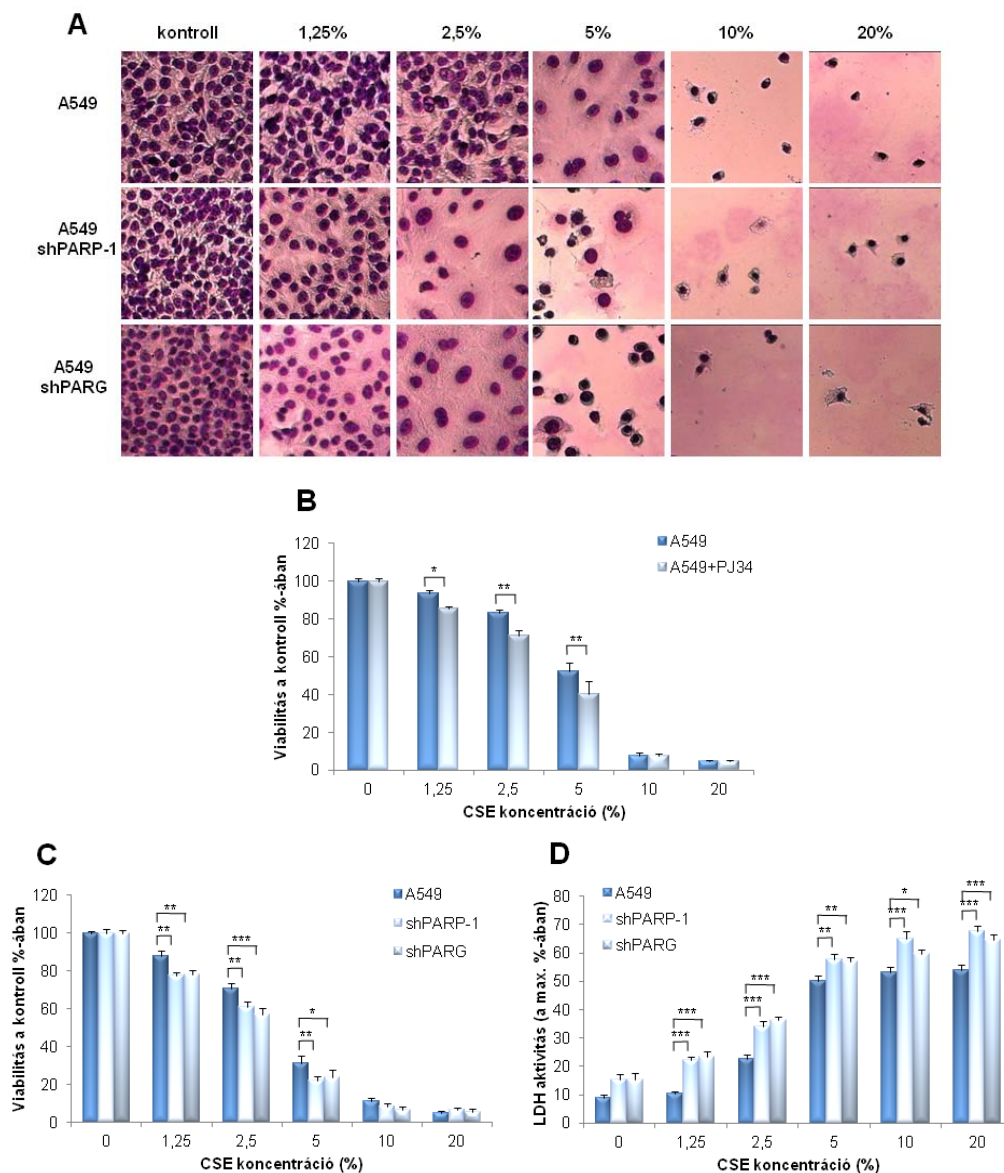
13. ábra PAR akkumuláció CSE kezelés hatására A549 sejtekben

(A) Kontroll A549, shPARP-1 illetve shPARG sejteket fedőlemezen növesztettünk, majd a megadott koncentrációjú cigarettafüst kivonattal kezeltük 30 percig. A PAR (zöld) jelenlétét specifikus antitesttel mutattuk ki, a magokat (kék) DAPI-val festettük. (B) Kontroll A549, shPARP-1 illetve shPARG sejteket 6 lyukú tenyésztőedényben növesztettünk, majd cigarettafüst kivonattal kezeltük 30 percig az ábrán jelölt koncentrációkban. A PAR akkumulációt Western blot segítségével mutattuk ki, endogén kontrollként β-aktint használtunk.

Az immunfestés és a Western blot eredményeiből levonható egyik fontos következtetés az, hogy a cigarettafüst kezelés a sejtekben aktiválja a PARP-1-et, ezáltal PAR képződést indukál, valamint hogy az A549 sejtekben megfelelően működik a PARG általi polimer lebontás.

6.1.3. PARP-1 és PARG csendesítés hatásának vizsgálata a CSE által indukált sejthalálban

Ezt követően az a kérdés vetődött fel, hogy a PARP-1 és a PARG szabályozza-e a CSE által kiváltott sejthalált. A CSE kezelés hatására bekövetkező morfológiai változásokat May-Grünwald-Giemsa festéssel vizsgáltuk.



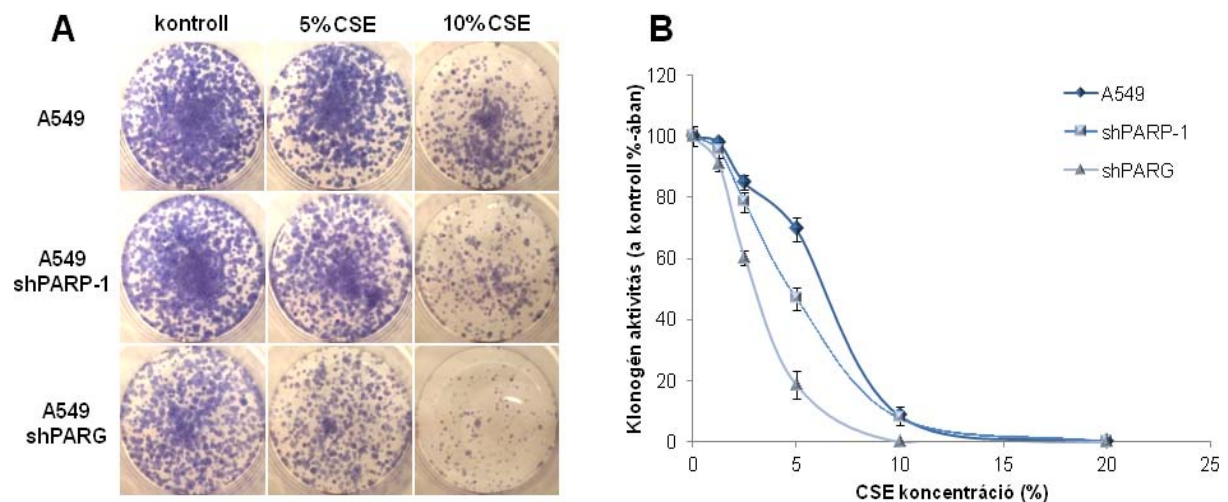
14. ábra PARP-1 és a PARG szerepe cigarettafüst kivonat által indukált sejthalálban

(A) Kontroll A549, shPARP-1 illetve shPARG sejteket a megadott koncentrációjú cigarettafüst kivonattal kezeltük 24 óráig. A morfológiai változásokat May-Grünwald-Giemsa festéssel mutattuk ki. (B) 10 μ M PJ34 előkezelést (30 perc) követően A549 sejteket 24 óráig

kezeltünk a megadott koncentrációjú cigarettafüst kivonattal. A viabilitás értékeket a kezeletlen kontroll %-ában adtuk meg. (C és D) Kontroll A549, shPARP-1 illetve shPARG sejteket 96 lyukú tenyésztőedényben növesztettünk, majd a megadott koncentrációjú cigarettafüst kivonattal kezeltük 24 óráig. A sejtek viabilitását MTT assay-vel (C), a sejtmembrán sérülését LDH assay (D) segítségével mértük. A grafikonokon 3 kísérlet átlaga \pm SE van feltüntetve. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

Alacsonyabb CSE koncentráció (5%) esetén az elsőként megfigyelhető morfológiai változás a sejtek megduzzadása és a citoplazma halvány festődése, ami a nekrozis vagy a nekroptózis egyik jellemzője. Nagy CSE koncentráció esetén (20%) a sejtek zöme felvált, a fedőlemezen letapadva maradók pedig kompakt morfológiát mutattak, de nem volt jele a sejtmag fragmentálódásának. Mindezen változások a PARP-1 és a PARG csendesítés esetén alacsonyabb CSE koncentrációnál mutatkoztak, azaz a csendesített sejtvonalak a kontroll sejtvonalhoz képest fokozott érzékenységet mutattak a kezelés során (14. ábra A).

Ezzel összhangban az életképesség mérés során is azt tapasztaltuk, hogy a PJ34 előkezelés, a PARP-1 és PARG csendesítés is fokozta a CSE sejtekre gyakorolt hatását. A felülúszóban mért LDH aktivitás szintén szignifikánsan magasabb volt mind az shPARP-1, mind az shPARG sejtvonalban, azaz nagyobb mértékben sérült a plazmamembrán integritása, fokozottabb mértékű a nekrozis (14. ábra B, C, D).



15. ábra CSE kivonat hatására A549 sejtek klonogén aktivitására, PARP-1 és PARG befolyásoló szerepe

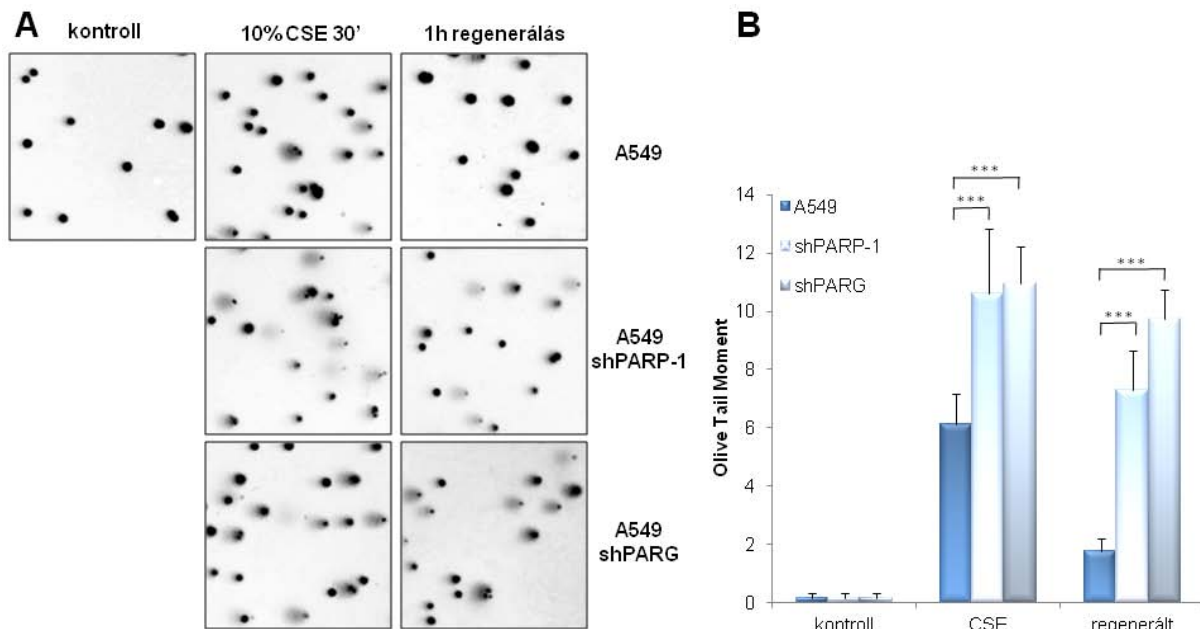
30 percig kezeltük a sejteket a megadott koncentrációjú cigarettafüst kivonattal, majd sejttenyésztő médiumban 6 lyukú tenyésztőedényben tenyésztettük 10 napig. (A) A sejteket hematoxilinnal festettük, (B) a képződő kolóniák megszámlálása után a klonogén aktivitást a kontroll százalékában adtuk meg (három párhuzamos átlaga \pm SD).

Következő lépésben azt kívántuk megvizsgálni, hogy a sejthalál fentebb leírt morfológiai és biokémiai jellemzői mellett a sejtek hosszú távú proliferációs kapacitása is

csökken-e. A klonogén assay eredményei szerint a CSE kezelés csökkentette a sejtek proliferációs képességét, és ez tovább csökkent a PARP-1 és a PARG csendesítéssel. Azt tapasztaltuk, hogy a PARG hiánya esetén nagyobb mértékű az érzékenyítő hatás (15. ábra).

6.1.4. A PARP-1 és a PARG szerepe a CSE által kiváltott DNS károsodás javításában

A PARP-1 szerepe az egyszálú DNS törések javításában betöltött központi szerepének ismeretében kézenfekvőnek tűnt azt feltételezni, hogy a PARP-1 és a PARG csendesítés érzékenyítő hatása a sejthalálban és a proliferáció gátlásában a DNS hibajavítás csökkent hatékonysága miatt tapasztalható. Hipotézisünket alkalikus comet assay segítségével igazoltuk. A CSE kezelés hatására keletkező DNS törések hatékonyan és viszonylag gyorsan javítottak a kontroll A549 sejtvonalban, míg a PARP-1 és a PARG csendesített sejtekben a javítás hatékonysága szignifikánsan csökkent (16. ábra).

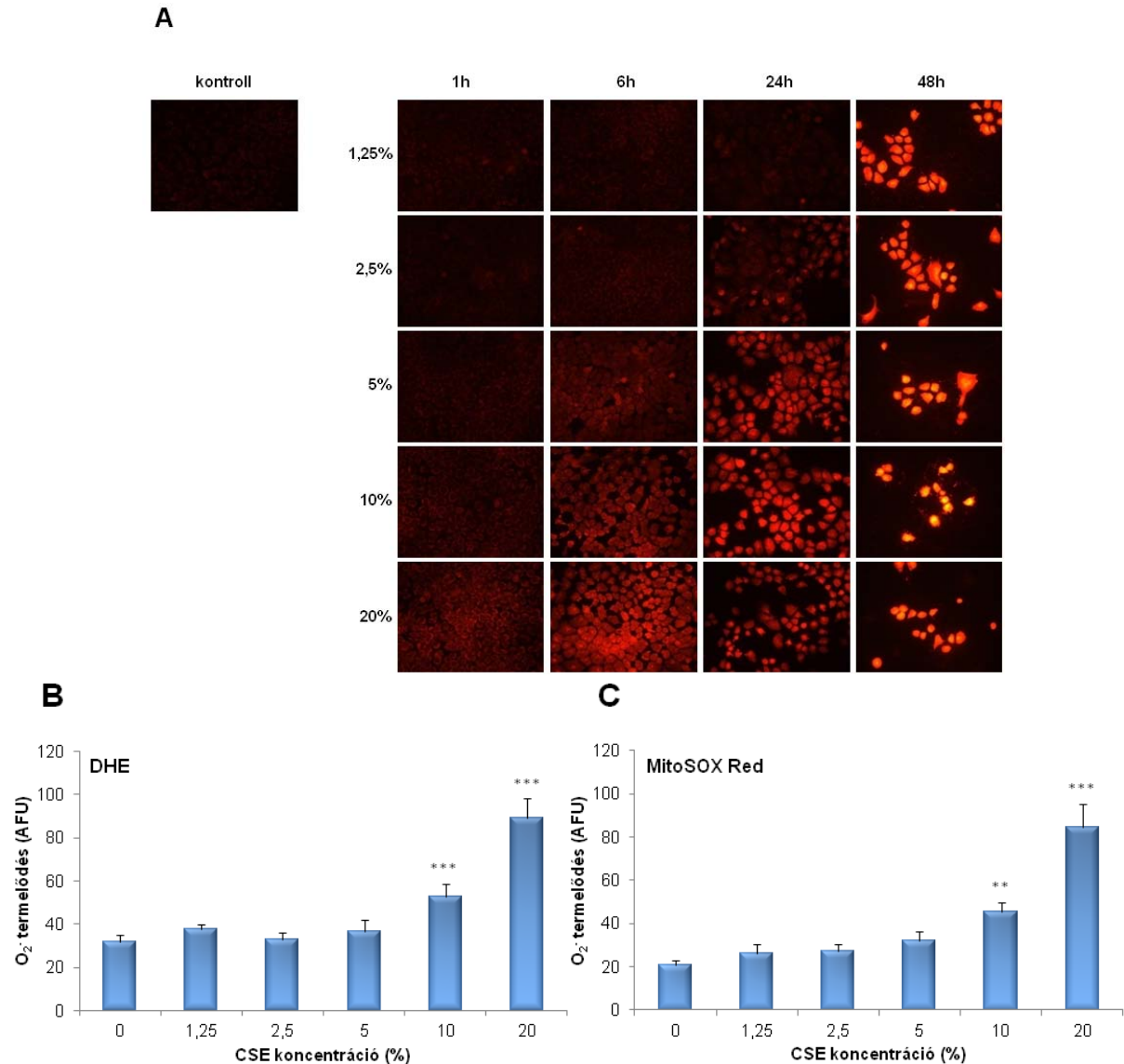


16. ábra PARP-1 és PARG szerepe a CSE által kiváltott DNS törésben és annak javításában A549 sejteket 30 percig kezeltünk 10% CSE kivonattal, majd 1 órán keresztül regenerálódta sejtenyésző médiumban. Az egyszálú DNS töréseket alkalikus Comet assay segítségével detektáltuk. (A) Mikroszkópos felvételek a sérült DNS-ről etidium-bromiddal történő festést követően. (B) A DNS törés kvantitatív kiértékelése (150 sejt átlaga \pm SD). *** $P < 0,001$.

6.1.5. CSE kezelés hatására intracellulárisan képződő ROS mérése

Felvetődött a kérdés, hogy a füst kivonat mely komponense indukál PARP képződést. A füst kivonat számos reaktív gyököt és nem gyök természetű alkotót tartalmaz, melyek DNS törést és PARP aktivációt okozhatnak. Ezen felül a CSE károsító hatására adott sejtválasz folyamán, intracellulárisan is képződhetnek reaktív oxigén gyökök. A sejtekben termelődő szuperoxidot szuperoxid-érzékeny fluoreszcens festékekkel, dihidroetidiummal illetve

MitoSOX Red-del detektáltuk. A mérések szerint a CSE-vel kezelt sejtekben idő-és koncentrációfüggő módon nőtt az intracellulárisan termelődő szuperoxid mennyisége (17. ábra). A MitoSOX Red vitális festésre is alkalmas, így mikroszkópos technikával is tudtuk igazolni a szuperoxid termelődést.



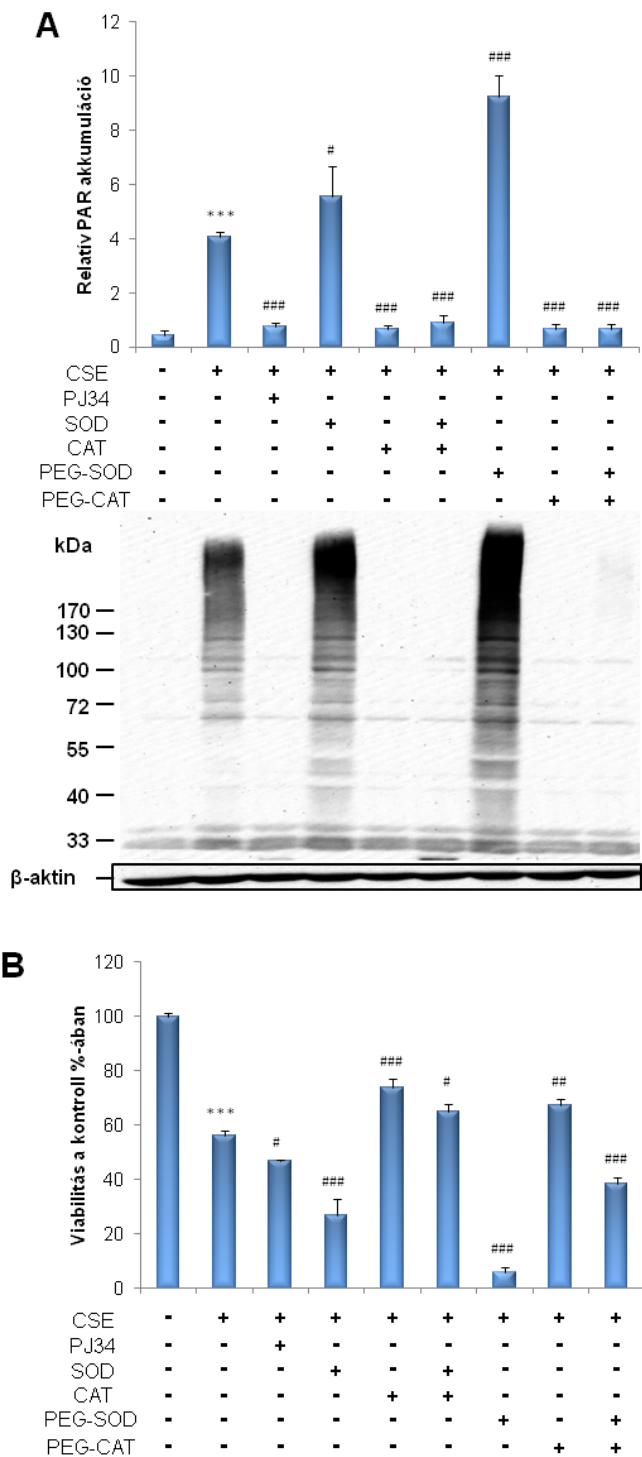
17. ábra Intracelluláris szuperoxid termelődés A549 sejtekben CSE kezelés hatására

(A) A sejtekben termelődő szuperoxid kimutatása fluoreszcens mikroszkópiával. A sejteket fedőlemezen növesztettük, majd az ábrán megadott koncentrációjú CSE kivonattal kezeltük 1, 6, 24 és 48 óráig. A sejtekben termelődő szuperoxid oxidáló hatására a MitoSOX Red mitokondriális szuperoxid indikátor vörös fényt emittál. (B és C) Az A549 sejteket 96 lyukú tenyésztőedényben növesztettük 2×10^4 sejt/lyuk sejtszámban, majd 6 óráig kezeltük a megadott koncentrációjú cigarettafüst kivonattal. A sejtek mosása után két fluoreszcens próbával mértük a termelődő szuperoxid mennyiségét: (B) dihidroetidiummal és (C) MitoSOX Red-del. Három független kísérlet átlaga \pm SE értékek szerepelnek a grafikonon. ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

A festékek hozzáadása előtt a sejtekről eltávolítottuk a CSE-t, így a festékek oxidációját és a fluoreszcens jelet teljes mértékben a sejtekben, valószínűleg mitokondriálisan termelődő szuperoxid váltotta ki, nem pedig a füstkivonatban jelen lévő szuperoxid.

6.1.6. Szuperoxid és hidrogén-peroxid szerepének vizsgálata a CSE által kiváltott PARP aktivációban és sejthalálban

A füstkivonatban jelen lévő, illetve a sejtek által termelt ROS vegyületek közül valószínűleg a hidrogén-peroxidnak van központi szerepe a DNS törésben és a PARP-1 aktiválásában. Western blot analízissel kimutattuk, hogy a CSE által indukált PAR akkumulációt jelentős mértékben fokozta a szuperoxid dizmutáz, még kifejezettebb mértékben a sejtpermeábilis (PEG-gel konjugált) SOD. A kataláz jelenléte - akár natív, akár PEG-gel konjugált formában - viszont visszaszorította a PAR szintézist. A kataláz SOD jelenlétében is hatékonyan védett, és gátolta a SOD által okozott fokozott PAR szintézist (18. ábra A). A szuperoxid-dizmutáz jelenlétében tapasztalható PARP-1 aktivációt tehát a hidrogén-peroxid képződése okozza. Az életképességi vizsgálatok hasonló eredményt mutattak. A PARP inhibitor PJ34 és a SOD (különösen a PEG-gel konjugált forma) érzékenyítette a sejteket a CSE kezelés során, jelenlétükben szignifikánsan csökkent a sejtek viabilitása. Ezzel szemben a kataláz jelenléte védelmet nyújtott a CSE toxikus hatásával szemben (18. ábra B).



18. ábra Szuperoxid és hidrogén-peroxid szerepe a füst kivonat által indukált PARP aktivációban és a CSE toxicitásban

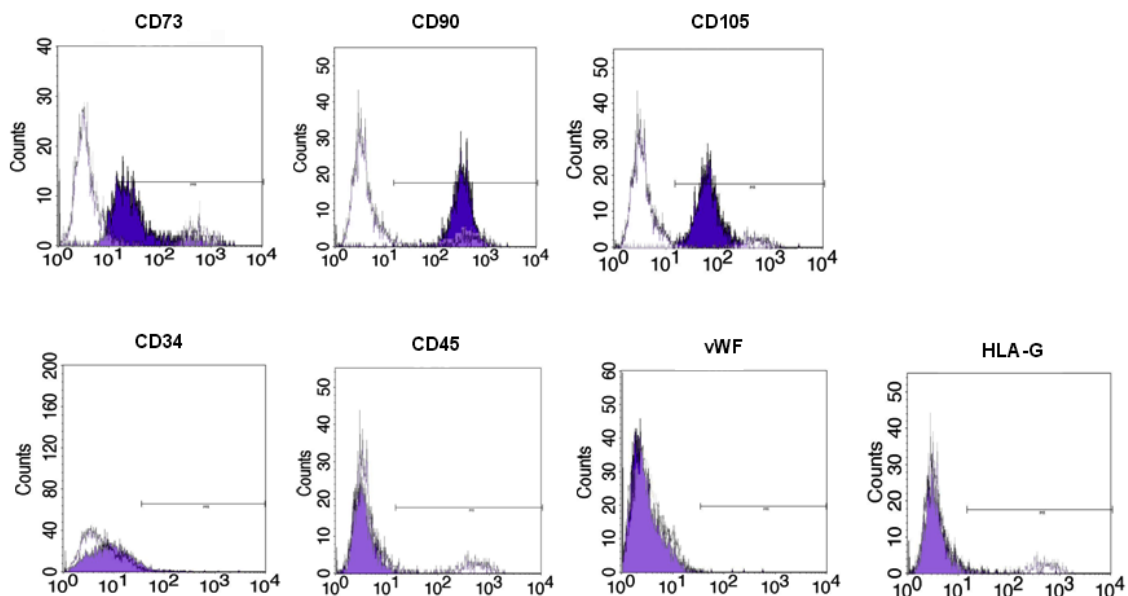
(A) shPARG A549 sejteket 6 lyukű tenyésztőedényben növesztettünk, 30 percig előkezeltek PJ34-gyel (10 μ M), SOD-dal (2 kU/ml), katalázzal (2 kU/ml), SOD és kataláz kombinációjával, PEG-SOD-dal (50 U/ml), PEG-katalázzal (1 kU/ml), illetve PEG-SOD és PEG-kataláz kombinációjával. Majd a sejteket 30 percig kezeltük 20% cigarettafüst kivonattal, és a PAR akkumulációt Western blot eljárással detektáltuk. Az ábra egy reprezentatív képet mutat be, a sávok intenzitását denzitometrállással kvantifikáltuk, a β -aktinra normalizált értékeket (három független kísérlet átlaga \pm SE) tüntettük fel a grafikonon. (B) Az A549 sejtek életképességét az (A) részben leírt előkezelések és 24 óras

időtartamú CSE (10%) kezelést követően mértük. Három független kísérlet átlaga \pm SE értékek szerepelnek a grafikonon. A kontroll sejtekkel összehasonlítva a CSE kezelés önmagában szignifikánsan csökkentette az életképességet (** $P < 0,001$). A PARP gátlószerekkel és a gyökfogókkal előkezelt sejtek életképességét a CSE kezeléssel hasonlítottuk össze (# $P < 0,05$; ## $P < 0,01$; ### $P < 0,001$).

6.2. Hidrogén-peroxid által indukált poli-ADP-riboziláció szabályozó szerepe az osteogén differenciáció során bekövetkező sejthalálban

6.2.1. Chorionális mesenchymalis őssejtek (cMSC) fenotipizálása és funkcionális jellemzése

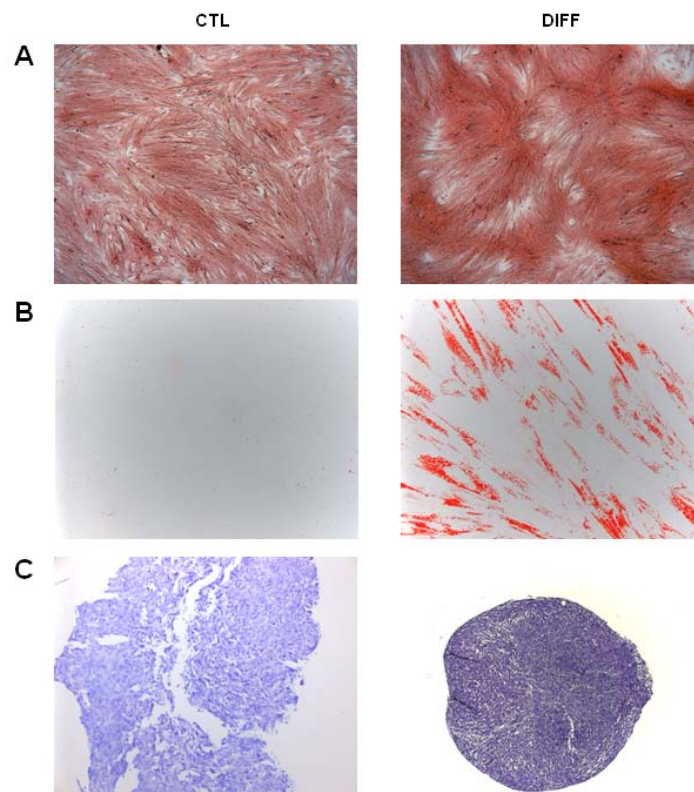
A placentából izolált sejtek fenotipizálását az ISCT (International Society for Cellular Therapy) ajánlása alapján végeztük. A mesenchymalis őssejtekre jellemző sejt felszíni antigén mintázatot FACS analízis segítségével határoztuk meg. Az izolált cMSC sejtek nem hordoztak felszínükön vércépző ősz- és elődsejtekre jellemző felszíni markert, endothel felszíni markert és trophoblaszt markert (CD45-, CD34-, vWF- és HLA-G-negatívak). Felszínükön jelen van viszont a CD73, CD90 és CD105. A cMSC sejtek felszíni markereinek vizsgálatát a 19. ábra mutatja be.



19. ábra cMSC sejtek felszíni antigén mintázatának meghatározása áramlási citometriával

A mesenchymalis őssejtekre jellemző sejt felszíni antigének vizsgálatát FACS analízis segítségével végeztük. Az általunk vizsgált felszíni antigének: CD34, CD45, CD73, CD90, CD105, vWF, HLA-G. A fluoreszcencia intenzitást BD FACS Calibur áramlási citométeren mértük FL2 csatornán, az adatokat BD Multiset software segítségével értékeltük.

A cMSC sejtek osteogén irányú differenciációs képességét az extracelluláris kalcium depozíciót kimutató Alizarin Red S festéssel ellenőriztük. A sejteket 21 napig inkubáltuk osteogén differenciáló médiumban, melyben már 7 nap után detektálható az extracelluláris kalcium kiválasztás (20. ábra A). Az adipogén irányú differenciációt Oil Red O festéssel vizsgáltuk. A 21 napig tartó differenciáció alatt a sejtek a harmadik naptól kezdve egyre nagyobb mennyiségben lipidcseppeket halmoztak fel a citoplazmában (20. ábra B). A porc irányú differenciációt speciális V aljú tenyésztőedényekben, differenciáló médium jelenlétében végeztük. A sejtek már a differenciáció első napján gömb alakú struktúrát alakítottak ki. A differenciáció ellenőrzésére a porc gömbökből készített metszeteken DMMB festéssel mutattuk ki a chondrogenézis során szintetizálódott szulfatált glükózaminoglikánokat (20. ábra C).

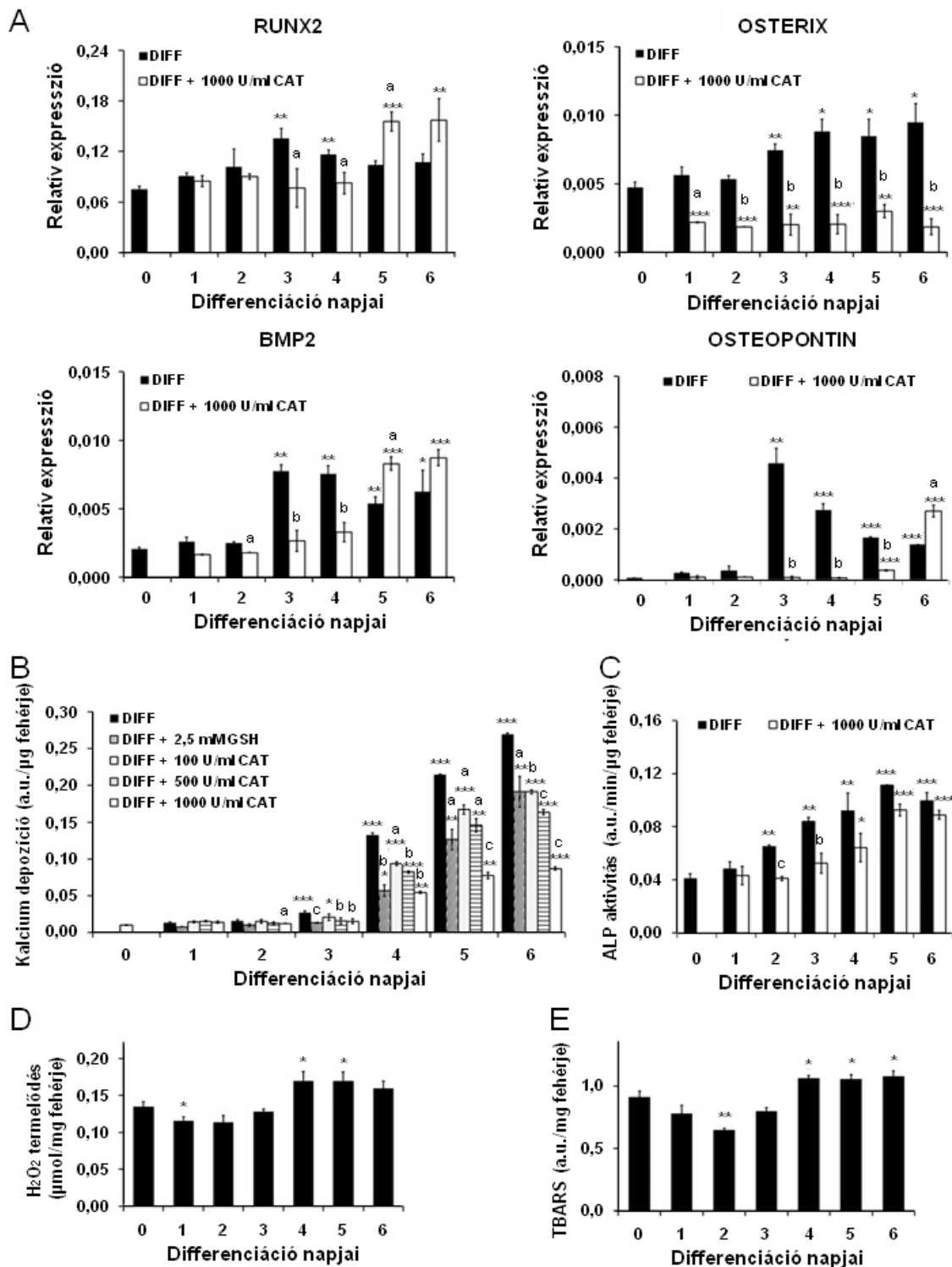


20. ábra cMSC sejtek differenciációs képességének ellenőrzése

(A) cMSC sejteket osteogén indukciós médiumban inkubáltunk, majd az extracelluláris kalcium depozíciót Alizarin Red S festéssel detektáltuk. (B) A sejtek az adipogén differenciáció során citoplazmatikus lipidcseppek felhalmozódása figyelhető meg, a lipidek kimutatására Oil Red O festést használtunk. (C) A chondrogén differenciáció során a sejtek háromdimenziós, gömb alakú struktúrába tömörülnek, az extracelluláris mátrixban felhalmozott szulfatált glükózaminoglikánokat a gömbökből készített metszeteken DMMB festéssel tettük láthatóvá. A C panel bal oldali részén a differenciáció első napján készült metszet látható.

6.2.2. Reaktív oxigén vegyületek (ROS) keletkezése szükséges a SAOS-2 sejtek csontirányú differenciációjához

A SAOS-2 sejtek a differenciáló médium hatására osteogén irányba differenciálódtak, melyet igazol az osteogén differenciációban szerepet játszó gének (Runx2, osterix, BMP2, osteopontin) expressziós szintjének emelkedése (21. ábra A), a Ca^{2+} felhalmozódás az extracelluláris mátrixban (19. ábra B), valamint az alkalikus foszfatáz aktivitásának emelkedése (21. ábra C). Az osteogén differenciációnak egyik érdekes velejárója volt a sejtek redox egyensúlyának változása. A differenciáció első két napján a sejtekben termelődő hidrogén-peroxid mennyisége kis mértékben, de szignifikánsan csökkent, a differenciáció későbbi időszakában pedig emelkedett (21. ábra D). Hasonló tendenciát figyelhettünk meg a lipidperoxidáció mértékének változása során is (21. ábra E). A gyökfogók jelenlétében végzett kísérletek azt mutatják, hogy ezen redox egyensúlybeli változásoknak funkcionális jelentőségük van a differenciáció során, és szabályozzák a differenciációt. Redukált glutation vagy kataláz jelenléte szignifikánsan csökkentette az extracelluláris Ca^{2+} mennyiségét (21. ábra B). A kataláz koncentrációfüggő módon gátolta a differenciációt, mind az extracelluláris kalcium depozíció, mind az alkalikus foszfatáz aktivitását jelentős mértékben csökkentette (21. ábra C). Ezen kívül a csontirányú differenciációban szereplő marker gének expresszióját is csökkentette vagy késleltette az expresszió növekedését (21. ábra A).



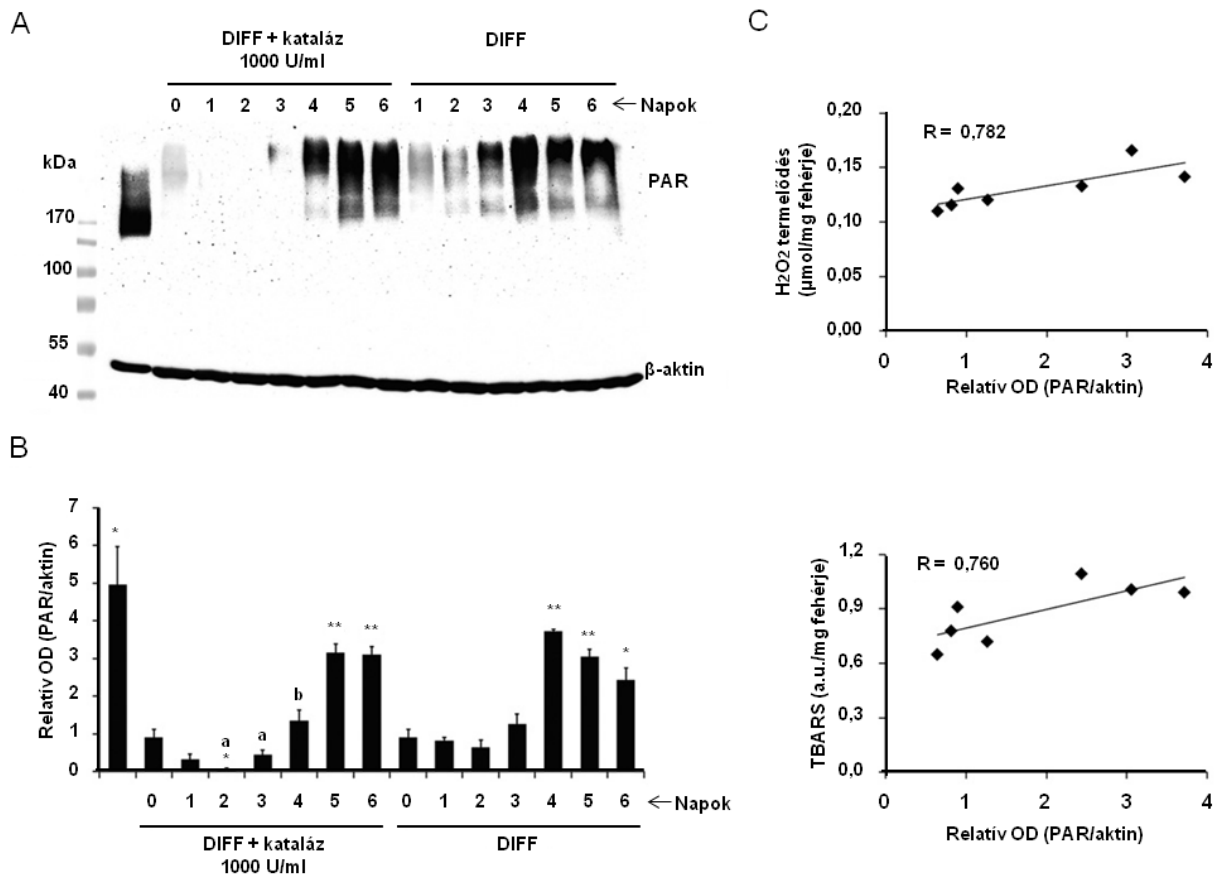
21. ábra A csontirányú differenciáció redox szabályozása SAOS-2 sejtekben

(A-C) SAOS-2 sejteket differenciációs médiumban inkubáltuk és vizsgáltuk a kataláz (1000 U/ml CAT) hatását a differenciáció mértékére. (A) SAOS-2 sejteket 4 cm Ø tenyésztőedényekben növesztettük, a konfluens sejteket differenciáló médiumban inkubáltuk 6 napig. A csontirányú differenciáció markergénjeinek (Runx2, BMP2, osteopontin, osterix) expresszióját real-time PCR segítségével határozzuk meg, a grafikonok a GAPDH-ra normalizált értékeket mutatják be. (B) Az extracelluláris kalcium depozíció mértékét Alizarin Red S festéssel határoztuk meg. (C) Alkalikus foszfatáz (ALP) aktivitásának fluorimetriás meghatározása. (D) A differenciáció során termelődött hidrogén-peroxid mérése Amplex Red

próbával. (E) Lipidperoxidáció mértékének spektrofotometriás meghatározása TBARS assay segítségével. Három független kísérlet átlaga \pm SE értékek szerepelnek a grafikonokon. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ szignifikáns különbséget jelöl a nulladik napi mintákhoz viszonyítva; ^a $P < 0,05$; ^b $P < 0,01$; ^c $P < 0,001$ szignifikáns különbséget jelöl az adott napi differenciált mintákhoz (DIFF) viszonyítva.

6.2.3. Az osteogén differenciáció során a PAR akkumuláció korrelációt mutat a ROS képződéssel

A reaktív oxigén intermedierek DNS károsító hatásuk révén aktiválhatják a PARP-1 enzimet. A PAR polimer akkumulációját Western blottal mutattuk ki a differenciáció során. A PAR szintje a differenciáció első két napján csökkent, ezt követően emelkedést mutatott (22. ábra A és B).



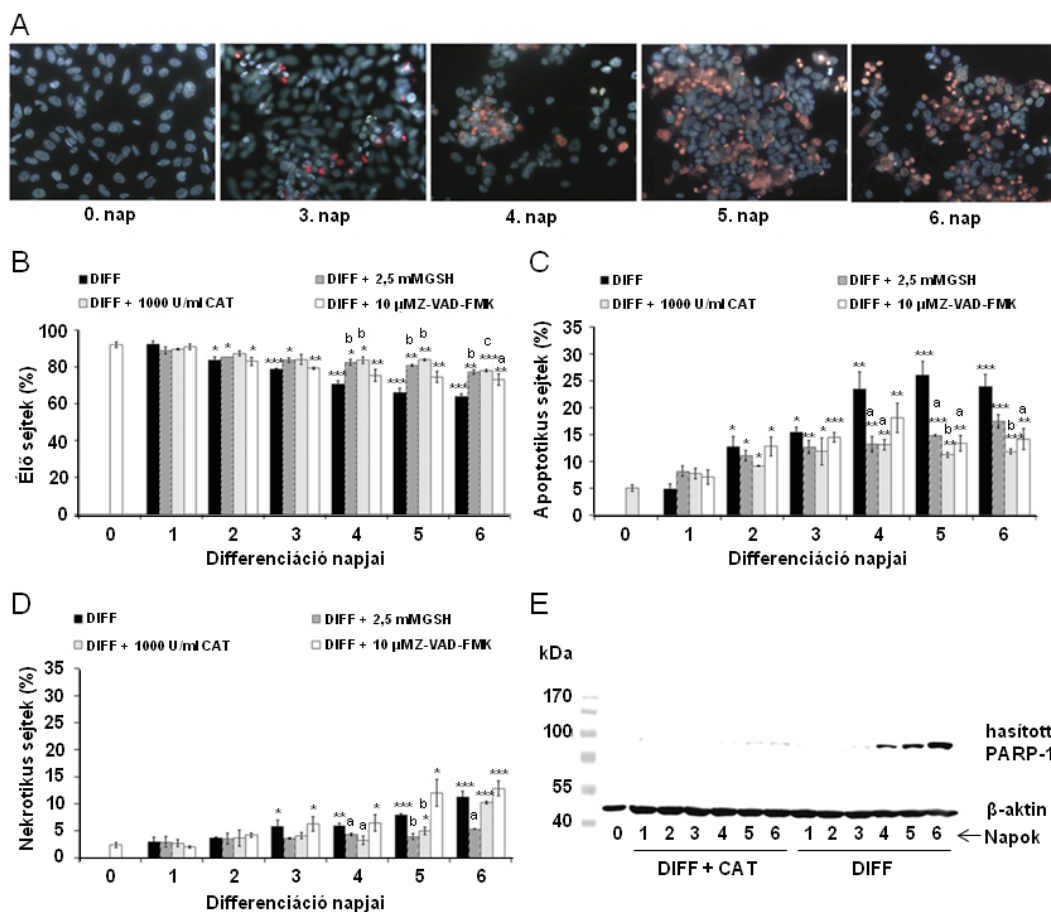
22. ábra SAOS-2 sejtek csontirányú differenciációja termelődő hidrogén-peroxid poli(ADP-ribóz) szintézist indukál

(A és B) SAOS-2 sejteket 4 cm \varnothing tenyészedényekben növesztettük, a konfluens sejteket differenciáló médiumban inkubáltuk 6 napig. A PAR akkumulációt Western blot segítségével detektáltuk (A). A sávok intenzitását denzitometrállással kvantifikáltuk, a -aktinra normalizált értékeket (három független kísérlet átlaga \pm SE) tüntettünk fel a grafikonon (B). * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ szignifikáns különbséget jelöl a nulladik napi mintákhoz viszonyítva; ^a $P < 0,05$; ^b $P < 0,01$ szignifikáns különbséget jelöl az adott napi differenciált mintákhoz (DIFF) viszonyítva. (C) Lineáris regressziós elemzés alapján mutatott korreláció a poli(ADP-ribóz) mennyisége és a hidrogén-peroxid termelődés és a TBARS értékek között.

A PAR szint változásának tendenciája hasonló volt a hidrogén-peroxid termelésben megfigyelt változásokhoz, ami ok-okozati összefüggésre utalhat. A lineáris regressziós analízis alapján korreláció mutatható ki a PAR és a hidrogén-peroxid termelés (R=0,78), valamint a PAR és a TBARS értékek (R=0,76) között (22. ábra C). Kataláz jelenlétében a PAR szint emelkedése időben eltolódott, a differenciáció során csak később volt kimutatható nagyobb mennyiségben (22. ábra A és B).

6.2.4. A differenciáció során keletkező hidrogén-peroxidnak szerepe van a sejthalálban

A differenciáció során jelentős mértékű sejtpusztulás figyelhető meg, mely a differenciáció második napján kezdődik és mértéke fokozatosan nő a differenciáció hatodik napjáig (23. ábra). Hoechst/propidium-jodid festéssel kromatin kondenzáció, Annexin V/propidium-jodid festéssel foszfatidil-szerin externalizáció mutatható ki, mely alapján a sejthalál formája leginkább apoptózis. Az apoptotikus sejtek mellett a propidium-jodid felvételt mutató nekrotikus sejtek száma is jelentős mértékben nőtt a differenciáció előrehaladtával (23. ábra A-D). Apoptózis során a PARP-1-et a kaszpáz-3 vagy -7 hasítja, a hasított PARP megjelenését is detektálni tudtuk Western blottal (23. ábra E). Az általános kaszpázgátló (z-VAD-fmk) csak részben csökkentette a sejthalál mértékét, jelenlétében a sejthalál formája inkább a nekrozis felé tolódott el (23. ábra B-D). A redukált glutation és a kataláz szignifikánsan növelte a sejtek életképességét a differenciáció során, csökkentették mind az apoptózis, mind a nekrozis mértékét (23. ábra B-D), kataláz jelenlétében pedig minimális mennyiségű hasított PARP volt csak detektálható (23. ábra E).

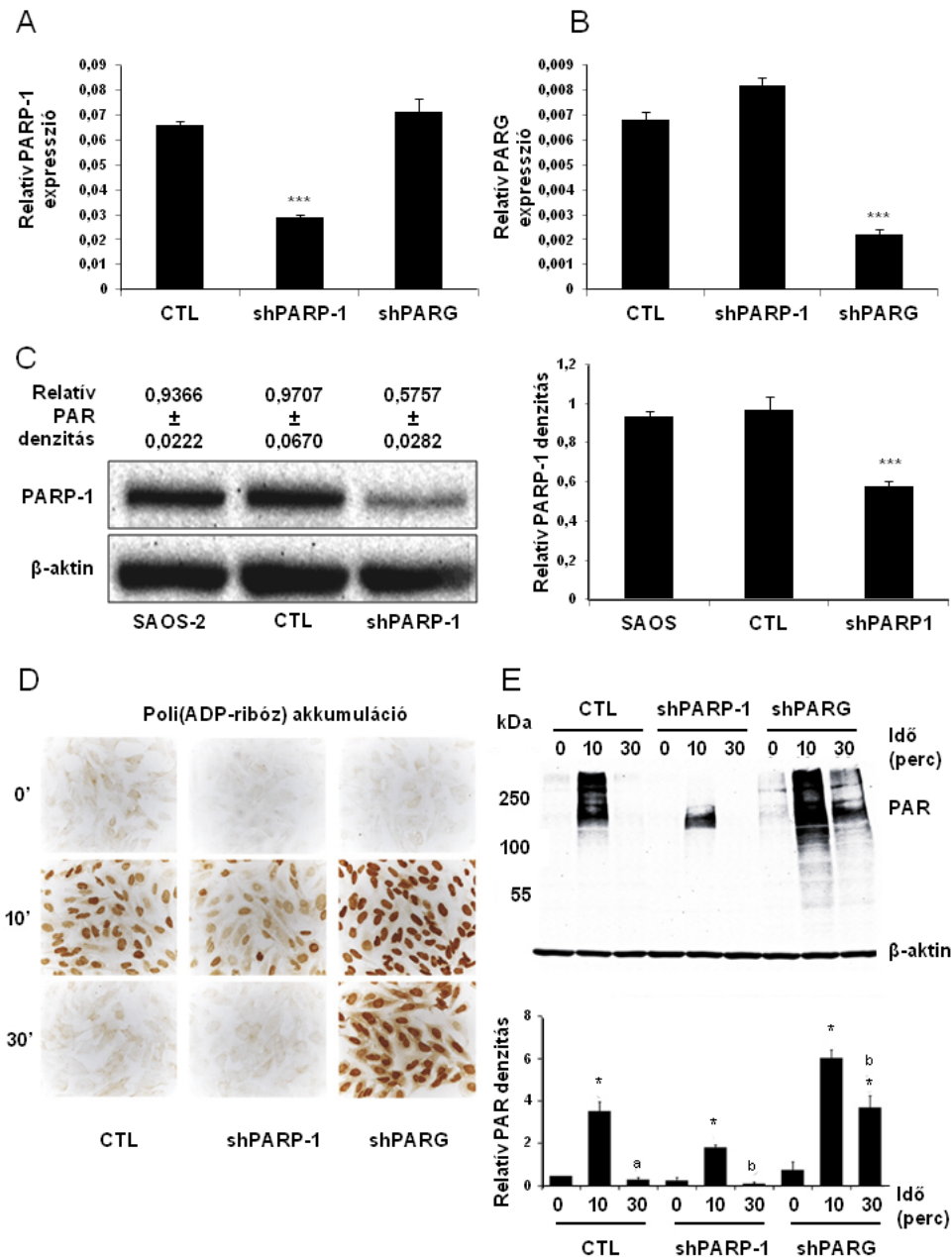


23. ábra A SAOS-2 sejtekben apoptózis és nekrozis indukálódik a differenciáció során (A) Sejthalál detektálása differenciálódó SAOS-2 sejtekben Hoechst 33342/propidium-jodid festéssel. (B-D) Annexin V/propidium-jodid detektálása áramlási citometriával, a sejthalál jellemzése differenciálódó sejtekben kataláz, redukált glutation és z-VAD-fmk jelenlétében. Az Annexin V és propidium-jodid negativitást mutató sejteket tekintettük élő sejteknek (B), az Annexin V pozitivitást mutató (propidium-jodid pozitív vagy negatív) sejteket tekintettük apoptotikus sejteknek (C) és a propidium-jodid felvételt mutató Annexin V negatív sejteket tekintettük nekrotikus sejteknek (D). Három független kísérlet átlaga \pm SE értékek szerepelnek a grafikonokon. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ szignifikáns különbséget jelöl a nulladik napi mintákhoz viszonyítva; ^a $P < 0,05$; ^b $P < 0,01$; ^c $P < 0,001$ szignifikáns különbséget jelöl az adott napi differenciált mintákhoz (DIFF) viszonyítva.

6.2.5. A PARP-1 és a PARG stabil csendesítése SAOS-2 sejtekben

Eddigi megfigyelésünk alapján a hidrogén-peroxid termelésnek és a redox egyensúlynak fontos szerepe van az osteogén differenciációban. Ismert továbbá, hogy a PARP-1 enzim és a PARiláció központi szerepet játszik különböző sejthalál folyamatokban. Így feltételezhető, hogy a PARP-1 enzimnek szabályozó szerepe lehet a differenciáció során bekövetkező sejthalálban. Ennek vizsgálatára a PARP-1 és PARG enzimeket stabilan csendesítettük SAOS-2 sejtvonalonban. Az így létrehozott shPARP-1, shPARG valamint kontroll (CTL, csendesítő szekvenciát nem hordozó) sejtvonalakban a PARP-1 illetve a

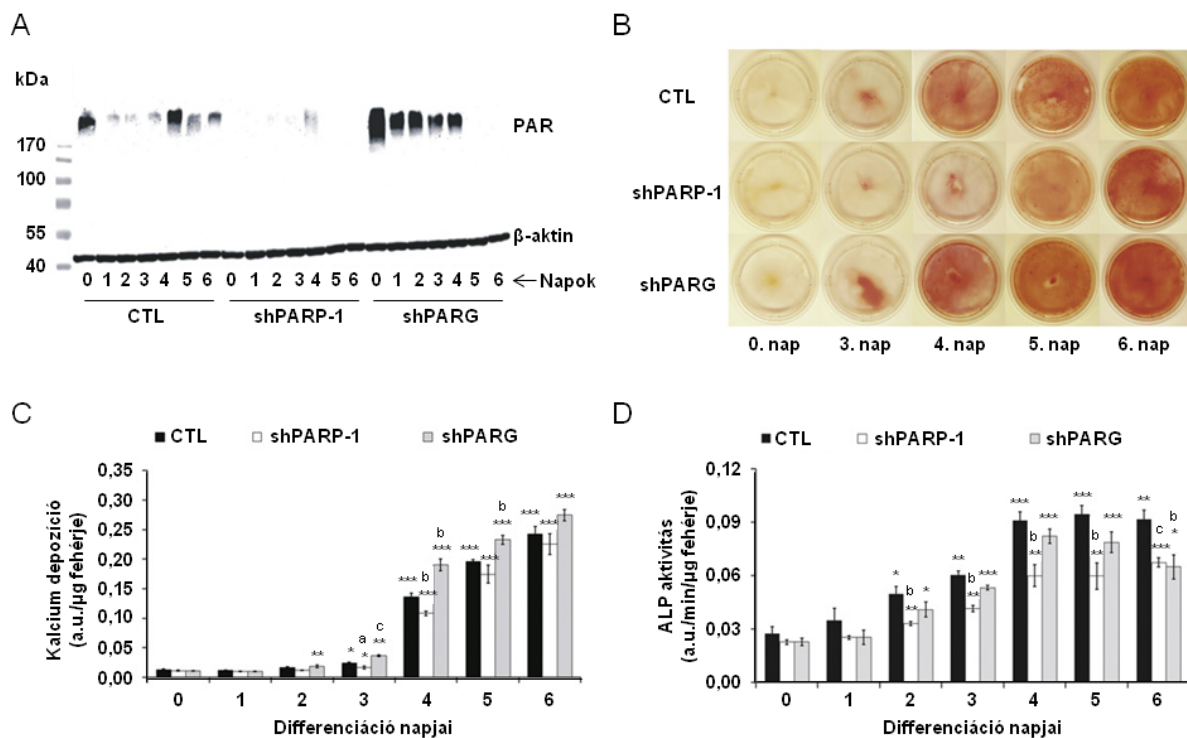
PARG mRNS szintjét real-time PCR módszerrel határoztuk meg. A kontroll (CTL) sejtekben a PARP-1 és a PARG expressziója nem különbözött a SAOS-2 sejtvonalonban mért értékektől. A PARP-1 mRNS mennyisége az shPARP-1 sejtvonalonban a kontroll sejtek értékéhez viszonyítva a felére csökkent (24. ábra A). A csendesítés hatékonyságának növelésére tett próbálkozásaink során a sejtek életképessége drasztikusan csökkent, a PARP-1 enzim jelenléte SAOS-2 sejtekben nélkülözhetetlen az életképességhez. A PARG csendesítés esetén nagyobb hatékonyságot sikerült elérnünk, a sejtek proliferációs képességének megtartása mellett (24. ábra B panel). Más közlésekkel összhangban (Erdélyi et al., 2009) a PARG mRNS szintje kismértékben megemelkedett a PARP-1 csendesített sejtekben a kontroll sejtvonálhoz képest, ez mutatja, hogy a két enzim befolyásolja egymás expresszióját. A PARP-1 csendesítés hatékonyságát Western blottal is ellenőriztük (24. ábra C). A sejtek funkcionális jellemzéséhez 10 perc hidrogén-peroxid kezelést, majd 30 perc regenerációt követően PAR akkumulációt detektáltunk immuncitokémiával (24. ábra D) és Western blot technikával (24. ábra E). A PARP-1 csendesített sejtekben hidrogén-peroxid kezelés hatására szignifikánsan kevesebb PAR detektálható immunfestéssel és Western blottal is. A PARG csendesített sejtekben a polimerek lebontása szenved zavart, 30 perc után is jelentős mennyiségű polimer detektálható.



24. ábra PARP-1 illetve PARG csendesített SAOS-2 sejtvonalak létrehozása és jellemzése
SAOS-2 sejtekben lentivirális rendszerrel stabilan csendesítettük a PARP-1 és a PARG enzimet. Az így létrehozott shPARP-1 illetve shPARG sejtvonalakban qPCR segítségével meghatároztuk a PARP-1 és a PARG mRNS szintjét (A és B), Western blot módszerrel a PARP-1 fehérjeszintjét (C). A sejtek funkcionális jellemzéséhez 10 perc hidrogén-peroxid kezelést, majd 30 perc regenerációt követően PAR akkumulációt detektáltunk immuncitokémia (D) és Western blot technikával (E). * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$ szignifikáns különbséget jelöl a kezeltlen mintákhoz viszonyítva; ^a $P < 0,05$; ^b $P < 0,01$; szignifikáns különbséget jelöl a 10 perces hidrogén-peroxid kezelést kapott mintákhoz viszonyítva.

6.2.6. A PARP-1 és a PARG szabályozza a SAOS-2 sejtek csontirányú differenciációját

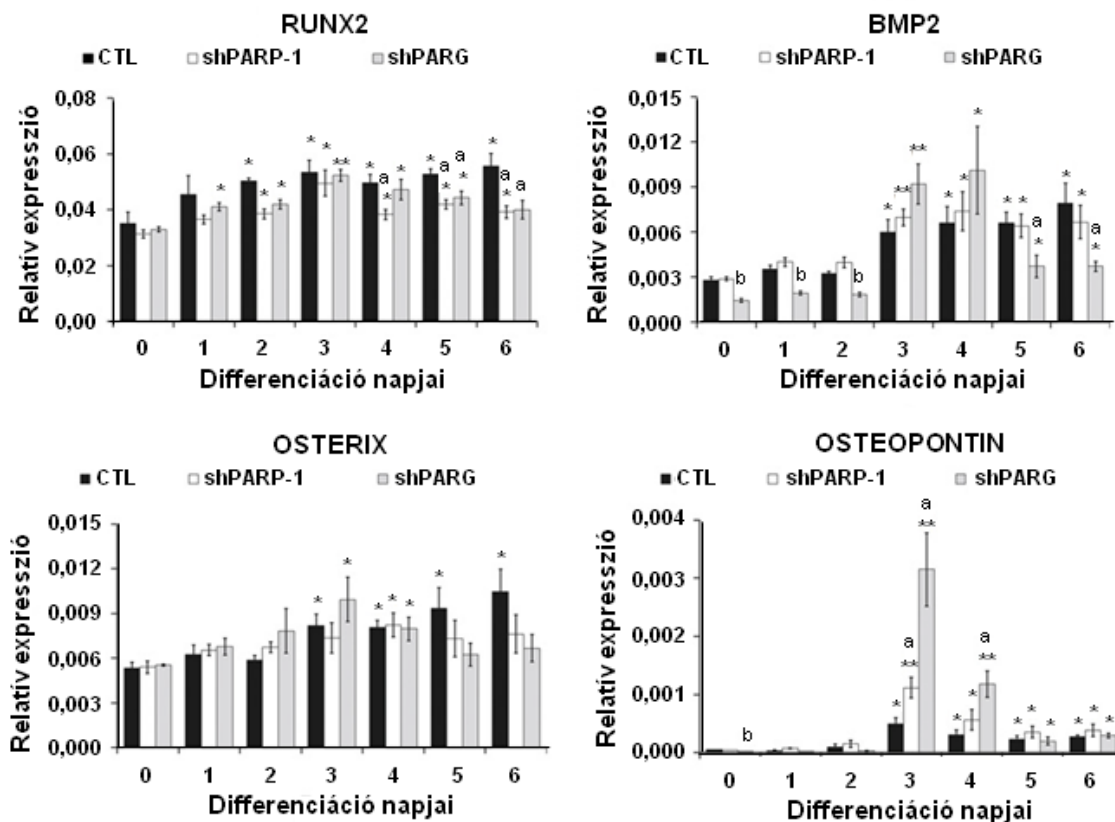
A PARP-1 és a PARG csendesítés hatására módosult a PAR akkumuláció mintázata a SAOS-2 sejtek csontirányú differenciációja során (25. ábra A). Mindhárom sejtvonalba megfigyelhető volt az extracelluláris kalcium depozíció, az ALP aktivitás fokozódása, de a változások különböző mértékben és más kinetikával zajlottak le (25. ábra B-D). A kontroll sejtvonálhoz képest a PARP-1 csendesített sejtekben később indul meg a mineralizáció, kisebb a kalcium depozíció mértéke (25. ábra B és C). Az ALP aktivitás mindkét csendesített vonalban kisebb, mint a kontroll sejtvonalban mért értékek (25. ábra D).



25. ábra PARP-1 és PARG csendesítés hatása SAOS-2 sejtek osteogén differenciációjára CTL, shPARP-1 és shPARG SAOS sejtekben osteogén differenciációt indukáltunk. (A) Western blot technikával mutattuk ki a poli(ADP-ribóz) polimer szintjének változását a differenciáció során. (B) Extracelluláris kalcium depozíció kimutatása Alizarin Red S festéssel. (C) A kalcium depozíció kvantitatív meghatározása Alizarin Red S cetylpiridinium-kloriddal történő visszaoldásával. (D) Alkalikus foszfatáz (ALP) aktivitás mérése a differenciáció során. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ szignifikáns különbséget jelöl a nulladik napi mintákhoz viszonyítva; ^a $P < 0,05$; ^b $P < 0,01$; ^c $P < 0,001$ szignifikáns különbséget jelöl a kontroll sejtekhez (CTL) viszonyítva.

A PARP-1 és a PARG csendesítés az osteogén differenciáció markergénjeinek expresszióját is befolyásolta. A szabályozó szerepet betöltő Runx2 és az osterix mRNS szintje a csendesített vonalakban nem mutatott jelentős eltérést a kontroll sejtvonálhoz képest. A

BMP2 és az osteopontin esetén ennek az ellenkezőjét tapasztaltuk, a PARP-1 és a PARG csendesített sejtekben is nőtt az expressziójuk (26. ábra).



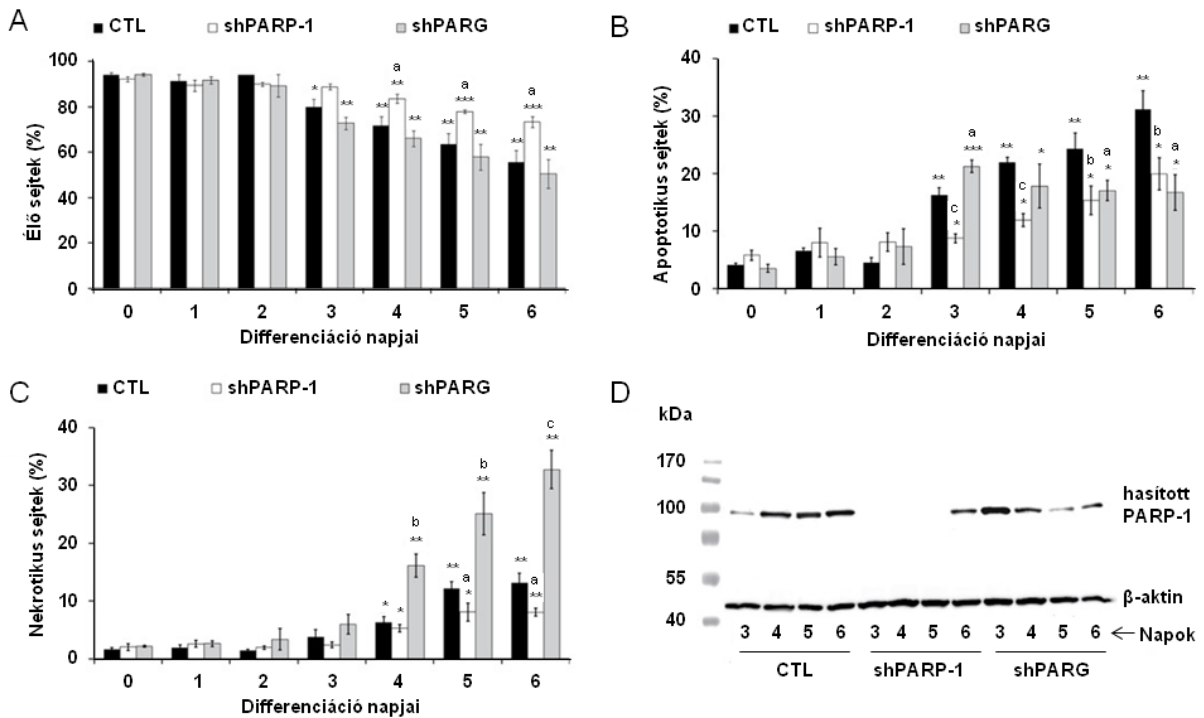
26. ábra Az osteogén differenciáció markergénjeinek expressziója PARP-1 és PARG csendesített SAOS-2 sejtekben

A sejteket 6 napig differenciáló médiumban inkubáltuk. Az osteogén differenciáció markergénjeinek (Runx2, osterix, osteopontin, BMP2) mRNS szintjét qPCR technikával határoztuk meg, endogén kontrollként GAPDH-t használtunk. $P < 0,05$; $**P < 0,01$; szignifikáns különbséget jelöl a nulladik napi mintákhoz viszonyítva; ^a $P < 0,05$; ^b $P < 0,01$; szignifikáns különbséget jelöl a kontroll sejtekhez (CTL) viszonyítva.

6.2.7. A poli-ADP-ribosziláció szabályozza a csontirányú differenciáció során bekövetkező sejthalált SAOS-2 sejtekben és mesenchymalis őssejtekben

A PARP-1 és PARG csendesítés SAOS-2 sejtekben a differenciáció során bekövetkező sejthalálra is hatással volt. A PARP-1 csendesített sejtek életképessége szignifikánsan nagyobb volt a differenciáció során, mint a kontroll sejteké, azaz a PARP-1 hiányában csökkent a differenciáció és az ehhez kapcsolt sejthalál (apoptózis és nekrozis) mértéke. A PARG csendesítés ezzel ellentétben csökkentette az életképességet a differenciáció alatt, emellett a sejthalál formáját a nekrozis felé tolta (27. ábra A-C). A géncsökkentés apoptózisra tett fent leírt hatását a hasított PARP megjelenésének mintázata is

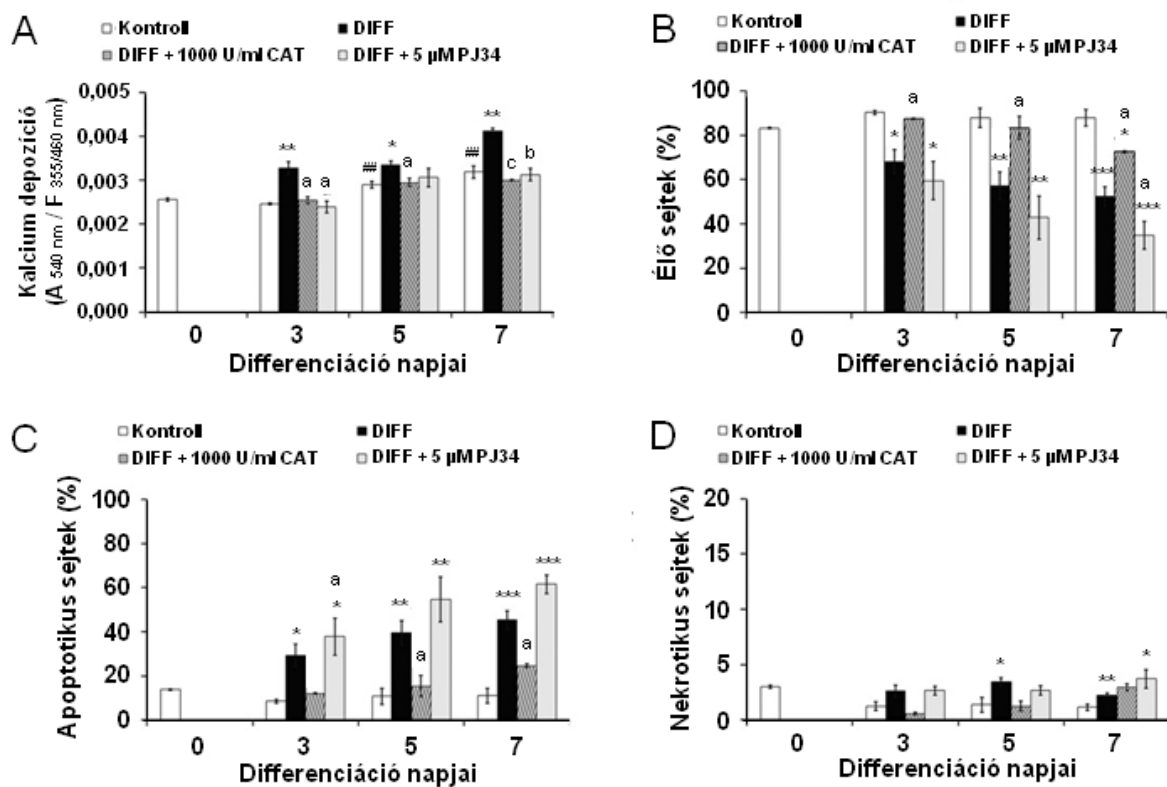
alátámasztja. A PARP-1 csendesített sejtekben csak a differenciáció hatodik napján jelent meg a hasított PARP detektálható mennyiségben. A PARG csendesített sejtek esetén bár a harmadik napon nagyobb volt a mennyisége, mint a kontroll sejtekben, de a kontroll sejtektől eltérően a differenciáció előrehaladtával fokozatosan csökkenő tendenciát mutatott (27. ábra D).



27. ábra PARP-1 és PARG csendesítés hatása a differenciáció során bekövetkező sejthalálra SAOS-2 sejtekben

Kontroll, PARP-1 csendesített és PARG csendesített sejteket osteogén differenciáló médiumban inkubáltunk. (A-C) A sejthalál mértékét Annexin V/propidium-jodid festést követően áramlási citometriával határoztuk meg. Az Annexin V és propidium-jodid negativitást mutató sejteket tekintettük élő sejteknek (A), az Annexin V pozitivitást mutató (propidium-jodid pozitív vagy negatív) sejteket tekintettük apoptotikus sejteknek (B) és a propidium-jodid felvételt mutató Annexin V negatív sejteket tekintettük nekrotikus sejteknek (C). A grafikonon 3 független kísérlet átlaga±SE szerepel. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ szignifikáns különbséget jelöl a nulladik napi mintákhoz viszonyítva; ^a $P < 0,05$; ^b $P < 0,01$; ^c $P < 0,001$ szignifikáns különbséget jelöl a kontroll sejtekhez (CTL) viszonyítva. (D) Hasított PARP detektálása Western blot technikával a differenciáció 3-6 napjain SAOS-2 CTL, shPARP-1 és shPARG sejtekben.

Humán chorionális mesenchymalis őssejteken (cMSC) szintén vizsgáltuk a hidrogén-peroxid által indukált PARiláció szerepét a csontirányú differenciáció során bekövetkező sejthalálban. A SAOS-2 sejtekhez hasonlóan a cMSC sejtek viabilitása is csökken a differenciáció során, apoptotikus és nekrotikus sejtek megjelenése mutatható ki.



28. ábra Hidrogén-peroxid által indukált PARiláció szabályozza a cMSC sejtek differenciációját és a differenciáció során bekövetkező sejthalált

Két különböző donorból izolált cMSC sejt kultúrát (cMSC1 és cMSC2) osteogén differenciáló médiumban inkubáltunk hét napig. (A) Kalcium depozíció kvantitatív meghatározása Alizarin Red S festéssel. (B-D) A sejthalál mértékét Annexin V/propidium-jodid festést követően a korábban leírtak szerint áramlási citometriával határoztuk meg. A grafikonon 3 független kísérlet átlaga±SE szerepel. ##P<0,01 szignifikáns különbséget jelöl a kontroll sejtekben a nulladik napi kontrollhoz viszonyítva; *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001 szignifikáns különbséget jelöl az adott napi kontroll mintákhoz viszonyítva; ^aP<0,05; ^bP<0,01; ^cP<0,001 szignifikáns különbséget jelöl az adott napi differenciált mintákhoz (DIFF) viszonyítva.

Ezen sejtek esetén szintén katalázal gátolható, hidrogén-peroxid-függő sejthalálról beszélhetünk. Kataláz, valamint 5 μM PJ34 specifikus PARP-1 inhibitor jelenlétében csökkent mértékű kalcium depozíció mutatható ki. A SAOS-2 sejtektől eltérően azonban az őssejtekben a PJ34 jelenlétében fokozódott az apoptózis mértéke. A cMSC sejteken végzett kísérleteket a 28. ábra foglalja össze.

7. DISZKUSSZIÓ

7.1. A poli-ADP-riboziláció szabályozó szerepe a cigarettafüst által kiváltott sejthalálban

A dohányzás általános oxidatív stresszt kiváltó hatása révén szinte az egész szervezet működésére hat. A dohányfüstnek az emberi szervezetre gyakorolt káros hatásait, az általa okozott betegségeket részletesen jellemzi nagyon sok tanulmány. Legtöbb közlemény a cigarettafüst által okozott sejthalált, a gyulladási folyamatokat, a DNS károsodást és az oxidatív stresszt vizsgálja, melyek együttesen vezetnek a dohányzás által okozott különböző betegségek kialakulásához. Nem tisztázott azonban, hogy a károsodott sejtekben milyen szabályozó folyamatok zajlanak le a sejtek túlélése vagy a sejthalál során. Az sem ismert pontosan, hogy ezekben a sejtekben hogyan működnek a túlélést segítő javítómechanizmusok, és hogy milyen sejthalál formát (apoptózis, nekrosis, autofágia) vált ki a cigarettafüst.

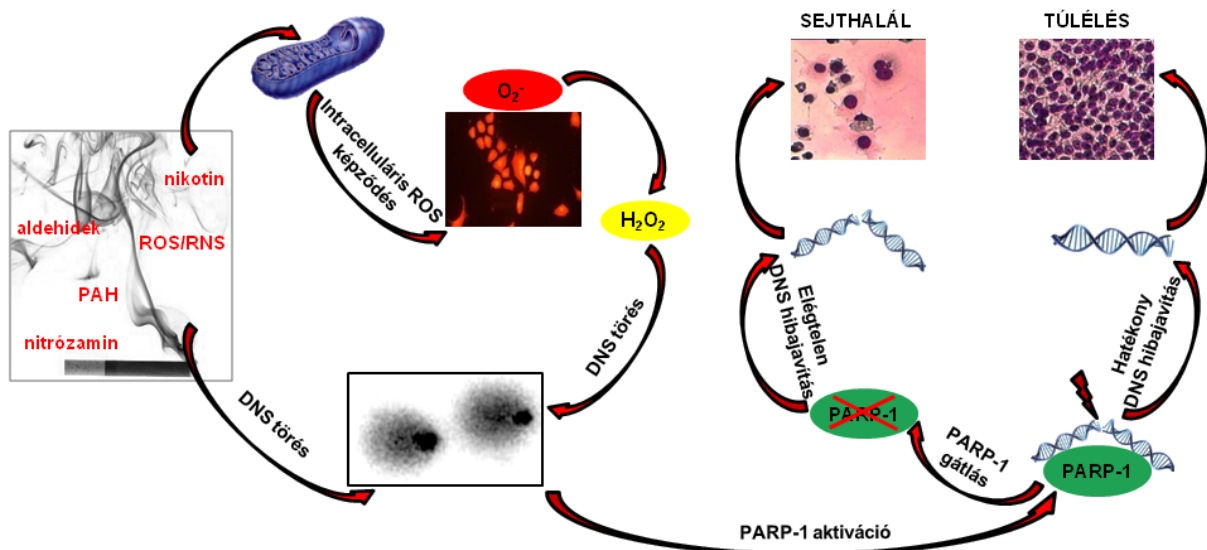
Vizsgálataink során igazoltuk a cigarettafüst kivonat toxikus hatásait A549 tüdő epithel sejteken. A sejtek életképességét (11. ábra) és proliferációs kapacitását (15. ábra) a CSE kivonat idő- és koncentrációfüggő módon csökkentette. A sejthalál azonban szokatlan formában zajlik le, apoptotikus és nekrotikus jellegek is megfigyelhetők. Alacsonyabb CSE koncentráció esetén (1,25-5%) a citoplazma duzzadása figyelhető meg, nekrotikus morfológiára emlékeztetve (14. ábra). Nagyobb CSE koncentrációk esetén a letapadva maradó sejtek kompakt, zsugorodott morfológiát mutatnak, de nem tapasztalható jelentős mértékű kromatin fragmentáció, és a tipikusan apoptózisra utaló kaszpáz aktivitás értéke sem nő (nem mutatott adat). Ellentmond az apoptotikus sejthalálnak az is, hogy magasabb CSE koncentráció jelentős sejtmembrán sérülést és LDH felszabadulást okoz (11. ábra). Az irodalomban is ellentmondásos eredményeket találunk a cigarettafüst által kiváltott sejthalál formáját tekintve, de mások is beszámoltak a cigarettafüst által okozott DNS károsodásról az apoptózis tipikus jelei nélkül (Liu et al., 2005). Felmerült az apoptózis indukáló faktor (AIF) szerepe a CSE által okozott sejthalálban és a parthanatos mint lehetséges sejthalál forma. Jelentős mértékű AIF transzlokációt a vizsgált kezelési idők esetén nem tudtunk kimutatni, így az AIF szerepe ebben a modellben kérdéses. Parthanatos során a DNS károsodás PAR szintézist indukál, a sejtmagból kijutó PAR a mitokondriumokban az AIF-hez kötődve váltja ki annak transzlokációját (Wang et al., 2011). A PAR szintézis tehát egy kulcsfontosságú esemény a parthanatos során, csakúgy mint más sejthalál formák esetén is, így szeretnénk volna megvizsgálni a PARiláció szerepét a cigarettafüst által kiváltott sejthalálban. A PARP-1 szerepét kevesen vizsgálták a CSE hatásainak tanulmányozása során, bár néhányan mutattak ki PARP aktivációt cigarettafüst kezelés hatására (Kamp et al., 2001; Csiszar et al., 2009;

Hageman et al., 1998). CSE kezelés hatására a mi modellünkben szintén PAR akkumulációt tudunk detektálni (13. ábra), mely a PARP-1 aktivitásalódására utal (PARP-1 csendesített sejteken és PJ34 specifikus gátlószer jelenlétében a CSE nem indukál polimer szintézist). A PARiláció kettős szerepet tölthet be a sejthalál folyamatok szabályozásában (Erdélyi et al., 2009; Virág et al., 2002). Kis mértékű DNS károsodás esetén elősegíti a DNS javítást és ezzel a sejt túlélését, nagy mértékű károsodás esetén viszont NAD^+ /ATP depléciónak révén nekrozist (Virág et al., 2002), vagy AIF transzlokáció kiváltása révén parthanatost indukálhat (David et al., 2009). A CSE által okozott sejtkárosodásban a PARP aktiváció túlélést segítő szerepe igazolódott, a CSE még a legmagasabb koncentrációban sem okozott olyan mértékű javíthatatlan károsodást, mely a PARP-1 túlzott aktivációjához vezetett volna. Ezek alapján A549 sejtekben a cigarettafüst hatására bekövetkező sejthalálban a parthanatos valószínűleg nem játszik fontos szerepet.

A PARiláció megfelelő egyensúlyának túlélést segítő szerepét mutatja, hogy a PARP-1 és a PARG csendesített sejtek esetén a kontroll sejtekhez képest kisebb az életképesség (14. ábra), a proliferációs kapacitás (15. ábra) és a DNS hibajavítás hatékonysága (16. ábra). Látszólag ellentmondásos módon a PAR szintézisét és lebontását végző két enzim csendesítése hasonló hatást eredményezett, mely összhangban van más kutatócsoportok megfigyeléseivel (Fisher et al., 2007; Erdélyi et al., 2009). A hatékony DNS hibajavításhoz ugyanis nemcsak a PAR szintézise, hanem annak lebontása, ezek megfelelő dinamikája, a PARP és a PARG összehangolt működése szükséges.

Egyik célkitűzésünk volt, hogy a cigarettafüst mely komponensei okoznak DNS törést és ezen keresztül PARP-1 aktivációt. A PARP-1 leginkább egyszálú DNS törések hatására aktiválódik, az egyszálú DNS töréseket pedig leginkább ROS/RNS vegyületek és alkiláló ágensek okozzák. A cigarettafüst számos DNS károsító vegyületet tartalmaz, köztük policiklusos aromás szénhidrogéneket, nitrózaminokat, ROS/RNS vegyületeket és hidrokinonokat, mely utóbbiak redox reakciókban további szuperoxid, hidrogén-peroxid és hidroxil gyök képzéséhez járulnak hozzá (Aoshiba és Nagai, 2003; Church és Pryor, 1985). Más kutatási eredményekkel összhangban (Church és Pryor, 1985; Asami et al., 1997; Kinnula, 2005) a mi eredményeink is a ROS, különösen a szuperoxid és hidrogén-peroxid kiemelt szerepét mutatják a CSE által okozott sejtkárosító hatásokban. Többféle ROS detektálásra alkalmas fluoreszcens próbával kimutattuk a CSE kezelt sejtekben a ROS képződést a füst kivonat eltávolítását követően is. Maga a cigarettafüst is tartalmaz ROS vegyületeket, de egyéb oxidatív vegyületekkel történő kezeléstől eltérően a PAR akkumuláció csak hosszabb kezelési idő után (30-60 perc) volt detektálható. Ez arra utal, hogy a ROS

termelés része a sejt stresszválaszának CSE kezelést követően. A mitokondriális membrán depolarizáció (11. ábra) és a MitoSOX Red mitokondriális szuperoxid indikátorral kapott eredmények (17. ábra) is a mitokondriális szuperoxid termelődést támasztják alá. Amplex Red assay segítségével intracelluláris hidrogén-peroxid termelődés is kimutatható volt CSE kezelés hatására. A kataláz jelenléte gátolta a PAR akkumulációt és fokozta a CSE kezelt sejtek életképességét, ezzel ellentétben a szuperoxid dizmutáz jelenlétében jelentős mértékben fokozódott a PAR akkumuláció és drasztikusan csökkent a viabilitás (18. ábra). Ez arra utal, hogy a szuperoxid átalakulása hidrogén-peroxiddá fokozza a DNS törést és ez által a PARP aktivációt. Habár a fluoreszcens ROS próbák megbízhatósága megkérdőjelezhető (Zielonka és Kalyanaraman, 2010), a SOD és CAT kezelés hatásai egyértelműen azt mutatják, hogy a szuperoxidnak és hidrogén-peroxidnak kulcsszerepe van a cigarettafüst által okozott DNS károsodásban és citotoxicitásban. A poli-ADP-riboziláció szerepét a cigarettafüst által okozott sejthalálban a 29. ábra foglalja össze.



29. ábra A poli-ADP-riboziláció szerepe a cigarettafüst által okozott sejthalálban

A cigarettafüstben jelen lévő és a stresszválasz során a sejtekben termelődő ROS kulcsszerepet játszik a DNS károsodásban és citotoxicitásban. A hatékony DNS hibajavításhoz, így a sejtek túléléséhez elengedhetetlen a PAR metabolizmus megfelelő működése.

7.2. Hidrogén-peroxid által indukált poli-ADP-riboziláció szabályozó szerepe az osteogén differenciáció során bekövetkező sejthalálban

A regeneratív orvoslásban előtérbe került az őssejtek szerepe, melyek multipotens jellegüknél fogva megfelelő stimulusok hatására különféle sejtekké képesek differenciálódni, elősegítve ezzel a szöveti regenerálódást. Felhasználásukhoz azonban elengedhetetlen a differenciációs folyamatok szabályozásának ismerete. Az osteogén differenciáció folyamatának és szabályozásának tanulmányozására az őssejtek mellett megfelelő modellt nyújtanak a SAOS-2 osteosarcoma sejtek, melyek differenciáló stimulusok hatására szintén képesek mineralizált extracelluláris mátrix struktúrák kialakítására.

A SAOS-2 sejtekben differenciáló médium hatására nőtt az osteogén differenciációban szerepet játszó gének (Runx2, osterix, BMP2, osteopontin) expressziós szintje és az alkalikus foszfatáz aktivitása, valamint a Ca^{2+} felhalmozódás mutatható ki az extracelluláris mátrixban (21. ábra). A differenciáció során a sejtekben hidrogén-peroxid képződését detektáltuk, melynek funkcionális jelentőségét az mutatja, hogy kataláz jelenlétében szignifikánsan csökkent az extracelluláris kalcium depozíció és az alkalikus foszfatáz aktivitás. A kataláz a csontirányú differenciációban szereplő marker gének expresszióját is csökkentette vagy késleltette az expresszió növekedését (21. ábra). A ROS osteogén differenciációban betöltött szerepét tekintve az ellentmondásos eredményeket találunk az irodalomban. Több munkacsoport a ROS vegyületek gátló hatását mutatta ki (Chen et al., 2008; Arai et al., 2007). Más vizsgálatok szerint a differenciáció során képződő ROS vegyületeknek pozitív szabályozó szerepük van a folyamatban. Kimutatták, hogy a NOX4 által termelt szuperoxid szabályozza a BMP2 expressziót és elősegíti a differenciációt (Mandal et al., 2011). A szuperoxid fokozta a kalcifikációt vaszkuláris simaizom sejtek osteogén differenciációja során (Sutra et al., 2008). Periodontális ligamentum eredetű fibroblasztokban a hidrogén-peroxid növelte a differenciációs kapacitást a csontspecifikus transzkripciós faktorok expressziójának fokozása révén (Choe et al., 2012). Az osteogén differenciáció során a ROS szintjének megemelkedése valószínűleg a NADPH oxidázok, főként a NOX4 és NOX2 működésével hozható összefüggésbe (Mandal et al., 2011; Lai et al., 2012). Chondrogén és adipogén differenciáció kapcsán szintén leírták a reaktív oxigénvegyületek szabályozó szerepét (Kim et al., 2010; Schröder et al., 2009), a redox szabályozás tehát többféle differenciálódási útvonalban szerepet kap. A redox szabályozás mibenlétéről azonban nem áll rendelkezésre információ, így feltételeztük és megvizsgáltuk a PARiláció lehetséges szerepét.

SAOS-2 sejtek osteogén differenciációja során PAR akkumulációt mutattunk ki. A képződő PAR mennyiségének változása hasonló volt a hidrogén-peroxid termelésben

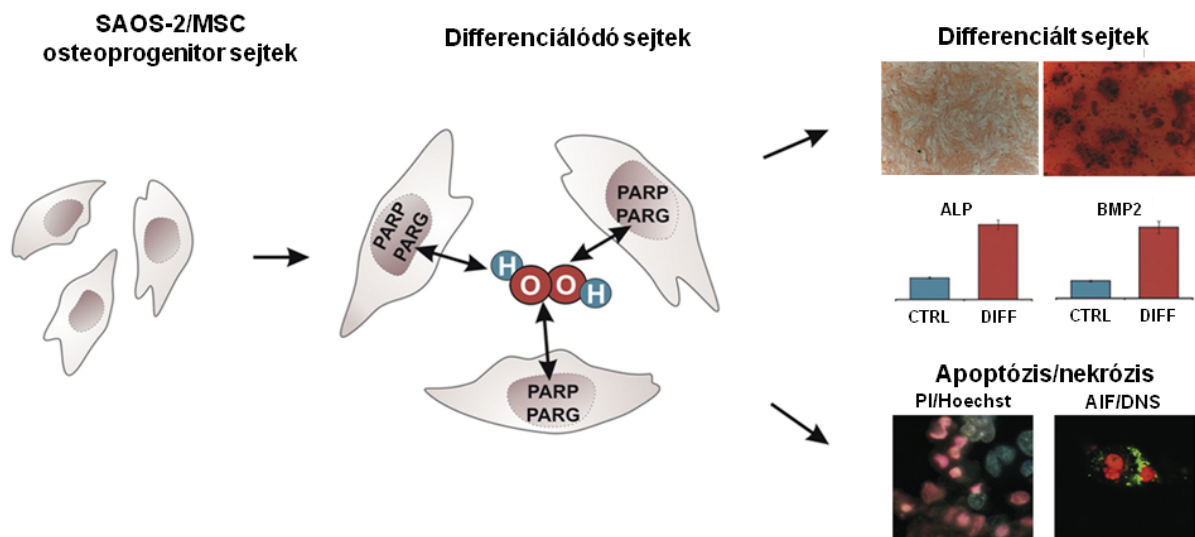
megfigyelt változásokkal, korreláció mutatható ki a PAR akkumuláció és a hidrogén-peroxid termelés között (22. ábra). Kataláz jelenlétében a PAR szint emelkedése időben eltolódott, így a PARP aktivitást nagyrészt a differenciáció során a képződő hidrogén-peroxid váltotta ki.

Az osteogén differenciáció során a sejtek jelentős része elpusztul (Javed et al., 2010), amit mi is megfigyeltünk SAOS-2 és MSC kultúrákban. A foszfatidil-szerin externalizáció, a kromatin kondenzáció, a hasított PARP megjelenése és az általános kaszpáz gátló z-VAD-fmk védő túlélést segítő hatása alapján a sejthalál formája döntően apoptózis, de megjelentek nekrotikus sejtek is (propidium-jodid felvétel) (23. ábra). Redukált glutation és kataláz jelenlétében nőtt a sejtek viabilitása, a sejthalált tehát feltehetőleg a hidrogén-peroxid indukálta. Mivel a hidrogén-peroxid termelés és a PARiláció között közvetlen kapcsolat áll fenn, szeretnénk volna megvizsgálni a PARiláció szerepét az osteogén differenciációban. Ennek érdekében a PARP-1 és PARG enzimeket stabilan csendesítettük SAOS-2 sejtvonalban. A hatékony PARP-1 csendesítés a sejtek életképességének drasztikus csökkenésével járt, így csak részleges, 50%-os hatékonyságú csendesítést sikerült elérnünk (24. ábra). A PARP-1 és a PARG csendesítése befolyásolta az extracelluláris kalcium depozíció mértékét, és az ALP aktivitást. Az shPARP-1 sejtekben később mutatható ki a mineralizáció a kontroll sejtvonalhoz képest, és csökken az ALP aktivitás is. Az shPARG sejtekben a nagyobb mértékű a kalcium depozíció, mint a kontroll sejtekben, de alacsonyabb az ALP aktivitás. (25. ábra). A szabályozó szerepet betöltő Runx2 és az osterix mRNS szintje a csendesített vonalakban nem mutatott jelentős eltérést a kontroll sejtvonalhoz képest. A BMP2 és az osteopontin expressziója fokozódott a PARG és kismértékben a PARP-1 csendesített sejtekben is. A PARP-1 illetve a PARiláció szerepét leírták több transzkripciós faktor szabályozása esetén, de a Runx2 és az osteogén differenciációban szereplő egyéb transzkripciós faktorok esetén még nem vizsgálták a hatását.

A PARP-1 és a PARG sejthalálban betöltött szerepe alapján feltételezhető, hogy befolyásolja a csontirányú differenciáció során bekövetkező sejthalált is. Az shPARP-1 sejtekben csökkent a differenciáció és az ehhez kapcsolt sejthalál (apoptózis és nekrozis) mértéke. A PARG csendesítés ezzel ellentétben csökkentette az életképességet a differenciáció alatt, emellett a sejthalál formáját a nekrozis felé tolta el (27. ábra). Tekintve a PARP-1 túlélést segítő szerepét enyhe oxidatív stressz során, ebben a modellben a kis mennyiségben termelődő hidrogén-peroxid termelés alapján a PARP-1 hiányában fokozott sejtpusztulást feltételeztük. Ezzel szemben a PARP-1 ebben a folyamatban a sejtpusztulást segíti elő. A PARP-1 és PARG csendesítés ellentétes hatása alapján feltételezhető, hogy ebben a folyamatban sokkal összetettebb a szabályozási folyamat, és a PARP aktivitáson kívül

szerepet játszhatnak a fehérje-fehérje kölcsönhatások is. Mint ahogyan például az NF- κ B aktiválása esetén sincs szükség a PARP-1 enzimatis aktivitására, a kölcsönhatás fehérje-fehérje interakció révén valósul meg (Hassa et al., 2001).

A ROS szerepét az osteogén differenciáció során humán chorionális mesenchymalis őssejteken (cMSC) is megerősítettük. Ezekben a sejtekben szintén katalázal gátolható, hidrogén-peroxid függő sejthalált mutattunk ki. Így a hidrogén-peroxid az MSC sejtekben is szerepet játszik a differenciációt kísérő sejthalálban. A SAOS-2 sejtektől eltérően azonban az őssejtekben a PJ34 jelenlétében fokozódott az apoptózis mértéke, azaz a PARP-1 túlélést segítő hatását tapasztaltuk (28. ábra). A PARilációnak az osteogén differenciációban betöltött szerepét a 30. ábra mutatja be.



30. ábra A poli-ADP-riboziláció szerepe a csontirányú differenciációban

Az osteogén differenciáció során termelődő hidrogén-peroxid PARP aktivációt vált ki. A PARiláció szabályozó szerepe van a differenciáció során bekövetkező sejthalálban.

Munkacsoportunk később megjelent közleménye alapján világosabb kép rajzolódik ki a PARP-1 osteogén differenciációban betöltött szerepét illetően. Korábbi munkáink során a PJ34 specifikus PARP-1 inhibitor az irodalomban is elfogadott és széles körben alkalmazott koncentrációban használtuk. Az osteogén differenciációs modellben illetve az őssejtekben azonban valószínűleg egyéb folyamatokra is hatással volt, hisz a későbbi munkák során alkalmazott alacsonyabb (1 μ M) koncentrációban nem volt ellentmondás a PARP-1 csendesítéssel és a farmakológiai gátlással kapott eredmények között. A PARP-1 csendesítése és az inhibitorral kapott gátlás egyaránt a differenciáció és az annak során bekövetkező sejthalál mértékének csökkenését eredményezte. Sikerült kimutatni a PARP-1 és a p38

kölcsönhatását valamint a p38 PARP-1-függő aktivációját. A p38 inhibitorok jelentős mértékben csökkentették a differenciáció hatásfokát és segítették a sejtek túlélését. A csontirányú differenciációban a sejthalál szabályozása tehát a PARP-1 – p38 útvonalon valósul meg (Robaszkiewicz et al., 2014). A csontirányú differenciáció során a ROS és a sejthalál fontosságát mások is igazolták, emellett kimutatták, hogy a nekrotikus és apoptotikus sejtek „kalcifikációs magként” funkcionálnak, a kalcium depozíció ezek körül indul meg. Nekrotikus sejtek vagy azok membránfrakciójának hozzáadása jelentős mértékben növelte a kalcium depozíció mértékét (Fujita et al., 2014). PAR polimerek osteogén differenciációban betöltött alapvető szerepét igazolja, hogy NMR spektroszkópiával PAR polimereket mutattak ki a csont extracelluláris mátrixában. Elméletük szerint a csontirányú differenciáció során a nekrotizáló sejtekből kiszabadul a sejtek tartalma, ezzel együtt a PAR az extracelluláris mátrixba kerül a fejlődő csontban. A PAR nagy affinitással kötődhet a kalciumhoz és a XII típusú kollagénhez, és polimer szerkezete révén ideális scaffold a mineralizáció során. Feltételezik, hogy patológiás kalcifikációs folyamatokban, például artériák elmeszesedésében hasonlóképpen zajlik le a folyamat (Chow et al., 2014).

Kísérleteink során a PARP-1 szerepét vizsgáltuk két teljesen eltérő folyamatban: a dohányfüst káros hatásaiban és a csontdifferenciációban. Mindkét folyamat esetén azt találtuk, hogy a PARiláció szabályozó szerepet tölt be. A PARiláció szerepét, fiziológiai és patofiziológiai jelentőségét számos biológiai folyamatban igazolták. Az általunk vizsgált folyamatok egy-egy újabb példát szolgáltatnak arra, hogy a PARP-1 és a PARiláció szerepe igen sokrétű, és amennyiben zavart szenved a PAR polimerek szintézise és lebontása, azaz felborul a PARiláció egyensúlya, az fiziológiás és patofiziológiás folyamatokat egyaránt módosíthat.

8. KONKLÚZIÓK

A poli-ADP-riboziláció szabályozó szerepe a cigarettafüst által kiváltott sejthalálban

1. A cigarettafüst toxikus hatású az A549 sejtekre.
2. A PARP-1 és a PARG csendesítés is érzékenyíti a sejteket a dohányfüst citotoxikus hatásaira.
3. PARP-1 és PARG hiányában csökken a DNS hibajavítás hatékonysága.
4. A cigarettafüst kezelés A549 sejtekben intracelluláris ROS képződéshez vezet.
5. Az intracelluláris ROS képződésnek kulcsszerepe van a dohányfüst toxikus hatásában.

Hidrogén-peroxid által indukált poli-ADP-riboziláció szabályozó szerepe az osteogén differenciáció során bekövetkező sejthalálban

1. A humán placentából izolált sejtek felszíni markereik alapján őssejt jellegűek és képesek osteogén, chondrogén és adipogén irányú differenciációra
2. SAOS-2 sejtek osteogén differenciációja során hidrogén-peroxid termelődik, mely hozzájárul a sejthalál kiváltásához.
3. A differenciáció során termelődő ROS PARP-1 aktivitást vált ki.
4. A PARilációnak szerepe van az osteogén differenciáció során bekövetkező sejthalál szabályozásában.

9. IRODALOMJEGYZÉK

- A.W., James. 2013.** Review of Signaling Pathways Governing MSC Osteogenic and Adipogenic Differentiation. *Scientifica (Cairo)*. 2013. 2013:684736.
- Afriat R., Horowitz S., Priel E. 2013.** Mycoplasma fermentans inhibits the activity of cellular DNA topoisomerase I by activation of PARP1 and alters the efficacy of its anti-cancer inhibitor. *PLoS One*. 2013. 8(8):e72377.
- Aguiar R.C., Yakushijin Y., Kharbanda S., Salgia R., Fletcher J.A., Shipp M.A. 2000.** BAL is a novel risk-related gene in diffuse large B-cell lymphomas that enhances cellular migration. *Blood*. 2000. 96(13):4328-34.
- Ahel D., Horejsí Z., Wiechens N., Polo S.E., Garcia-Wilson E., Ahel I., Flynn H., Skehel M., West S.C., Jackson S.P., Owen-Hughes T., Boulton S.J. 2009.** Poly(ADP-ribose)-dependent regulation of DNA repair by the chromatin remodeling enzyme ALC1. *Science*. 2009. 325(5945):1240-3.
- Alano C.C., Garnier P., Ying W., Higashi Y., Kauppinen T.M., Swanson R.A. 2010 .** NAD⁺ depletion is necessary and sufficient for poly(ADP-ribose) polymerase-1-mediated neuronal death . *J Neurosci*. 2010 . 30(8):2967-78.
- Aldinucci A., Gerlini G., Fossati S., Cipriani G., Ballerini C., Biagioli T., Pimpinelli N., Borgognoni L., Massacesi L., Moroni F., Chiarugi A. 2007.** A key role for poly(ADP-ribose) polymerase-1 activity during human dendritic cell maturation. *J Immunol*. 2007. 179.
- Allen M.D., Buckle A.M., Cordell S.C., Löwe J., Bycroft M. 2003.** The crystal structure of AF1521 a protein from *Archaeoglobus fulgidus* with homology to the non-histone domain of macroH2A. *J Mol Biol*. 2003. 330(3):503-11.
- Altmeyer M., Messner S., Hassa P.O., Fey M., Hottiger M.O. 2009.** Molecular mechanism of poly(ADP ribosylation) by PARP1 and identification of lysine residues as ADP-ribose acceptor sites. *Nucleic Acids Res*. 2009. 37(11):3723-38.
- Amé J.C., Rolli V., Schreiber V., Niedergang C., Apiou F., Decker P., Muller S., Höger T., Ménissier-de Murcia J., de Murcia G. 1999.** PARP-2, a novel mammalian DNA damage-dependent poly(ADP-ribose) polymerase. *J Biol Chem*. 1999. 274(25):17860-8.
- Amé J.C., Spenlehauer C., de Murcia G. 2004.** The PARP superfamily. *Bioessays*. 2004. 26(8):882-93.
- Andrabi S.A., Kim N.S., Yu S.W., Wang H., Koh D.W., Sasaki M., Klaus J.A., Otsuka T., Zhang Z., Koehler R.C., Hurn P.D., Poirier G.G., Dawson V.L., Dawson T.M. 2006.** Poly(ADP-ribose) (PAR) polymer is a death signal. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006. 103(48):18308-13.
- Aoshiba K., Nagai A. 2003.** Oxidative stress, cell death, and other damage to alveolar epithelial cells induced by cigarette smoke. *Tob Induc Dis*. 2003. 1(3):219-26.

- Arai M., Shibata Y., Pugdee K., Abiko Y., Ogata Y. 2007.** Effects of reactive oxygen species (ROS) on antioxidant system and osteoblastic differentiation in MC3T3-E1 cells. *IUBMB Life*. 2007. 59(1):27-33.
- Ariumi Y., Masutani M., Copeland T.D., Mimori T., Sugimura T., Shimotohno K., Ueda K., Hatanaka M., Noda M. 1999.** Suppression of the poly(ADP-ribose) polymerase activity by DNA-dependent protein kinase in vitro. *Oncogene*. 1999. 18(32):4616-25.
- Asami S., Manabe H., Miyake J., Tsurudome Y., Hirano T., Yamaguchi R., Itoh H., Kasai H. 1997.** Cigarette smoking induces an increase in oxidative DNA damage, 8-hydroxydeoxyguanosine, in a central site of the human lung. *Carcinogenesis*. 1997. 18(9):1763-6.
- Aubin R.J., Fréchette A., de Murcia G., Mandel P., Lord A., Grondin G., Poirier G.G. 1983.** Correlation between endogenous nucleosomal hyper(ADP-ribosylation) of histone H1 and the induction of chromatin relaxation. *EMBO J*. 1983. 2(10):1685-93.
- Augustin A., Spenlehauer C., Dumond H., Menissier-De Murcia J., Piel M. 2003.** PARP-3 localizes preferentially to the daughter centriole and interferes with the G1/S cell cycle progression. *J Cell Sci*. 2003. 116:1551–1562.
- Baginski T.K., Dabbagh K., Satjawatcharaphong C., Swinney D.C. 2006.** Cigarette smoke synergistically enhances respiratory mucin induction by proinflammatory stimuli. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2006. 35(2):165-74.
- Baglole C.J., Bushinsky S.M., Garcia T.M., Kode A., Rahman I., Sime P.J., Phipps R.P. 2006.** Differential induction of apoptosis by cigarette smoke extract in primary human lung fibroblast strains: implications for emphysema. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2006. 291(1):L19-29.
- Bai P., Canto C., Brunyánszki A., Huber A., Szántó M., Cen .Y, Yamamoto H., Houten S.M., Kiss B., Oudart H., Gergely P., Menissier-de Murcia J., Schreiber V., Sauve A.A., Auwerx J. 2011.** PARP-2 regulates SIRT1 expression and whole-body energy expenditure. *Cell Metab*. 2011. 13(4):450-60.
- Bai P., Hegedus C., Szabó E., Gyüre L., Bakondi E., Brunyánszki A., Gergely S., Szabó C., Virág L. 2009.** Poly(ADP-ribose) polymerase mediates inflammation in a mouse model of contact hypersensitivity. *J Invest Dermatol*. 2009. 129(1):234-8.
- Berger N.A., Sims J.L., Catino D.M., 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*. 1983. 13:219-26.
- Berry D.L., Baehrecke E.H. 2007.** Growth arrest and autophagy are required for salivary gland cell degradation in *Drosophila*. *Cell*. 2007. 131(6):1137-48.

- Bhatia M., Kirkland J.B., 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.* 1995. 308 (Pt 1):131-7.
- Braun S.A., Panzeter P.L., Collinge M.A., Althaus F.R. 1994.** Endoglycosidic cleavage of branched polymers by poly(ADP-ribose) glycohydrolase. *Eur J Biochem.* 1994. 220(2):369-75.
- Bürkle A., Virág L. 2013.** Poly(ADP-ribose): PARadigms and PARadoxes. *Mol Aspects Med.* 2013. 34(6):1046-65.
- Caiafa P., Guastafierro T., Zampieri M. 2009.** Epigenetics: poly(ADP-ribosyl)ation of PARP-1 regulates genomic methylation patterns. *FASEB J.* 2009. 23(3):672-8.
- Caldini R., Fanti E., Magnelli L., Barletta E., Tanganelli E., Zampieri M., Chevanne M. 2011.** Low doses of 3-aminobenzamide, a poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor, stimulate angiogenesis by regulating expression of urokinase type plasminogen activator and matrix metalloprotease 2. *Vasc Cell.* 2011. 3(1):12.
- Carnevali S., Petruzzelli S., Longoni B., Vanacore R., Barale R., Cipollini M., Scatena F., Paggiaro P., Celi A., Giuntini C. 2003.** Cigarette smoke extract induces oxidative stress and apoptosis in human lung fibroblasts. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2003. 284(6):L955-63.
- Chamberlain G., Fox J., Ashton B., Middleton J. 2007.** Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells.* 2007. 25(11):2739-49.
- Chambon, P., Weill, J.D., Mandel, P. 1963.** Nicotinamide mononucleotide activation of new DNA-dependent polyadenylic acid synthesizing nuclear enzyme. *Biochem Biophys Res Commun.* [11:39-43.]. 1963. 11:39-43.
- Chang S.S., Jiang W.W., Smith I., Glazer C., Sun W.Y., Mithani S., Califano J.A. 2010.** Chronic cigarette smoke extract treatment selects for apoptotic dysfunction and mitochondrial mutations in minimally transformed oral keratinocytes. *Int J Cancer.* 2010. 126(1):19-27.
- Chen C.T., Shih Y.R., Kuo T.K., Lee O.K., Wei Y.H. 2008.** Coordinated changes of mitochondrial biogenesis and antioxidant enzymes during osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* 2008. 26(4):960-8.
- Chen Z.H., Kim H.P., Scirba F.C., Lee S.J., Feghali-Bostwick C., Stolz D.B., Dhir R., Landreneau R.J., Schuchert M.J., Yousem S.A., Nakahira K., Pilewski J.M., Lee J.S., Zhang Y., Ryter S.W., Choi A.M. 2008.** Egr-1 regulates autophagy in cigarette smoke-induced chronic obstructive pulmonary disease. *PLoS One.* 2008. 3(10):e3316.
- Chi N.W., Lodish H.F. 2000.** Tankyrase is a golgi-associated mitogenactivated protein kinase substrate that interacts with IRAP in GLUT4 vesicles. *J Biol Chem.* 2000. 275:38437-38444.

- Cho S.H., Goenka S., Henttinen T., Gudapati P., Reinikainen A., Eischen C.M., Lahesmaa R., Boothby M. 2009.** PARP-14, a member of the B aggressive lymphoma family, transduces survival signals in primary B cells. *Blood*. 2009. 113(11):2416-25.
- Choe Y., Yu J.Y., Son Y.O., Park S.M., Kim J.G., Shi X., Lee J.C. 2012 .** Continuously generated H₂O₂ stimulates the proliferation and osteoblastic differentiation of human periodontal ligament fibroblasts. *J Cell Biochem*. 2012 . 113(4):1426-36.
- Chou H.Y., Chou H.T., Lee S.C. 2006.** CDK-dependent activation of poly(ADP-ribose) polymerase member 10 (PARP10). *J Biol Chem*. 2006. 281(22):15201-7.
- Chow W.Y., Rajan R.2, Muller K.H., Reid D.G., Skepper J.N., Wong W.C., Brooks R.A., Green M., Bihan D., Farndale R.W., Slatter D.A., Shanahan C.M., Duer M.J. 2014 .** NMR spectroscopy of native and in vitro tissues implicates polyADP ribose in biomineralization. *Science*. 2014 . 344(6185):742-6.
- Church D.F., Pryor W.A. 1985.** Free-radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications. *Environ Health Perspect*. 1985. 64:111-26.
- Cohen-Armon M., Visochek L., Rozensal D., Kalal A., Geistrikh I., Klein R., Bendetz-Nezer S., Yao Z., Seger R. 2007.** DNA-independent PARP-1 activation by phosphorylated ERK2 increases Elk1 activity: a link to histone acetylation. *Mol Cell*. 2007. 25(2):297-308.
- Cortes U., Tong W.M., Coyle D.L., Meyer-Ficca M.L., Meyer R.G., Petrilli V., Herceg Z., Jacobson E.L., Jacobson M.K., Wang Z.Q. 2004.** Depletion of the 110-kilodalton isoform of poly(ADP-ribose) glycohydrolase increases sensitivity to genotoxic and endotoxic stress in mice. *Mol Cell Biol*. 2004. 24(16):7163-78.
- Curtin N.J., Szabo C. 2013 .** Therapeutic applications of PARP inhibitors: anticancer therapy and beyond. *Mol Aspects Med*. 2013 . 34(6):1217-56.
- Csiszar A., Podlutzky A., Wolin M.S., Losonczy G., Pacher P., Ungvari Z. 2009.** Oxidative stress and accelerated vascular aging: implications for cigarette smoking. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2009. 14:3128-44.
- D'Alimonte I., Lannutti A., Pipino C., Di Tomo P., Pierdomenico L., Cianci E., Antonucci I., Marchisio M., Romano M., Stuppia L., Caciagli F., Pandolfi A., Ciccarelli R. 2013.** Wnt signaling behaves as a "master regulator" in the osteogenic and adipogenic commitment of human amniotic fluid mesenchymal stem cells. *Stem Cell Rev*. 2013. 9(5):642-54.
- D'Amours D., Desnoyers S., D'Silva I., and Poirier G.G. 1999.** Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions. *Biochem J*. 1999. 342(Pt 2): 249–268.
- D'Amours D., Sallmann F.R., Dixit V.M., Poirier G.G. 2001.** Gain-of-function of poly(ADP-ribose) polymerase-1 upon cleavage by apoptotic proteases: implications for apoptosis. *J Cell Sci*. 2001. 114(Pt 20):3771-8.

- Dantzer F., Mark M., Quenet D., Scherthan H., Huber A., Liebe B., Monaco L., Chicheportiche A., Sassone-Corsi P., de Murcia G., Ménissier-de Murcia J. 2006.** Poly(ADP-ribose) polymerase-2 contributes to the fidelity of male meiosis I and spermiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006. 103(40):14854-9.
- David K.K., Andrabi S.A., Dawson T.M., Dawson V.L. 2009.** Parthanatos, a messenger of death. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2009. 14:1116-28.
- de Murcia J.M., Niedergang C., Trucco C., Ricoul M., Dutrillaux B., Mark M., Oliver F.J., Masson M., Dierich A., LeMeur M., Walztinger C., Chambon P., 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*. 1997. 94(14):7303-7.
- De Rycker M., Venkatesan R.N., Wei C., Price C.M. 2003.** Vertebrate tankyrase domain structure and sterile alpha motif (SAM)-mediated multimerization. *Biochem J*. 2003. 372:87-96.
- Delavallée L., Cabon L., Galán-Malo P., Lorenzo H.K., Susin S.A. 2011.** AIF-mediated caspase-independent necroptosis: a new chance for targeted therapeutics. *IUBMB Life*. 2011. 63(4):221-32.
- Diani-Moore S., Ram P., Li X., Mondal P., Youn D.Y., Sauve A.A., Rifkind A.B. 2010.** Identification of the aryl hydrocarbon receptor target gene TiPARP as a mediator of suppression of hepatic gluconeogenesis by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and of nicotinamide as a corrective agent for this effect. *J Biol Chem*. 2010. 285(50):38801-10.
- Ding R., Smulson M. 1994.** Depletion of nuclear poly(ADP-ribose) polymerase by antisense RNA expression: influences on genomic stability, chromatin organization, and carcinogen cytotoxicity. *Cancer Res*. 1994. 54(17):4627-34.
- Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans R., Keating A., Prockop D.J., Horwitz E. 2006.** Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006. 8(4):315-7.
- Durkacz B.W., Omidiji O., Gray D.A., Shall S. 1980.** (ADP-ribose)_n participates in DNA excision repair. *Nature*. 1980. 283(5747):593-6.
- El-Khamisy S.F., Masutani M., Suzuki H., Caldecott K.W. 2003.** A requirement for PARP-1 for the assembly or stability of XRCC1 nuclear foci at sites of oxidative DNA damage. *Nucleic Acids Res*. 2003. 31(19):5526-33.
- Elkholi R., Chipuk J.E. 2014.** How do I kill thee? Let me count the ways: p53 regulates PARP 1 dependent necrosis. *Bioessays*. 2014. 36(1):46-51.
- Erdélyi K., Bai P., Kovács I., Szabó E., Mocsár G., Kakuk A., Szabó C., Gergely P., Virág L. 2009.** Dual role of poly(ADP-ribose) glycohydrolase in the regulation of cell death in oxidatively stressed A549 cells. *FASEB J*. 2009. 23(10):3553-63.

Erener S., Hesse M., Kostadinova R., Hottiger M.O. 2012 . Poly(ADP-ribose)polymerase-1 (PARP1) controls adipogenic gene expression and adipocyte function. *Mol Endocrinol.* 2012 . 26(1):79-86.

Exley R., Gordon J., 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.* 1987 . 84(18):6467-70.

Facchinetti F., Amadei F., Geppetti P., Tarantini F., Di Serio C., Dragotto A., Gigli P.M., Catinella S., Civelli M., Patacchini R. 2007 . Alpha,beta-unsaturated aldehydes in cigarette smoke release inflammatory mediators from human macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2007 . 37(5):617-23.

Fahrer J., Kranaster R., Altmeyer M., Marx A., Bürkle A. 2007. Quantitative analysis of the binding affinity of poly(ADP-ribose) to specific binding proteins as a function of chain length. *Nucleic Acids Res.* 2007. 35(21):e143.

Faraone-Mennella M.R., Gambacorta A., Nicolaus B., Farina B. 1998. Purification and biochemical characterization of a poly(ADP-ribose) polymerase-like enzyme from the thermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Biochem J.* 1998. 335 (Pt 2):441-7.

Fazi B., Bursch W., Fimia G.M., Nardacci R., Piacentini M., Di Sano F., Piredda L. 2008. Fenretinide induces autophagic cell death in caspase-defective breast cancer cells. *Autophagy.* 2008. 4(4):435-41.

Filipovic D.M., Meng X., Reeves W.B. 1999 . Inhibition of PARP prevents oxidant-induced necrosis but not apoptosis in LLC-PK1 cells. *Am J Physiol.* 1999 . 277(3 Pt 2):F428-36.

Fisher A.E., Hohegger H., Takeda S., Caldecott K.W. 2007 . Poly(ADP-ribose) polymerase 1 accelerates single-strand break repair in concert with poly(ADP-ribose)glycohydrolase. *Mol Cell Biol.* 2007 . 27(15):5597-605.

Fowles J., Dybing E. 2003. Application of toxicological risk assessment principles to the chemical constituents of cigarette smoke. *Tob Control.* 2003. 12(4):424-30.

Francis G.E., Gray D.A., Berney J.J., Wing M.A., Guimaraes J.E., Hoffbrand A.V. 1983. Role of ADP-ribosyl transferase in differentiation of human granulocyte-macrophage progenitors to the macrophage lineage. *Blood.* 1983. 62(5):1055-62.

Friedenstein A.J., Gorskaja J.F., Kulagina N.N. Sep. 1976 . Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol.* 1976 . 4(5):267-74.

Fujita H., Yamamoto M., Ogino T., Kobuchi H., Ohmoto N., Aoyama E., Oka T., Nakanishi T., Inoue K., Sasaki J. 2014. Necrotic and apoptotic cells serve as nuclei for calcification on osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells in vitro. *Cell Biochem Funct.* . 2014. 32(1):77-86.

Gagné J.P., Isabelle M., Lo K.S., Bourassa S., Hendzel M.J., Dawson V.L., Dawson T.M., Poirier G.G. 2008. Proteome-wide identification of poly(ADP-ribose) binding proteins and poly(ADP-ribose)-associated protein complexes. *Nucleic Acids Res.* 2008. 36(22):6959-76.

Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, Dawson TM, Dawson VL, El-Deiry WS, Fulda S, Gottlieb E, Green DR, Hengartner MO, Kepp O, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Lu X, Madeo F, Malorni W, Mehlen P, Nuñez G, Peter ME, ... 2012. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ.* 2012. 19(1):107-20.

Gangl K., Reininger R., Bernhard D., Campana R., Pree I., Reisinger J., Kneidinger M., Kundi M., Dolznig H., Thurnher D., Valent P., Chen K.W., Vrtala S., Spitzauer S., Valenta R., Niederberger V. 2009. Cigarette smoke facilitates allergen penetration across respiratory epithelium. *Allergy.* 2009. 64(3):398-405.

Gao F., Kwon S.W., Zhao Y., Jin Y. 2009. PARP1 poly(ADP-ribosyl)ates Sox2 to control Sox2 protein levels and FGF4 expression during embryonic stemcell differentiation. *J Biol Chem.* 2009. 284(33):22263-73.

Gibson B.A., Kraus W.L. 2012. New insights into the molecular and cellular functions of poly(ADP-ribose) and PARPs. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012. 13(7):411-24.

Giustina A., Mazziotti G., Canalis E. 2008 . Growth hormone, insulin-like growth factors, and the skeleton. *Endocr Rev.* 2008 . 29(5):535-59.

Gottschalk A.J., Timinszky G., Kong S.E., Jin J., Cai Y., Swanson S.K., Washburn M.P., Florens L., Ladurner A.G., Conaway J.W., Conaway R.C. 2009. Poly(ADP-ribosyl)ation directs recruitment and activation of an ATP-dependent chromatin remodeler. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009. 106(33):13770-4.

Grabarz A., Barascu A., Guirouilh-Barbat J., Lopez B.S. 2012. Initiation of DNA double strand break repair: signaling and single-stranded resection dictate the choice between homologous recombination, non-homologous end-joining and alternative end-joining. *Am J Cancer Res.* 2012. 2(3):249-68.

Gradwohl G., Ménissier de Murcia J.M., Molinete M., Simonin F., Koken M., Hoeijmakers J.H., de Murcia G. 1990. The second zinc-finger domain of poly(ADP-ribose) polymerase determines specificity for single-stranded breaks in DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990. 87(8):2990-4.

Guo X., Carroll J.W., Macdonald M.R., Goff S.P., Gao G. 2004. The zinc finger antiviral protein directly binds to specific viral mRNAs through the CCCH zinc finger motifs. *J Virol.* 2004. 78(23):12781-7.

- Ha H.C., Snyder S.H. 1999.** Poly(ADP-ribose) polymerase is a mediator of necrotic cell death by ATP depletion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999. 96(24):13978-82.
- Hackett N.R., Heguy A., Harvey B.G., O'Connor T.P, Luettich K., Flieder D.B., Kaplan R., Crystal R.G. 2003 .** Variability of antioxidant-related gene expression in the airway epithelium of cigarette smokers. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2003 . 29(3 Pt 1):331-43.
- Hageman G.J., Stierum R.H., van Herwijnen M.H., van der Veer M.S., Kleinjans J.C. 1998.** Nicotinic acid supplementation: effects on niacin status, cytogenetic damage, and poly(ADP-ribosylation) in lymphocytes of smokers. *Nutr Cancer.* 1998. 32(2):113-20.
- Haince J.F., Kozlov S., Dawson V.L., Dawson T.M., Hendzel M.J., Lavin M.F., Poirier G.G. 2007.** Ataxia telangiectasia mutated (ATM) signaling network is modulated by a novel poly(ADP-ribose)-dependent pathway in the early response to DNA-damaging agents. *J Biol Chem.* 2007. 282(22):16441-53.
- Harris J.L., Jakob B., Taucher-Scholz G., Dianov G.L., Becherel O.J., Lavin M.F. 2009.** Aprataxin, poly-ADP ribose polymerase 1 (PARP-1) and apurinic endonuclease 1 (APE1) function together to protect the genome against oxidative damage . *Hum Mol Genet.* 2009. 18(21).
- Hass R., Kasper C., Böhm S., Jacobs R. 2011 .** Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Commun Signal.* 2011 . 9:12.
- Hassa P.O., Covic M., Hasan S., Imhof R., 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.* 2001. 276(49):45588-97.
- Hassa P.O., Haenni S.S., Buerki C., Meier N.I., Lane W.S., Owen H., Gersbach M., Imhof R., Hottiger M.O. 2005.** Acetylation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 by p300/CREB-binding protein regulates coactivation of NF-kappaB-dependent transcription. *J Biol Chem.* 2005. 280(49):40450-64.
- Heale J.T., Ball A.R. Jr., Schmiesing J.A., Kim J.S., Kong X., Zhou S., Hudson D.F., Earnshaw W.C., Yokomori K. 2006.** Condensin I interacts with the PARP-1-XRCC1 complex and functions in DNA single-strand break repair. *Mol Cell.* 2006. 21(6):837-48.
- Hegedus C., Lakatos P., Oláh G., Tóth B.I., Gergely S., Szabó E., Bíró T., Szabó C., Virág L. 2008.** Protein kinase C protects from DNA damage-induced necrotic cell death by inhibiting poly(ADP-ribose) polymerase-1. *FEBS Lett.* 2008. 582(12):1672-8.
- Herceg Z., Wang Z.Q. 1999.** Failure of poly(ADP-ribose) polymerase cleavage by caspases leads to induction of necrosis and enhanced apoptosis. *Mol Cell Biol.* 1999. 19(7):5124-33.
- Hottiger M.O., Hassa P.O., Lüscher B., Schüler H., Koch-Nolte F. 2010.** Toward a unified nomenclature for mammalian ADP-ribosyltransferases. *Trends Biochem Sci.* 2010. 35(4):208-19.

Huber A., Bai P., de Murcia J.M., de Murcia G. 2004. PARP-1, PARP-2 and ATM in the DNA damage response: functional synergy in mouse development. *DNA Repair (Amst)*. 2004. 3(8-9):1103-8.

Hwang J.W., Chung S., Sundar I.K., Yao H., Arunachalam G., McBurney M.W., Rahman I. 2010 . Cigarette smoke-induced autophagy is regulated by SIRT1 PARP-1-dependent mechanism: implication in pathogenesis of COPD. *Arch Biochem Biophys*. 2010 . 500(2):203-9.

Ikejima M., Noguchi S., Yamashita R., Ogura T., Sugimura T., Gill D.M., Miwa M. 1990. The zinc fingers of human poly(ADP-ribose) polymerase are differentially required for the recognition of DNA breaks and nicks and the consequent enzyme activation. Other structures recognize intact DNA. *J Biol Chem*. 1990. 265(35):21907-13.

Imamura M., Waseda Y., Marinova G.V., Ishibashi T., Obayashi S., Sasaki A., Nagai A., Azuma H. 2007 . Alterations of NOS, arginase, and DDAH protein expression in rabbit cavernous tissue after administration of cigarette smoke extract. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2007 . 293(5):R2081-9.

Ishii T., Matsuse T., Igarashi H., Masuda M., Teramoto S., Ouchi Y. 2001. Tobacco smoke reduces viability in human lung fibroblasts: protective effect of glutathione S-transferase P1. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2001. 280(6):L1189-95.

James A.W., Leucht P., Levi B., Carre A.L., Xu Y., Helms J.A., Longaker M.T. 2010 . Sonic Hedgehog influences the balance of osteogenesis and adipogenesis in mouse adipose-derived stromal cells. *Tissue Eng Part A*. 2010 . 16(8):2605-16.

James A.W., Pang S., Askarinam A., Corselli M., Zara J.N., Goyal R., Chang L., Pan A., Shen J., Yuan W., Stoker D., Zhang X., Adams J.S., Ting K., Soo C. 2012 . Additive effects of sonic hedgehog and Nell-1 signaling in osteogenic versus adipogenic differentiation of human adipose-derived stromal cells. *Stem Cells Dev*. 2012 . 21(12):2170-8.

Javed A., Chen H., Ghori F.Y. 2010. Genetic and transcriptional control of bone formation. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am*. 2010. 22(3):283-93.

Jensen E.D., Gopalakrishnan R., Westendorf J.J. 2010. Regulation of gene expression in osteoblasts. *Biofactors*. 2010. 36(1):25-32.

Ji Y., Tulin A.V. 2009 . Poly(ADP-ribosyl)ation of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins modulates splicing. *Nucleic Acids Res*. 2009 . 37(11):3501-13.

Jiao Z X., Ao Q.L., Xiong M.,. 2006 . Cigarette smoke extract inhibits the proliferation of alveolar epithelial cells and induces apoptosis. *Sheng Li Xue Bao*. 2006 . 58(3):244-54.

Ju B.G., Rosenfeld M.G. 2006. A breaking strategy for topoisomerase IIbeta/PARP-1-dependent regulated transcription. *Cell Cycle*. 2006. 5(22):2557-60.

- Ju B.G., Solum D., Song E.J., Lee K.J., Rose D.W., Glass C.K., Rosenfeld M.G. 2004 .** Activating the PARP-1 sensor component of the groucho/ TLE1 corepressor complex mediates a CaMKinase II δ -dependent neurogenic gene activation pathway. *Cell*. 2004 . 119(6):815-29.
- Kaminker P.G., Kim S.H., Taylor R.D., Zebarjadian Y., Funk W.D. 2001.** TANK2, a new TRF1-associated poly(ADP-ribose) polymerase, causes rapid induction of cell death upon overexpression. *J Biol Chem*. 2001. 276: 35891–35899.
- Kamp D.W., Srinivasan M., Weitzman S.A. 2001.** Cigarette smoke and asbestos activate poly-ADP-ribose polymerase in alveolar epithelial cells. *J Investig Med*. 2001. 49(1):68-76.
- Karras G.I., Kustatscher G., Buhecha H.R., Allen M.D., Pugieux C., Sait F., Bycroft M., Ladurner A.G. 2005.** The macro domain is an ADP-ribose binding module. *EMBO J*. 2005. 24(11):1911-20.
- Kaufmann S.H., Desnoyers S., Ottaviano Y., Davidson N.E., Poirier G.G. 1993.** Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res*. 1993. 53(17):3976-85.
- Kauppinen T.M., Chan W.Y., Suh S.W., Wiggins A.K., Huang E.J., Swanson R.A. 2006.** Direct phosphorylation and regulation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 by extracellular signal-regulated kinases 1/2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006. 103(18):7136-41.
- Keatings V.M., Collins P.D., Scott D.M., Barnes P.J. 1996.** Differences in interleukin-8 and tumor necrosis factor- α in induced sputum from patients with chronic obstructive pulmonary disease or asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996. 153(2):530-4.
- Kent L., Smyth L., Clayton C., Scott L., Cook T., Stephens R., Fox S., Hext P., Farrow S., Singh D. 2008 .** Cigarette smoke extract induced cytokine and chemokine gene expression changes in COPD macrophages. *Cytokine*. 2008 . 42(2):205-16.
- Kickhoefer V.A., Siva A.C., Kedersha N.L., Inman E.M., Ruland C., Streuli M., Rome L.H. 1999.** The 193-kD vault protein, VPARP, is a novel poly(ADP-ribose) polymerase. *J Cell Biol*. 1999. 146(5):917-28.
- Kim H.P., Wang X., Chen Z.H., Lee S.J., Huang M.H., Wang Y., Ryter S.W., Choi A.M. 2008 .** Autophagic proteins regulate cigarette smoke induced apoptosis: protective role of heme oxygenase-1. *Autophagy*. 2008 . 4(7):887-95.
- Kim J.W., Kim K., Kang K., Joe C.O. 2000.** Inhibition of homodimerization of poly(ADP-ribose) polymerase by its C-terminal cleavage products produced during apoptosis. *J Biol Chem*. 2000. 275(11):8121-5.
- Kim K.S., Choi H.W., Yoon H.E., Kim I.Y. 2010 .** Reactive oxygen species generated by NADPH oxidase 2 and 4 are required for chondrogenic differentiation. *J Biol Chem*. 2010 . 285(51):40294-302.

- Kim M.Y., Mauro S., Gévry N., Lis J.T., Kraus W.L. 2004 .** NAD⁺-dependent modulation of chromatin structure and transcription by nucleosome binding properties of PARP-1. *Cell*. 2004 . 119(6):803-14.
- Kim M.Y., Zhang T., Kraus W.L. 2005.** Poly(ADP-ribosyl)ation by PARP-1: 'PAR-laying' NAD⁺ into a nuclear signal. *Genes Dev*. 2005. 19(17):1951-67.
- Kinnula V.L., Crapo J.D. 2003 .** Superoxide dismutases in the lung and human lung diseases. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003 . 167(12):1600-19.
- Kode A., Rajendrasozhan S., Caito S., Yang S.R., Megson I.L., Rahman I. 2008 .** Resveratrol induces glutathione synthesis by activation of Nrf2 and protects against cigarette smoke-mediated oxidative stress in human lung epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008 . 294(3):L478-88.
- Kode A., Yang S.R., Rahman I. 2006.** Differential effects of cigarette smoke on oxidative stress and proinflammatory cytokine release in primary human airway epithelial cells and in a variety of transformed alveolar epithelial cells. *Respir Res*. 2006. 7:132.
- Koh D.W., Lawler A.M., Poitras M.F., Sasaki M., Wattler S., Nehls M.C., Stöger T., Poirier G.G., Dawson V.L., Dawson T.M. 2004.** Failure to degrade poly(ADP-ribose) causes increased sensitivity to cytotoxicity and early embryonic lethality. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004. 101(51):17699-704.
- Kotova E., Lodhi N., Jarnik M., Pinnola A.D., Ji Y., Tulin A.V. 2011 .** Drosophila histone H2A variant (H2Av) controls poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1) activation in chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 . 108(15):6205-10.
- Kroemer G., Levine B. 2008 .** Autophagic cell death: the story of a misnomer. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008 . 9(12):1004-10.
- Kulkarni R., Rampersaud R., Aguilar J.L., Randis T.M., Kreindler J.L., Ratner A.J. 2010.** Cigarette smoke inhibits airway epithelial cell innate immune responses to bacteria. *Infect Immun*. 2010. 78(5):2146-52.
- Küpper J.H., Müller M., Jacobson M.K., Tatsumi Miyajima J., Coyle D.L., Jacobson E.L., Bürkle A. 1995.** trans-dominant inhibition of poly(ADP-ribosyl)ation sensitizes cells against gamma-irradiation and N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine but does not limit DNA replication of a polyomavirus replicon. *Mol Cell Biol*. 1995. 15(6):3154-63.
- Lai C.F., Shao J.S., Behrmann A., Krcma K., Cheng S.L., Towler D.A. 2012 .** TNFR1-activated reactive oxidative species signals up-regulate osteogenic Msx2 programs in aortic myofibroblasts. *Endocrinology*. 2012 . 153(8):3897-910.
- Lamplot J.D., Qin J., Nan G., Wang J., Liu X., Yin L., Tomal J., Li R., Shui W., Zhang H., Kim S.H., Zhang W., Zhang J., Kong Y., Denduluri S., Rogers M.R., Pratt A., Haydon R.C., Luu H.H., Angeles J., Shi L.L., He T.C. 2013.** BMP9 signaling in stem cell differentiation and osteogenesis. *Am J Stem Cells*. 2013. 2(1):1-21.

Langelier M.F., Pascal J.M. 2013. PARP-1 mechanism for coupling DNA damage detection to poly(ADP-ribose) synthesis. *Curr Opin Struct Biol.* 2013. 23(1):134-43.

Langelier M.F., Planck J.L., Roy S., Pascal J.M. 2011 . Crystal structures of poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) zinc fingers bound to DNA: structural and functional insights into DNA-dependent PARP-1 activity. *J Biol Chem.* 2011 . 286(12):10690-701. kötet.

Langelier M.F., Servent K.M., Rogers E.E., Pascal J.M. 2008. A third zinc-binding domain of human poly(ADP-ribose) polymerase-1 coordinates DNA-dependent enzyme activation. *J Biol Chem.* 2008. 283(7):4105-14.

Lavrik O.I., Prasad R., Sobol R.W., Horton J.K., Ackerman E.J., Wilson S.H. 2001. Photoaffinity labeling of mouse fibroblast enzymes by a base excision repair intermediate. Evidence for the role of poly(ADP-ribose) polymerase-1 in DNA repair. *J Biol Chem.* 2001. 276(27):25541-8.

Li C.J., Ning W., Matthay M.A., Feghali-Bostwick C.A., Choi A.M. 2007. MAPK pathway mediates EGR-1-HSP70-dependent cigarette smoke-induced chemokine production. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2007. 292(5):L1297-303.

Liaudet L., Szabó E., Timashpolsky L., Virág L., Cziráki A., Szabó C. 2001. 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.* 2001. 133(8):1424-30.

Liu X., Conner H., Kobayashi T., Kim H., Wen F., Abe S., Fang Q., Wang X., Hashimoto M., Bitterman P., Rennard S.I. 2005 . Cigarette smoke extract induces DNA damage but not apoptosis in human bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2005 . 33(2):121-9.

Liu X.D., Zhu Y.K., Umino T., Spurzem J.R., Romberger D.J., Wang H., Reed E., Rennard S.I. 2001. Cigarette smoke inhibits osteogenic differentiation and proliferation of human osteoprogenitor cells in monolayer and three-dimensional collagen gel culture. *J Lab Clin Med.* 2001. 137(3):208-19.

Liu Y., Snow B.E., Kickhoefer V.A., Erdmann N., Zhou W., Wakeham A., Gomez M., Rome .L.H., Harrington L. 2004. Vault poly(ADP-ribose) polymerase is associated with mammalian telomerase and is dispensable for telomerase function and vault structure in vivo. *Mol Cell Biol.* 2004. 24(12):5314-23.

Liu Z., Lenardo M.J. 2007. Reactive oxygen species regulate autophagy through redox-sensitive proteases. *Dev Cell.* 2007. 12(4):484-5.

Lixuan Z., Jingcheng D., Wenqin Y., Jianhua H., Baojun L., Xiaotao F. 2010. Baicalin attenuates inflammation by inhibiting NF-kappaB activation in cigarette smoke induced inflammatory models. *Pulm Pharmacol Ther.* 2010. 23(5):411-9.

- Lonskaya I., Potaman V.N., Shlyakhtenko L.S., Oussatcheva E.A., Lyubchenko Y.L., Soldatenkov V.A. 2005.** Regulation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 by DNA structure-specific binding. *J Biol Chem.* 2005. 280(17):17076-83.
- Loseva O., Jemth A.S., Bryant H.E., Schüler H., Lehtiö L., Karlberg T., Helleday T. 2010.** PARP-3 is a mono-ADP-ribosylase that activates PARP-1 in the absence of DNA. *J Biol Chem.* 2010. 285(11):8054-60.
- Luijsterburg M.S., Lindh M., Acs K., Vrouwe M.G., Pines A., van Attikum H., Mullenders L.H., Dantuma N.P. 2012 .** DDB2 promotes chromatin decondensation at UV-induced DNA damage. *J Cell Biol.* 2012 . 197(2):267-81.
- Lyons R.J., Deane R., Lynch D.K., Ye Z.S., Sanderson G.M., Eyre H.J., Sutherland G.R., Daly R.J. 2001.** Identification of a novel human tankyrase through its interaction with the adaptor protein Grb14. *J Biol Chem.* 2001. 276(20):17172-80.
- Ma Q., Baldwin K.T., Renzelli A.J., McDaniel A., Dong L. 2001.** TCDD-inducible poly(ADP-ribose) polymerase: a novel response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001. 289(2):499-506.
- Mandal C.C., Ganapathy S., Gorin Y., Mahadev K., Block K., Abboud H.E., Harris S.E., Ghosh-Choudhury G., Ghosh-Choudhury N. 2011.** Reactive oxygen species derived from Nox4 mediate BMP2 gene transcription and osteoblast differentiation. *Biochem J.* 2011. 433(2):393-402.
- Matsuo R., Murayama A., Saitoh Y., Sakaki Y., Inokuchi K. 2000.** Identification and cataloging of genes induced by long-lasting long-term potentiation in awake rats. *J Neurochem.* 2000. 74(6):2239-49.
- Mendoza-Alvarez H., Alvarez-Gonzalez R. 2001.** Regulation of p53 sequence-specific DNA-binding by covalent poly(ADP ribosyl)ation. *J Biol Chem.* 2001. 276(39):36425-30.
- Meyer R.G., Meyer-Ficca M.L., Jacobson E.L., Jacobson M.K. 2006.** Enzymes in poly(ADP-ribose) metabolism. *in: Poly(ADP-ribose)ylation edited by Alexander Bürkle.* TX, USA : Landes Biscience and Springer Science, 2006.
- Meyer R.G., Meyer-Ficca M.L., Whatcott C.J., Jacobson E.L., Jacobson M.K. 2007.** Two small enzyme isoforms mediate mammalian mitochondrial poly(ADP-ribose) glycohydrolase (PARG) activity. *Exp Cell Res.* 2007. 313(13):2920-36.
- Meyer-Ficca M.L., Meyer R.G., Coyle D.L., Jacobson E.L., Jacobson M.K. 2004.** Human poly(ADP-ribose) glycohydrolase is expressed in alternative splice variants yielding isoforms that localize to different cell compartments. *Exp Cell Res.* 2004. 297(2):521-32.
- Minaga T., Kun E. 1983.** Probable helical conformation of poly(ADP-ribose). The effect of cations on spectral properties. *J Biol Chem.* 1983. 258(9):5726-30.

- Mio T., Romberger D.J., Thompson A.B., Robbins R.A., Heires A., Rennard S.I. 1997.** Cigarette smoke induces interleukin-8 release from human bronchial epithelial cells. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997. 155(5):1770-6.
- Monz, D., Munnia, A., Comtesse, N., Fischer, U., Steudel, W. I., Feiden, W., Glass, B., Meese, E. U. 2001.** Novel tankyrase-related gene detected with meningioma-specific sera. *Clin. Cancer Res.* 2001. 7(1):113-9..
- Mortaz E., Lazar Z., Koenderman L., Kraneveld A.D., Nijkamp F.P., Folkerts G. 2009.** Cigarette smoke attenuates the production of cytokines by human plasmacytoid dendritic cells and enhances their release of IL-8 in response to TLR-9 stimulation. *Respir Res.* 2009. 10:47.
- Mortusewicz O., Amé J.C., Schreiber V., Leonhardt H. 2007.** Feedback-regulated poly(ADP-ribosylation) by PARP-1 is required for rapid response to DNA damage in living cells. *Nucleic Acids Res.* 2007. 35(22):7665-75.
- Moubarak R.S., Yuste V.J., Artus C., Bouharrou A., Greer P.A., Menissier-de Murcia J., Susin S.A. 2007.** Sequential activation of poly(ADP-ribose) polymerase 1, calpains, and Bax is essential in apoptosis-inducing factor-mediated programmed necrosis. *Mol Cell Biol.* 2007. 27(13):4844-62.
- Muñoz-Gámez J.A., Rodríguez-Vargas J.M., Quiles-Pérez R., Aguilar-Quesada R., Martín-Oliva D., de Murcia G., Menissier de Murcia J., Almendros A., Ruiz de Almodóvar M., Oliver F.J. 2009.** PARP-1 is involved in autophagy induced by DNA damage. *Autophagy.* 2009. 5(1):61-74.
- Nakamoto T., Yasuda K., Yasuhara M., Nakajima T., Mizokami T., Okada H., Kanzaki H. 2006 .** Cigarette smoke extract enhances oxytocin-induced rhythmic contractions of rat and human preterm myometrium. *Reproduction.* 2006 . 132(2):343-53.
- Nakanishi S., Uyeki E.M. 1985 .** Benzamide on chondrocytic differentiation in chick limb bud cell culture. *J Embryol Exp Morphol.* 1985 . 85:163-75.
- Niere M., Mashimo M., Agledal L., Dölle C., Kasamatsu A., Kato J., Moss J., Ziegler M. 2012.** ADP-ribosylhydrolase 3 (ARH3), not poly(ADP-ribose) glycohydrolase(PARG) isoforms, is responsible for degradation of mitochondrial matrix-associated poly(ADP-ribose). *J Biol Chem.* 2012. 287(20):16088-102.
- Nishio E., Watanabe Y. 1997.** Cigarette smoke extract inhibits plasma paraoxonase activity by modification of the enzyme's free thiols. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997. 236(2):289-93.
- Nishizuka Y., Ueda K., Nakazawa K., Hayaishi O. 1967.** Studies on the polymer of adenosine diphosphate ribose. I. Enzymic formation from nicotinamide adenine dinucleotide in mammalian nuclei. *J Biol Chem.* 1967. 242(13):3164-71.

- Noren Hooten N., Kompaniez K., Barnes J., Lohani A., Evans M.K. 2011.** Poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP-1) binds to 8-oxoguanine-DNA glycosylase (OGG1). *J Biol Chem.* 2011. 286(52):44679-90.
- Ogata N., Ueda K., Kagamiyama H., Hayaishi O. 1980.** ADP-ribosylation of histone H1. Identification of glutamic acid residues 2, 14, and the COOH-terminal lysine residue as modification sites. *J Biol Chem.* 1980. 255(16):7616-20.
- Ohashi Y., Ueda K., Kawaichi M., Hayaishi O. 1983.** Activation of DNA ligase by poly(ADP-ribose) in chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1983. 80(12):3604-7.
- Oka S., Kato J., Moss J. 2006.** Identification and characterization of a mammalian 39-kDa poly(ADP-ribose) glycohydrolase. *J Biol Chem.* 2006. 281(2):705-13.
- Oliver F.J., de la Rubia G., Rolli V., Ruiz-Ruiz M.C., de Murcia G., Murcia J.M. 1998.** Importance of poly(ADP-ribose) polymerase and its cleavage in apoptosis. Lesson from an uncleavable mutant. *J Biol Chem.* 1998. 273(50):33533-9.
- Oliver F.J., Ménissier-de Murcia J., Nacci C., Decker P., Andriantsitohaina R., Muller S., de la Rubia G., Stoclet J.C., 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.* 1999. 18(16):4446-54.
- Onizawa S., Aoshiba K., Kajita M., Miyamoto Y., Nagai A. 2009 .** Platinum nanoparticle antioxidants inhibit pulmonary inflammation in mice exposed to cigarette smoke. *Pulm Pharmacol Ther.* 2009 . 22(4):340-9.
- Orosz Z., Csiszar A., Labinskyy N., Smith K., Kaminski P.M., Ferdinandy P., Wolin M.S., Rivera A., Ungvari Z. 2007.** Cigarette smoke-induced proinflammatory alterations in the endothelial phenotype: role of NAD(P)H oxidase activation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007. 292(1):H130-9.
- Ota Y., Kugiyama K., Sugiyama S., Ohgushi M., Matsumura T., Doi H., Ogata N., Oka H., Yasue H. 1997.** Impairment of endothelium-dependent relaxation of rabbit aortas by cigarette smoke extract—role of free radicals and attenuation by captopril. *Atherosclerosis.* 1997. 131(2):195-202.
- Otto H., Reche P.A., Bazan F., Dittmar K., Haag F., Koch-Nolte F. 2005.** In silico characterization of the family of PARP-like poly(ADP-ribosyl)transferases (pARTs). *BMC Genomics.* 2005. 6:139.
- Pacher P., Liaudet L., Bai P., Virag L., Mabley J.G., Haskó G., Szabó C. 2002.** Activation of poly(ADP-ribose) polymerase contributes to development of doxorubicin-induced heart failure. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002. 300(3):862-7.
- Panda K., Chattopadhyay R., Chattopadhyay D.J., Chatterjee I.B. 2000 .** Vitamin C prevents cigarette smoke-induced oxidative in vivo. *Free Radic Biol Med.* 2000 . 29(2):115-24.

- Payne C.M., Crowley C., Washo-Stultz D., Briehl M., Bernstein H., Bernstein C., Beard S., Holubec H., Warneke J. 1998.** The stress-response proteins poly(ADP-ribose) polymerase and NF-kappaB protect against bile salt-induced apoptosis. *Cell Death Differ.* 1998. 5(7):623-36.
- Pellat-Deceunynck C., Wietzerbin J., Drapier J.C. 1994 .** Nicotinamide inhibits nitric oxide synthase mRNA induction in activated macrophages. *Biochem J.* 1994 . 297 (Pt 1):53-8.
- Perfetti T.A., Rodgman A. 2011.** The Complexity of Tobacco and Tobacco Smoke. *Beiträge zur Tabakforschung International/Contributions to Tobacco Research.* 2011. 24:215–32.
- Phipps J.C., Aronoff D.M., Curtis J.L., Goel D., O'Brien E., Mancuso P. 2010.** Cigarette smoke exposure impairs pulmonary bacterial clearance and alveolar macrophage complement-mediated phagocytosis of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun.* 2010. 78(3):1214-20.
- Pines A., Vrouwe M.G., Marteiijn J.A., Typas D., Luijsterburg M.S., Cansoy M., Hensbergen P., Deelder A., de Groot A., Matsumoto S., Sugawara K., Thoma N., Vermeulen W., Vrieling H, Mullenders L. 2012.** PARP1 promotes nucleotide excision repair through DDB2 stabilization and recruitment of ALC1. *J Cell Biol.* 2012. 199(2):235-49.
- Pinnola A., Naumova N., Shah M., Tulin A.V. 2007.** Nucleosomal core histones mediate dynamic regulation of poly(ADP-ribose) polymerase 1 protein binding to chromatin and induction of its enzymatic activity. *J Biol Chem.* 2007. 282(44):32511-9.
- Poirier G.G., de Murcia G., Jongstra-Bilen J., Niedergang C., Mandel P. 1982.** Poly(ADP-ribosylation) of polynucleosomes causes relaxation of chromatin structure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1982. 79(11):3423-7.
- Prasad R., Lavrik O.I., Kim S.J., Kedar P., Yang X.P., Vande Berg B.J., Wilson S.H. 2001.** DNA polymerase beta -mediated long patch base excision repair. Poly(ADP-ribose)polymerase-1 stimulates strand displacement DNA synthesis. *J Biol Chem.* 2001. 276(35):32411-4.
- Pryor W.A., Prier D.G., Church D.F. 1983 .** Electron-spin resonance study of mainstream and sidestream cigarette smoke: nature of the free radicals in gas-phase smoke and in cigarette tar. *Environ Health Perspect.* 1983 . 47:345-55.
- Qu Z., Fujimoto S., 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.* 1994. 269(8):5543-7.
- Ramage L., Jones A.C., Whelan C.J. 2006.** Induction of apoptosis with tobacco smoke and related products in A549 lung epithelial cells in vitro. *J Inflamm (Lond).* 2006. 3:3.

- Ray S.D., Sorge C.L., Kamendulis L.M., 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.* 1992. 263(1):38.
- Reale A., Matteis G.D., Galleazzi G., Zampieri M., Caiafa P. 2005.** Modulation of DNMT1 activity by ADP-ribose polymers. *Oncogene.* 2005. 24(1):13-9.
- Richter A., O'Donnell R.A., Powell R.M., Sanders M.W., Holgate S.T., Djukanović R., Davies D.E. 2002 .** Autocrine ligands for the epidermal growth factor receptor mediate interleukin-8 release from bronchial epithelial cells in response to cigarette smoke. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2002 . 27(1):85-90.
- Robaszkiewicz A., Valkó Z., Kovács K., Hegedűs C., Bakondi E., Bai P., Virág L. 2014.** The role of p38 signaling and poly(ADP-ribosyl)ation-induced metabolic collapse in the osteogenicdifferentiation-coupled cell death pathway. *Free Radic Biol Med.* 2014. 76C:69-79.
- Robert I., Karicheva O., Reina San Martin B., Schreiber V., Dantzer F. 2013.** Functional aspects of PARylation in induced and programmed DNA repair processes: preserving genome integrity and modulating physiological events. *Mol Aspects Med.* 2013. 34(6):1138-52.
- Robu M., Shah R.G., Petitclerc N., Brind'Amour J., Kandan-Kulangara F., Shah G.M. 2013.** Role of poly(ADP-ribose) polymerase-1 in the removal of UV-induced DNA lesions by nucleotide excision repair. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013. 110(5):1658-63.
- Roemer E., Schorp M.K., Piadé J.J., Seeman J.I., Leyden D.E., Haussmann H.J. 2012 .** Scientific assessment of the use of sugars as cigarette tobacco ingredients: a review of published and other publicly available studies. *Crit Rev Toxicol.* 2012 . 42(3):244-78.
- Rouleau M., Aubin R.A., Poirier G.G. 2004.** Poly(ADP-ribosyl)ated chromatin domains: access granted. *J Cell Sci.* 2004. 117(Pt 6):815-25.
- Sambucci M., Laudisi F., Novelli F., Bennici E., Rosado M.M., Pioli C. 2013.** Effects of PARP-1 deficiency on Th1 and Th2 cell differentiation. *ScientificWorldJournal.* 2013. 2013:375024.
- Sawaya R., Schwer B., Shuman S. 2005.** Structure-function analysis of the yeast NAD⁺-dependent tRNA 2'-phosphotransferase Tpt1. *RNA.* 2005. 11(1):107-13. kötet.
- Scherz-Shouval R., Shvets E., Fass E., Shorer H., Gil L., Elazar Z. 2007 .** Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. *EMBO J.* 2007 . 26(7):1749-60.
- Schreiber V., Amé J.C., Dollé P., Schultz I., Rinaldi B., Fraulob V., Ménissier-de Murcia J., de Murcia G. 2002.** Poly(ADP-ribose) polymerase-2 (PARP-2) is required for efficient base excision DNA repair in association withPARP-1 and XRCC1. *J Biol Chem.* 2002. 277(25):23028-36.

- Schreiber V., Ricoul M., Amé J.C., Dantzer F., Meder V., Spenlehauer C., Stiegel P., Niedergang C., Sabatier L., Favaudon V., Menissier-de Murcia J., de Murcia G. 2006.** PARP-2: Structure-function relationship. *in: Poly(ADP-ribosyl)ation edited by Alexander Bürkle.* TX USA : Landes Biscience and Springer Science, 2006.
- Schröder K., Wandzioch K., Helmcke I., Brandes R.P. 2009.** Nox4 acts as a switch between differentiation and proliferation in preadipocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009. 29(2):239-45.
- Scovassi A.I., Mariani C., Negroni M., Negri C., Bertazzoni U. 1993.** ADP-ribosylation of nonhistone proteins in HeLa cells: modification of DNA topoisomerase II. *Exp Cell Res.* 1993. 206(1):177-81.
- Shieh W.M., Amé J.C., Wilson M.V., Wang Z.Q., Koh D.W., Jacobson M.K., Jacobson E.L. 1998.** Poly(ADP-ribose) polymerase null mouse cells synthesize ADP-ribose polymers. *J Biol Chem.* 1998. 273(46):30069-72.
- Shin V.Y., Liu E.S., Koo M.W., Wang J.Y., Matsui H., Cho C.H. 2002.** Cigarette smoke extracts delay wound healing in the stomach: involvement of polyamine synthesis. *Exp Biol Med (Maywood).* 2002. 227(2):114-24.
- Shiokawa D., Maruta H., Tanuma S. 1997.** Inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase suppress nuclear fragmentation and apoptotic-body formation during apoptosis in HL-60 cells. *FEBS Lett.* 1997. 413(1):99-103.
- Shrivastav M., De Haro L.P., Nickoloff J.A. 2008.** Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. *Cell Res.* 2008. 18(1):134-47.
- Smith S., Gariat I., Schmitt A., de Lange T. 1998.** Tankyrase, a poly(ADPribose) polymerase at human telomeres. *Science.* 1998. 282:1484–1487.
- Soriano F.G., Pacher P., Mabley J., Liaudet L., Szabó C. 2001.** Rapid reversal of the diabetic endothelial dysfunction by pharmacological inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase. *Circ Res.* 2001. 89(8):684-91.
- Sosna J., Voigt S., Mathieu S., Lange A., Thon L., Davarnia P., Herdegen T., Linkermann A., Rittger A., Chan F.K., Kabelitz D., Schütze S., Adam D. 2014.** TNF-induced necroptosis and PARP-1-mediated necrosis represent distinct routes to programmed necrotic cell death. *Cell Mol Life Sci.* 2014. 71(2):331-48.
- Spinelli S.L., Malik H.S., Consaul S.A., Phizicky E.M. 1998.** A functional homolog of a yeast tRNA splicing enzyme is conserved in higher eukaryotes and in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998. 95(24):14136-41.
- Steiger M.A., Jackman J.E., Phizicky E.M. 2005.** Analysis of 2'-phosphotransferase (Tpt1p) from *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for a conserved two-step reaction mechanism. *RNA.* 2005. 11(1):99-106.

Ström C.E., Johansson F., Uhlén M., Szigyarto C.A., Erixon K., Helleday T. 2011 . Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) is not involved in base excision repair but PARP inhibition traps a single-strand intermediate. *Nucleic Acids Res.* 2011 . 39(8):3166-75.

Su Y., Han W., Giraldo C., De Li Y., Block E.R. 1998 . Effect of cigarette smoke extract on nitric oxide synthase in pulmonary artery endothelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1998 . 19(5):819-25.

Sugiura H., Liu X., Togo S., Kobayashi T., Shen L., Kawasaki S., Kamio K., Wang X.Q., Mao L.J., Rennard S.I. 2007. Prostaglandin E(2) protects human lung fibroblasts from cigarette smoke extract induced apoptosis via EP(2)receptor activation. *J Cell Physiol.* 2007. 210(1):99-110.

Sutra T., Morena M., Bargnoux A.S., Caporiccio B., Canaud B., Cristol J.P. 2008. Superoxide production: a procalcifying cell signalling event in osteoblastic differentiation of vascular smoothmuscle cells exposed to calcification media. *Free Radic Res.* 2008. 42(9):789-97.

Suzuki H., Quesada P., Farina B., Leone E. 1986. In vitro poly(ADP-ribosyl)ation of seminal ribonuclease. *J Biol Chem.* 1986. 261(13):6048-55.

Tagawa Y., Hiramatsu N., Kasai A., Hayakawa K., Okamura M., Yao J., Kitamura M. 2008. Induction of apoptosis by cigarette smoke via ROS-dependent endoplasmic reticulum stress and CCAAT/enhancer-binding protein-homologous protein (CHOP). *Free Radic Biol Med.* 2008. 45(1):50-9.

Tanuma S., Yagi T., 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.* 1985. 237(1):38-42.

Tao Z., Gao P., Hoffman D.W., Liu H.W. 2008. Domain C of human poly(ADP-ribose) polymerase-1 is important for enzyme activity and contains a novel zinc-ribbon motif. *Biochemistry.* 2008. 47(21):5804-13.

Tentori L., Balduzzi A., Portarena I., Levati L., Vernole P., Gold B., Bonmassar E., Graziani G. 2001 . Poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor increases apoptosis and reduces necrosis induced by a DNA minor groove binding methyl sulfonate ester. *Cell Death Differ.* 2001 . 8(8):817-28.

Thomas C., Tulin A.V. 2013. Poly-ADP-ribose polymerase: machinery for nuclear processes. *Mol Aspects Med.* 2013. 34(6):1124-37.

Thorne D., Adamson J. 2013. A review of in vitro cigarette smoke exposure systems. *Exp Toxicol Pathol.* 2013. 65(7-8):1183-93.

Tiitto L., Kaarteenaho-Wiik R., Sormunen R., Holmgren A., Pääkkö P., Soini Y., Kinnula V.L. 2003 . Expression of the thioredoxin system in interstitial lung disease. *J Pathol.* 2003 . 201(3):363-70.

Trucco C., Oliver F.J., de Murcia G., Ménissier-de Murcia J. 1998 . DNA repair defect in poly(ADP-ribose) polymerase-deficient cell lines. *Nucleic Acids Res.* 1998 . 26(11):2644-9.

V.L., Kinnula. 2005. Focus on antioxidant enzymes and antioxidant strategies in smoking related airway diseases. *Thorax.* 2005. 60(8):693-700.

van der Vliet A. 2006. Oxidative Modifications of Proteins and Lipids by Cigarette Smoke (CS). A Central Role for Unsaturated Aldehydes in CS-Mediated Airway Inflammation. *in: Cigarette smoke and oxidative stress edited by Barry B. Halliwell and Henrik E. Germany :* Springer, 2006.

van Zon A., Mossink M.H., Schoester M., Houtsmuller A.B., Scheffer G.L., Scheper R.J., Sonneveld P., Wiemer E.A. 2003. The formation of vault-tubes: a dynamic interaction between vaults and vault PARP. *J Cell Sci.* 2003. 116(Pt 21):4391-400.

Vassallo R., Kroening P.R., Parambil J., Kita H. 2008 . Nicotine and oxidative cigarette smoke constituents induce immune-modulatory and pro-inflammatory dendritic cell responses. *Mol Immunol.* 2008 . 45(12):3321-9.

Virág L., Robaszekiewicz A., Rodriguez-Vargas J.M., Oliver F.J. 2013. Poly(ADP-ribose) signaling in cell death. *Mol Aspects Med.* 2013. 34(6):1153-67.

Virág L., Salzman A.L., Szabó C. 1998a. Poly(ADP-ribose) synthetase activation mediates mitochondrial injury during oxidant-induced cell death. *J Immunol.* 1998a. 161(7):3753-9.

Virág L., Scott G.S., Cuzzocrea S., Marmer D., Salzman A.L., Szabó C. 1998b. Peroxynitrite-induced thymocyte apoptosis: the role of caspases and poly (ADP-ribose) synthetase (PARS) activation. *Immunology.* 1998b. 94(3):345-55.

Virág L., Szabó C. 2002. The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Pharmacol Rev.* 2002. 54(3):375-429.

Vodenicharov M.D., Sallmann F.R., Satoh M.S., Poirier G.G. 2000. Base excision repair is efficient in cells lacking poly(ADP-ribose) polymerase 1. *Nucleic Acids Res.* 2000. 28(20):3887-96.

Vyas S., Chesarone-Cataldo M., Todorova T., Huang Y.H., Chang P. 2013. A systematic analysis of the PARP protein family identifies new functions critical for cell physiology. *Nat Commun.* 2013. 4:2240.

Wang M., Wu W., Wu W., Rosidi B., Zhang L., Wang H., Iliakis G. 2006. PARP-1 and Ku compete for repair of DNA double strand breaks by distinct NHEJ pathways. *Nucleic Acids Res.* 2006. 34(21):6170-82.

Wang Y., Kim N.S., Haince J.F., Kang H.C., David K.K., Andrabi S.A., Poirier G.G., Dawson V.L., Dawson T.M. 2011. Poly(ADP-ribose) (PAR) binding to apoptosis-inducing factor is critical for PAR polymerase-1-dependent cell death (parthanatos). *Sci Signal.* 2011. 4(167):ra2.

- Wang Y., Kim N.S., Li X., Greer P.A., Koehler R.C., Dawson V.L., Dawson T.M. 2009.** Calpain activation is not required for AIF translocation in PARP-1-dependent cell death (parthanatos). *J Neurochem.* 2009. 110(2):687-96.
- Wang Z., Michaud G.A., Cheng Z., Zhang Y., Hinds T.R., Fan E., Cong F., Xu W. 2012.** Recognition of the iso-ADP-ribose moiety in poly(ADP-ribose) by WWE domains suggests a general mechanism for poly(ADP-ribosyl)ation-dependent ubiquitination. *Genes Dev.* 2012. 26(3):235-40.
- Wang Z.Q., Stingl L., Morrison C., Jantsch M., Los M., Schulze-Osthoff K., Wagner E.F. 1997 .** PARP is important for genomic stability but dispensable in apoptosis. *Genes Dev.* 1997 . 11(18):2347-58.
- Watson A.J., Askew J.N., Benson R.S. 1995 .** Poly(adenosine diphosphate ribose) polymerase inhibition prevents necrosis induced by H₂O₂ but not apoptosis. *Gastroenterology.* 1995 . 109(2):472-82.
- Watts J.A., Grattan R.M., Whitlow B.S., Kline J.A. 2001.** Activation of poly(ADP-ribose) polymerase in severe hemorrhagic shock and resuscitation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2001. 281(2):G498-506.
- Weaver A.N., Yang E.S. 2013.** Beyond DNA Repair: Additional Functions of PARP-1 in Cancer. *Front Oncol.* 2013. 3:290.
- Wesierska-Gadek J., Schmid G., 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.* 1996. 224(1):96-102.
- Wielckens K., George E., Pless T., Hilz H. 1983.** Stimulation of poly(ADP-ribosyl)ation during Ehrlich ascites tumor cell "starvation" and suppression of concomitant DNA fragmentation by benzamide. *J Biol Chem.* 1983. 258(7):4098-104.
- Wooten J.B., Chouchane S., McGrath T. E. 2006.** Tobacco Smoke Constituents Affecting Oxidative Stress. *innen: Cigarette Smoke and Oxidative Stress.* hely nélkül. : Springer Berlin Heidelberg, 2006.
- Wyatt M.D., Pittman D.L. 2006.** Methylating agents and DNA repair responses: Methylated bases and sources of strand breaks. *Chem Res Toxicol.* 2006. 19(12):1580-94.
- Xu Y., Huang S., Liu Z.G., Han J. 2006.** Poly(ADP-ribose) polymerase-1 signaling to mitochondria in necrotic cell death requires RIP1/TRAF2-mediated JNK1 activation. *J Biol Chem.* 2006. 281(13):8788-95.
- Yang S.R., Chida A.S., Bauter M.R., Shafiq N., Seweryniak K., Maggirwar S.B., Kilty I., Rahman I. 2006.** Cigarette smoke induces proinflammatory cytokine release by activation of NF- κ B and posttranslational modifications of histone deacetylase in macrophages. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2006. 291(1):L46-57.

Ying W., Chen Y., Alano C.C., Swanson R.A. 2002. Tricarboxylic acid cycle substrates prevent PARP-mediated death of neurons and astrocytes. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2002. 22(7):774-9.

Yoon J.H., Ahn S.G., Lee B.H., Jung S.H., Oh S.H. 2012. Role of autophagy in chemoresistance: regulation of the ATM-mediated DNA-damage signaling pathway through activation of DNA-PKcs and PARP-1. *Biochem Pharmacol.* 2012. 83(6):747-57.

Yoshihara K., Itaya A., Tanaka Y., Ohashi Y., Ito K., Teraoka H., Tsukada K., Matsukage A., Kamiya T. 1985. Inhibition of DNA polymerase alpha, DNA polymerase beta, terminal deoxynucleotidyl transferase, and DNA ligase II by poly(ADP-ribosylation) reaction in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 1985. 128(1):61-7.

Yu S.W., Wang Y., Frydenlund D.S., Ottersen O.P., Dawson V.L., Dawson T.M. 2009. Outer mitochondrial membrane localization of apoptosis-inducing factor: mechanistic implications for release. *ASN Neuro.* 2009. 1(5).

Zákány R., Bakondi E., Juhász T., Matta C., Sziógyártó Z., Erdélyi K., Szabó E., Módis L., Virág L., Gergely P. 2007 . Oxidative stress-induced poly(ADP-ribosylation) in chick limb bud-derived chondrocytes. *Int J Mol Med.* 2007 . 19(4):597-605.

Zampieri M., Passananti C., Calabrese R., Perilli M., Corbi N., De Cave F., Guastafierro T., Bacalini M.G., Reale A., Amicosante G., Calabrese L., Zlatanova J., Caiafa P. 2009. Parp1 localizes within the Dnmt1 promoter and protects its unmethylated state by its enzymatic activity. *PLoS One* . 2009. 4(3):e4717.

Zang L.Y., Stone K., Pryor W.A. 1995. Detection of free radicals in aqueous extracts of cigarette tar by electron spin resonance. *Free Radic Biol Med.* 1995. 19(2):161-7.

Zhang S., Lin Y., Kim Y.S., Hande M.P., Liu Z.G., Shen H.M. 2007. c-Jun N-terminal kinase mediates hydrogen peroxide-induced cell death via sustained poly(ADP-ribose) polymerase-1 activation. *Cell Death Differ.* 2007. 14(5):1001-10.

Zhang W.Z., Venardos K., Chin-Dusting J., Kaye D.M. 2006. Adverse effects of cigarette smoke on NO bioavailability: role of arginine metabolism and oxidative stress. *Hypertension.* 2006. 48(2):278-85.

Zielonka J., Kalyanaraman B. 2010. Hydroethidine- and MitoSOX-derived red fluorescence is not a reliable indicator of intracellular superoxide formation: another inconvenient truth. *Free Radic Biol Med.* 2010. 48(8):983-1001.

Zingarelli B., Salzman A.L., 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.* 1998. 83(1):85-94.

10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném köszönetemet kifejezni témavezetőmnek, Dr Virág Lászlónak a munkám során nyújtott segítségéért, támogatásáért és nem utolsósorban türelméért.

Köszönettel tartozom Agnieszka Robaszkiewicznek az együttműködésért. Köszönöm Mocsár Gábornak (Debreceni Egyetem Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet) a konfokális mikroszkópos felvételek elkészítésében nyújtott segítségét.

Köszönöm munkatársaimnak, Bai Péternek, Bakondi Edinának, Brunyánszki Attilának, Erdélyi Katalinnak, Finta Lászlónak, Fodor Tamásnak, Hegedüs Csabának, Herbály Mihálynénak, Hunyadi Kálmánnénak, Kakuk Annamáriának, Kovács Istvánnak, Kókai Endrének, Lakatos Petrának, Nagy Lillának, Regdon Zsoltnak, Szabó Ildikónak, Szántó Magdolnának, Valkó Zsuzsannának a szakmai és baráti támogatást munkám során.

És végül sok köszönettel tartozom családomnak, elsősorban lányomnak, Saroltának.

11. ÖSSZEFOGLALÁS

A PARP-1 szerepet játszik a DNS hibajavításban, a genom integritásának fenntartásában, a sejtciklus ellenőrzésében, a transzkripció szabályozásában, a sejthalál útvonalak szabályozásában és számos egyéb folyamatban. Munkánk első részében a PARP-1 szabályozó szerepét vizsgáltuk a dohányfüst által kiváltott sejthalálban. Vizsgálataink során igazoltuk a cigarettafüst kivonat toxikus hatásait A549 tüdő epithel sejteken. A sejtek életképességét és proliferációs kapacitását a CSE kivonat idő- és koncentrációfüggő módon csökkentette. A cigarettafüst által kiváltott sejthalál az apoptózis és a nekrozis jellemzőit is mutatja. CSE kezelés hatására PAR akkumulációt tudtunk detektálni, mely a PARP-1 aktiválódására utal (PARP-1 csendesített sejteken és PJ34 specifikus gátlószer jelenlétében a CSE nem indukál polimer szintézist). Kimutattuk, hogy mind a PARP-1, mind a PARG csendesítés érzékenyítette a sejteket a CSE toxikus hatásaival szemben. Az érzékenyítő hatás ezekben a sejtekben annak köszönhető, hogy a PARiláció egyensúlyának felborulása miatt csökken a DNS hibajavítás hatékonysága. További vizsgálatainkban azt tapasztaltuk, hogy A549 sejtekben a dohányfüst kezelés intracelluláris ROS képződést indukál. A szuperoxid dizmutáz és kataláz jelenlétében végzett kísérletek azt bizonyítják, hogy a szuperoxidnak és hidrogén-peroxidnak kulcsszerepe van a cigarettafüst által okozott DNS károsodásban és citotoxicitásban.

Munkánk második részében az osteogén differenciáció során bekövetkező sejthalálban vizsgáltuk a poli-ADP-riboziláció szerepét. SAOS-2 osteosarcoma sejtekben és humán chorionális mesenchymalis őssejtekben indukáltunk csontirányú differenciációt. Kimutattuk, hogy az osteogén differenciáció során a sejtekben kis mennyiségű hidrogén-peroxid termelődik, mely poli(ADP-ribóz) szintézist indukál. A képződő ROS szintje korrelációt mutat a PAR akkumuláció szintjével. Kataláz jelenléte gátolja a differenciálódási folyamatot, így a termelődő hidrogén-peroxid szükséges a differenciációhoz. A differenciáció során jelentős mértékű sejtpusztulás figyelhető meg, a sejthalál leginkább apoptotikus jellegű. PARP-1 és a PARG csendesített SAOS-2 sejtekben némiképp módosult a kalcium depozíció és az ALP aktivitás, és jelentős különbségek mutathatók ki a sejthalál mértékében. Ez arra utal, hogy a poli(ADP-ribóz) metabolizmus szabályozó szerepet játszik a csontirányú differenciáció során bekövetkező sejthalálban.

Tárgyszavak: PARP-1, poli-ADP-riboziláció, ROS, dohányfüst (CSE), osteogén differenciáció, sejthalál

12. SUMMARY

PARP-1 plays many roles in DNA repair, maintenance of genomic integrity, cell cycle control, regulation of transcription and cell death pathways and in many other processes including mediating cellular recovery following genotoxic stress, elimination of overly damaged cells, and ensuring proper segregation of genetic material at cell division. In the first part of our work we investigated the regulatory role of PARP-1 in cigarette smoke induced cell death. We have shown that cigarette smoke extract is toxic to A549 lung epithelial cells. CSE caused a concentration-dependent loss of viability and severely impaired the proliferative capacity. CSE-induced cell death takes place in an unusual form, combining features of both necrosis and apoptosis. CSE caused an increase in cellular PAR content, as a result of PARP-1 activation (no PAR signal could be detected in the shPARP-1 cell line and in the presence of PJ34 specific PARP-1 inhibitor). Silencing PARP-1 or PARG sensitized cells to the toxic effects of cigarette smoke and these sensitizing effects were due to DNA repair defect. Next we could detect that cigarette smoke induces intracellular ROS production in A549 cells. Experiments carried out in the presence of superoxide dismutase and catalase revealed that superoxide and hydrogen-peroxide are key components in CSE induced DNA damage and toxicity.

In the second part of our work we investigated the role of poly(ADP-ribosyl)ation in osteogenic differentiation-associated cell death. Osteogenic differentiation was induced in SAOS-2 osteosarcoma cells and human chorional mesenchymal cells. During osteogenic differentiation, we could detect a small amount of ROS production which induces poly(ADP-ribose) synthesis. PARylation correlates well with ROS production. Catalase inhibits differentiation suggesting that ROS generation is essential for osteogenic differentiation. Cell death is a physiological process during osteodifferentiation, the predominant form of cell death is apoptosis. Downregulation of PARP-1 and PARG affected extracellular calcium deposition, ALP activity and cell death. These findings suggest that poly(ADP-ribose) metabolism regulates osteogenic differentiation-associated cell death.

Keywords: PARP-1, poly(ADP-ribozyl)ation, ROS, cigarette smoke (CSE), osteogenic differentiation, cell death

13. PUBLIKÁCIÓS LISTA



DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR
PUBLIKÁCIÓK



Iktatószám: DEENKÉTK/322/2014.
Tételszám:
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Kovács Katalin
Neptun kód: IOM6TT
MTMT azonosító: 10034288
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Robaszkiewicz, A., Erdélyi, K., **Kovács, K.**, Kovács, I., Bai, P., Rajnavölgyi, É., Virág, L.: Hydrogen peroxide-induced poly(ADP-ribose)ation regulates osteogenic differentiation-associated cell death.
Free Radic. Biol. Med. 53 (8), 1552-1564, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.08.567>
IF:5.271
2. **Kovács, K.**, Erdélyi, K., Hegedűs, C., Lakatos, P., Regdon, Z., Bai, P., Haskó, G., Szabó, É., Virág, L.: Poly(ADP-ribose)ation is a survival mechanism in cigarette smoke-induced and hydrogen peroxide-mediated cell death.
Free Radic. Biol. Med. 53 (9), 1680-1688, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.08.579>
IF:5.271



Cím: 4032 Debrecen, Egyetem tér 1. □ Postacím: 4010 Debrecen, Pf. 45. □ Tel.: (52) 518-600
E-mail publikaciok@lib.unideb.hu □ Honlap: lib.unideb.hu



További Közlemények

3. El-Hamoly, T., Hegedűs, C., Lakatos, P., **Kovács, K.**, Bai, P., El-Ghazaly, M.A., El-Denshary, E.S., Szabó, É., Virág, L.: Activation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 delays wound healing by regulating keratinocyte migration and production of inflammatory mediators.
Mol. Med. 20, 363-371, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.2119/molmed.2014.00130>
IF:4.824 (2013)
4. Robaszkiewicz, A., Valkó, Z., **Kovács, K.**, Hegedűs, C., Bakondi, E., Bai, P., Virág, L.: The role of p38 signaling and poly(ADP-ribosyl)ation-induced metabolic collapse in the osteogenic differentiation-coupled cell death pathway.
Free Radic. Biol. Med. 76C, 69-79, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.07.027>
IF:5.71 (2013)
5. Brunyánszki, A., Hegedűs, C., Szántó, M., Erdélyi, K., **Kovács, K.**, Schreiber, V., Gergely, S., Kiss, B., Szabó, É., Virág, L., Bai, P.: Genetic ablation of PARP-1 protects against oxazolone-induced contact hypersensitivity by modulating oxidative stress.
J. Invest. Dermatol. 130 (11), 2629-2637, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/jid.2010.190>
IF:6.27

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 27,346

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
10,542

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2014.10.02.

