

Hegedűs Csaba

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

Egyetemi doktori (Ph. D.) értekezés

Debreceni Egyetem, Orvos- és Egészségtudományi Centrum

Orvosi Vegytani Intézet

Témavezető: Dr. Virág László

2008

1. Tartalomjegyzék

1. TARTALOMJEGYZÉK	2
2. RÖVIDÍTÉSEK	4
3. BEVEZETÉS	6
3.1. A poli(ADP-ribóz) metabolizmus	6
3.1.1. A poli(ADP-ribóz) polimeráz (PARP) enzimcsalád	6
3.1.2. A poli(ADP-ribóz) polimeráz 1 (PARP-1) szerkezete és működése	9
3.1.3. Protein kinázok szerepe a PARP-1 enzim működésének szabályozásában	12
3.1.3.1. A protein kináz C enzimcsalád	13
3.2. A poli-ADP-riboziláció biológia szerepe	14
3.2.1. A PARP szerepe a DNS hibajavításban	14
3.2.2. A poli-ADP-riboziláció szerepe a differenciáció, a kromatinszerkezet és génexpresszió szabályozásában	16
3.2.3. A poli-ADP-riboziláció szerepe a sejthalálban	18
3.3. A poli-ADP-riboziláció főbb stimulusai	21
3.3.1. Oxidatív/nitrozatív stressz	21
3.3.2. DNS alkilálószerkek	21
3.4. A poli-ADP-riboziláció patofiziológiai jelentősége	21
3.4.1. A poli-ADP-riboziláció szerepe ischaemia-reperfúzióban és gyulladásos folyamatokban	22
3.4.2. A PARP aktiváció lehetséges szerepe a bőr kórélettanában	24
4. CÉLKITŰZÉS	26
5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	27
5.1. Anyagok	27
5.2. Módszerek	28
5.2.1. Állatkísérletek	28
5.2.1.1. Timocita preparálás	28
5.2.1.2. Kontakt hiperszenzitivitási vizsgálata	28
5.2.1.3. Irritatív dermatitis vizsgálata	29
5.2.2. Nitrogén-monoxid felszabadulás detektálása	29
5.2.3. Nitrotirozin kimutatása immunfluoreszcencia segítségével	29
5.2.4. Western blot	30
5.2.5. Egyszálú DNS törések kimutatása	30
5.2.6. Radioaktív PARP aktivitásmérés	31
5.2.7. A mitokondriális membrán depolarizációjának és a szuperoxid termelődésének kimutatása	32
5.2.8. Kaszpáz-3 aktivitás mérése	32
5.2.9. A DNS fragmentáció kimutatása (DNS létra képződése)	33
5.2.10. Citotoxicitás meghatározása (propidium jodid felvétel)	33

5.2.11. Citotoxicitás meghatározása (MTT redukciós módszer)	33
5.2.12. Immunprecipitáció	33
5.2.13. PKC izoformák lokalizációjának vizsgálata immunfluoreszcenciával	34
5.2.14. In vitro foszforiláció	34
5.2.15. Metalloproteináz zimográfia	35
5.2.16. Peroxidáz aktivitás mérése	35
5.2.17. Citokin expresszió vizsgálata ELISA módszerrel	35
5.2.18. Mieloperoxidáz aktivitás mérése	36
5.2.19. Statisztikai analízis	36
6. EREDMÉNYEK	37
6.1. MNNG kezelés hatására bekövetkező tirozin nitrálás és PARP aktiváció vizsgálata	37
6.1.1. Az MNNG által okozott sejtpusztulás és PARP aktiváció tanulmányozása	38
6.1.2. DNS törés és mitokondriális paraméterek vizsgálata MNNG-vel kezelt timocitákban	42
6.1.3. Az intracelluláris és az extracelluláris GSH eltávolításának hatása az MNNG által kiváltott citotoxicitásra	45
6.1.4. Az MNNG-ből felszabaduló NO hatásainak vizsgálata	45
6.2. A protein kináz C szerepe az MNNG által kiváltott citotoxicitás szabályozásában	48
6.2.1. A PKC aktiváció hatása az MNNG által kiváltott PARP aktivációra	49
6.2.2. A PKC aktiváció hatása az MNNG által kiváltott citotoxicitásra	50
6.2.3. A PKC aktiváció hatása az MNNG indukálta DNS törésre	50
6.2.4. A PARP-1 PKC általi foszforilációjának vizsgálata	52
6.2.5. A PKC útvonal indirekt stimulációjának hatása a PARP-aktivitásra	53
6.3. A PARP-1 szerepe a kontakt hiperszenzitivitás gyulladáshoz vezető folyamataiban	54
6.3.1. PARP gátlószer hatása a neutrofil infiltrációra	54
6.3.2. A PARP aktiváció szerepe irritatív dermatitisben	56
6.3.3. Citokin expresszió és MMP aktiváció CHS-ben	57
7. DISZKUSSZIÓ	59
7.1. MNNG kezelés hatása a tirozin nitrálásra és PARP aktivációra	59
7.2. A protein kináz C szerepe az MNNG által kiváltott citotoxicitás szabályozásában	61
7.3. A PARP-1 szerepe a kontakt hiperszenzitivitás gyulladáshoz vezető folyamataiban	64
8. KONKLÚZIÓK	67
9. IRODALOMJEGYZÉK	68
10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	89
11. ÖSSZEFOGLALÁS	90
12. SUMMARY	91
13. PUBLIKÁCIÓS LISTA	92
14. FÜGGELÉK (KÖZLEMÉNYEK MÁSOLATAI)	93

2. RÖVIDÍTÉSEK

A nehézkesen magyarra fordítható kifejezések a listában angolul szerepelnek

AFU: arbitrary fluorescence unit	hnRNP: heterogén magi ribonukleoprotein
AIF: apoptózis indukáló faktor	HR: homológ rekombináció
AMC: aminometil-kumarin	HTAB: hexadecil-trimetil-ammónium-bromid
AMPK: AMP aktivált protein kináz	I/R: ischaemia-reperfúzió
AP-2: Activating protein 2	ICAM-1: intercelluláris adhéziós molekula-1
ATM: ataxia-teleangiectasia gén fehérjeterméke	IGF-I: inzulinszerű növekedési faktor
BER: báziskihasítási DNS-hibajavítás	IL: interleukin
CAMKIIδ: kalcium-kalmodulin-függő protein kináz II δ	iNOS: indukálható nitrogén-monoxid szintáz
CBP: CREB-kötő fehérje	IP: immunprecipitáció
CDK: ciklin-függő kináz	i.p.: intraperitoneális
CHAPS: 3-[(3-kolamidopropil)-dimetilammonium]- 1-propánszulfonát hidrát	JNK1: c-Jun-N-terminális kináz 1
CHS: kontakt hiperszenzitivitás	L-NAME: N ^G -nitro-l-arginin metilészter
eNOS: konstitutív nitrogén-monoxid szintáz	L-NNMA: N ^G -monometil-l-arginin
CPM: percenkénti beütésszám	LPS: lipopoliszacharid
c-PTIO: (karboxi-2-fenil-4,4,5,5-tetrametilimidazolin-1-oxid-3-oxid)	MAPK: mitogén aktivált protein kináz
DAF-2: 4,5-diaminofluoreszcein	MIP-1, MIP-2: makrofág inflammatorikus protein-1, -2
DiOC₆(3): 3,3'-dihexiloxakarbocianin jodid	MMP: mátrix metalloproteináz
DLBCL: diffúz nagy B-sejtes limfoma	MNNG: N-metil-N'-nitro-N-nitrozoguanidin
DMSO: dimetil-szulfoxid	MOPS: 3-(N-morfolino)-propánszulfonsav
DNA-PK: DNS-függő protein kináz	MPO: mieloperoxidáz
DTT: ditiotritol	MRC: multiprotein replikációs komplex
ECL: enhanced chemiluminescence	MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil- tetrazólium-bromid
EDTA: etilén-diamin-tetraacetát	MVP: fő vault fehérje
ELISA: enzimhez kapcsolt immunszorbens vizsgálatok	NAC: N-acetilcisztein
eNOS: endoteliális nitrogén-monoxid szintáz	NAD⁺: nikotinsavamid adenin dinukleotid
ERK 1/2: extracelluláris szignál által szabályozott kináz 1/2	NF-κB: nukleáris faktor kappa B
FCS: főtális borjúsavó	NHEJ: nem homológ rekombináció
GSH: redukált glutation	NMDA: N-metil-D-aszpartát
³H-NAD⁺: trícilált nikotinsavamid-adenin-dinukleotid	nNOS: neuronális nitrogén-monoxid szintáz
HE: hidroetidin	NO: nitrogén-monoxid
	NOS: nitrogén-monoxid szintáz
	PAR: poli(ADP-ribóz)
	PARG: poli(ADP-ribóz) glikohidroláz

PARP: poli(ADP-ribóz) polimeráz	TBP: TATA binding protein
PI: propidium jodid	TCA: triklórecetsav
PKC: protein kináz C	TIMP: szöveti metalloproteináz inhibitor
PMSF: fenil-metilszulfonil-fluorid	TMB: 3,3',5,5'-tetrametil-benzidin
PMA: forbol-12-mirisztát-13-acetát	TNFα: tumor nekrosis faktor α
ROI: reaktív oxigén intermedier	TRF1: telomeric repeat binding factor-1
RNI: reaktív nitrogén intermedier	UIM: ubikvitin interakciós motívum
SDS-PAGE: nátrium dodecil-szulfát poliakrilamid gélelektroforézis	UVB sugárzás: ultraibolya B sugárzás
sPARP: short PARP	VEGF: vaszkuláris endoteliális növekedési faktor
STZ: sztreptozotocin	vPARP: vault PARP
	XRCC1: X-ray cross-complementing group 1

3. BEVEZETÉS

3.1. A poli(ADP-ribóz) metabolizmus

3.1.1. A poli(ADP-ribóz) polimeráz (PARP) enzimcsalád

A PARP géncsalád elsőként felfedezett tagja a **PARP-1** [poli(ADP-ribóz) polimeráz-1] (EC 2.4.2.30). Ez az enzim az egyik legnagyobb mennyiségű sejtmagi fehérje, mely a nukleoplazmában fordul elő. Sejtosztódáskor a centroszómában és a kromoszómákon lokalizálódik, mérete 116 kDa. Széleskörűen elterjedt és konzervált enzim az eukarióták között. Ennek ellenére eddig nem sikerült kimutatni *Saccharomyces cerevisiae*-ben és *Schizosaccharomyces pombe*-ben, illetve differenciálódott granulocitákban. A legnagyobb fokú konzerváltságot egy 50 aminosavból álló PARP-ra jellemző szekvencia (PARP signature sequence) mutatja, mely a katalitikus doménben található és a gerincesek körében csaknem azonos (Virág és Szabó, 2002). A PARP-1-nek számos kölcsönható partnerét azonosították: a PARP enzimcsalád más tagjai (PARP-1, PARP-2, PARP-3), hisztonok, HMG (high mobility group) proteinek, centromer-kötő fehérjék, DNS-függő protein kináz-komplex alegységek, p300/CBP, Mediátor alegységek, RNS polimeráz II, transzkripció faktorok, kinázok, stb. (Hassa és Hottiger, 2008).

A PARP-1 knockout (PARP-1^{-/-}) fibroblasztokban sikerült kimutatni további, bár alacsony mértékű PARP aktivitást (Shieh és mtsai., 1998). Ez a felismerés vezetett a további PARP izoformák felfedezéséhez. Az izoformák megegyeznek a PARP katalitikus domén jelenlétében, illetve a katalitikus domén jellemző szerkezetében.

Az **sPARP (PARP-1b)** molekulatömege 55 kDa, szekvenciája a PARP-1 katalitikus doménjével egyezik meg. Az irodalom nem egységes abban, hogy az sPARP a PARP-1 alternatív splice variánsa-e, vagy önálló gén terméke. Aktivációjához nem szükséges DNS törés. Azonban a genotoxikus stresszt követően - eddig ismeretlen módon - aktiválódik az sPARP (Sallmann és mtsai., 2000).

A **PARP-2** mérete 62 kDa és 40% homológiát mutat a PARP-1-gyel. Hiányzik belőle az automodifikációs domén, azonban képes auto-poli-ADP-ribozilációra. Ez az enzim rendelkezik egy SAP (scaffold-associated protein) motívummal, mely a kromoszómák AT-gazdag, ún. SAR (scaffold-attachment regions) régióihoz való kötődést segítik elő. Ezek a régiók a transzkripcionálisan aktív kromatinnal kapcsolatosak (Aravind és mtsai., 2000). A PARP-2 részt vesz a DNS repair rendszerek (Schreiber és mtsai., 2002) és a centromerek

működésében (Saxena és mtsai., 2002). Más vizsgálatok *in vivo* is bizonyították fontosságát a DNS javításában és az egyedfejlődésben (de Murcia és mtsai., 2003). A sejthalálban betöltött szerepe szövettípusonként eltérő lehet (Kofler és mtsai., 2006)

A **PARP-3** molekulatömege 67 kDa, a centroszómában lokalizálódik (Augustin és mtsai., 2003). Szövetspecifikus expressziót mutat, legnagyobb mennyiségben a vázizomban található, míg a tímuszban, a vékony- és a vastagbélben fordul elő legkisebb mennyiségben (Urbanek és mtsai., 2002).

A vault PARP (**vPARP, PARP-4**) a legnagyobb méretű PARP (192 kDa), egyaránt megtalálható a citoplazmában és a nukleáris mátrixban. A citoszolban ribonukleoprotein partikulumokban („vault”-okban) és vPARP pálcikákban található (Kickhoefer és mtsai., 1999; Liu és mtsai., 2004). A vPARP az „fő vault fehérjét” (MVP-t), képes poli-ADP-ribozilálni. A sejtbeli vPARP egy része nukleáris, illetve a mitotikus orsóhoz lokalizálódik (Kickhoefer és mtsai., 1999).

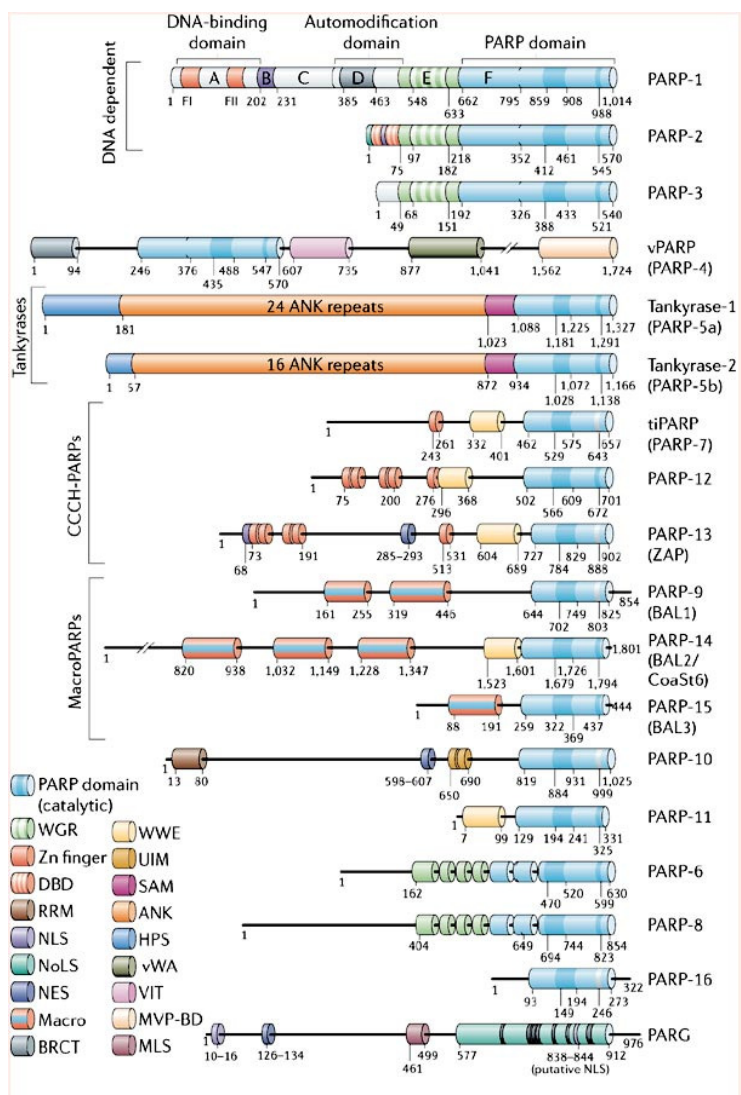
A **tankiráz-1 (PARP-5a)** a telomerek meghosszabbításáért felelős telomerázzal áll kapcsolatban (Smith és mtsai., 1998). A telomerekben és a mitotikus centroszómákban helyezkedik el. Szerkezetére – a katalitikus doménon kívül – 24 ankirinszerű ismétlődés jellemző, melyek fehérje-fehérje kölcsönhatások közvetítésében játszanak szerepet. Ezekkel a motívumokkal kapcsolódik a tankiráz-1 a TRF1 (telomeric repeat binding factor-1) fehérjéhez és képes annak poli-ADP-ribozilálására. (Smith és mtsai., 1998, Smith és de Lange, 2000). A C-terminálisan található steril alfa motívum (SAM) a homo- és heterodimerizációt (tankiráz-2-vel) segíti elő (Hassa és mtsai., 2006).

A **tankiráz-2-t (PARP-5b)** eredetileg a Golgival kapcsolatban lévő fehérjeként ismerték (Chi és Lodish, 2000; Lyons és mtsai., 2001), megtalálható még ezen kívül az endoszómákban, a sejtmagban, a nukleáris membránban és annak pórusaiban, a pericentrioláris mátrixban és a telomerekben.

A **Ti-PARP (PARP-7)** 2,3,7,8-tetraklorodibenzo-p-dioxinnal indukálható, molekulatömege 75 kDa. Nagyfokú hasonlóságot mutat az RM1 és a TIL fehérjékkel, melyek közül az előbbi a memória kialakulásában, az utóbbi a tumort infiltráló aktivált T sejtekben indukálódik. (Ma és mtsai., 2001).

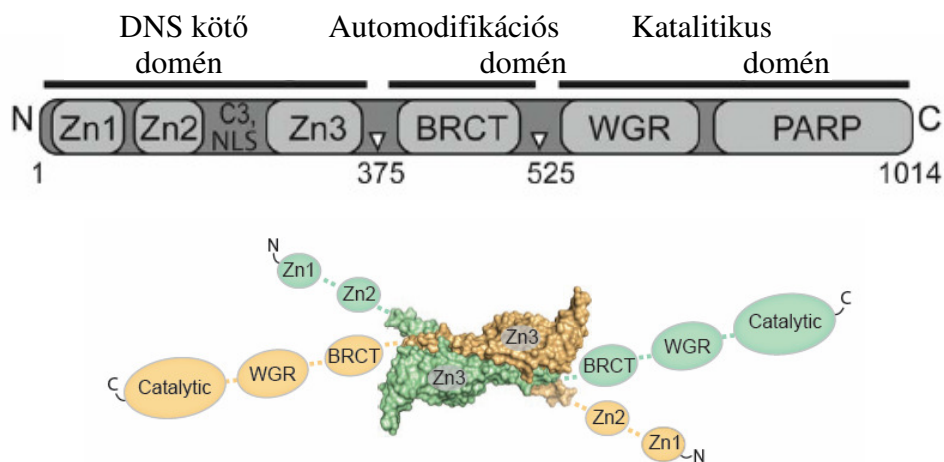
Ame és mtsai. (2004) *in silico* vizsgálatokkal 18 PARP fehérjét azonosítottak, azonban Otto és mtsai. (2005) szerint az Ame és mtsai. által közölt PARP-5c csupán a tankiráz-2 (PARP-5b) génjének trunkált terméke, allélikus variánsa, vagy szekvenálási/klónozási hiba. Ezért Otto és mtsai. (2005) szerint a PARP enzimes család 17 tagból áll. A fentiekén kívül újabb doméneket találhatunk a további tagok esetében, a leggyakoribb a WEE domén, mely a PARP-7;-11;-12;-13; és PARP-14 enzimekben fordul elő, az ubikvitinálással kapcsolatos fehérjékre jellemző. A PARP-10 -ben ubikvitin interakciós motívum (UIM) található. A PARP-7, PARP-8 és a PARP-13 egy cink-ujjal rendelkezik, míg a PARP-12 -ben 3 cink-ujj található, amely nem azonos a PARP-1 és a DNS-ligáz III cink-ujjaival. A PARP-10 és PARP-15 RNS felismerő motívumával (RRM) RNS-kötésre képes. Ez a motívum számos RNS-kötő fehérjében megtalálható [heterogén magi ribonukleo-proteinek (hnRNP), az alternatív splicingben résztvevő fehérjék]. A PARP-9 -et a diffúz nagy B-sejtes limfomák (DLBCL) egyes típusaiban fedezték fel. Aguiar és mtsai. (2000) végstádiumú DLBCL – ben a PARP-9 szignifikánsan magasabb expresszióját tapasztalták, s a B-sejtek migrációjával hozták összefüggésbe. A PARP enzimek doménszerkezetének vázlatát az 1. ábra mutatja.

1. ábra PARP enzimek vázlatos doménszerkezete [Schreiber és mtsai. (2006) nyomán]



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

A PARP-1 jellegzetesen moduláris felépítésű. N-terminálisan találjuk a DNS-kötő domént, melyben három cink-kötő motívum (Langelier és mtsai., 2007) és egy nukleáris lokalizációs szignál helyezkedik el. A két N-terminálisan elhelyezkedő cink-ujj elsősorban a DNS kötést szolgálja, míg a harmadik cink-kötő motívum a PARP-1 dimerizációját segíti elő (Langelier és mtsai., 2007). A DNS-kötő doménban található a kaszpáz-3 hasítóhely (C3), melynél az apoptotikus sejthalál során kettéhasítódik a PARP-1. A DNS-kötő doméntól C-terminális irányban az automodifikációs domén található, benne egy BRCT motívummal, amely számos, a DNS hibajavításban és a sejtciklus ellenőrzésében résztvevő fehérjében előfordul. Szerepét foszforiláció-függő fehérje-fehérje kölcsönhatásokban valószínűsítik (Glover és mtsai., 2004). A katalitikus domén a molekula C-terminálisan található. Ennek részét képezi egy WGR domén, melyet konzervált központi motívumáról neveztek el (W/G/R). A katalitikus doménban található az 50 aminosavból álló (hPARP: 859-908), PARP-ra jellemző szekvencia (PARP signature sequence), mely a gerincesek körében csaknem azonos (Virág és Szabó, 2002). Ez a szekvencia tartalmazza a NAD⁺ akceptorhelyeket, illetve a polimerszintézis inicializációjához, elongációjához szükséges, valamint az elágazások kialakításáért felelős aminosavakat (2. ábra).



2. ábra A PARP-1 vázlatos doménszerkezeti képe és a PARP-1 homodimer kapcsolódása a harmadik cink-kötő motívumon keresztül (Langelier és mtsai., 2007)

A PARP által termelt poli(ADP-ribóz) (PAR) polimerek metabolizmusa egy teljes szubsztrátciklust alkot. Az aktivációt követő polimerszintézis után, az automodifikáció következtében a PARP gátolt állapotba kerül. A polimereket a poli(ADP-ribóz)

glikohidroláz (PARG), az ADP-ribozil hidroláz 3 (ARH3) és az ADP-ribozil protein liáz enzimek távolítják el.

A PARP-1 főleg egy- vagy kétszálú DNS-törés hatására aktiválódik, de a DNS meghajlása is aktiváló hatású lehet (Gradwohl és mtsai., 1987; Sastry és Kun, 1990). A PARP-1 homodimereket alkot és a DNS-törésekhez kapcsolódik, az N-terminális cink-ujjainak segítségével. Ez indukálja a PARP-1 enzimátikus aktivációját (de Murcia és mtsai., 1994; de Murcia és de Murcia, 1994; Lindahl és mtsai., 1995; Schreiber és mtsai., 1995; Burkle, 2001).

A PARP-1 esetében más aktivációs utat is leírtak. Primer patkány neuronokban a foszfolipáz C aktivációja következtében megnövekvő inozitol-1,4,5-triszfoszfát koncentráció hatására bekövetkező intracelluláris kalcium koncentráció-növekedés vezet PARP aktivációhoz (Homburg és mtsai., 2000).

A duplaszálú DNS-en kívül egyéb molekulák is (poliaminok, Ca^{2+} , Mg^{2+} , ATP) pozitív vagy negatív hatással lehetnek a PARP-1 katalitikus aktivitására. A fiziológiás ATP koncentráció szinte teljesen megakadályozza a PARP-1 automodifikációját (Kim és mtsai., 2004), viszont a transz-ADP-ribozilációra nincs hatással (Bauer és mtsai., 2005).

A PARP-1 működését a poli(ADP-ribóz) glikohidroláz (PARG) enzim közvetlenül is képes befolyásolni. A PARG katalitikus doménjén keresztül kapcsolódni tud a PARP-1 automodifikációs doménjével, ezáltal részlegesen gátolja annak aktivitását (Keil és mtsai., 2006).

Az aktivált PARP által katalizált enzimreakció a NAD^+ ADP-ribózra és nikotinamidra történő hasításával kezdődik (NAD^+ glikohidroláz lépés), majd az ADP-ribóz részt a PARP megfelelő akceptor fehérjék glutamát oldalláncához csatolja és elágazó, néhány PAR egységtől akár 200 egységnyi hosszúságú polimereket szintetizál (Virág és Szabó, 2002). Az ADP-ribóz egységeket glikozidos ribóz-ribóz kötésekkel kapcsolja össze (D'Amours és mtsai., 1999). A nem stimulált sejtekben általában kis mennyiségű PAR található (D'Amours és mtsai., 1999; Wielckens és mtsai., 1982; Bredehorst és mtsai., 1978), mennyisége genotoxikus stressz és mitotikus stimulus hatására 10-500-szorosára nő (Ziegler és mtsai., 2000). Ennek során a sejt NAD^+ tartalma 5-15 perc alatt 10-20%-kal csökken (Goldwin és mtsai., 1978). Mivel az ATP esszenciális a NAD^+ -szintézishez, a

fenti folyamat ATP deplációhoz is vezet (D'Amours és mtsai., 1999; Wielckens és mtsai., 1982; Beredehorst és mtsai., 1978).

A poli-ADP-ribozilációnak több akceptorát azonosították, mint a hisztonok (Tanuma és mtsai., 1985; Nagale, 1995) a nukleáris faktor kappá B (NF- κ B), (Oliver és mtsai., 1999), B-MYB (Cervellera és Salla, 2000), a DNS-függő protein kináz (DNS-PK) (Ariumi és mtsai., 1999), p53 (Kumari és mtsai., 1998). A PAR-ban található negatív töltések megváltoztatják a PAR által módosított fehérje tulajdonságait. A hisztonokra kerülő PAR taszítja a DNS negatív töltésű foszfocsoportjait, ami a kromatinszerkezet fellazulásához vezet (Boulikas, 1990).

A poli-ADP-riboziláció egyik legfontosabb akceptora maga a PARP-1. A PAR a PARP-1 DNS kötő -, valamint automodifikációs doménjére kerül (Desmarais és mtsai., 1991), ami a PARP-1 enzimatis gátlásához, és a DNS-ről történő leválásához vezet (autoinhibíció) (Virág és Szabó, 2002).

A genotoxikus stimulus hatására termelődött PAR féléletideje egy perc körül van, mivel katabolizmusa igen gyors (Alvarez-Gonzalez és mtsai., 1989), míg konstitutívan jelen lévő ADP-ribóz polimerek féléletideje ennél sokkal hosszabb: 7,7 óra (Alvarez-Gonzalez és mtsai., 1989; Alvarez-Gonzalez és mtsai., 1987).

A polimerek eltávolításáért elsősorban a poli(ADP-ribóz) glikohidroláz (PARG) enzim felelős. A PARG, bár kis mennyiségben van jelen a sejtekben, magas specifikus aktivitása miatt képes a nagyságrendekkel nagyobb mennyiségben lévő PARP által szintetizált PAR gyors lebontására (Jonsson és mtsai., 1988). Exo- és endoglikozidázként is működni (Brochu és mtsai., 1994). A PARG gátlása, a PARP hiper-ADP-ribozilált állapotához vezet, és következményesen a PARP gátlását eredményezheti (Ying és Swanson, 2000, Ying és mtsai., 2001). Nemrégiben fedezték fel, hogy az ADP-ribóz polimerek katabolizmusában az ADP-ribozil hidroláz 3 (ARH3) (Oka és mtsai., 2006) enzim is részt vesz, azonban pontos szerepe még kevésbé ismert. A fehérjéhez közvetlenül kapcsolódó utolsó, ún. proximális ADP-ribóz egységet az ADP-ribozil protein liáz távolítja el (Oka és mtsai., 1984).

A PARP aktivitás sejtbeli szabályozása több szinten zajlik le. Erőteljes, hosszan ható genotoxikus stressz esetén a PARP mennyisége változik a sejtben, ezek transzkripciós és posztranszkripciós szabályozásra utalnak (Bergeron és mtsai., 1997). A kutatások az Sp1

transzkripciós faktor szerepét vetették fel a PARP transzkripciójában (Bergeron és mtsai, 1997). A poszttranszlációs módosítások közül ki kell emelnünk az auto-poli-ADP-ribozilációt (Kawaichi és mtsai., 1981), illetve a protein kináz C (PKC) általi foszforilációt (Tanaka és mtsai., 1987, Bauer és mtsai., 1992, 1994). Az *in vivo* jelen lévő allosztérikus inhibitorok közül a nikotinamid (a NAD⁺ hasítási terméke), illetve a purinok a legjelentősebbek, melyek ischaemia során érhetnek el PARP gátláshoz elégséges szintet (Virág és Szabó, 2001).

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

Több protein kinázzal kimutatták, hogy képes befolyásolni a PARP-1 aktivitását fehérje-fehérje kölcsönhatás, vagy foszforiláció által. A foszforiláció hatása egyaránt lehet aktiváló [ERK 1/2 (Kauppinen és mtsai., 2006), JNK1 (Zhang és mtsai., 2007), AMPK (Walker és mtsai., 2006)], illetve gátló [PKC (Tanaka és mtsai., 1987), DNA-PK (Ariumi és mtsai., 1999)] hatású.

Ariumi és mtsai. (1998) HTLV-1-gyel fertőzött T-sejtvonalakon kimutatták a PARP szerinen történő foszforilációját *in vivo*. A PARP foszforilációja nem fertőzött sejtvonalakon nem volt megfigyelhető, ezért feltételezhető, hogy a kináz a fertőzés hatására indukálódik. A foszforiláció nem befolyásolta a PARP aktivitását, sőt apoptotikus kaspázok általi hasítását sem. Mértékét nem befolyásolta a DNS jelenléte, vagy hiánya (Ariumi és mtsai., 1998).

A mitogén aktivált protein kinázok (MAPK) közül az extracelluláris szignál által szabályozott kináz 2 (ERK2) Kauppinen és mtsai. (2006) szerint szükséges a maximális PARP-aktivációhoz. Rekombináns humán PARP enzimmel végzett vizsgálataikban alkalikus foszfatázzal történő inkubáció hatására csökkent a PARP aktivitása. A PARP aktivitás ERK 1-gyel, vagy ERK 2-vel történő inkubációval visszaállítható volt (Kauppinen és mtsai., 2006). Ez a jelenség magyarázatot adhat az ERK inhibitorok sejtpusztulást csökkentő hatásaira ischaemia-reperfúziót követően (Alessandrini és mtsai., 1999).

A hidrogén-peroxid által kiváltott nem apoptotikus sejthalál fő végrehajtója a c-Jun-N-terminális kináz 1 (JNK1). Zhang és mtsai. (2007) eredményei szerint a folyamatban bekövetkező PARP-1 aktiváció is a JNK1 pozitív szabályozása alatt áll, mivel a JNK1 gátlásának hatására jelentősen csökkent a hidrogén-peroxid által indukált PARP-aktiváció. A fentieket alátámasztja a JNK1 nukleáris transzlokációja és közvetlen fehérje-fehérje

kölcsönhatás a JNK1 és a PARP-1 között; valamint az *in vitro* kináz assay –vel sikerült kimutatni a PARP-1 JNK1 általi foszforilációját. A JNK1 gátlása nem befolyásolta a kezdeti PARP-aktivációt, viszont gátolta a PARP-1 hosszantartó aktivitását (Zhang és mtsai., 2007). Andreone és mtsai. (2003) szerint a PARP-1 a JNK aktiváción keresztül modulálja az AP-1 transzkripció faktor (cJun és cFos által alkotott dimer) aktivitását.

Az AMP-függő protein kináz (AMPK) egy szerin/treonin specifikus protein kináz. Aktivációja az AMP:ATP arány megváltozásának hatására következik be, célja az energiaegyensúly helyreállítása, az ATP igényes folyamatok gátlásával és az ATP szintézis fokozásával (Carling, 2004). Walker és mtsai. (2006) - intesztinális epitél sejteken - fizikai kölcsönhatást találtak a PARP-1 és az AMPK között, valamint kimutatták, hogy az AMPK általi PARP-1 foszforiláció fokozza a PARP-1 aktivitását.

A DNS-függő protein kináz (DNA-PK) képes közvetlenül kapcsolódni a PARP-1-hez, ezáltal gátolni annak aktivitását, illetve képes a PARP-1 DNS-függő foszforilációjára is. A DNA-PK PARP-gátló hatása független annak foszforilációjától, mivel a szerzők ATP hiányában is tapasztalták a gátló hatást (Ariumi és mtsai., 1999).

3.1.3.1. A protein kináz C enzimes család

A protein kináz C enzimes családba szerin/treonin specifikus protein kinázok tartoznak, melyek számos sejttípus különböző jelátviteli folyamataiban játszanak szerepet. Alapvető szerepük van például a sejtproliferáció, az apoptózis és a citoszkeleton átrendeződés szabályozásában. Jelenleg 12 PKC izoenzimet ismerünk, melyeket kofaktorigényük alapján három alcsaládba sorolnak. Az egyes izoformák eltérnek aktivációjukban, szöveti megoszlásukban és szubsztrátspecificitásukban. A PKC-k inaktív állapotban a citoplazmában található, aktivációjuk során reverzibilisen membránhoz kötődnek. Aktiválódásukhoz - alcsaládtól függően - foszfatidil szerin, diacil-glicerol és Ca^{2+} szükséges.

Tanaka és mtsai (1987) *in vitro* vizsgálataiban a PKC foszforilálta a PARP-1-et és gátolta annak aktivitását. A szerzők két másik kináz hatását is megvizsgálták. A CAM-kináz II esetében a PKC-hez képest gyengébb jelet kaptak, míg a PKA esetében nem mutattak ki PARP-1 foszforilációt. Bauer és mtsai. (1992) tisztított PKC α és PKC β segítségével *in vitro* vizsgálták a tisztított PARP-1 foszforilációját. A foszforiláció a PARP

aktivitásának és DNS-kötésének gátlását okozta, míg a PARP DNS-hez való kötődése gátolta a foszforilációt. [Bauer és mtsai. \(2001\)](#) megvizsgálták a PARP-1 cdc-2 általi foszforilációjának lehetőségét is. Ebben az esetben nem tapasztaltak foszforilációs jelet, viszont a PARP-1 jelenléte jelentősen fokozta a H1 hiszton cdc-2 általi foszforilációját.

[Beckert és mtsai. \(2006\)](#) a VEGF (vaszkuláris endoteliális növekedési faktor) expresszióját vizsgálták HUVEC sejteken. Az IGF-I (inzulinszerű növekedési faktor) serkentette a VEGF expresszióját, amit az ERK-1, a foszfatidil-3-inozitol kináz és protein kináz C gátlószerek megakadályoztak, míg a PARP-1 gátlása fokozta a VEGF expressziót. Az IGF-I hatására fokozódott a PARP-1 foszforilációja és csökkent az aktivitása. A gátlószerekkel végzett vizsgálatok alapján a PARP foszforilációját a PKC végzi ([Beckert és mtsai., 2006](#)).

3.2. A poli-ADP-ribóziláció biológia szerepe

3.2.1. A PARP szerepe a DNS hibajavításban

A PARP-pal kapcsolatos korai megfigyelések közé tartozik, hogy a PARP farmakológiai gátlása érzékenyíti a sejteket a genotoxikus stresszre.

A DNS-törés hatására automodifikálódó PARP dimer leválik a DNS-ről ([Ferro és mtsai., 1982](#)), lehetővé téve annak hozzáférhetőségét a javító enzimek számára. A PARP-1 automodifikációja egyaránt gátolja a PARP-1 katalitikus aktivitását és módosíthatja fehérje-fehérje interakciókban való részvételét ([D'Amours és mtsai., 1999](#)).

A fenti eredményeket magyarázza, hogy a PARP-1 kapcsolatban áll a báziskihasítási DNS-hibajavító rendszerrel (BER – base excision repair). A BER-nek kétféle útvonala létezik. Amennyiben csak egy bázis helyettesítéséről van szó, akkor „short patch repair”-ről, több (10-15) egymás utáni nukleotid cseréje esetén pedig „long patch repair”-ről beszélünk. Emlős szervezetekre a short patch repair jellemzőbb, a long patch repair akkor aktiválódik, amikor a short patch repair elakad. A PARP-1^{-/-} egerekből származó fibroblasztok estében a PARP-1 fehérje hiánya és a PARP aktivitás jelentős csökkenése elsősorban a long patch repair-t érintette, azonban jelentősen, 50%-kal csökkentette a short patch repair-t is ([Dantzer és mtsai, 2000](#)). Ezzel szemben [Vodenicharov és mtsai. \(2000\)](#) a hibajavítási képességben nem találtak különbséget röntgensugárzásnak kitett, illetve MNNG-vel kezelt PARP-1^{+/+} és PARP-1^{-/-} primer sejtek vizsgálatakor. [Soldatenkov és Smulson \(2000\)](#) szerint a PARP gátlás nem inaktiválja a BER-t, mindössze lassítja

beindulását. A kései beindulás oka lehet, hogy a PARP kölcsönhat a BER-ben résztvevő fehérjék egy részével. [Parsons és mtsai. \(2005\)](#) úgy gondolják, hogy ha a sejt javítókapacitását meghaladó számú egyszálú törés keletkezik, a PARP-1 egymás után többször kapcsolódik a DNS-hez és leválik onnan, amíg a hiba ki nem javítódik, megelőzve ezzel a kettős törések létrejöttét. A BER esszenciális fehérjéivel [XRCC1 ([Tebbs és mtsai., 1999](#)), DNS polimeráz β ([Gu és mtsai., 1994](#)), DNS ligáz III α] ellentétben a PARP-1 hiánya nem okoz embrionális letalitást ([Wang és mtsai., 1995](#); [de Murcia és mtsai., 1997](#)). A PARP-1 jelenléte és/vagy aktivitása tehát nem elengedhetetlen az alapszintű, endogén DNS károsodás esetén, viszont szükséges az ennél nagyobb mértékű DNS sérülések kijavításához. PARP inhibitor kezelések előnyösek a malignus melanoma kemoterápia során, melyek a báziskihasításos DNS hibajavítás gátlásával elősegítik a temozolomidhez hasonló, DNS károsító vegyületek citotoxikus hatását ([Tentori és mtsai., 2003](#); [2005](#)). Ellenkező esetben a PARP a kemoterápiás szerekkel szembeni rezisztenciát okoz, a DNS hibajavítás elősegítésével ([Kasper és mtsai., 2007](#)).

A PARP-1 -nek szerepe van a duplaszálú DNS törések javításában is. Emlős sejtekben a duplaszálú DNS törések kijavításnak két fő módja létezik: homológ – (HR) és nem homológ rekombináció (NHEJ). A javítás módjáról a sejtciklus állapota dönt. A PARP-1 szerepét illetően ellentmondásos eredmények születtek ([Noel és mtsai., 2003](#); [Nevaldine és mtsai., 1997](#)). [Wang és mtsai. \(2006\)](#) szerint létezik egy alternatív útvonal (B-NHEJ), aminek tagjai a PARP-1, az XRCC1 és a DNS ligáz III.

A replikáció során az MRC (multiprotein replikációs komplex) kialakulásában is szerepet játszik a PARP ([Dantzer és mtsai, 1998](#), [Simbulan-Rosenthal és mtsai, 1996](#)). A PARP szerepét a replikációban a legtöbben, mint molekuláris kapcsolót képzelik el, amely a DNS szintézis helyszínén a hibákat, töréseket jelzi, leállítja a replikációt, illetve elindítja a hibajavítást ([Dantzer és mtsai, 1998](#); [Ziegler és Oei, 2001](#); [Soldatenkov és Smulson, 2000](#)).

PARP-aktivációt tapasztalhatunk a sejtciklus során is több alkalommal, az eddigi eredmények szerint valószínűleg szintén a genomi integritás védelme érdekében. Az ellenőrzési pontok kulcsfehérjéi közül a PARP-1 kölcsönhat az ataxia-teleangiectasia gén fehérjetermékével (ATM), a DNS-függő protein kinázzal (DNA-PK), a p53 fehérjével ([Smith és Jackson, 1999](#)) és a ciklinfüggő kinázokkal (CDK) ([Masutani és mtsai., 1999](#)). A PARP-1 az osztódás során a kromoszómákkal és a centroszómális fehérjékkel (Cenpa,

Cenpb, Bub3) asszociál (Saxena és mtsai., 2002; Kanai és mtsai, 2000), sejtosztódás során történő gátlása kromoszómaszegregációs problémákkal jár, gyakorivá válnak az aneuploid vagy tetraploid sejtek (Simbulan-Rosenthal és mtsai, 1996).

3.2.2. *A poli-ADP-riboziláció szerepe a differenciáció, a kromatinszerkezet és génexpresszió szabályozásában*

A legtöbb PARP-1-gyel kapcsolatos vizsgálat a fehérje DNS hibajavításban és sejthalálban betöltött szerepére irányult, míg a PARP-1 fiziológias körülmények közötti funkciója kezdetben kevesebb figyelmet kapott. A stimulálatlan sejtekben jelenlévő PARP-1 „háttéraktivitás” azonban fontos szerepet játszik a génexpresszió szabályozásában a differenciáció során és specifikus sejtválaszokban. (Kraus és mtsai., 2003). A PARP szerepét leírták a vérképzési rendszer sejtjeinek differenciációjában (Bahtia és mtsai., 1995; Exley és mtsai., 1987; Francis és mtsai., 1983), a melanomasejtek differenciálódásában (Durkacz és mtsai., 1992), mesenchyma (Nishio és mtsai, 1983) és trophoblast sejtek differenciálódásában (Masutani és mtsai, 2001). A PARP-1 fehérje mennyisége minden esetben korrelációt mutatott a differenciáció folyamatával, azonban jó okunk van feltételezni, hogy hasonlóan az ivarsejt-differenciációhoz (di Megilo és mtsai, 2003) a PARP mennyiségének változása is számottevő tényező lehet.

A PARP-1-nek *in vivo* fontos szerepe van a kromatinszerkezet modulálásában is, viszont aktivitásának hatásai a kromatinszerkezetre és transzkripcióra eltérőek lehetnek a különböző kromatinkörnyezetben lévő gének esetében. Képes közvetlenül módosítani a hisztonokat (D'Amours és mtsai., 1999), a módosítás elsősorban a H1 és H2B hisztonokat érinti (Huletsky és mtsai., 1989). Ezen kívül anionos poli(ADP-ribóz) mátrixot képez, amely köti a hisztonokat, elősegítve ezzel a magasabb szerveződésű kromatinstruktúra dekondenzációját (Mathis és Althaus, 1987).

A PARP-1 nukleoszóma-kötő fehérjeként is funkcionál. A H1 hisztonhoz hasonló módon kötődik a nukleoszómákhoz (a DNS kilépési helyénél és az összekötő DNS szakaszon), képes a transzkripció gátlására (Kim és mtsai., 2004). Ebben a folyamatban a molekula DNS-kötő doménje játszik szerepet a katalitikus doménnel együttműködve. Nem szükséges azonban a PARP-1 enzimatis aktivitása, sőt NAD^+ hozzáadására a kromatin dekondenzációja következik be (Wacker és mtsai., 2007). Krishnakumar és mtsai. (2008)

szerint a H1 hiszton és a PARP-1 elhelyezkedése a nukleoszómákon ellentétes mintázatot mutat számos RNS polimeráz II promóter esetében.

A PARP-1 tehát mind a kromatin kondenzációban, mind pedig annak dekondenzációjában szerepet játszik, aktivitása az aktuális fiziológiai szignáloktól függ. A PARP gátlása fokozza a DNS metilációját és megváltoztatja annak mintázatát, mely szintén fontos a kromatinszerkezet szerveződése szempontjából (Robertson, 2002; Zardo és Caiafa, 1998). Valószínűleg a PARP-aktiváció felelős a H1 hisztonok HMGB (high mobility group B) fehérjékre való kicserélődéséért génspecifikus transzkripció során (Haince és mtsai., 2006). Neuronális differenciáció során a PARP-1 aktivációja szükséges a korepresszor komplex disszociációjához és a transzkripció aktivátor komplex összeszereléséhez (Ju és mtsai, 2004). A szerzők szerint a PARP-1 kalcium-kalmodulin-függő protein kináz II δ általi foszforilációja az enzim aktivációjához vezet.

A PARP-1 enhancer/promóter szabályozó komplexek részét képezi, a DNS-hez közvetlenül kötődik, vagy más, DNS kötő faktorokkal asszociálódik (Akiyama és mtsai., 2001). Több transzkripció faktorról mutatták ki, hogy asszociálódik a PARP-pal, ezek az AP-2 (Kannan, 1999), az YY1 (Oei és mtsai., 1997), az oct-1 (Nie és mtsai., 1998), a TEF-1 (Butler és Ordahl, 1999), és a B-MYB (Cervellera és Sala, 2000). A PARP-1 bizonyos esetekben transzkripció koaktivátorként funkcionál, serkenti a transzkripció faktorok aktivitását (Hassa és Hottiger, 2002), más esetekben azonban a transzkripcióra gátló módon hat (Butler és Ordahl, 1999): gátolja például az YY1 és a TBP DNS-kötését (D'Amours és mtsai., 1999; Hassa és Hottiger, 2002). A PARP-1 enzimatis aktivitása nem minden esetben szükséges hatásának kifejtéséhez (Butler és Ordahl, 1999; Hassa és Hottiger, 2002). Részletesen jellemzett a PARP kölcsönhatása az NF- κ B transzkripció faktorral. Az NF- κ B egy indukálható transzkripció faktor család, mely döntő szerepet játszik a gyulladásos folyamatokban és az immunválaszban résztvevő gének (citokinek, sejtadhéziós molekulák, komplement-faktorok és számos immunreceptor) expressziójának szabályozásában. Ezen kívül az NF- κ B számos sejtfolyamat (apoptózis, sejtproliferáció, differenciáció) szabályozásában is részt vesz.

3.2.3. A poli-ADP-riboziláció szerepe a sejthalálban

A sejtek elhalásának több típusát különböztetjük meg: alapvetően morfológiai jellemzők alapján beszélünk apoptózisról, nekrozisról és autofágiáról. Az apoptózis és a nekrozis nem egymástól élesen elkülönülő folyamatok, sokkal inkább arról van szó, hogy egy skála két szélét képviselik. A nekrotikus sejthalálra jellemző a sejtterefogat növekedése, a plazmamembrán integritásának megszűnése és a sejt tartalom kiszabadulása (Edinger és Thompson, 2004). Ez utóbbi „szivárgás” gyulladást serkentő hatású. Ezzel szemben, az apoptózist a kompakt sejt morfológia, a kromatin kondenzációja, a sejtmembrán épségnek megőrzése, illetve az apoptotikus sejtek fagocitózissal történő gyors eltávolítása jellemzi. Az autofágiát autofagoszómák kialakulása jellemzi, melyek túlzott felhalmozódása egy alternatív programozott sejthalálhoz vezet.

A PARP aktivációt a DNS károsító szerek citotoxikus hatásával először Berger és munkatársai (1983, 1986) hozták összefüggésbe („PARP öngyilkosság” modell). Eszerint a PARP aktiváció hatására a sejt NAD^+ készlete a PAR szintézis miatt lecsökken. A NAD^+ képződés ATP-igényes, így elfogy a sejt ATP készlete. Az ATP hiánya gátolja az ATP igényes folyamatokat, mint a glikolízis kezdeti lépései, a NAD^+ hiánya pedig a mitokondriális elektrontranszportláncot állítja le, ami a mitokondriális membránpotenciál összeomlásához vezet. Ilyen körülmények között a mitokondriális F1/F0 ATPáz enzim ATPáz-ként kezd működni, ami az ATP mennyiség és a sejtbeli energia további csökkenéséhez vezet (Virág és mtsai, 1998a, Ha és Snyder, 1999). A fenti folyamatok eredményeképpen sejt diszfunkció, végül sejtpusztulás következik be (Berger és mtsai., 1985).

A poli-ADP-riboziláció és a nekrotikus sejthalál kapcsolata függ a sejtípustól és az adott sejt metabolikus állapotától (Hassa és Hottiger, 2008). A proliferáló sejtekben szinte kizárólag - a citoplazmában zajló - aerob glikolízis megy végbe. A nem proliferáló sejtek ATP szintjük fenntartására többféle energiaforrást használnak (aminosavak, lipidek), az ATP nagy részét a mitokondriumban zajló oxidatív foszforilációból nyerik. A PARP-1 nukleáris aktivációjának hatására a magi és a citoplazmatikus NAD^+ -készletek csökkenése tapasztalható, míg a mitokondriális NAD^+ -szint változatlan marad, így a glikolízis akadályozott, viszont az oxidatív foszforiláció nem (Zong és mtsai., 2004). A fenti jelenség miatt a nem proliferáló sejtek rezisztensek, vagy kevésbé érzékenyek az ATP deplécióra és

a sejthalálra azonos körülmények között (Zong és mtsai., 2004; Zong és mtsai., 2006). A poli-ADP-riboziláció fontos szerepet játszik a nekrotikus sejthalálban például endotél- és epitheliális sejtek, valamint számos neuronális sejttípus esetében, míg a hepatocitákban nincs jelentősége (Hassa és Hottiger, 2006; Jagtap és mtsai., 2005). A PARP gátlása a nekrotikus sejthalált az apoptózis irányába tereli, ezért a PARP-nak átkapcsoló szerepe van a két sejthalálforma között.

Egy másik elképzelés szerint a PARP-1 túlzott aktivációja indukálja az apoptózis indukáló faktor (AIF) transzlokációját a mitokondriumból a sejtmagba, ami DNS-fragmentációt és sejthalált okoz. A PARP-1 enzim gátlása, vagy hiánya megakadályozta az AIF felszabadulását, illetve magi transzlokációját (Yu és mtsai., 2002). Az AIF egy filogenetikailag konzervált flavoenzim, a mitokondrium két membránja közötti térben helyezkedik el, a sejthalált elősegítő, és az ellen védő tulajdonságokkal egyaránt rendelkezik (van Empel és mtsai., 2005). Az AIF a citoplazmába jutva a ciklofillin A - val egyesülve aktív DN-ázt képez, ami a magba transzlokálódva DNS-fragmentációt okoz (Yu és mtsai., 2002; Ye és mtsai., 2002). PARP-1^{-/-} sejtekkel és PARP inhibitorokkal végzett vizsgálatok alapján elmondható, hogy az AIF transzlokációja PARP-1 -függő folyamat (Yu és mtsai., 2002). Yu és mtsai (2006) eredményei alapján az AIF transzlokációját a PAR polimerek váltják ki. A PAR polimerek képesek kapcsolódni számos, apoptózissal és DNS-hibajavítással kapcsolatos fehérjével (p53, p21, DNS ligáz III, XRCC1, DNS polimeráz ϵ , iNOS, NF- κ B p52, Ku70, DNS-PK) (Pleschke és mtsai., 2000). A polimerek önmagukban is citotoxikus hatásúak lehetnek (Andrabi és mtsai., 2006), citotoxikus hatásuk a polimer méretének növekedésével fokozódik.

Az apoptózis korai lépései során a PARP-1-et a kaspáz-7 vagy 3 elhasítja, egy 85 kDa (p85) és egy 25 kDa (p25) méretű fragmentre (Tewari és mtsai., 1995, Germain és mtsai., 1999), így a katalitikus és a DNS kötő domén elválik egymástól, ami az enzim inaktiválódásához vezet. Ezen inaktiváció jelentősége az lehet, hogy megelőzi a PARP-aktivációt az apoptózis későbbi szakaszában lejátszódó DNS fragmentáció során, így megőrzi a sejtek energiakészletét (Herceg és Wang, 1999). A folyamatnak ezen kívül szerepe lehet a felesleges DNS hibajavítás megelőzésében is (Soldani és Scovassi, 2002).

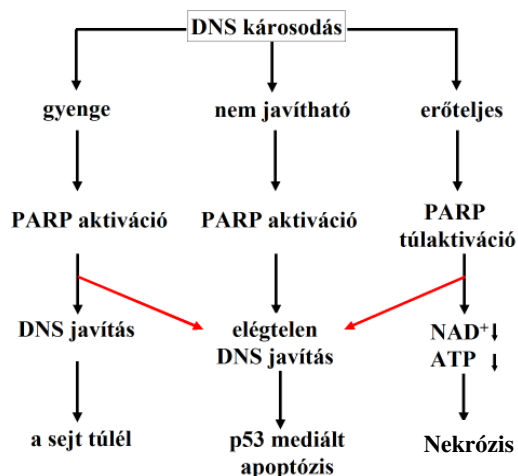
A PARP-1 szerepe az apoptózisban nem tisztázott, gátlása az apoptózis során bizonyos esetekben gátolta (Tanaka és mtsai., 1995; Richardson és mtsai., 1999), más

vizsgálatokban fokozta (Tentori és mtsai., 1999), vagy nem befolyásolta (Watson és mtsai., 1995) a folyamatot. Összességében megállapítható, hogy az apoptózis legtöbb formájához a PARP nem szükséges, azonban hasítása nélkülözhetetlen az apoptózis zavartalan lezajlásához. PARP gátlását vagy genetikai ablációját az apoptózis, a nekrosis, illetve a DNS repair szempontjából a 3. ábrán foglaltuk össze.

Az autofágia egy, a sejtekben állandóan jelenlévő folyamat, mely a sejt fehérjéinek és organelleimainak folyamatos megújulását biztosítja, valamint a sejtek stresszadaptációjához is hozzájárul. A folyamat során a degradációra szánt molekulát vagy sejtstruktúrákat kettős membrán zárja körül, autofagoszóma keletkezik. Az autofagoszómaival egyesülő endoszómális és lizoszómális hidrolázok emésztik meg annak tartalmát. Az autofagoszóma túlzott felhalmozódása egy alternatív programozott sejthalálhoz vezet. A PARP szerepet játszik az autofágia folyamataiban is. Xu és mtsai. (2006) eredményei alapján a PARP gátlása csökkentette az autofágiás sejthalált LPS-sel stimulált makrofágok esetében. Ezzel szemben, ionizáló sugárzásnak kitett H460 tüdőrák sejtvonalon a PARP-gátlás az apoptózis és az autofágia fokozódását okozta (Albert és mtsai., 2007).

3. ábra A PARP-1 szerepe az apoptózisban és a nekrosisban.

Gyenge DNS-károsodás után a PARP aktiváció a hibajavító rendszerek aktiválásán keresztül a sejt túléléséhez járul hozzá (bal oldali folyamatsor). Ha a repair rendszerek nem tudnak megbirkózni a hibák mennyiségével, a sejt elindítja az apoptózis programját és elpusztul (középső folyamatsor). Azonban az erőteljes, túlzott mértékű DNS károsodás a sejtek NAD⁺- és ATP-tartalmának elhasználásával lehetetlenné teszi az apoptózis végbemenetelét, így nekrotikus sejthalált vált ki (jobb oldali folyamatsor). A PARP gátlása mind a jobb, mind a bal ágról a középsőre tereli a sejtek sorsát (piros nyilak), vagyis a sejtek apoptózisát okozza. Az apoptotikus és a nekrotikus sejthalál közül az előbbi a szervezet számára kevésbé megterhelő, ezért önmagában egy ilyen váltás terápiás előnyt jelenthet. A sejthalál típusát befolyásolhatja a stimulus fajtája, időtartama és erőssége, a sejt metabolikus állapota, valamint sejt típusonként is változhat (Virág és mtsai., 2005).



3.3. A poli-ADP-riboziláció főbb stimulusai

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

3.3.1. Oxidatív/nitrozatív stressz

Reaktív oxigén/nitrogén intermedierek termelődését tapasztalták például gyulladásoz folyamatokban, sugárzásnak kitett sejtes és szöveti rendszerekben, ischaemia-reperfundált szívbén, májban, vesében és agyban (Kloner és mtsai., 1989; Krippeit-Drews és mtsai., 1994). Többféleképpen is képesek károsítani a szöveteket: a DNS törésén kívül gátolják a mitokondriális légzési lánc folyamatát, lipid peroxidációt okoznak, ioncsatornák működését gátolják és fehérjéket oxidálnak. Az ebbe a vegyületsorozatba tartozó, legalaposabban tanulmányozott reaktív intermedierek: szuperoxid anion-gyök ($O_2^{\bullet-}$), a hidrogén-peroxid (H_2O_2), a hidroxil gyök (OH^{\bullet}), a nitrogén-monoxid (NO^{\bullet}) és a peroxinitrit ($ONOO^{\bullet}$).

3.3.2. DNS alkilálószerrek

Az alkilálószerrek [metil-metán-szulfonát, N-metil-N'-nitro-N-nitrozoguanidin (MNNG), nitrogén- és kénmustár] elsősorban a DNS nukleofil csoportjait támadják meg, legalább 12-féle alkilált bázist vagy foszfortriésztert hoznak létre (Singer és Kusmierek, 1982), melyek közül legjelentősebb az O^6 -alkilguanin (Margison és mtsai., 2002). Ezek a módosítások hibás bázispárosodáshoz, vagy DNS-töréshez vezethetnek, mutációkat okozhatnak, valamint zavart szenvedhet a transzkripció, a replikáció és a rekombináció. Az alkilálószerrek reakcióba lépnek a fehérjék tiolcsoportjaival is, károsítva azok funkcióját. Ezen az elven működik az alkilcsoportok eltávolítását végző O^6 -metilguanin metiltranszferáz enzim is, mely a metilcsoport átvételekor irreverzibilisen inaktiválódik („öngyilkos enzim”) (Samson és Cairns, 1977). Az utóbbi évek eredményei arra utalnak, hogy az MNNG nem csupán egy laboratóriumban alkalmazott vegyület, megtalálható például a dohányfüstben (Zhu és mtsai, 2003) és a jól átsütött húsokban (The Sidney Kimmel Comprehensive Cancer Center at Johns Hopkins, 2002).

3.4. A poli-ADP-riboziláció patofiziológiai jelentősége

Számos idegrendszeri rendellenességről (Parkinson kór, ischaemiás stroke, traumás agysérülés) feltételezik, hogy kialakulásukért az oxidatív stressz tehető felelőssé

(Woodhouse és Dianov, 2008), melyet a PARP-1 közvetít. Továbbá a PARP-1-nek szerepe van a szívinfarktusban, különböző gyulladásos megbetegedésekben, STZ által kiváltott diabéteszben, ischaemia-reperfúziós sérülésekben, traumában és sokkban (Virág és Szabó 2002). A poli-ADP-riboziláció farmakológiai gátlása jelentősen javítja az illető betegségmodellekben a legfontosabb klinikai és laboratóriumi paramétereket (infarktus terület, gyulladásos sejtek migrációja, gyulladásos citokinek termelődése, szervfunkciók). A fenti eredményeket a PARP-1 deficiens egerekkel, ischaemia-reperfúziós és gyulladásos betegségmodellekben végzett vizsgálatok is megerősítik (Virág és Szabó 2002).

3.4.1. A poli-ADP-riboziláció szerepe ischaemia-reperfúzióban és gyulladásos folyamatokban

Az ischaemia-reperfúziós (I/R) sérülés szervtranszplantáció, miokardiális infarktus, stroke és számos sokkszindróma során megfigyelhető (Weinberg, 1991). A leginkább veszélyeztetett sejtek közé tartoznak a nagy oxigén- és energiaigényű sejtek. A szöveti sérülés súlyossága elsősorban az ischaemia időtartamától függ (Weinberg, 1991; Massberg és Messmer, 1998). A keletkező rendellenességek fő oka az, hogy az elégtelen oxigénellátás során a sejtek nem képesek fenntartani a megfelelő ATP szintet. Lelassul a sejtmembránban található aktív ioncsatornák működése, ezáltal növekszik a membrán permeabilitása, megváltozik például a K^+ , Na^+ , illetve Ca^{2+} ionok eloszlása. A Na^+-K^+ ATP-áz csökkent működésének hatására megnövekszik a Na^+ ionok mennyisége a sejtben, aminek hatására vízbeáramlás történik. A megnövekedő ic. kalciumszint különböző proteázok aktivációja által hozzájárul a szöveti sérüléshez és a sejthalálhoz. A hipoxia és az ic. kalciumszint emelkedése egyaránt megváltoztatja a mitokondriális légzési lánc funkcióját, aminek hatására megnövekszik a reaktív oxigén intermedierek (ROI) mennyisége. A hipoxiás körülmények között a nagy energiatartalmú foszfátok AMP-vé és hipoxantinná alakulnak. A hipoxantin akkumulálódik, - a reperfúzió során, a xantin oxidáz hatására - urea és szuperoxid anion keletkezik belőle (van Wijk és Hageman, 2005). Ezen kívül, neutrofilek vándorolnak a területre, ami további reaktív intermedierek keletkezéséhez vezet (van Wijk és Hageman, 2005). A fehérvérsejtek citokineket/kemokineket is termelnek, aminek hatására további immunsejtek érkeznak a sérült területre, ez újabb szabadgyök-termeléshez vezet. Stroke-ban és neurodegeneratív betegségekben

megfigyelték, hogy az oxidatív foszforiláció gátlása serkenti a glutamát termelését. A glutamát az NMDA (N-metil-D-aszpartát) receptorhoz kötődve stimulálja az i.c. kalciumszint növekedését. A megnövekedett i.c. kalciumszint a neuronális nitrogén-monoxid szintáz (nNOS) aktivációjához vezet. Az NO szuperoxiddal egyesülve peroxinitritet képez (Zhang és mtsai., 1994), ami szintén DNS-törést okoz. Láthatjuk tehát, hogy mind az ischaemia, mind pedig a reperfúzió szabadgyökök termelődéséhez vezet. A reperfúzió szükségszerű a szövet túlélése szempontjából, viszont további szöveti sérülés elindítója is. Ez az ún. reflow paradoxon.

Halmosi és mtsai. (2001) PARP inhibitorok (3-aminobenzamid, nikotinamid, BGP-15) védő hatását tapasztalták ischaemia-reperfúzió során kialakuló lipid-peroxidációval, fehérje-oxidációval és DNS törések kialakulásával szemben is. A PARP inhibitorok hatására csökkent az ischaemia-reperfúzió-indukálta mitokondriális ROI-termelés, így megelőzhető volt a légzési lánc inaktivációja. Kovács és mtsai. (2005) eredményei szerint a PARP inhibitorok ischaemia-reperfúzióban megfigyelhető védőhatásában PI3-kináz/Akt útvonal aktiválása és az ehhez kapcsolódó folyamatok is legalább olyan fontosak, mint a sejt energiametabolitjainak megőrzése.

A DNS törések hatására aktiválódik a PARP, melynek eredményeképpen a sejt energiakészletének további csökkenése, az AIF nukleáris transzlokációja (Yu és mtsai., 2002), a mitokondriális funkciók PAR általi gátlása (Cipriani és mtsai., 2005), a túlélést elősegítő faktorok csökkent expressziója (Chiarugi, 2002) és gyulladáshoz vezető mediátorok fokozott expressziója (Chiarugi és Moskowitz, 2003) figyelhető meg. A PARP patofiziológiás szerepét számos gyulladáshoz vezető betegségmodellben igazolták: streptozotocin-indukált diabetes (Pieper és mtsai., 1999), zymosan-indukált vaszkuláris rendellenesség (Szabo és mtsai., 1997), endotoxin által kiváltott szeptikus sokk (Oliver és mtsai., 1999).

Irodalmi adatok alapján a PARP-1 két, a gyulladáshoz vezető mediátorok expressziójában kulcsszerepet játszó transzkripciós faktor [NF- κ B (Oliver és mtsai., 1999) és az AP-1 (Andreone és mtsai., 2003)] aktivitását is fokozza. Valószínűsíthető, hogy a PARP-1 része a fenti transzkripciós faktorokat tartalmazó transzkriptoszómáknak, ezáltal hozzájárul a gyulladáshoz vezető mediátorok szintéziséhez (Virág, 2005). A PARP gátlása csökkenti a granulocita infiltrációt és az iNOS expresszióját (ezáltal a reaktív nitrogén intermedierek keletkezését) (Boulares és mtsai., 2003).

Gyulladásos stimulus hatására [Hassa és mtsai. \(2005\)](#) a PARP-1 p300/CREB-kötő fehérje általi acetilációját figyelték meg, ez a módosítás szükséges az NF- κ B aktivációjához. Az NF- κ B nyugalmi állapotában trimerként a citoplazmában található, ahol aktiváció (IL-1, TNF α , virális fehérjék, bakteriális LPS, forbol észterek, UV, stb.) hatására a trimer inhibitorikus tagja (IkB) foszforilálódik, majd leválik és proteolitikusan lebomlik. A felszabadult NF- κ B dimer (leggyakrabban p50 és p65) a magba transzlokálódik, a κ B válaszadó szekvenciákhoz kapcsolódik és az iniciációs komplex tagjaival asszociálódva különböző gének expresszióját fokozza. A PARP-1 az NF- κ B mindkét alegységével kölcsönhat, s ehhez [Hassa és mtsai. \(2001\)](#) szerint nem szükséges sem a PARP-1 enzimatis aktivitása, sem pedig DNS-kötő képessége; míg [Chang és Alvarez-Gonzales \(2001\)](#) kísérletei szerint az NF- κ B DNS-hez kapcsolódása NAD⁺-függő volt, ami szerintük az NF- κ B poli-ADP-ribozilációjához volt köthető. [Perkins és mtsai. \(1997\)](#) szerint az NF- κ B-függő géneknek csak egy része (iNOS, TNF α) PARP-1 -függő, valamint bizonyos esetekben a PARP-1 szerepét más specifikus koaktivátorok vehetik át, valószínűleg sejt- és stimulus-függő módon ([Hassa és Hottiger, 2002](#)).

3.4.2. A PARP aktiváció lehetséges szerepe a bőr kórélettanában

Kimutatták, hogy több bőrbetegség (napégés után kialakuló eritéma, kontakt hiperszenzitivitási reakció, psoriasis) kialakulásában is fontos szerepet játszanak a reaktív oxigén/nitrogén intermedierek ([Virág és mtsai., 2002](#)). A nitrogén-monoxid (NO) a bőrben különböző fiziológiás folyamatokban játszik szerepet, a keringés szabályozásától a melanogenezisig. A bőrben az NO több forrásból is származhat. Az endoteliális nitrogén-monoxid szintáz (eNOS) fontos szerepet játszik a keringés szabályozásában ([Feron, 1999](#)). A legtöbb bőrben előforduló sejttípusról kimutatták, hogy megfelelő stimulus (gyulladásos citokinek, LPS) hatására képesek NO termelésére ([Virág és mtsai., 2002](#)). Feleslegben termelődve, szuperoxiddal egyesülve peroxinitritet képez, ami sokk, gyulladás és ischaemia-reperfúzió során szöveti károsodást okoz. Az NO sorsa attól függ, hogy a sejt aktuális fiziológiai állapota mennyire kedvez a peroxinitrit képződésének. A peroxinitrit DNS-törést okoz, ami PARP-aktivációhoz vezet, a PARP túlzott aktivációja pedig sejtpusztulást eredményez. A kontakt hiperszenzitivitás (CHS) effektor fázisában - keratinocitákban és Langerhans sejtekben - [Ross és mtsai. \(1998\)](#) az iNOS expressziójának

emelkedését tapasztalták, ezért valószínűsíthető, hogy CHS reakció során az NO hozzájárul a szöveti sérüléshez. Az NO jelenléte azonban nem minden kórállapotban negatív a szervezet számára. A sebgyógyulás során termelődő NO hozzájárul a folyamathoz (Efron és mtsai., 2000), sőt iNOS deficiens egereken elhúzódó sebzáródást tapasztaltak (Yamasaki és mtsai., 1998), ami adenovirális géntranszferrel bevitt iNOS génnel kivédhető volt. A peroxinitrit reakcióba lép a tiolokkal (Radi és mtsai., 1991a), elindítja a lipid-peroxidációt (Radi és mtsai., 1991b) és DNS törést okoz (Salgo és mtsai., 1995). A bőr különböző gyulladásos folyamataiban keletkező peroxinitrit PARP aktivációt okozhat, a PARP részt vesz a peroxinitrit citotoxikus hatásának közvetítésében (Szabó és mtsai., 2001). A szerzők CHS reakcióban is kimutatták a PARP aktivációját, azonban az UVB sugárzásnak kitett bőrben is megfigyelhető peroxinitrit termelődése.

A peroxinitritnek számos bőrbetegségben van szerepe. Ezek közül az egyik legtöbbet vizsgált elváltozás a napégés után kialakuló eritéma. Az ultraibolya B sugárzás önmagában is DNS törést okoz, valamint NO - és szuperoxid-termelődést indukál az endotél sejtekben és a keratinocitákban (Deliconstantinos és mtsai., 1995, 1996a, 1996b, 1996c). Az UVB sugárzás aktiválni képes az NO - és szuperoxid-termelődésért felelős enzimeket (cNOS és a xantin-oxidáz) (Deliconstantinos és mtsai., 1996a). Az NO-ból és a szuperoxidból peroxinitrit keletkezik, ami felelős lehet a napégés következtében kialakuló eritémáért. Jacobson és mtsai. (2001) röntgen sugárzás hatására a sejt NAD⁺ koncentrációjának jelentős csökkenését tapasztalták, ami szintén a PARP-1 aktivációjának következménye.

Bőr homogenizátumból - Western blottal vagy ELISA-val - számos betegségben mutattak ki nitrotirozint, mint az *in vivo* peroxinitrit termelődés bizonyítékát. Többek között peroxinitrittel kezelt patkánybőrben (Greenacre és mtsai., 1999), égésben (Rawlingson és mtsai., 2000), krónikus UVB sugárzás után (Hattoni és mtsai., 1996), ischaemia-reperfúziós károsodásban (Um és mtsai., 1999), sikerült nitrotirozint detektálni. Immun-hisztokémiás vizsgálatokban főleg az epidermiszben észlelték a nitrotirozint (Ormerod és mtsai., 1999).

Az aktív PARP az NF- κ B-t aktiválva, gyulladásos mediátorok képződéséhez vezet, a PARP gátlása csökkenti a gyulladást, ezáltal előnyös nem fertőző gyulladásos folyamatokban: napégés okozta eritéma, CHS.

4. CÉLKITŰZÉS

Munkánk során az alábbi három témakör köré csoportosítottuk kérdéseinket.

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

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

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

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

A PARP-1 szerepének vizsgálata a kontakt hiperszenzitivitás gyulladási folyamataiban

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

5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

5.1. *Anyagok*

A DAF-2 -t, a propidium jodidot (PI), a hidroetidint (HE), a 3,3'-dihexiloxakarbocianin jodidot (DiOC₆(3)) és a Streptavidine-Alexa-Fluor488-at a Molecular Probes-tól (Eugene, OR, USA) vásároltuk. A nitrotirozin antitestet Dr. Wim Buurmantól (University of Maastricht) kaptuk, a későbbiekben pedig az Upstate Biotechnology-tól (Lake Placid, NY) vásároltuk. Az RPMI-1640 tápfolyadékot, a hidrogén-peroxidot, a DMSO-t, az EDTA-t, az EGTA-t, a HEPES-t, a digitonint, az SDS-t, a CHAPS-ot, a brómfenol kék-et, az RNáz A-t, a proteáz inhibitor koktélt, a PMSF-et, a proteináz K-t, a NAD⁺-ot, a Triton X-100 -at, a főtális borjúsavót, az oxazolont, az MTT-t, a PMA-t, a NaF-ot, a Na₂VO₃ -ot, a HTAB-ot, a MOPS-ot, a NaN₃ -ot, a foszfoserin elleni antitestet, a ditiotreitolt, a TMB-t, a poli-lizint, a torna-peroxidázzal jelölt szekunder antitesteket, az MNNG-t, a redukált glutationt (GSH), az N-acetilciszteint (NAC), PEG-SOD-ot, PEG-katalázt és az indukálható nitrogén-monoxid szintáz (iNOS) elleni antitestet a Sigma-Aldrich-tól (St. Louis, MO, USA) szereztünk be. A PARP specifikus gátlására a fenantridion-alapú PJ34-et (Jagtap és mtsai, 2002) használtuk (Inotek Pharmaceuticals, Beverly, MA, USA). A szabad gyökök *in vivo* befogására ferroporfirin alapú szert, az FP15-öt használtuk (Inotek Pharmaceuticals, Beverly, MA, USA). Az agarózt, a PKC inhibitorokat, a Sepharose - protein A-t, az aminometil-kumarinnal konjugált tetrapeptid kaszpáz szubsztrátot (DEVD-AMC), a c-PTIO-t (karboxi-2-fenil-4,4,5,5 tetrametilimidazolin-1-oxil-3-oxid), az L-NAME-t (N^G-nitro-l-arginin metilészter) és az L-NNMA-t (N^G-monometil-l-arginin), a Calbiochem-Merck-től (Darmstadt, Germany) szereztük be. A C57BL6, CD1 egértörzseket a Charles-River -től vásároltuk. A KCl-t, a MgCl₂-t, a CaCl₂-t, a Tris-t, a Tris-HCl-t, a glicerolt, az acetont, a maratott tárgylemezeket, a TCA-t, a NaOH-ot, a NaCl-ot, az etanolt, a metanolt és az ecetsavat a SPEKTRUM-3D Kft. (Debrecen)-től vásároltuk. A poliakrilamidot, a nitrocellulóz membránt és a molekulaméret markereket a Bio-Rad Kft-től szereztük be. A kemilumineszcencia előhívó oldatot az Amersham Pharmacia Biotech-től (Vienna, Austria) vásároltuk. A ³H-NAD⁺ -ot és a ³²P-ATP-t Izinta Kft-től vásároltuk. A 2X SDS mintapuffert, a zselatin - és kazein zimográfiaiás géleket, a renaturáló puffert és az előhívó puffert az Invitrogen-től (Carlsbad, CA, USA) szereztük be. A Cryochrome Blue matrix-ot és a Hypermount fedőoldatot a Shandon-tól (Pittsburgh, PA, USA) vásároltuk. A Nuclear

Fast Red-et a Vector Laboratories-től (Burlingame, CA, USA) szereztük be. Az ELISA kitéket az R&D System-től (Minneapolis, MN) vásároltuk. Az olíva olajat (SPAR) az Intersparban szereztük be.

5.2. Módszerek

5.2.1. Állatkísérletek

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

5.2.1.1. Timocita preparálás

A timociták preparálását a már leírtak szerint végeztük (Bai és mtsai., 2001). Hatnyolc hetes hím C57BL6 egerek (Charles-River) tímuszát használtuk kísérleteinkben. Az állatokat CO₂-belélegeztetéssel túllaltattuk, majd a mellkas megnyitása után kivágtuk a tímuszt. A tímuszt dróthálón préseltük át, így nyertünk önálló sejtekből álló timocita preparátumot. A sejteket RPMI-1640 médiumban (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) tartottuk, melyet 10% főtális borjúsavóval egészítettünk ki. A sejteket 37 °C-on, 5% CO₂ atmoszférában tartottuk.

5.2.1.2. Kontakt hiperszenzitivitási vizsgálata

30 db nőstény CD1 egeret (Charles-River) véletlenszerűen három csoportba osztottunk (kontroll, CHS, CHS+PJ34). Leborotváltuk hasoldalukat, majd a borotvált bőrfelületen 100-100 µl (0,2 m/v %, aceton:oliva olaj 1:4 arányú elegyében oldva) oxazolonnal szenzitizáltuk őket. A kontroll állatok hasát aceton:oliva olaj 1:4 arányú elegyével kentük be. Egy héttel a szenzitizáció után az egereket i.p. kezeltük PJ34 (10 mg/kg, PBS-ben oldva) PARP inhibitorral (CHS+PJ34 csoport) vagy PBS-sel (kontroll és CHS csoport). Ezt követően 10-10 µl oxazolont kentünk az állatok mindkét fülének mindkét oldalára. 24 óra

elteltével *Mitutoyo Absolute ID-C112BS* vastagságmérővel megmértük a fülek vastagságát és szövetmintát vettünk további vizsgálatok céljából.

5.2.1.3. Irritatív dermatitis vizsgálata

16 db nőstény CD1 egeret (Charles-River) véletlenszerűen két csoportba osztottunk (CHS, CHS+PJ34). Az állatok mindkét fülének mindkét oldalára 10-10 µl PMA-t (forbol-mirisztát-acetát; 0,05 m/v%, acetonban oldva) kentünk. Ezt követően az egereket i.p. kezeltük PJ34 (10 mg/kg, PBS-ben oldva) PARP-inhibitorral (CHS+PJ34 csoport) vagy PBS-sel (CHS csoport). Hat óra elteltével *Mitutoyo Absolute ID-C112BS* vastagságmérővel megmértük a fülek vastagságát és szövetmintát vettünk további vizsgálatok céljából.

5.2.2. Nitrogén-monoxid felszabadulás detektálása

A nitrogén-monoxid mennyiségét fluorimetriás DAF-2 módszerrel mértük, [Kojima és mtsai. \(1998\)](#) leírása alapján. A módszer a zölden fluoreszkáló triazolofluoreszcein detektálásán alapszik, ami a nitrogén-monoxid és a 4,5-diaminofluoreszcein (DAF-2) reakciójában keletkezik. A DAF-2-t (1 µM) különböző ideig (4-24h) inkubáltuk MNNG különböző koncentrációival. A fluoreszcenciát *Fluoroskan Ascent FL* microplate fluoriméteren (Thermo Labsystems) detektáltuk (EX: 485 nm, EM: 527 nm).

A nitrogén-monoxid termelődését a nitrit és nitrát mennyiségének detektálásával is nyomon követtük, melyek vizes oldatban a nitrogén-monoxid stabil végtermékei. A nitrit és nitrát együttes koncentrációját Griess-Ilosvay reakcióban detektáltuk ([Liaudet és mtsai. 2002](#)), melynek során a keletkezett nitrátot nitritté redukáltuk nitrát-reduktáz (160 mU/ml) és NADH (34 µg/ml) segítségével (2h, 37 °C), majd 100-100 µl mintamennyiséghez 100-100 µl Griess-reagenst [0.1% naftil-etilén-diamin-dihidroklorid (vízben oldva) és 1% szulfanilamid (5% H₃PO₄-ben) 1:1 arányú elegye]. Az abszorbanciát 550 nm-en mértük *Multiskan MS* microplate olvasón (Thermo Labsystems). A nitrit koncentrációk meghatározása kalibrációs görbe alapján történt.

5.2.3. Nitrotirozin kimutatása immunfluoreszcencia segítségével

A fehérjék tirozil oldalláncainak nitrálódását az alábbi, standard immunfluoreszcens protokoll alapján végeztük. A sejteket 10 percig jéghideg, 95%-os etanolban fixáltuk. A

rehidráció PBS-ben történt. A fedőlemezeket 5%-os kecskeszérummal blokkoltuk 1 órán keresztül. Ezt követően mintáinkat 4 °C-on, egy éjszakán át inkubáltuk poliklonális anti-nitrotirozin ellenanyaggal (1:300). 5×5 perc PBS-sel való mosást követően a fedőlemezeket biotinilált, kecskében termeltetett, anti-nyúl IgG antitesttel inkubáltuk (1:200, 1 h, szobahőmérséklet). A PBS-ben történt mosási lépéseket (5×5 perc) követően a mintákat streptavidin-AlexaFluor 488 konjugátummal inkubáltuk (30 perc, szobahőmérséklet), majd Zeiss Axiolab fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk.

5.2.4. Western blot

A tirozin nitrálódás, az iNOS expresszió, a poli(ADP-ribóz) akkumuláció detektálása, a PARP foszforilációjának meghatározása (IP mintákból) és a PKC izoformák azonosítása Western blot módszerrel történt. A műveleteket Pfeiffer és mtsai. (2001) leírása alapján végeztük. A kezelések elvégzése után homogenizáltuk a sejteket, majd gélelektroforézist végeztünk, 10%-os (tirozin nitrálódás, iNOS expresszió), vagy 8%-os (összes többi esetben) SDS-poliakrilamid gélben. Ezt követően a gélben lévő mintáinkat nitrocellulóz membránra transzferáltunk [transzfer puffer: 25mM Tris/HCl, pH 8.3, 192mM glicin, 0,02% (m/v) SDS, és 20% (v/v) metanol] 250mA áramerősségen, 90 percig. A membrán aspecifikus kötőhelyeit 5% zsírszegény tejporoldattal blokkoltuk, melyet 0,01% TBST-ben oldottunk. A mosási lépések (2x5 perc) után monoklonális, vagy poliklonális nyúl anti-nitrotirozin (tirozin nitrálódás), nyúl anti-egér iNOS (iNOS expresszió) antitesttel inkubáltuk a membránokat. A primer antitesteket 1% tejpport tartalmazó TBST-ben oldottuk. A membránokat 2x15 percig mostuk TBST-vel, majd 1 órán keresztül inkubáltuk a torna-peroxidázzal jelölt szekunder antitesttel [anti-nyúl-IgG (anti-nitrotirozin, anti-iNOS, anti-PKC antitestek, anti-PARP antitest), anti-egér-IgG (anti-foszfoszerin, anti-PAR) 1% tejpport tartalmazó TBST-ben oldva]. A membránokat 3x20 percig mostuk TBST-vel, eredményeinket kemilumineszcencia előhívó oldattal (Amersham Pharmacia Biotech, Vienna, Austria), röntgenfilmen tettük láthatóvá.

5.2.5. Egyszálú DNS törések kimutatása

A DNS töréseket comet assay-vel mutattuk ki, Singh és mtsai. (1998) leírása alapján. Az eljárás a károsodott DNS azon tulajdonságán alapszik, hogy könnyebben hurkolódik ki és mozdul el elektromos erőterben, mint az ép DNS. A sejteket agarózba ágyasztuk, lizáltuk,

majd elektromos erőterbe helyeztük. A maganyag károsodás hatására üstökösszerűen elnyúlik (innen az eljárás neve), míg az ép DNS a sejt eredeti helyén marad.

Maratott tárgylemezekre (Spektrum 3D, Debrecen, Hungary) 1% normál olvadáspontú agarózt rétegeztünk. A timocitákat MNNG-vel (10 μ M, 20 min, 37 °C) vagy a pozitív kontrollként használt hidrogén-peroxiddal kezeltük. A sejteket (10^5 sejt/lemez) alacsony olvadáspontú agarózba kevertük, és az agarózzal fedett tárgylemezekre rétegeztük. A gél megszilárdulása után 1 órán át, 4 °C-on lizáltuk mintáinkat (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 10% DMSO, 1% Triton X-100 pH 10.0). A tárgylemezeket ezután futtatókádba helyeztük, és alkalikus elektroforézis pufferben (300 mM NaOH, 1 mM EDTA) 30 percig ekvibráltuk, majd elektromos erőteret kapcsoltunk a kádra (25 perc, 300 mA). A tárgylemezeket 0.4M Tris (pH 7.5) pufferben 10 percig ekvibráltuk, majd etidium bromiddal (10 μ g/ml) festettük. Eredményeinket fluoreszcens mikroszkópiával detektáltuk. Felállítottunk egy vizuális értékelési rendszert:

0=ép sejtek, a teljes DNS állomány a feji részben található, farkok nincs;

1=enyhe DNS károsodás, legtöbb DNS a feji részben;

2=a DNS-tartalom kb. fele a farki részben;

3=a DNS nagy része a farki részben található, de még látszik a fej;

4=erősen károsodott sejtek a teljes DNS állomány a farki részben található.

Lemezenként legalább 25 sejtet soroltunk be a fenti kategóriák valamelyikébe. Eredményeinket hisztogrammon ábráztuk.

5.2.6. Radioaktív PARP aktivitásmérés

A sejt-lizátumok PARP aktivitását a klasszikus módszerrel határoztuk meg, amely a $^3\text{H-NAD}^+$ TCA-val kicsapható fehérjefrakcióba való beépülésének a meghatározásán alapszik (Virág és mtsai, 1999).

A sejteket 20 percig MNNG-vel kezeltük, majd a médiumot 0,5 ml aktivitásmérő pufferre cseréltük (56 mM HEPES, pH 7,5, 28 mM KCl, 28 mM NaCl, 2 mM MgCl_2 , 0,01% digitonin, 0,125 μ M NAD^+ és 0,5 μ Ci/ml $^3\text{H-NAD}^+$), és 30 percen át 37 °C-on inkubáltuk a timocitákat. A sejtfehérjéket 200 μ l jéghideg 50%-os TCA-val kicsaptuk és 4 órán át 4°C-on inkubáltuk. Centrifugálást (10000 RPM, 10 perc) követően a csapadékot kétszer mostuk 500 μ l 5% TCA-val, majd 250 μ l 2% SDS/0,1 N NaOH oldatban, 37°C-on

egy éjszakán át szolubilizáltuk. A csövek tartalmát 6,5 ml Scintisafe Plus szcintillációs folyadékhoz adtuk (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA) és a radioaktivitást folyadékszcintillációs számlálóval mértük meg (Wallac, Gaithersburg, MD, USA).

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

A mitokondriális membránpotenciál változását áramlási citometriával vizsgáltuk, FACS-Calibur citométeren (Becton-Dickinson, San Jose, CA), 3,3'-dihexiloxakarbocianin-jodiddal [DiOC₆(3)] festett sejtekben (Virág és mtsai, 1998b). A festék kationos lipofil karakterű, melyet a mitokondriumba transzportál a negatív mitokondriális membránpotenciál, és így az a mitokondriális mátrixban dúsul fel. Ezért csökkenő mitokondriális membránpotenciál a sejt csökkenő fluoreszcenciáját eredményezi. A festéket 37°C-on, 15 percig tartó inkubáció során 40 nM koncentrációban alkalmaztuk, majd PBS-sel történő mosás után detektáltuk eredményeinket.

A mitokondriális szuperoxid termelést szintén áramlási citometriával határoztuk meg hidroetidium (HE) felhasználásával (2 µM, 15 perc, 37 °C), amit a szuperoxid erősen fluoreszkáló etidiummá alakít. A mérést ebben az esetben is PBS-sel történő mosás előzte meg.

5.2.8. *Kaspáz-3 aktivitás mérése*

A kaspáz-3 aktivitást a Vanags és mtsai. (1996) által leírt módon végeztük el az alábbi módosításokkal (Virág és mtsai, 1998a). Hat órával az MNNG kezelés megkezdése után a timocitákat lízis pufferben lizáltuk (10 mM HEPES pH 7,25; 0,1% w/v CHAPS, 5 mM ditiotreitol, 2 mM EDTA, 10 µg/ml aprotinin, 20 µg/ml leupeptin, 10 µg/ml pepstatin A, 1 mM PMSF). A lizátumokhoz 1:1 arányban reakciópuffert adtunk (100 mM HEPES pH 7,25; 10% szacharóz, 5 mM ditiotreitol, 0,1% CHAPS,), amely 50 µM-os végkoncentrációban tartalmazta az aminometil-kumarinnal konjugált tetrapeptid kaspáz szubsztrátot (DEVD-AMC) (Calbiochem, San Diego, CA, USA), mellyel 1 órán át inkubáltuk. Az AMC fluoreszcenciáját Fluoroskan Ascent FL microplate fluoriméteren detektáltuk (EX: 390 nm, EM: 460 nm).

5.2.9. A DNS fragmentáció kimutatása (DNS létra képződése)

Az internukleoszomális DNS fragmentációt agaróz gélelektroforézissel mutattuk ki, az [Eastman \(1995\)](#) által leírt módon. Két százalékos agaróz gélre öntöttünk, majd a gél megszilárdulása után a felső feletti részt levágtuk. Az üres részbe 1% agaróz gélre öntöttünk, mely 2% SDS-t és 64 µg/ml proteináz K-t tartalmazott. 2×10^6 sejtet 20 µl mintapufferben (5% v/v glicerol, 10 mM Tris, pH 8,0, 0,05% brómfenol kék, 5 mg/ml RNáz A) vittük fel a gélre. Az elektroforézist 60 V feszültség mellett 12 órán át végeztük, majd a gélre 2 µg/ml etidium bromiddal festettük meg, a felesleges festéket desztillált vízzel mostuk ki.

5.2.10. Citotoxicitás meghatározása (propidium jodid felvétel)

Az MNNG kezelés által kiváltott sejtpusztulást propidium jodid (PI) felvétellel határoztuk meg ([Bai és mtsai, 2001](#)). A timocitákat 2,5 µg/ml PI oldattal festettük 15 percen át, majd PBS-sel végzett mosás után áramlási citometriával analizáltuk a mintákat. A citotoxicitást a következő képlet segítségével számítottuk: $100 \times (T-C)/(100-C)$, ahol a T a PI pozitív sejtek százalékát jelenti a mintákban, míg a C a kontroll mintában a PI pozitív sejtek arányát.

5.2.11. Citotoxicitás meghatározása (MTT redukciós módszer)

Az MNNG kezelés hatását a sejtek életképességére 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium-bromid (MTT) redukciós módszerrel ([Hussain és mtsai., 1993](#)) is vizsgáltuk [Virág L. \(1995\)](#) leírása alapján, egy eltéréssel: mivel szuszpenziós sejtekkel dolgoztunk, a kezeléseket elvégzése után a sejteket Eppendorf csövekbe gyűjtöttük, centrifugáltuk, majd a médium leszívása után dimetil-szulfoxidban (DMSO) vettük fel.

5.2.12. Immunprecipitáció

A PARP-1 foszforilációjának detektálását immunprecipitációval végeztük. A kezeléseket elvégzése után a sejteket lizáltuk [50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 150 mM NaCl, 1% Triton-X 100, 1 mM EDTA, proteáz inhibitor koktél (100×), 1 mM NaF, 1 mM Na₂VO₃], majd szonikáltuk (20 s). Mintáinkat 50 µl 50%-os *Sepharose - protein A* gyanta hozzáadásával előtisztítottuk (1h, 4 °C), majd centrifugálást követően a felülúszókhöz adtuk a PARP elleni antitestet (4 µg/500 µl minta), amivel 4 °C-on, 90 percen át tartó

inkubációt végeztünk. Ezt követően 50 µl 50%-os Sepharose-proteinA gyantát adtunk mintáinkhoz, ezzel 1 órán át, 4°C-on történt az inkubáció. Végül mintáinkat 3×1 ml mintapufferrel [50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 1% Triton-X 100, 1 mM EDTA, proteáz inhibitor koktél (100×), 1 mM NaF, 1 mM Na₂VO₃] mostuk, majd a pelletet SDS mintapufferrel elegyítettük és az antitestek kötéseinek megszüntetése céljából felfőztük (10 perc, 100 °C). Ezután foszfoszerin elleni antitesttel Western blotot végeztünk. A vizsgálatot foszfoszerin elleni antitesttel immunprecipitálva és PARP elleni antitesttel Western blotot végezve is elvégeztük.

5.2.13. PKC izoformák lokalizációjának vizsgálata immunfluoreszcenciával

Az immunfluoreszcenciás vizsgálatainkhoz a sejteket poli-lizinnel bevont lemezekre immobilizáltuk. Etanolos fixálást követően vizsgálatainkhoz a Western blot módszernél is használt PKC elleni antitesteket alkalmaztuk. Immunfluoreszcens jelölésre FITC-cel konjugált szekunder antitestet használtunk. A magokat DAPI-val festettük. A felvételeket Zeiss LSM 510 META konfokális mikroszkóppal készítettük. Z-szeleteket készítettünk, ábráinkon a magok középsíkjában készült felvételeket mutatjuk be.

5.2.14. *In vitro* foszforiláció

Ebben a vizsgálatban tisztított PARP-1 enzimet foszforiláltunk tisztított cPKC eleggyel (alfa, béta és gamma izoformák keveréke), HEPES tartalmú assay pufferben [200 mM HEPES pH 7.5; 100 mM MgCl₂, 10 mM ditiotritol (DTT)]. A PKC elegyet PKC tároló pufferben hígítottuk (20 mM HEPES pH7,5; 1 mM EGTA; 1 mM EDTA; 1 mM DTT; 25% glicerin; 0.02 % NaN₃; 0.05% Triton X-100), végkoncentrációja 0.1 µg/ml volt. Az enzimet 0,65 mM CaCl₂ és foszfatidil-szerin – diolein micellák hozzáadásával aktiváltuk. Mintánként 5 µl ATP elegyet használtunk [0,998 mM ATP és 20-szorosára hígított ³²P-ATP (270 CPM/pmol)]. Mintáinkat 20, 50, vagy 90 percig inkubáltuk, 30 °C-on. Negatív kontrollként PKC nélküli mintát alkalmaztunk. Mintáinkat SDS mintapufferrel elegyítettük, majd SDS-poliakrilamid gélelektroforézist végeztünk, 8 %-os gélen. A géleket megszáritottuk, majd az eredményeket autoradiográfiával detektáltuk.

5.2.15. Metalloproteináz zimográfia

A kezelések elvégzése után nyert szövetmintát TNC pufferben homogenizáltuk (50 mM Tris, 0,15 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, 0,05% Brij-35, 0,02% NaN₃, pH 7,4) (Koyama és mtsai. 2000), majd a törmelékot centrifugálással eltávolítottuk. A fehérjekoncentrációt Bradford módszerével határoztuk meg. A homogenizátumokat ezután 2X SDS mintapufferrel kevertük össze (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), és szobahőmérsékleten inkubáltuk 15 percen át. Az így elkészített mintákból 7,5 µg fehérjét zselatin vagy kazein zimográfiai gélekre (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) vittünk fel. A géleket a futtatás (125 V, 90 min) után renaturáló pufferben (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 30 percig rázattuk, majd az aktív proteinázok előhívását 37 °C-on végeztük egy éjszakán át előhívó pufferben (Invitrogen). Az emésztetlen szubsztrátot Brilliant Blue festékkel festettük meg (0,1% Coomassie Brilliant Blue, 45,5% metanol, 9% ecetsav). Bizonyítandó, hogy az emésztés után megjelenő sávok Ca²⁺-függő proteázoknak felelnek meg, replikátum géleket Ca²⁺-mentes pufferben (20 mM EDTA) hívtunk elő.

5.2.16. Peroxidáz aktivitás mérése

Cryochrome Blue matrix-ba (Shandon, Pittsburgh, PA, USA) ágyazott szövetekből 6 µm vastagságú szeleteket vágunk. Az A (0,8 mM diamino-benzidin – tetrahidroklorid; 121 mM Na-acetát desztillált vízben oldva) és B (1,8 mM hidrogén-peroxid desztillált vízben oldva) oldatok 1:50 arányú elegyét a mintáinkra mértük. A reakciót 10 percen át végeztük szobahőmérsékleten. A tárgylemezeket kétszer mostuk desztillált vízzel, majd egy órán át, szobahőmérsékleten háttérfestést végeztünk Nuclear Fast Red-del (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). A tárgylemezeket desztillált vízzel mostuk, majd dehidráltuk és lefedtük (Hypermount, Shandon).

5.2.17. Citokin expresszió vizsgálata ELISA módszerrel

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

5.2.18. *Mieloperoxidáz aktivitás mérése*

Az egérfületeket 600 μ l homogenizáló pufferben [125 mg hexadecil-trimetil-ammónium-bromid (HTAB) 25 ml 10 mM MOPS] összeturmixoltuk, majd centrifugáltuk (5 perc, 13 000 RPM). A mieloperoxidáz aktivitás mérését 1 mM hidrogén-peroxid jelenlétében NAPP pufferben (250 ml 80 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-H}_2\text{O}$ oldat pH-ját 80 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-7H}_2\text{O}$ -val pH 5,5-re állítottuk be) végeztük, TMB (3,9 mg/ml, DMSO-ban oldva, majd 1:8 arányban elegyítve NAPP pufferrel) szubsztráttal. Az MPO aktivitást 650 nm-en, fotometriásan detektáltuk. Eredményeinket fehérjetartalomra vonatkoztattuk. A felülúszó fehérjetartalmát Comassie reagenssel határoztuk meg.

5.2.19. *Statisztikai analízis*

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

6. EREDMÉNYEK

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

Más sejttípusok esetében már ismert volt, hogy az MNNG aktiválja a DNS törés - PARP aktiváció útvonalat (Juarez-Salinas és mtsai., 1979), ezért megvizsgáltuk, hogy rendelkezik-e hasonló hatással timocitákon. Az MNNG jelentős mértékű nekrotikus sejtpusztulást (PI felvétel) eredményezett, ami a PARP gátlószerrel és a tiolos antioxidánsokkal kivédhető volt (4. ábra). Ezzel egyidejűleg azonban a PARP gátlásának hatására emelkedtek az apoptotikus paraméterek (6. és 7. ábra). A tiolos antioxidánsok - a PARP inhibitorhoz hasonlóan - az alapérték alá csökkentették az MNNG által kiváltott PARP aktivitását (8. ábra). Az alkalmazott antioxidánsok védelmet nyújtottak az MNNG által okozott DNS törések ellen is, míg a PARP inhibitor PJ34 a DNS törést nem befolyásolta (9. ábra). MNNG kezelés hatására hasonló mitokondriális változásokat tapasztaltunk, mint korábban, az oxidatív stressznek kitett timocitákon (10. ábra). Mivel az MNNG hatásai a fenti folyamatokban hasonlóak az oxidatív stressz hatásaihoz, feltételeztük, hogy az MNNG hatásmechanizmusában is szerepet játszik az oxidatív stressz. Az MNNG molekula tartalmaz egy nitrozocsoportot, ezért elképzelhetőnek tartottuk, hogy a szerves nitrozo-vegyületekhez hasonlóan az MNNG bomlása során is keletkezhet nitrogén-monoxid. Az MNNG vizes oldatában koncentrációfüggő nitrit/nitrát termelődést tapasztaltunk, ami az MNNG-ből történő NO-felszabadulásra utal (12/A. ábra). Eredményeinket az NO-specifikus DAF-2 nevű, fluorogén próbával erősítettük meg. (12/B. ábra).

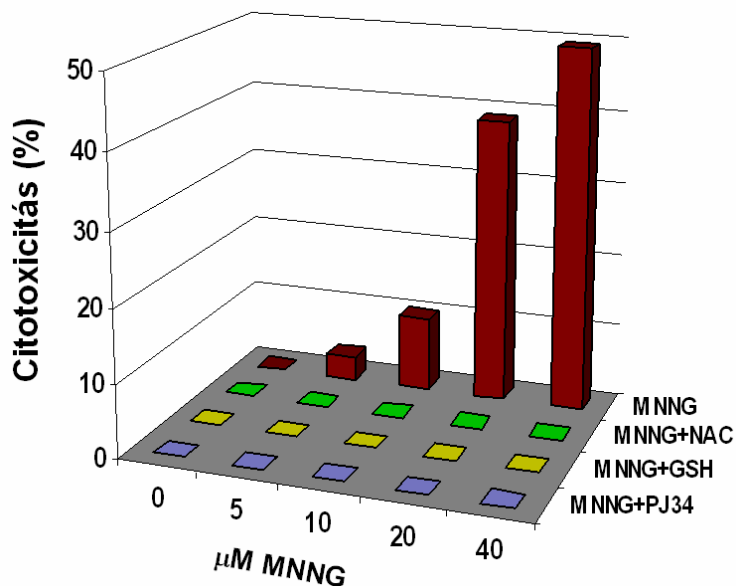
Feltételezéseink között az is szerepelt, hogy az MNNG-ből származó NO a sejten lévő szuperoxiddal egyesülve peroxinitrit képződéséhez vezethet. A peroxinitrit közismerten nitrálni képes a fehérjék tirozin és triptofán oldalláncait, valamint a DNS guanin bázisait (Ischiropoulos, 2003). Az MNNG-vel kezelt sejtek erős immunopozitivitást mutattak nitrotirozinra (12/C. és D. ábra), amely dózis- és időfüggést mutatott (12/D. ábra). Pozitív kontrollként peroxinitritet használtunk, amelynél hasonló nitrálási mintázatot látunk, mint az MNNG esetében (12/D. ábra). A fenti adatok alapján feltételezhető, hogy az MNNG-ből NO szabadul fel, ami szuperoxiddal egyesülve peroxinitritet képez MNNG-vel kezelt timocitákban. Ez arra enged következtetni, hogy a timocitákban peroxinitrit felelős az MNNG által okozott fehérje nitrálásért. A nitrogén-monoxid szintáz (NOS) inhibitor L-

NMMA alkalmazása nem befolyásolta az MNNG által kiváltott DNS törést és citotoxicitást (13/A. és B. ábra), az MNNG kezelés hatására nem indukálódott az iNOS timocitákban (13/C ábra). Eredményeink arra utalnak, hogy az endogén NO termelésnek nincs szerepe a folyamatban.

A további kísérleteinkben alkalmazott sejtp permeábilis szuperoxid-diszmutáz, kataláz, cPTIO (NO scavenger) és FP-15 (peroxinitrit bomlását katalizáló porfirinszármazék) egyike sem volt képes gátolni az MNNG által okozott DNS törést és citotoxicitást (13/A. és B. ábra). Ezek alapján elmondható, hogy az MNNG indukálta citotoxicitásban nem játszik szerepet sem az NO, sem a szuperoxid, sem pedig az ezek egyesüléseként keletkező peroxinitrit.

6.1.1. Az MNNG által okozott sejtpusztulás és PARP aktiváció tanulmányozása

Az MNNG citotoxikus hatását timocitákon a sejtek propidium jodid felvételével vizsgáltuk, ami az elhalt sejteket festi, mivel ép sejtmembránon nem képes áthatolni. Azt találtuk, hogy már egy viszonylag alacsony MNNG koncentráció is koncentrációfüggő citotoxicitást okoz (4. ábra). Összehasonlításképpen, korábbi közlemények adatai szerint 100-500 μ M MNNG koncentráció volt citotoxikus hatású adherens epiteliális, neuronális és fibroblaszt sejteken (Ha és Snyder, 1999; Ying és mtsai., 2001; Yu és mtsai.; 2002). Glutathionnal, N-acetilciszteinnel, vagy a PARP inhibitor PJ-34-gyel történt előkezelésekkel meggátolható volt az MNNG citotoxikus hatása. Eredményeink szerint az oxidatív stressz és a PARP aktiváció szerepet játszik az MNNG citotoxikus hatásában timocitákon. Míg a tiolos antioxidánsok védőhatása a hosszabbtávú kezelések (24h) alkalmazásakor is érvényesült, a PARP gátlószer hatása kevésbé volt kifejezett 24 óra elteltével. (5. ábra).

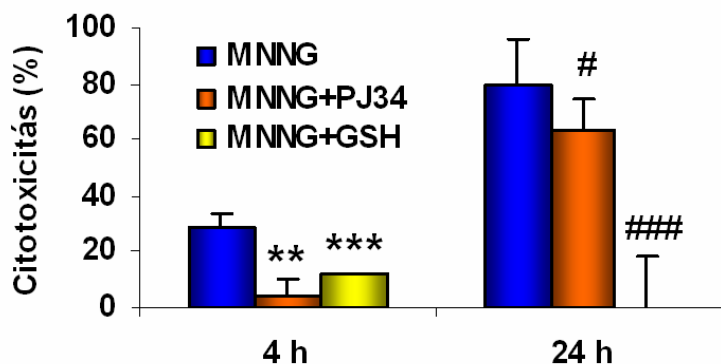


4. ábra

Az MNNG citotoxikus hatása.

A sejteket 30 percig előkezeltük PARP inhibitorral (PJ-34), illetve antioxidánsokkal (NAC, GSH), melyet 4 órás MNNG kezelés követett. A timocitákat PI oldattal festettük, és a citotoxicitást áramlási citometriával határoztuk meg. Koncentrációfüggő citotoxicitást (PI-felvételt) tapasztaltunk. Az alkalmazott tiol antioxidánsok (NAC, GSH) alkalmazása teljesen meggátolta az MNNG okozta citotoxicitást. Hasonló hatást értünk el a PARP inhibitor PJ-34 alkalmazása esetén is. Az

ábra három független kísérlet átlagát mutatja, eredményeink szórás – és szignifikancia értékei megfelelőek voltak, azokat itt, a 3D ábrázolás miatt nem tudtuk feltüntetni.

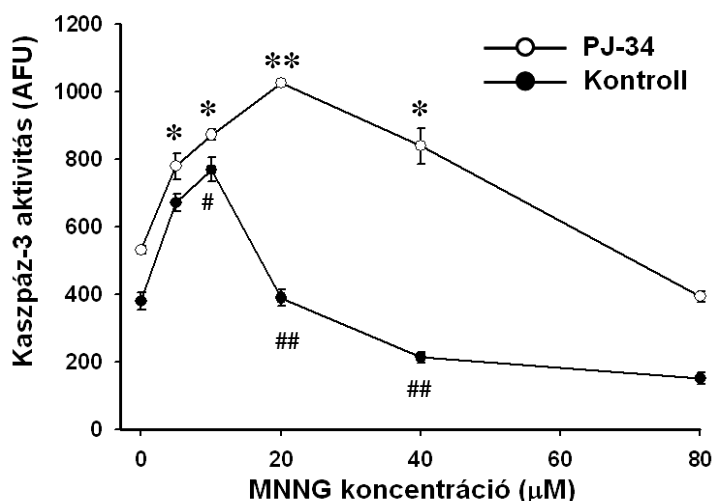


5. ábra *Inkubációs idő szerepe a PARP-gátlás és a GSH citoprotektív hatásában*

A timocitákat 30 percen át előkezeltük GSH-val vagy PJ34-gyel, ezt 4 órás MNNG kezelés (10 μM) követte. A citotoxicitást közvetlenül az MNNG kezelés után, vagy további 20 óra elteltével (24 h) mértük (**P<0,01, ***P<0,005 a 4 órás, MNNG-vel kezelt mintákhoz viszonyítva és #P<0,05, ###P<0,005 a 24 órás, MNNG-vel kezelt mintákhoz viszonyítva). Az ábra három független kísérlet átlagát mutatja (±SD).

Korábbi vizsgálatokban peroxinitrit vagy hidrogén-peroxid kezelés hatására bekövetkező PARP aktiváció eredményeképpen az eredetileg apoptotikus sejthalál helyett nekrozist tapasztaltunk (Virág és mtsai., 1998b,c). E megfigyelést más laboratóriumok tapasztalatai is megerősítették (Cole és Perez-Polo, 2002; Filipovic és mtsai., 1999; Ha és Snyder, 1999). A PARP szerepét a sejthalálban PARP knock out, vagy PARP inhibitorokkal kezelt vad típusú timocitákkal végzett vizsgálatunk is bizonyítja. A PARP gátlása vagy genetikai inaktivációja a nekrotikus paraméterek csökkenését (PI felvétel), és ezzel egyidejűleg az apoptotikus paraméterek (kaspáz-aktiváció, DNS fragmentáció) fokozódását (Virág és mtsai., 1998b,c) eredményezte.

Megvizsgáltuk, hogy az MNNG által stimulált PARP aktivációnak vannak-e az oxidatív stressz indukálta PARP aktivációhoz hasonló következményei. Alacsony MNNG koncentráció alkalmazása esetén emelkedett kaspáz aktivitást mértünk, míg magasabb MNNG koncentrációk hatására a kaspáz aktivitás csökkenését tapasztaltuk. (6. ábra). PJ-34-gyel történő előkezelés hatására timocitákban az MNNG indukálta kaspáz-aktiváció emelkedett.

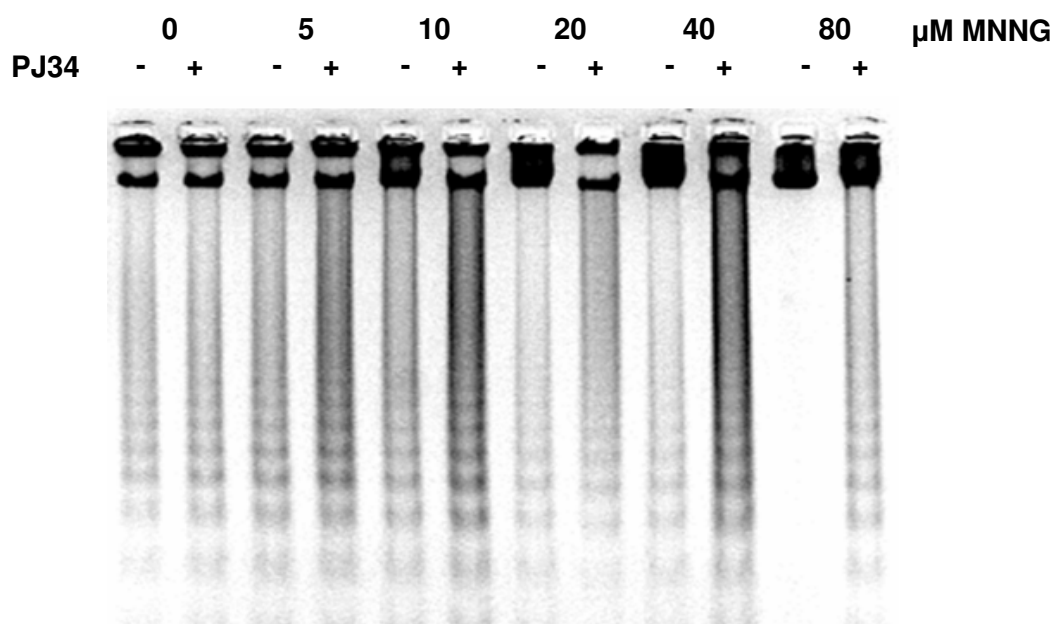


6. ábra MNNG hatása a kaspáz-3 aktivitásra

A timociták 6 órás MNNG kezelését követően tetrapeptid kaspázszubsztrát aminometil-kumarin konjugátumának (DEVD-AMC) hidrolízisét fluorimetriás módon meghatározva mértük a kaspáz-aktivitást. Egy kétfázisú görbét kaptunk: alacsonyabb MNNG koncentrációk esetében növekvő kaspáz-aktivitást tapasztaltunk, ami az MNNG koncentráció emelkedésével az alapérték alá

csökken. A PARP-ot gátló PJ-34 alkalmazása (30 perces előkezelés) esetén magasabb kaspáz-aktivitást tapasztaltunk. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ a PJ34-gyel előkezelt kontrollhoz képest; # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$ a kontrollhoz képest). Az ábra három független mérés átlagát mutatja (\pm SD)

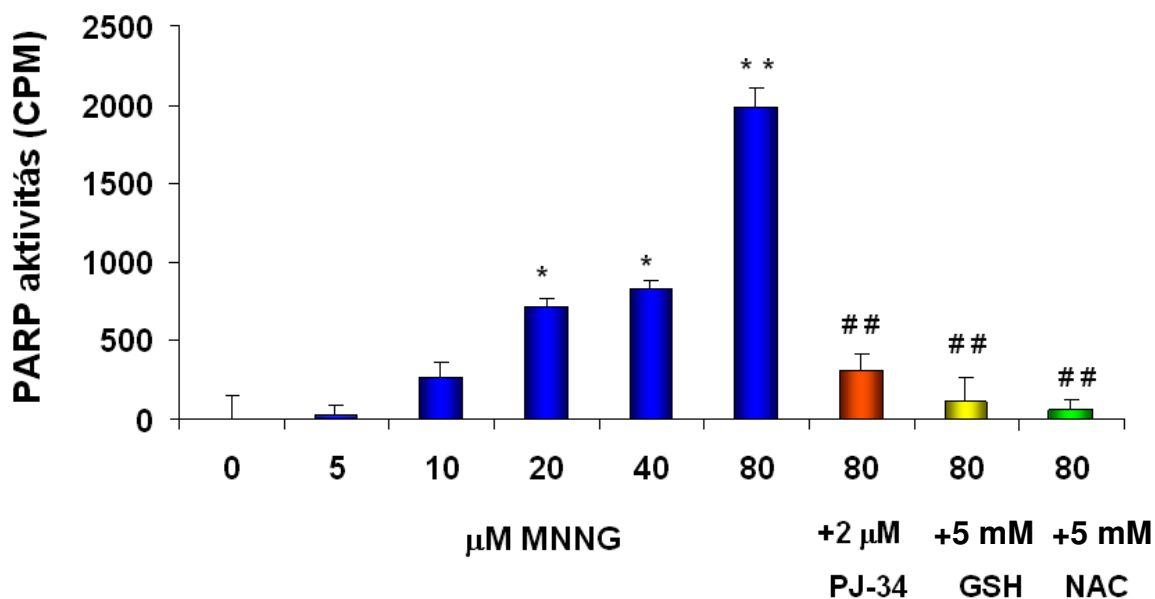
Az apoptotikus sejthalál egy másik jellemző eseménye az internukleoszómális DNS fragmentáció, amely agaróz gélelektroforézis segítségével vizsgálható. A kaszpáz-aktivitáshoz hasonlóan a DNS fragmentáció is csökkenő tendenciát mutatott magas MNNG koncentrációk esetén, amelyet a PARP gátlószer alkalmazása ebben az esetben is ellensúlyozni tudott (7. ábra).



7. ábra DNS fragmentáció vizsgálata.

A timocitákat hat órán át kezeltük 10 µM MNNG-vel. Egyes mintákat (+) PARP inhibitorral (1 µM PJ34) kezeltünk elő, 30 percen át. Az internukleoszómális DNS fragmentációt agaróz gélelektroforézissel mutattuk ki, a „Módszerek” fejezetben leírtak szerint. Az apoptotikus sejtek számára a sávok intenzitásából következtethetünk. Alacsony MNNG koncentrációk hatására a sávok intenzitása növekszik, nagy MNNG koncentrációknál viszont megszűnik (-). PARP gátlószer (PJ-34) alkalmazásakor (+) a sávok intenzitása az MNNG koncentráció növekedésével nő, ami az apoptotikus sejtek számának növekedésére utal. Az ábrán bemutatott eredmények három független kísérlet eredményeit szemléltetik.

Az MNNG PARP aktivációt okozott timocitákban, ami mind a tiolos antioxidánsokkal, mind pedig a PARP inhibitorral gátolható volt (8. ábra).

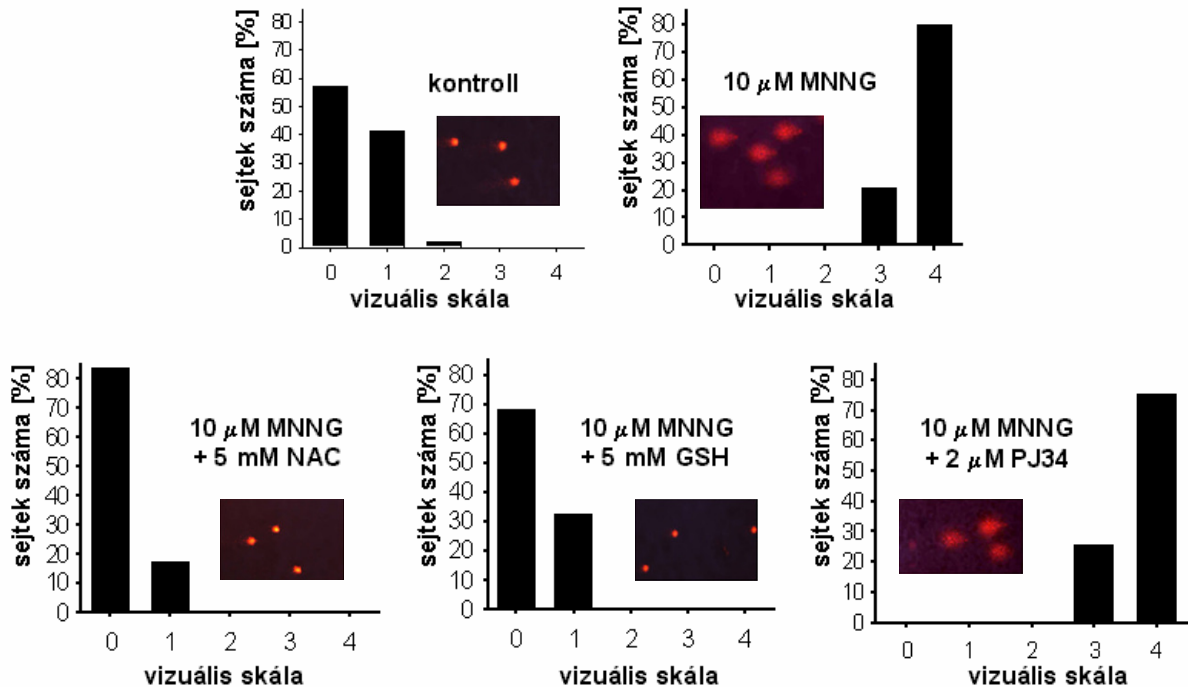


8. ábra PARP aktiváció vizsgálata

Az egyes mintákat 30 percig előkezeltünk 5mM NAC-cal, 5 mM GSH-val, illetve a PARP inhibitor 2 μM PJ-34-gyel. Az MNNG-kezelés (0-80 μM) 20 percig tartott. A PARP aktivációját a radioaktív NAD⁺ beépülésének mérésével követtük nyomon, a „Módszerek” fejezetben leírtak szerint. A PARP aktivitás az MNNG koncentráció függvényében változott (0-80 μM) (* p<0,05, ** p<0,01 a kontrollhoz képest). A PARP aktivitása antioxidánsokkal (5mM NAC, 5 mM GSH), illetve PARP inhibitor (2 μM PJ-34) alkalmazásával jelentős mértékben csökkenthető volt (##p<0,01 a 80 μM MNNG kezeléshez képest). (CPM: percenkénti beütésszám) Az ábra négy független kísérlet átlagát mutatja (±SD).

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

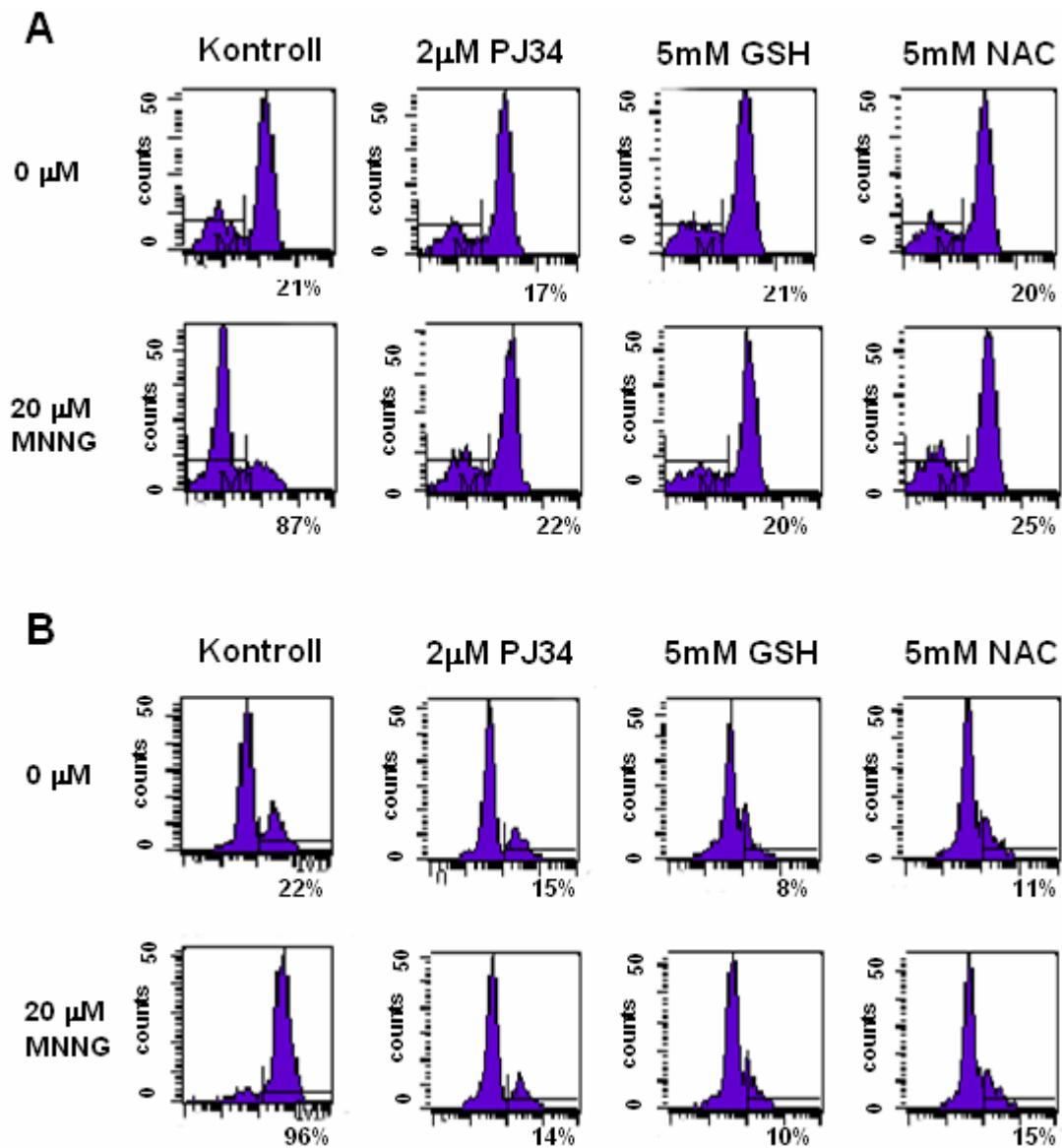
A DNS törést comet assay-vel detektáltuk. A kezeletlen sejtek kerek morfológiát mutattak, tehát maganyaguk a sejtmagban maradt. Ezzel szemben MNNG (10 μM) kezelés hatására jelentős DNS károsodást tapasztaltunk, amit az üstökös-szerű morfológia mutat (9. ábra). Szélesspektrumú antioxidánsok [glutathion és N-acetilcisztein (5-5 mM)] megakadályozták a DNS törések kialakulását, a PARP inhibitor PJ34 azonban nem volt hatással erre a paraméterre (9. ábra).



9. ábra. MNNG által kiváltott DNS törés

Egyes mintákat 30 percig előkezeltünk 5mM NAC-cal, 5 mM GSH-val, illetve a PARP inhibitor PJ-34-gyel (2 μ M). A timocitákat 10 μ M MNNG-vel 20 percen át kezeltük. A DNS törést comet assay-vel detektáltuk. Megfigyelhető a kezeltlen sejtek magjának ép morfológiája, míg az MNNG-vel kezelt sejtek jelentős DNS-károsodást szenvedtek. Tíol antioxidánsok (NAC, GSH) alkalmazásával az MNNG okozta DNS-törés kivédhető volt, a PARP inhibitor (PJ-34) alkalmazása a DNS károsodás mértékét nem befolyásolta. A kapott képek értékelésére egy vizuális értékelő – skálát állítottunk fel, a „Módszerek” fejezetben leírtak alapján. Eredményeinket hisztogramokon ábrázoltuk és reprezentatív mikrofotográfiákat mutatunk be, melyek három független kísérlet eredményeit szemléltetik.

Korábbi vizsgálataink alapján a peroxinitrit, vagy hidrogén-peroxid által kiváltott nekrotikus sejthalált mitokondriális változások is kísérik, mint például a mitokondriális membrán depolarizációja, szekunder szuperoxid termelés és a mitokondrium szerkezeti sérülése (Virág és mtsai., 1998b). Ezenkívül azt is bizonyították, hogy ezeket a változásokat timocitákban a PARP aktivációja okozza (Virág és mtsai., 1998b). Megvizsgáltuk, hogy vajon az MNNG indukál-e mitokondriális membrán-depolarizációt és szekunder szuperoxid termelést. MNNG kezelés hatására hasonló mitokondriális változásokat tapasztaltunk, mint korábban, az oxidatív stressznek kitett timocitákon (10. ábra).

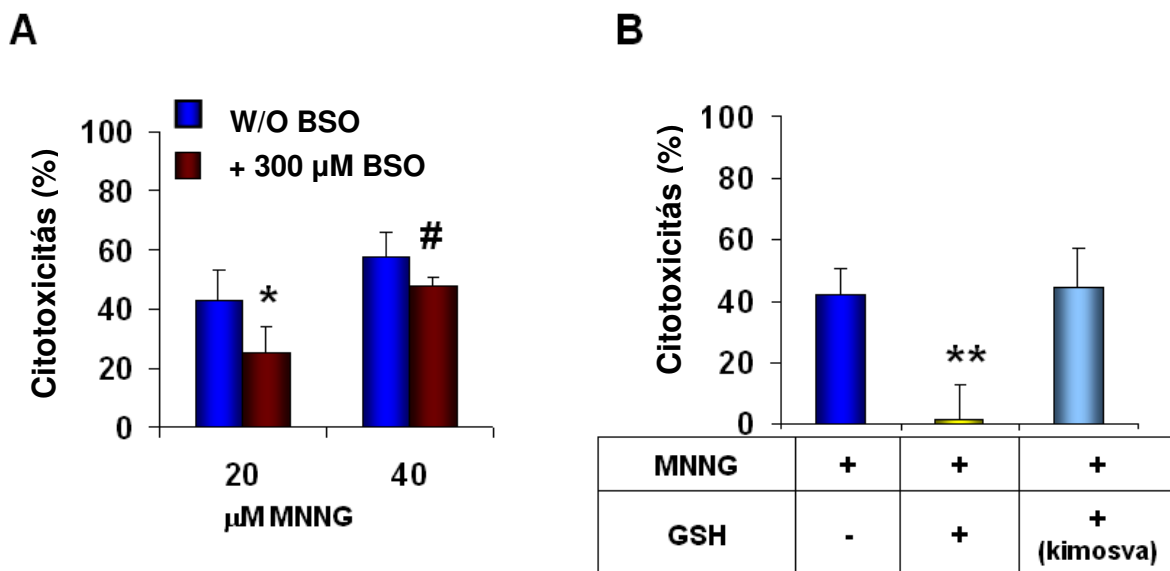


10. ábra Az MNNG által kiváltott mitokondriális depolarizáció és mitokondriális szuperoxid termelés vizsgálata áramlási citometriával.

A timocitákat 30 percen át előkezeltük PJ34-gyel, GSH-val, vagy NAC-cal, majd a sejteket MNNG-vel kezeltük 3 órán át. A mitokondriális membrán depolarizációját DiO₆(3) fluoreszcens festékkel vizsgáltuk (A). A fluoreszcencia intenzitásának csökkenése a mitokondriális membránpotenciál csökkenésére utal. A mitokondriális szuperoxid-termelés vizsgálata során hidroetidiummal festettük a sejteket (B), melyet a szuperoxid erősen fluoreszkáló etidiummá alakít. Az ábrán bemutatott eredmények három független kísérlet eredményeit szemléltetik.

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

A glutationszintézis sebesség-meghatározó lépését a gamma-glutamil cisztein szintáz enzim katalizálja. Ez az enzim specifikusan gátolható butionin-szulfoximinnel (BSO). Megfelelő ideig tartó BSO kezeléssel depletálható az intracelluláris glutation. A BSO (300 μM) kezelés valamelyest csökkentette az MNNG citotoxikus hatását (11. ábra, A panel). A glutationkezelést követően PBS-sel mosva a sejteket, nem tapasztaltuk a GSH citoprotektív hatását (11. ábra, B panel)



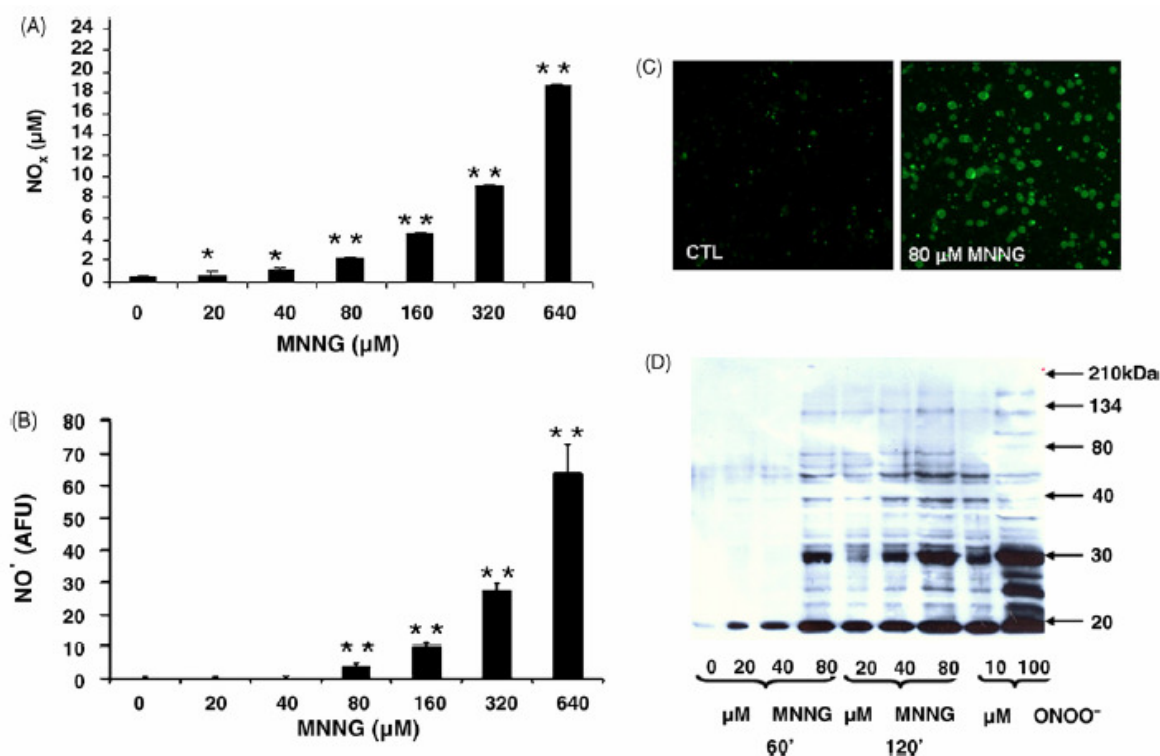
11. ábra Az intra- és extracelluláris glutation-depléció hatása az MNNG által kiváltott citotoxicitásra.

Az MNNG citotoxikus hatását (10 μM és 20 μM , 4 óra) négy órás BSO előkezelést követően is vizsgáltuk (A). (* $p < 0,05$, a 20 μM MNNG-vel kezelt mintához viszonyítva, # $p < 0,05$ a 40 μM MNNG-vel kezelt mintához képest). Ezen kívül tanulmányoztuk az extracelluláris GSH eltávolításának hatását is, melynek során a GSH előkezelést követően a sejteket PBS-sel mostuk, majd 20 μM MNNG-el kezeltük (B panel, utolsó oszlop). (** $p < 0,01$, a 20 μM MNNG-vel kezelt mintához viszonyítva, az ábrák négy párhuzamos kísérlet átlagát mutatják \pm S.D.)

6.1.4. Az MNNG-ből felszabaduló NO hatásainak vizsgálata

Az MNNG molekula tartalmaz egy nitrozo csoportot, ezért elképzelhetőnek tartottuk, hogy a szerves nitrozo-vegyületekhez hasonlóan az MNNG bomlása során is keletkezhet nitrogén-monoxid. Az MNNG vizes oldatában koncentrációfüggő nitrit/nitrát termelődést tapasztaltunk, ami az MNNG-ből történő NO felszabadulásra utal (12/A. ábra). Eredményeinket az NO-specifikus, DAF-2 nevű fluorogén próbával erősítettük meg. (12/B.

ábra). Feltételezéseink között az is szerepelt, hogy az MNNG-ből származó NO a sejtben lévő szuperoxiddal egyesülve peroxinitrit képződéséhez vezethet. A peroxinitrit közismerten nitrálni képes a fehérjék tirozin és triptofán oldalláncait, valamint a DNS guanin bázisait (Ischiropoulos, 2003). Az MNNG-vel kezelt sejtek erős immunopozitivitást mutattak nitrotirozinra (12/C. és D. ábra), amely dózis- és időfüggést mutatott (12/D. ábra). Pozitív kontrollként peroxinitritet használtunk, amelynél hasonló nitrálási mintázatot láttunk, mint az MNNG esetében.

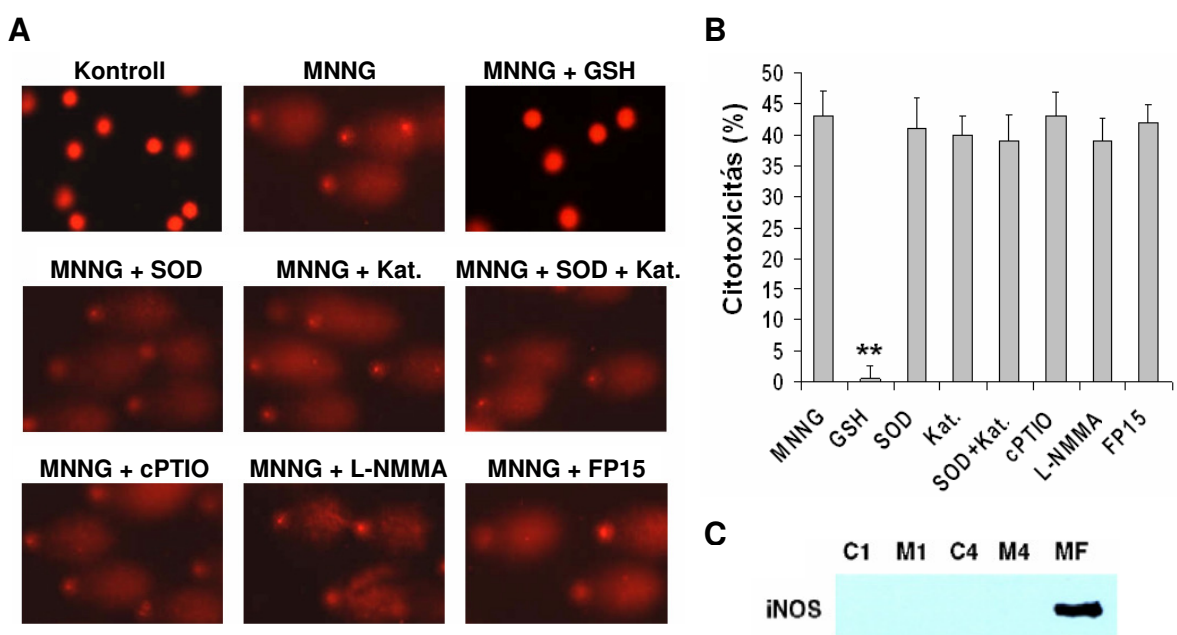


12. ábra A felszabaduló NO hatásai MNNG-vel kezelt timocitákon

Az MNNG-t PBS-ben hígítva, sejtmentes rendszerben 4 órán át inkubáltuk szobahőmérsékleten (A és B). A nitrit-tartalmat Griess reakcióval (A), az NO-t pedig a DAF-2 fluoreszcenciájának detektálásával mértük. Az A és B panelen bemutatott eredmények három független kísérlet átlagát (\pm SD) mutatják, * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, a kontrollhoz képest. A C és D panelen bemutatott vizsgálatokhoz 1 órás (C) vagy 1 és 2 órás (D) MNNG kezelést végeztünk timocitákon. A fehérjéken végbemenő tirozin nitrálódást immunfluoreszcens festéssel (C) és Western blottal (D) detektáltuk.

Az előzőekben bemutattuk, hogy az MNNG bomlása során nitrogén-monoxid keletkezik, amely szuperoxiddal egyesülve peroxinitritet képezhet. Eredményeink alapján valószínűsíthető továbbá, hogy mind a peroxinitrit, mind pedig az MNNG citotoxikus hatásában szerepe van a PARP aktivációjának (Berger és mtsai., 1983; Virag és mtsai.,

2003). Ezért megvizsgáltuk, hogy szerepet játszik-e a peroxinitrit az MNNG citotoxikus hatásában. Feltevésünk mellett szól a tiolos antioxidánsok védőhatása az MNNG által okozott DNS töréssel és citotoxicitással szemben. Ismert viszont, hogy a GSH és a NAC a reaktív oxigén – és nitrogén intermedierek (ROI és RNI) mellett az alkil gyökök befogására is képesek, ezért megvizsgáltuk specifikus ROI és RNI inhibitorok hatását is. Kísérleteinkben sejtp permeábilis szuperoxid-dizmutázt, katalázt, cPTIO-t (NO scavenger), L-NMMA-t (NOS inhibitor), és FP-15-öt (peroxinitrit bomlását katalizáló porfirinszármazék) alkalmaztunk. (13/A. ábra). Az MNNG által okozott DNS törést és citotoxicitást nem volt képes megakadályozni egyik általunk alkalmazott anyag sem. Fenti megfigyeléseink alapján elmondható, hogy az MNNG indukálta citotoxicitásban nem játszik szerepet sem az NO, sem a szuperoxid, sem pedig az ezek egyesüléseként keletkező peroxinitrit (13/B. ábra).



13. ábra A szuperoxid, a nitrogén-monoxid és a peroxinitrit szerepének vizsgálata az MNNG citotoxikus hatásában

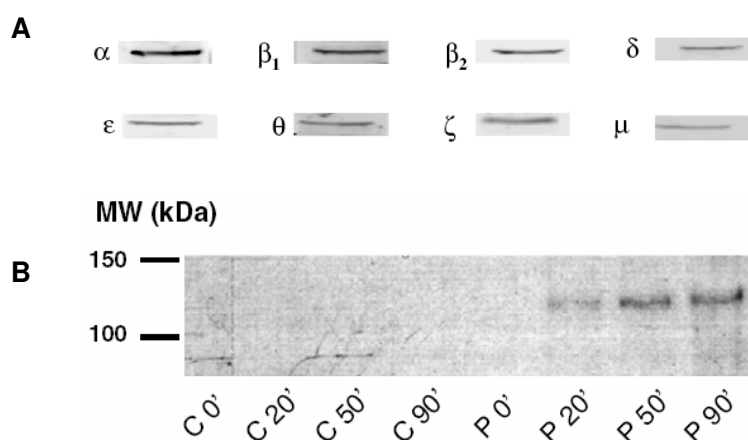
A timocitákat 30 percig PEG-SOD-dal (200 U/ml), PEG-katalázzal (Kat., 800 U/ml), PEG-SOD és PEG-kataláz kombinációjával, cPTIO-val (300 μ M), L-NMMA-val FP-15-tel (1 μ g/ml) és pozitív kontrollként GSH-val kezeltük elő. Húsz perces MNNG (10 μ M) kezelést követően comet assay-t végeztünk (A). A citotoxicitást 4 óra elteltével vizsgáltunk (B) (** $p < 0,01$ a kontrollhoz képest). A B panel három független kísérlet átlagát (\pm S.D.) mutatja. Az iNOS expressziójának vizsgálatát Western blottal végeztük (C). Egy, illetve négy órás MNNG kezelést alkalmaztunk (M1, M4). Pozitív kontrollként interferon-gammával és lipopoliszachariddal kezelt egér peritoneális makrofágok lizátumát használtuk (MF).

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

Korábbi adataink alapján az MNNG kezelés timocitákban DNS törések keletkezéséhez és ezáltal a PARP-1 enzim aktivációjához vezet (Bai és mtsai., 2007). Irodalmi adatok szerint a PKC képes a PARP-1 *in vitro* foszforilációjára (Bauer és mtsai., 1992; Tanaka és mtsai., 1987). Megvizsgáltuk, hogy képes-e a PKC *in vivo* is foszforilálni a PARP-1-et, és ha igen, akkor hatással van-e ez a foszforiláció az MNNG indukálta PARP aktivációra, illetve a sejtek életképességére.

A timocitákban előforduló PKC izoformákat Western blot módszerrel határoztuk meg. Eredményeink azt mutatják, hogy egér timocitákban az összes általunk vizsgált PKC izoforma expresszálódik (14/A. ábra).

Megvizsgáltuk a tisztított PARP-1 *in vitro* foszforilációját is tisztított PKC enzimek által. A PKC enzimeket tartalmazó elegy a klasszikus PKC izoformákat (alfa, béta és gamma) tartalmazta. Radioaktív jelölésre gamma helyzetben jelölt ^{32}P -ATP-t használtunk. Mintáinkat 20, 50, vagy 90 percig inkubáltuk, 30 °C-on. Negatív kontrollként PKC nélküli mintát alkalmaztunk. Mintáinkat SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel választottuk el, majd az eredményeket autoradiográfiával detektáltuk. (14/B. ábra).

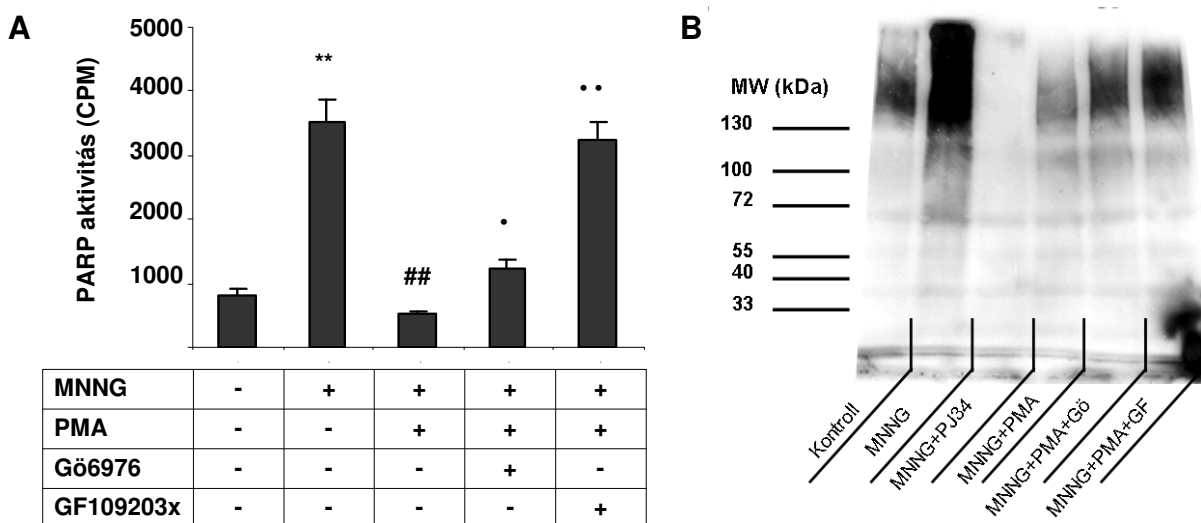


14. ábra PKC izoformák expressziója timocitákban és PARP *in vitro* foszforilációja

A timocitákban előforduló PKC izoformákat Western blot módszerrel határoztuk meg (A). A PARP *in vitro* foszforilációját autoradiográfiával detektáltuk (B). A foszforilációt 20, 50, vagy 90 percig végeztük, 30 °C-on. Negatív kontrollként PKC nélküli mintát alkalmaztunk (C0', C20', C50', C90'). A P0', P20', P50', P90' jelölésű minták tartalmazták a PKC enzimeket, a számok az inkubációs időket jelölik percben kifejezve. Az ábrán bemutatott eredmények három független kísérlet eredményeit szemléltetik.

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

Két rendszerben vizsgáltuk a PKC hatását az MNNG indukálta PARP aktivációra. Az egyik a tríciummal jelzett NAD⁺ beépülésének vizsgálatán alapuló PARP aktivitásmérés (15/A ábra), a másik pedig a PARP aktiváció eredményeképpen létrejövő polimerek mennyiségét detektáló Western blot módszer (15/B ábra). MNNG-vel kezelve a timocitákat - korábbi eredményeinknek megfelelően - jelentős mértékű PARP aktivációt tapasztaltunk, melyet megakadályozott a PARP gátlószer PJ34 egyidejű alkalmazása (15/A. ábra). A PKC aktivátor PMA-val (forbol-12-mirisztát-13-acetát) történt előkezelés hatására az MNNG által kiváltott PARP aktiváció gátlását tapasztaltuk. Ezzel összhangban a keletkező ADP-ribóz polimerek mennyiségének szignifikáns csökkenését tapasztaltuk a PMA-vel kezelt sejtekben (15/B. ábra). A PMA PARP-gátló hatása különböző mértékben ellensúlyozható volt PKC inhibitorok alkalmazásával. A széles spektrumú GF109203X (bizindolmaleimid-1) - ami a PKC α -, β _I-, β _{II}-, γ -, δ -, és ϵ - izoformákat gátolja - nagymértékben csökkentette a PMA hatását, míg csupán a klasszikus PKC enzimekre ható Gö6976 alkalmazásával részleges gátlást tudunk elérni (15. ábra).



15. ábra A PKC aktiváció hatása az MNNG indukálta PARP aktivációra

A sejteket MNNG-vel kezeltük (20 μ M, 10 perc). A PMA (100 nM) és a PJ34 (2 μ M) előkezelések 30 percig tartottak. A PKC inhibitorokkal történő előkezelések (Gö6976, GF109203X) a PMA kezelést megelőzően, 30 percig tartottak. A PARP aktivitását a tríciummal jelzett NAD⁺ beépülésének mérésével határoztuk meg (A). MNNG kezelés hatására szignifikánsan fokozódott a PARP aktivitása (**P<0,01 a kontrollhoz viszonyítva). A PMA előkezelés szignifikánsan csökkentette az MNNG indukálta PARP aktivációt. A PKC inhibitorokkal történő előkezelések különböző mértékben ellensúlyozták a PMA hatását (**P<0,01; •P<0,05). Az A panel négy független kísérlet átlagát (\pm SD) mutatja.

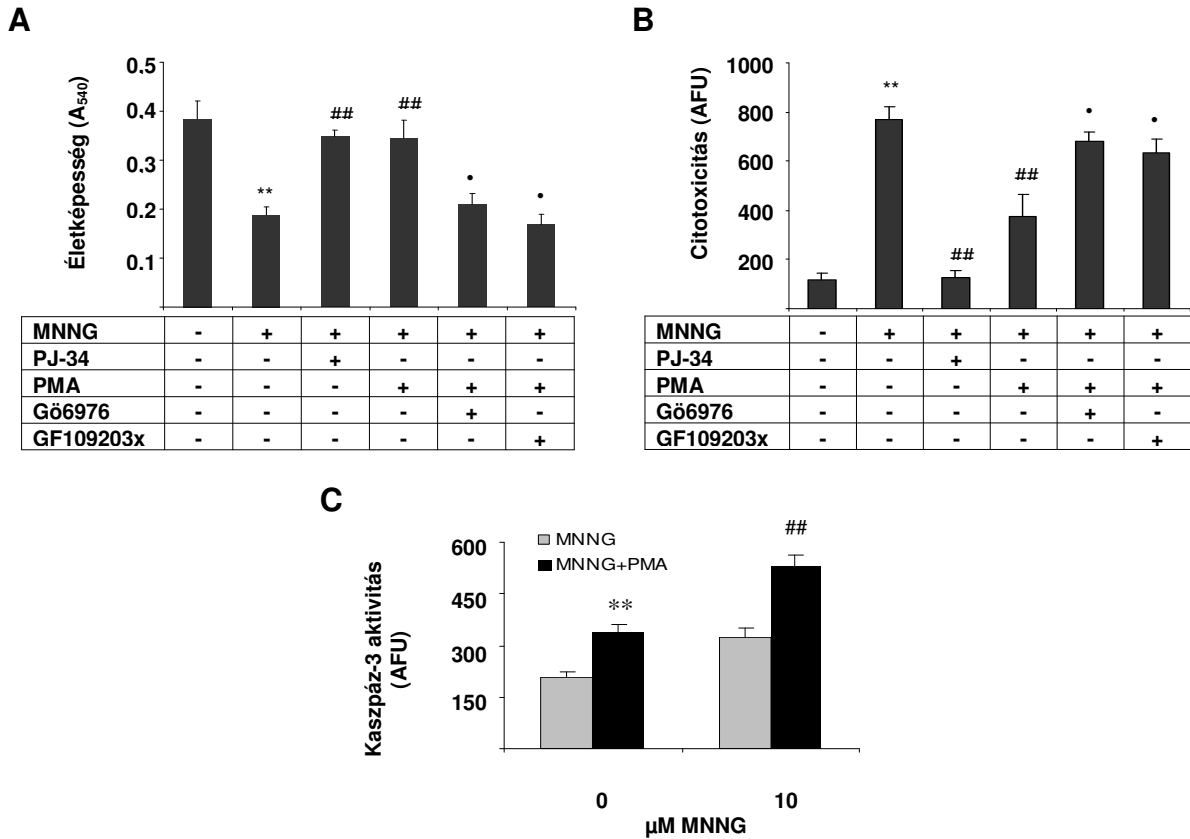
6.2.2. A PKC aktiváció hatása az MNNG által kiváltott citotoxicitásra

Annak kiderítésére, hogy milyen módon befolyásolja a PKC aktivációja az MNNG citotoxikus hatását, a sejthalál különböző paramétereit vizsgáltuk MNNG-vel kezelt sejteken. A kezelések elvégzése után meghatároztuk a sejtek életképességét, mértük a nekrotikus sejthalálra utaló propidium jodid felvételt, valamint az apoptózis markereként ismert kaszpáz-3 aktivációt.

Az MNNG kezelés szignifikánsan csökkentette a sejtek életképességét és növelte a nekrotikus sejtek számát (16/B. ábra). A PARP gátlószerekkel végzett vizsgálataink alapján a sejtpusztulásban szerepet játszik a PARP aktivációja (16/A. és B. ábra). A PMA-val történt előkezelés szintén gátolta az MNNG kezelés hatására bekövetkező timocita nekrozist, ez összhangban van PARP gátló hatásával is (16/A és B ábra). Korábbi - PARP-függő sejthalállal kapcsolatos, egér timocitákon végzett - vizsgálataink szerint a nekrozist gátolhatjuk PARP inhibitorokkal (Virág és mtsai., 1998b,c), ezáltal megőrizhetjük a sejt NAD⁺ - és ATP-készleteit, így emelhető a sejtek energiaszintje. Megfigyeléseink szerint az ép sejtek és az apoptotikus sejtek száma növekszik, a nekrotikus sejtek száma csökken a PARP gátlásának, vagy genetikai inaktivációjának hatására (Virág és mtsai., 1998b,c). PMA jelenlétében az MNNG-vel kezelt sejtekben emelkedett kaszpáz aktivitást mértünk (16/C ábra). A PMA hatását csökkenteni tudtuk az alkalmazott PKC inhibitorokkal (GF109203X, Gö6976) (16/A és B ábra).

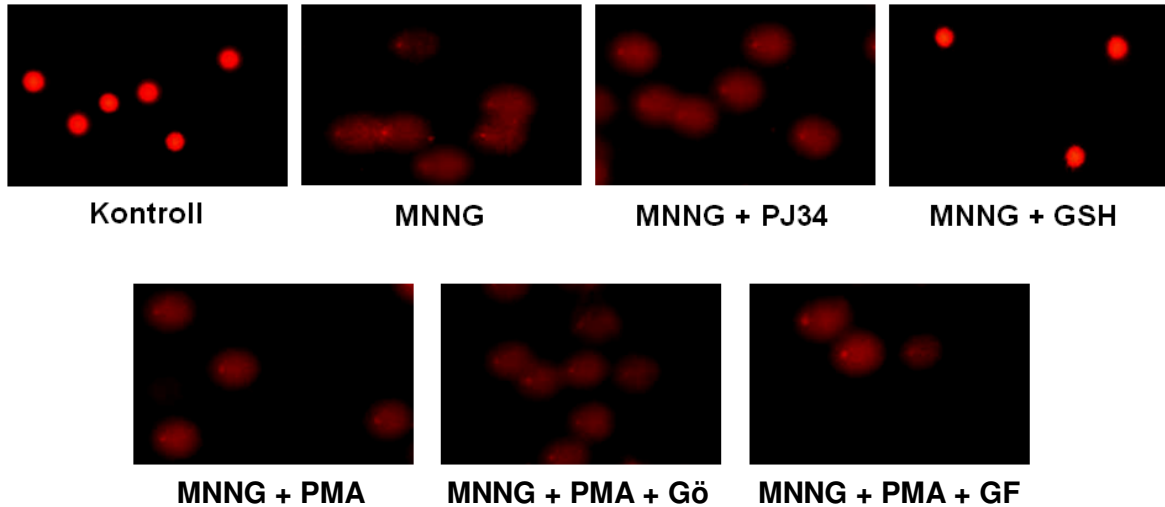
6.2.3. A PKC aktiváció hatása az MNNG indukálta DNS törésre

Kíváncsiak voltunk, hogy a PKC aktivációja befolyásolja-e a PARP aktivációhoz vezető folyamatokat, vagy közvetlenül a PARP aktivációjára hat. Ennek kiderítésére vizsgáltuk, hogy befolyásolják-e a PKC-re ható aktiváló -, illetve gátlószerek az MNNG-indukálta DNS törést. Vizsgálatainkat comet assay módszerrel végeztük. Eredményeink szerint sem a PMA sem pedig a PKC inhibitorok nem befolyásolják az MNNG hatására létrejövő DNS törést (17. ábra). Pozitív kontrollként glutationt (GSH) használtunk, mely a 6.1. fejezetben leírtaknak megfelelően megakadályozta az MNNG által kiváltott DNS törést. Ezek az eredmények megerősítik azt a feltevésünket, miszerint a PKC nem a PARP aktivációhoz vezető folyamatokat, hanem magát a PARP aktivációt befolyásolja.



16. ábra A PKC aktiváció hatása az MNNG indukálta citotoxicitásra.

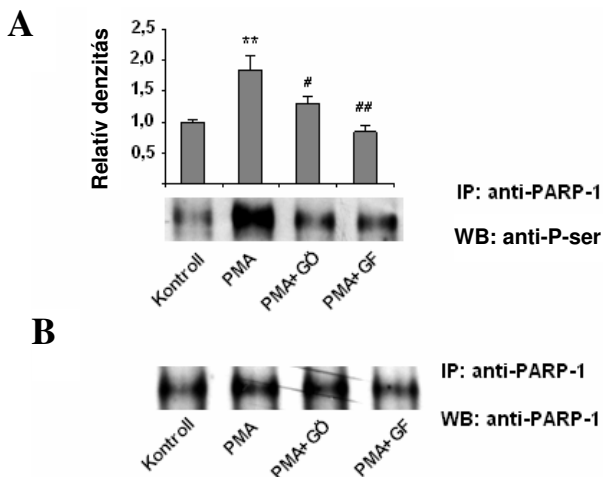
A sejteket 4 órán át kezeltük 10 μM (A,C), illetve 20 μM (B) MNNG-vel. A PMA-val (100 nM) és a PJ43-gyel történő előkezelést 30 percig végeztük. A PKC inhibitorokkal történő előkezelések (Gö6976, GF109203X) a PMA kezelést megelőzően történtek, 30 percig tartottak. A sejtek életképességét MTT teszttel (A), a citotoxicitást pedig a sejtek PI felvételével (B) vizsgáltuk. Az apoptotikus sejthalál jellemző paraméterét, a kaszpáz-3 aktivitást fluoreszcens szubsztrát segítségével követtük nyomon (C). Az MNNG szignifikánsan csökkentette a sejtek életképességét (** $P < 0,01$ a kontrollhoz viszonyítva), és fokozta a nekrotikus sejthalált. A PMA és a PJ34 szignifikánsan (** $P < 0,01$) csökkentette az MNNG hatását. A PKC inhibitorok (Gö6976, GF109203X) ellensúlyozták a PMA hatását (** $P < 0,01$; * $P < 0,05$). A PMA a nekrotikus sejthalál csökkentésével egyidejűleg fokozta az apoptotikus paramétereket (** $P < 0,01$ a kontrollhoz viszonyítva, ** $P < 0,01$ a csak MNNG-vel kezelt mintához képest). A diagramok három-három független kísérlet átlagát mutatják (\pm S.D.)



17. ábra A PKC aktiváció hatása az MNNG indukálta DNS törésre (comet assay)
 A sejteket 10 percen át kezeltük 20 μ M MNNG-vel. A PMA-val (100 nM) és a PJ43-gyel (3 μ M) történő előkezelést 30 percig végeztük. A PKC inhibitorokkal történő előkezelések (Gö6976, GF109203X) a PMA kezelést megelőzően történtek, 30 percig tartottak. Sem a PMA sem pedig a PKC inhibitorok nem befolyásolják az MNNG hatására létrejövő DNS törést. Pozitív kontrollként glutationt (GSH) használtunk. A reprezentatív képek három független kísérlet eredményét mutatják.

6.2.4. A PARP-1 PKC általi foszforilációjának vizsgálata

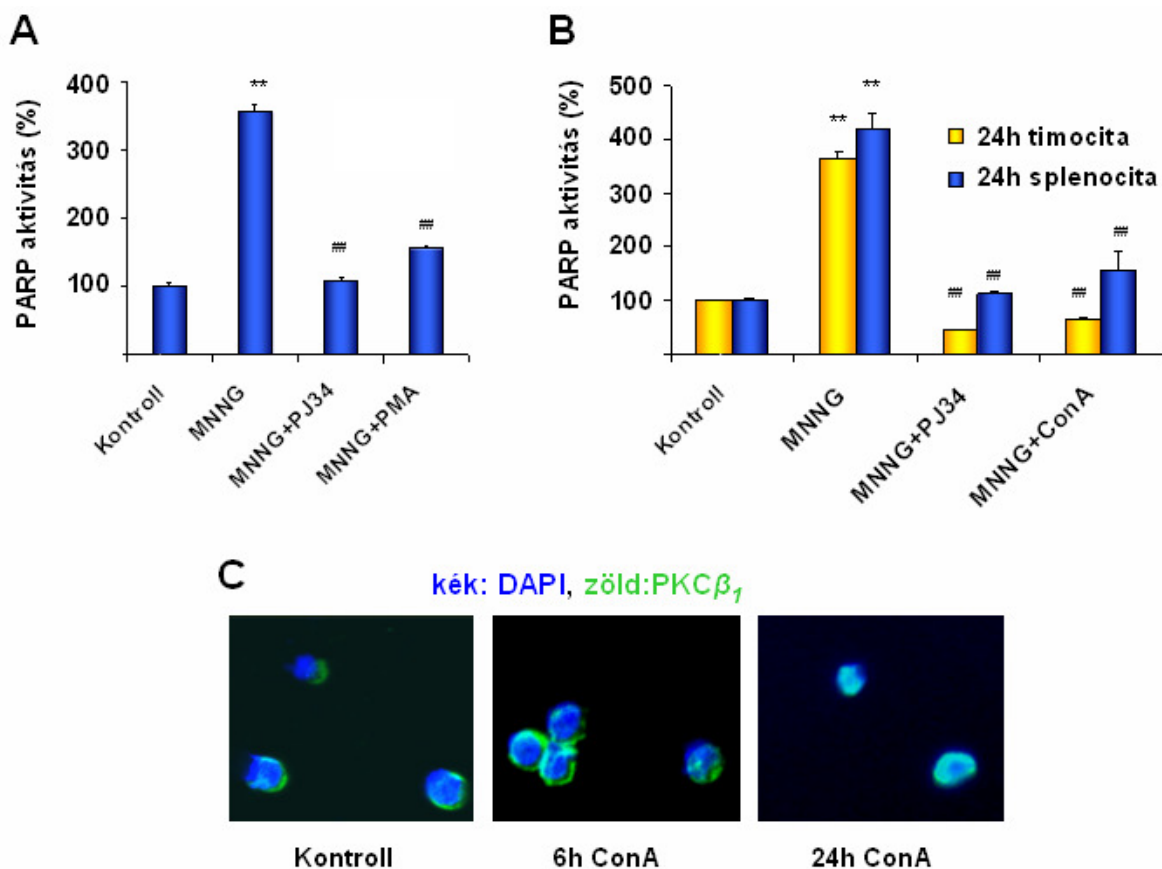
A PMA kezelést követően a PARP-1 foszforilációját tapasztaltuk, amit az alkalmazott PKC inhibitorok csökkentettek (18/A. ábra). Mintáink PARP-1 -tartalmát PARP-1 elleni antitesttel határoztuk meg (18/B. ábra).



18. ábra A PARP-1 *in vivo* foszforilációja
 A timocitákat PKC inhibitorokkal kezeltük 30 percig, a PMA kezelést (100 nM, 30 perc) megelőzően. Immunprecipitáltuk a PARP-1-et, majd P-Ser elleni antitesttel Western blotot végeztünk (A). A PARP-1 foszforilációja PMA hatására növekszik. A PMA hatását a PKC inhibitorok csökkentették. Mintáink összehasonlíthatósága érdekében, az előzővel párhuzamosan elvégeztünk egy másik Western blotot is, PARP-1 elleni antitesttel (B). Foszfoserin elleni antitesttel immunprecipitálva és PARP elleni antitesttel Western blotot végezve hasonló eredményeket kaptunk. (**P<0,01 a kontrollhoz viszonyítva, #P<0,05, ##P<0,01 a PMA-val kezelt mintához viszonyítva.)

6.2.5. A PKC útvonal indirekt stimulációjának hatása a PARP-aktivitásra

A PMA az érettebb limfoid sejtpopulációt képviselő splenociták esetében is PARP-gátló hatásúnak bizonyult (19/A ábra). A PKC jelátviteli útvonalának ConA-val történt indirekt stimulációja (24 h) szintén a PARP gátlásához vezetett, timocitákon és splenocitákon egyaránt (19/B ábra). Immunfluoreszcens vizsgálatban 24 órás ConA stimulus hatására a PKC β_1 nukleáris transzlokációját tapasztaltuk (19/C ábra).



19. ábra A timociták aktivációjának hatása a PARP-aktivitásra.

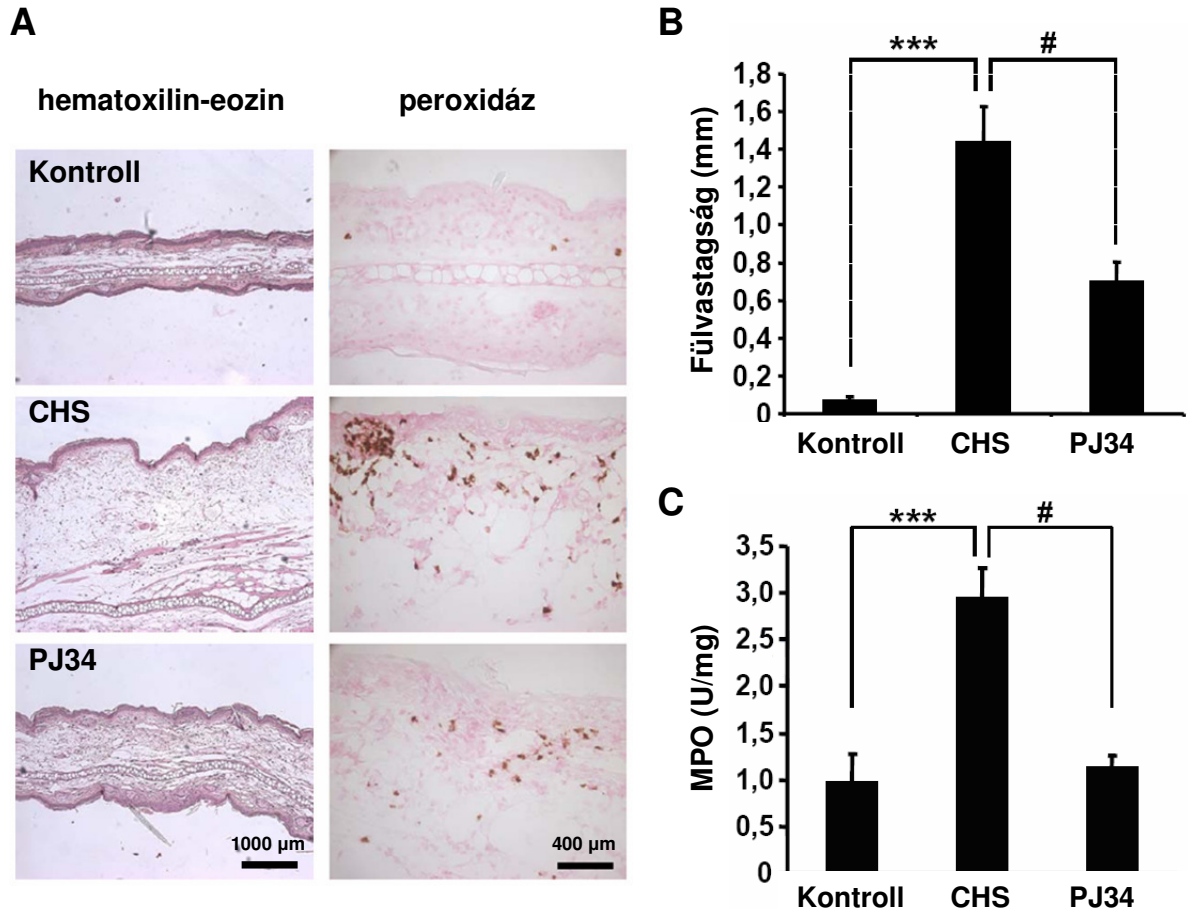
A splenociták PMA-val történő előkezelése (30 perc), a timocitákhoz hasonlóan gátolta a PARP-aktivációt (A). Timocitákat és splenocitákat 1, 6 és 24 órán át Concanavalin A - val (ConA) kezeltünk, melyet 10 perces MNNG kezelés (20 μ M) követett. Az 1 - és 6 órás ConA kezelés nem befolyásolta a PARP-aktivitást, viszont a 24 órás ConA kezelés hatására jelentősen csökkent az MNNG által kiváltott PARP-aktiváció (B). [***P<0,01 a kontrollhoz viszonyítva, ##P<0,01 az MNNG-vel kezelt mintához viszonyítva (A és B panel)]. A 24 órás ConA kezelést követően megfigyelhető a PKC β_1 nukleáris transzlokációja, amit a 6 órás ConA kezelést követően nem tudtunk detektálni (C). A többi vizsgált PKC izoforma (α , β_2 , δ , ϵ , ζ , θ , μ) lokalizációjában nem tapasztaltunk változást, sem 6, sem 24 óráig tartó kezelés esetében. Az A és B diagramok három-három független kísérlet átlagát mutatják (\pm S.D.), a reprezentatív képek három független kísérlet eredményét mutatják.

6.3. A PARP-1 szerepe a kontakt hiperszenzitivitás gyulladásoz folyamatáiban

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

6.3.1. PARP gátlószert hatása a neutrofil infiltrációra

Vizsgálataink első részében a PARP inhibitor PJ-34 (Jagtap és mtsai., 2002; Jagtap és Szabo, 2005) hatását vizsgáltuk a Szabó és mtsai. (2001) által korábban leírt, oxazolonnal kiváltott CHS egérmodellen. A preszenzitizált állatok oxazolon kezelése a fülek duzzanatát okozta (20/A. és B. ábra). PJ-34 kezelés hatására a fülek duzzanata jelentősen mérséklődött, ami csökkent gyulladásra utal (20/A. és B. ábra). A kötőszövetben az infiltráló gyulladásoz sejtek mennyiségét szöveti metszetekben enzimhisztokémiai módszerrel, a peroxidáz aktivitás mérésével határoztuk meg (20/A. ábra). Míg szövetlizátumban a mieloperoxidáz (MPO) aktivitás meghatározásával (Virág és mtsai., 2004) mutattuk ki (20/C. ábra). PARP inhibitor alkalmazásával az infiltráló sejtek száma csökkent (20/A. és C. ábra).

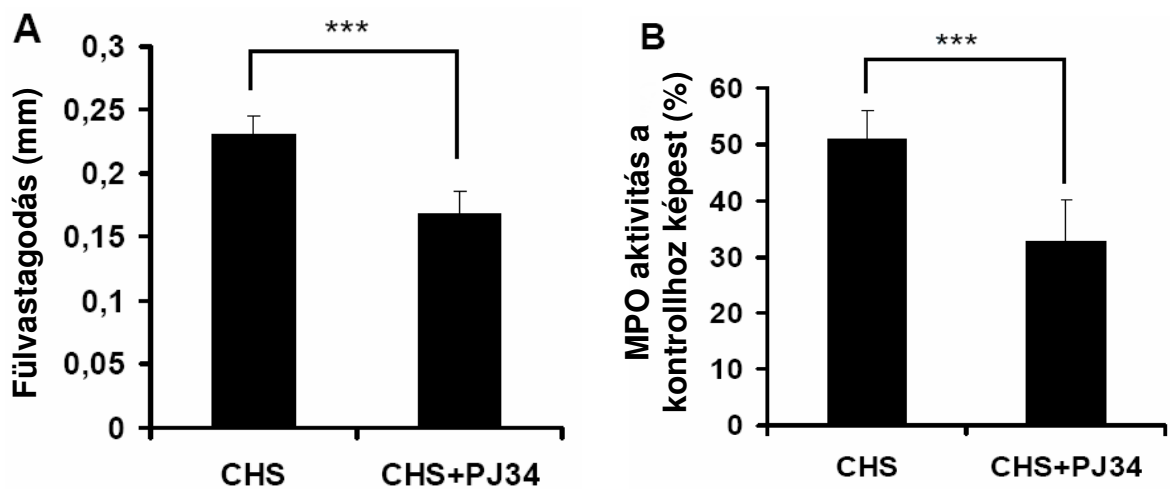


20. ábra PARP gátlószert hatása a neutrofil infiltrációra

Oxazolonnal szenitizált egerek fülét oxazolonnal kezelve CHS reakciót indukáltunk. A fülekből készített metszeteket hematoxilin-eozinnal festettük és enzimhisztokémiai módszerrel peroxidáz-pozitív sejteket mutattunk ki (A). A PJ34 előkezelés egyaránt csökkentette a fülek duzzanatát és a peroxidáz-pozitív sejtek számát. A fülek vastagodásának (B) és a mieloperoxidáz aktivitásának mérése megerősíti a PARP-1 szerepét a CHS-ben (C). *** $P < 0,005$ a kontrollhoz viszonyítva, # $P < 0,05$ a CHS-hez képest (B és C panel). A B és C panel három-három független kísérlet átlagát mutatja (\pm S.E.M.), a reprezentatív képek három független kísérlet eredményét mutatják.

6.3.2. A PARP aktiváció szerepe irritatív dermatitisben

Grabbe és mtsai. (1996) szerint bőrfelülettel érintkező haptének nem antigén-specifikus irritatív dermatitist is indukálhatnak. Annak kiderítésére, hogy a PARP gátlása meggátolja-e az irritatív dermatitist is, megvizsgáltuk a PJ34 hatását a PMA által kiváltott fülvastagodásra. A PMA kisebb mértékű duzzanatot okozott, mint az oxazonon. A PARP inhibitor szignifikánsan - bár a CHS-ben tapasztalhoz képest kisebb mértékben - csökkentette a fülek duzzanatát, és gátolta a sejtes infiltrációt (21. ábra). Eredményeink arra utalnak, hogy a PARP mind az antigén által kiváltott, immunmediált gyulladást, mind a nem antigén-specifikus általános gyulladós útvonalakat modulálja.



21. ábra A PARP aktiváció szerepe PMA által kiváltott irritatív dermatitisben

Az egerek füleit 0,05% PMA-val kezeltük 6 órán át, majd mértük a fülek vastagodását (A) és mintát vettünk mieloperoxidáz (MPO) aktivitásméréshez (B). A PJ34 (10mg/kg i.p.) hatására szignifikánsan (***) csökkent a fülek duzzanata, illetve az MPO aktivitása. A diagramok három-három független kísérlet átlagát mutatják (\pm S.E.M.).

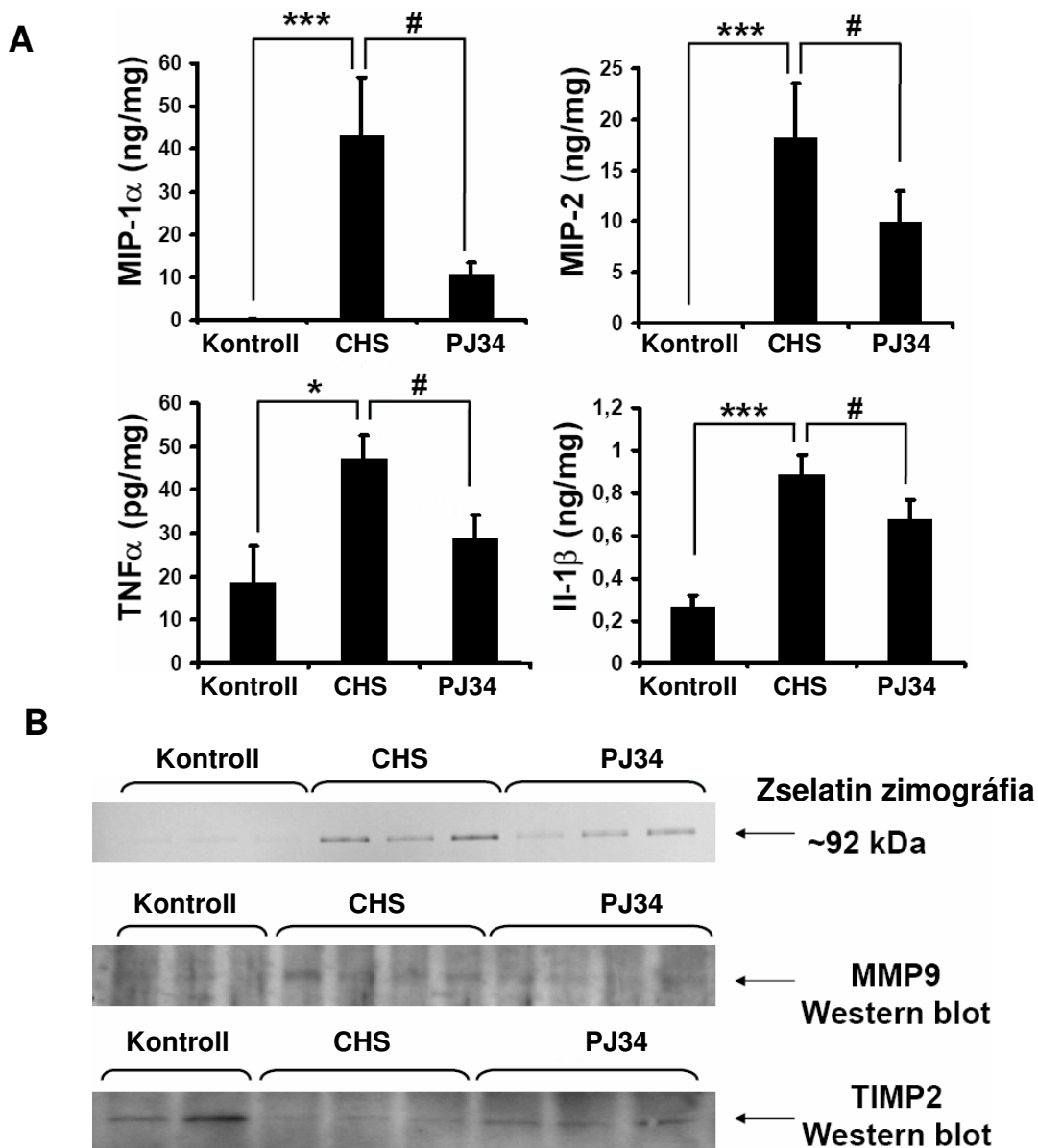
6.3.3. *Citokin expresszió és MMP aktiváció CHS-ben*

Korábbi vizsgálataink szerint a PARP-1 citokinek expresszióját szabályozza különböző gyulladásos modellekben (Virág és Szabó, 2002). A MIP-1 α (a neutrofil granulociták egyik legfontosabb kemoattraktánsa) és más proinflammatorikus citokinek/kemokinek (MIP-2, TNF α , IL-1 β) indukcióját figyeltük meg oxazonon kezelés hatására, ezek szintjét a PJ-34 kezelés mérsékelte (22/A. ábra).

Megvizsgáltuk, hogy szerepet játszik-e a PARP-1 az MMP expresszió szabályozásában CHS-ben. Az MMP termelésre különböző sejttípusok képesek, pl.: fibroblasztok, epitel sejtek, makrofágok, neutrofilek és limfociták. Ezek az enzimek zimogén formában expresszálódnak és más proteolitikus enzimek aktiválják őket. Szabadgyökök is képesek az MMP-k aktiválására, szerkezeti változásokat okozva, teljes hosszúságú aktív MMP enzimeket eredményezve. Az MMP-k aktivitását szöveti metalloproteináz inhibitorok (TIMP-ek) ellensúlyozzák.

Mintáink mátrix-metalloproteináz (MMP) aktivitását zselatin zimográfia segítségével vizsgáltuk. A szenitizált egerek mintáiban egy 89-92 kDa molekulatömegű sáv intenzitásának emelkedését tapasztaltuk, ami a PJ-34 kezelés hatására lecsökkent. Hasonló hatást figyeltünk meg az MMP9 Western blot analízise során is, míg az MMP inhibitor TIMP2 esetében ellentétes változásokat tapasztaltunk (22/B. ábra).

Eredményeink alapján elmondható, hogy a PARP aktivitás szerepet játszik a gyulladás kifejlődésében CHS-ben. A PARP több ponton modulálja a gyulladásos reakciókat: fokozza a leukocita migrációt, a gyulladásos citokinek és kemokinek termelődését, valamint fokozza az MMP-k expresszióját.



22. ábra *Citokin expresszió és MMP aktiváció CHS-ben*

A fülekből készült lizátumokban citokinek (TNF α , IL-1 β) és kemokinek (MIP-1 α , MIP2) expresszióját vizsgáltuk ELISA módszerrel (A). A CHS mintákban minden vizsgált citokin és kemokin expressziója növekedett, és az emelkedést a PJ34 gátolta (** $p < 0,001$, * $p < 0,05$ a kontrollhoz képest; # $p < 0,05$ a CHS-hez képest). A mátrix metalloproteinázok expresszióját zimográfia és Western blot módszerekkel vizsgáltuk (B). Egy 89-92 kDa méretű proteináz aktivitást tapasztaltunk a gyulladt fülekben. E sáv intenzitása PJ34 kezelés hatására csökkent. MMP9 elleni antitesttel végzett vizsgálatainkban egy csekély mértékű emelkedést tapasztaltunk az MMP9 expressziójában, ami valószínűsíti az MMP9 szerepét a gyulladásban. A TIMP2 fehérje expressziója a CHS mintákban csökkent (B), az expresszió csökkenését a PJ34 kezelés kis mértékben gátolta. Az A panel három-három független kísérlet átlagát mutatja (\pm S.D.). A B panel három-három független kísérlet eredményét mutatja.

7. DISZKUSSZIÓ

7.1. MNNG kezelés hatása a tirozín nitrálásra és PARP aktivációra

Juarez-Salinas és mtsai. (1979) kimutatták, hogy az MNNG DNS károsító hatása a PARP enzim aktivációjához vezet, ezért az MNNG lett az egyik leggyakrabban alkalmazott vegyület, melyet a PARP aktiváció mechanizmusának és szabályozásának vizsgálataiban alkalmaznak. Munkacsoportunk korábban jellemezte a PARP aktiváció szerepét az oxidatív stressznek (peroxinitrit, hidrogén-peroxid, szuperoxid) kitett sejtek pusztulásában timocitákon (Virág és mtsai., 1998b, 1999, 2003). Jelen munkánkban kimutattuk, hogy az MNNG által indukált sejthalál jellemző tulajdonságai megegyeznek az oxidatív stressznek kitett timociták esetében tapasztaltakkal. Mindkét rendszerben nekrotikus sejtpusztulás történik, amely jórészt a PARP aktivációjától függ. Ezen kívül, az MNNG PARP-függő mitokondriális membrán-depolarizációt és másodlagos szabadgyök-termelést okozott, melyek szintén jellemzőek oxidatív stressz esetében is (Virág és mtsai., 1998b). Továbbá PARP gátlószerek hatására, mind az MNNG -, mind pedig az oxidatív stressz által kiváltott sejthalál során emelkedik a kaspáz-aktivitás és a DNS-fragmentáció, ami azt mutatja, hogy a PARP aktivációja az apoptotikus sejthalált nekrosis irányába tereli mind alkiláló, mind oxidatív hatások esetén.

Kíváncsiak voltunk, hogy az NO és reaktív oxigén- vagy nitrogén intermedierek szerepet játszanak-e az MNNG citotoxikus hatásában. Számos nitrozo-vegyületből, mint a streptozotocin és az S-nitrozo-L-glutation nitrogén-monoxid (NO) szabadul fel (Kwon és mtsai., 1994; Tanaka és mtsai., 1995; Turk és mtsai., 1993). Ezért feltételeztük, hogy az MNNG-ből szintén felszabadulhat NO, ami hozzájárulhat az MNNG által okozott DNS károsodáshoz és sejthalálhoz. Eredményeink egyértelműen bizonyítják, hogy az MNNG-ből vizes oldatban NO szabadul fel, bár ebben a sejtmentes rendszerben az NO keletkezése viszonylag lassan zajlott. Sejtes rendszerben azonban a folyamat valószínűleg sokkal gyorsabban zajlik, az MNNG glutation és glutation-transzferáz hatására történő metabolizmusa miatt (Niknahad és O'Brien, 1995). Elméletileg az is lehetséges, hogy az MNNG indukálja az indukálható nitrogén-monoxid szintáz (iNOS) expresszióját és az így keletkező NO a sejtben termelődő szuperoxiddal egyesülve peroxinitritet képezhet. Ez a lehetőség azonban valószínűtlennek tűnik. Nem sikerült kimutatnunk az iNOS expresszióját sem egy, sem pedig négy órás MNNG kezelést követően.

Az NO önmagában citoprotektív hatású is lehet, viszont fokozott termelődése során, a sejtben képződő szuperoxiddal egyesülve peroxinitritet képez, ami a fehérjék és a DNS oxidálásával és nitrálásával citotoxikus hatású lehet (Beckman és Koppenol, 1996). Peroxinitrit képződhet az MNNG-vel kezelt timocitákban is, ha az MNNG-ből felszabaduló NO egyesül a sejtben képződő szuperoxiddal. A fenti elképzelést igazolja, hogy Western blotlalt és immunfluoreszcenciával nitrált fehérjéket mutattunk ki az MNNG-vel kezelt timocitákban. Az MNNG-vel kezelt sejtekben keletkező peroxinitrit - legalább részben - felelős lehet az MNNG citotoxikus hatásáért. A fehérjék és a DNS oxidációja, vagy nitrálása egyaránt károsíthatja azok funkcióját, ami Pacher és mtsai. (2007) szerint hozzájárul a peroxinitrit-indukálta sejtpusztuláshoz, bár a nitrálás citotoxikus hatását nehéz bizonyítani. Azonban az általunk vizsgált rendszerben az MNNG kezelés hatására megjelenő nitrált fehérjék peroxinitrit képződésére utalnak.

Eredményeink összefügghetnek a streptozotocin-indukálta diabétessel is. A streptozotocin szintén egy alkilálószer (Bhuyan, 1970) és NO szabadul fel belőle (Thomas és Ramwell, 1989), ami PARP-függő citotoxikus hatást vált ki a hasnyálmirigy inzulintermelését végző béta sejtekben (Wilson és mtsai., 1984). Az még nem ismert, hogy a béta sejtek pusztulását közvetlen DNS alkilálás, vagy a nitrozatív stressz által kiváltott DNS törés okozza (Delaney és mtsai., 1995; Murata és mtsai., 1999). A jelenség *in vivo* vizsgálata azért sem könnyű, mert a streptozotocin indukálhatja az iNOS-t, (Kolb és mtsai., 1991; Lukic és mtsai., 1991), ami tovább emeli a felszabaduló NO mennyiségét.

Az extracelluláris tiolok védőhatása szintén gyökös mechanizmus jelenlétére utal az MNNG-indukálta DNS-sérülés, PARP-aktiváció és sejthalál folyamataiban. A lehetőséget, miszerint az MNNG bomlása okozhatja reaktív intermedierek termelődését, megerősítik Mikuni és mtsai. (1992) megfigyelései, akik hidroxil gyököt mutattak ki hidrogén-peroxid és MNNG elegyében, valamint hipoxantin/xantin oxidáz és MNNG elegyében. Ezen kívül, Blasiak és mtsai. (2002) az MNNG DNS-károsító hatását vizsgálták limfocitákon comet assay segítségével, melynek során a C-vitamin védőhatását tapasztalták. Más sejtípusokban azonban a C-vitamin nem befolyásolta az MNNG DNS-károsító hatását (Robichova és Slamenova, 2002), ami alátámasztja a sejtípus-specifikus metabolizmus jelentőségét.

Romert és Jenssen (1987) szerint az MNNG citotoxikus hatásában a tiolok kettős szerepet játszanak. Egyrészt a nukleofil tiolok közvetlenül, vagy közvetve kölcsönhatnak az MNNG-vel és detoxifikálják azt. Másrészt az intracelluláris glutation hatására végbemegy az MNNG bioaktivációja, melynek során DNS-károsító hatású diazónium ion keletkezik (Romert és Jenssen, 1987). Vizsgálatainkban az intracelluláris glutation depléciója szignifikáns védelmet nyújtott az MNNG citotoxikus hatásával szemben, ami azt jelzi, hogy a GSH/GST rendszer valóban az MNNG bioaktivációját szolgálja az általunk vizsgált sejtekben. Kísérleti körülményeink között az exogén tiolok valószínűleg az MNNG extracellulárisan történő detoxifikációjának révén fejtették ki citoprotektív hatásukat. Ezt támasztja alá az a megfigyelésünk is, amikor a tiolokat az MNNG kezelés előtt kimostuk a sejtek tápfolyadékából. Ebben az esetben nem tapasztaltunk citoprotektív hatást. A tiolok védőhatása tehát nem bizonyítja, hogy az MNNG citotoxicitásának hátterében szabadgyökök által közvetített mechanizmus áll. Ezen kívül, szuperoxid-diszmutáz -, kataláz -, vagy NO/peroxinitrit közömbösítő anyagokat is alkalmaztunk, azonban egyik sem gátolta az MNNG-indukálta DNS-törést.

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

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

Irodalmi adatok alapján a PARP-1 kinázok szubsztrátja lehet (Ruscetti és mtsai., 1998; Ariumi és mtsai., 1999), ami felveti a PARP-aktivitás foszforiláció általi szabályozásának lehetőségét. A PARP-1 szoros kapcsolatban áll a DNS-függő protein kinázzal (DNA-PK), amely Ruscetti és mtsai. (1998) szerint foszforilálja a PARP-1-et. Ezen kívül *in vitro* rendszerben, a tisztított protein kináz C (PKC) foszforilálja a PARP-1-et. A PARP-1 foszforilációja gátolta az enzim DNS-kötését és enzimátikus aktivitását (Bauer és mtsai., 1992; Tanaka és mtsai., 1987). Azonban nem történtek vizsgálatok a PARP-1 sejtes rendszerben történő foszforilációjával kapcsolatban, így nincsenek adatok arra vonatkozóan, hogy a foszforiláció sejtes rendszerben is gátolja-e az enzim aktivitását. Arról sincs információnk, hogy a PARP-1 - PKC kölcsönhatás befolyásolja-e a sejthalált.

Munkánk során megvizsgáltuk, hogy a PKC képes-e foszforilálni a PARP-1-et sejt rendszerben, és hogy ennek a módosításnak van-e hatása a DNS-károsodás által indukált sejthalálra. Eredményeink alapján sejt rendszerben a PKC aktivációja gátolja a PARP-1 aktivitását. PKC inhibitorokkal végzett vizsgálataink alapján elmondható, hogy a hatásokért, legalább részben, a klasszikus (kálcium-függő) PKC izoformák felelősek. A PKC aktivátor és a gátlószerek a PARP-aktivációra kifejtett hatásokkal összhangban a sejthalált is befolyásolják. A PARP-aktivitás PMA kezelés hatására történő gátlása - a PARP inhibitorokhoz hasonlóan (Virág és mtsai., 1995; 1998c) - véd a nekrotikus sejthalál ellen, és egyúttal a sejthalált az apoptotikus útvonalakra tereli. Erre utal a PMA-val előkezelt sejtek megnövekedett kaszpáz-aktivitása, MNNG kezelést követően. Hasonló megfigyeléseket tettünk az érett limfoid populációt képviselő splenocitákon is, viszont Jurkat T limfoid sejt vonalon és adherens sejteken (A549 tüdőepitél sejt vonal, HaCaT keratinocita sejt vonal) a jelenséget nem tudtuk kimutatni. Ezek alapján elmondható, hogy eredményeink kiterjeszthetők érettebb limfoid sejtekre is, viszont transzformált sejt vonalakra nem.

A PKC jelátviteli útvonalának indirekt stimulációja (pl.: aktivált timocitákban és splenocitákban) szintén a PARP gátlásához vezetett 24 órás stimulációt követően. Azonban 1 és 6 órás inkubáció alkalmával nem tapasztaltuk az MNNG-indukálta PARP-aktivitás gátlását. Innunfluoreszcens vizsgálatban klasszikus PKC-k sejtbeli elhelyezkedését vizsgálva a PKC β_1 nukleáris transzlokációját tapasztaltuk, 24 órás ConA stimulus hatására. Korábbi időpontokban citoplazmatikus lokalizációját találtuk. A fenti adatok alapján valószínűleg a PKC β_1 közvetítheti a PARP-1 gátlását aktivált timocitákban és splenocitákban.

Eredményeink alapján a PKC sejt rendszerben is képes a PARP-1 foszforilációjára, aktivitásának gátlására, s ezáltal citoprotektív hatású. Ez a felfedezés számos, a PKC, a PARP és a sejthalál területén megjelent eredményt megmagyaráz. Számos korábbi cikkben különböző stimulusok (oxidánsok, proinflammatorikus citokinek) által indukált sejthalál meggátolható volt a PKC-t aktiváló forbolészterekkel (Byun és mtsai., 2006; Mansat és mtsai., 1997; Yiang és mtsai., 2008), ráadásul a PKC overexpressziója gátolta a sejthalált (Gubina és mtsai., 1998). Vaszkuláris simaizom sejteken hidrogén-peroxid által kiváltott oxidatív stresszben aktiválódik a PKC és gátolja a

sejthalált (Li és mtsai., 1999). Számos esetben a PKC inhibitorok fokozzák a sejthalált (Drew és mtsai., 1998; Kobayashi és mtsai., 1997). A PKC ezen kívül véd a miokardiális infarktussal szemben (Joyeux és mtsai., 1997), amelyben a miokardiális nekrozis a PARP-1 túlaktiváció következménye (Pacher és Szabó, 2007). A fenti összefüggések rámutatnak arra, hogy a PKC-nek fontos szerepe van különböző, oxidatív stressz okozta citotoxikus folyamatok szabályozásában. Eredményeink alapján valószínűsíthetjük, hogy a PARP-1 aktivitásának regulációja is részét képezi a PKC sejthalál szabályozásában betöltött szerepének. Emellett a PARP PKC általi foszforilációja a sejt más jelátviteli folyamataiban is szerepet játszhat. Például humán endotél sejteken az IGF-1 indukálta VEGF expresszió a PKC általi foszforiláció hatására gátlódó PARP-aktivitástól függ (Beckert és mtsai., 2006).

Számos megfigyelés utal arra, hogy párhuzamos jelátviteli útvonalak szintén befolyásolhatják a sejthalált. A PMA hatására bekövetkező PARP-foszforilációt a Gö6976 részlegesen, míg a GF109203X teljesen gátolta. Ezek az anyagok azonban nyilvánvalóan nem csak a PARP foszforilációjára vannak hatással, hanem más, PARP-tól független módon is befolyásolhatják a sejtpusztulás mértékét.

Érdeemes megjegyeznünk, hogy fibroblasztokban és humán monocitákban a PKC a PARP-1 aktivációját okozza (Singh és mtsai., 1985a,b). A fenti ellentmondást indokolhatja például az eltérő sejttípus és - kísérleti körülmények. Azonban lehetséges, hogy a PMA a PARP enyhe aktivációját okozza, ami PARP-1 automodifikációjához vezet, amiről ismert, hogy gátolja az enzim működését. Ezt követően az MNNG által kiváltott DNS-törés csupán enyhe PARP aktivációt eredményez, a PARP így nem tud túlaktiválódni és nekrozist okozni. Ennek a feltételezésnek az igazolása azonban további vizsgálatokat igényel.

A PARP is képes befolyásolni a PKC aktivitását. A PARP inhibitorokkal végzett vizsgálatok alátámasztják a PARP és a PKC közötti fizikai kapcsolatot, a PARP gátlása gátolja a PKC aktivitását (Riciarelli és mtsai., 1998). Ráadásul, a PARP befolyásolja a MARCKS (myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate) fehérjék tulajdonságait is, melyek a PKC enzimek fontos szubsztrátjai (Schmitz és mtsai., 1998; Chao és mtsai., 1994). Magas extracelluláris glükóz-koncentrációnak kitett endotél sejtekben a PKC aktivációja is a PARP szabályozó hatása alatt áll (Du és mtsai., 2003).

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

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

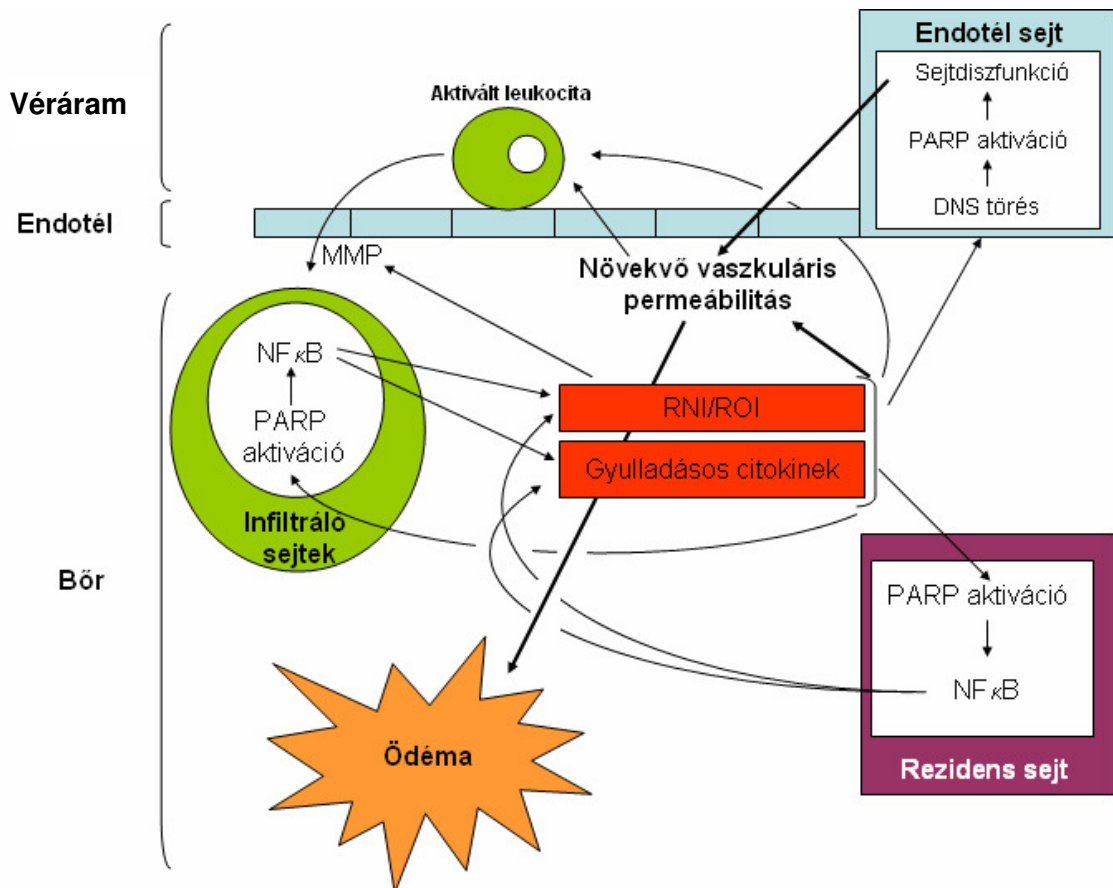
Munkánk harmadik részében a PARP-1 szerepét vizsgáltuk a kontakt hiperszenzitivitás (CHS) gyulladós folyamataiban. A PARP gátlásának hatására csökkent az ödémaképződés (fülvastagodás) és az inflammatorikus sejtek migrációja a gyulladós területre. Különböző gyulladásokban, így a CHS-ben is reaktív oxigén – és nitrogén intermedierek (ROI és RNI) keletkeznek, melyeknek fontos szerepe van az endotél diszfunkciójának kialakításában (Virág és mtsai., 2002). Ezek az intermedierek stimulálhatják a DNS-törés - PARP-aktiváció útvonalat, amely részt vesz az endotél diszfunkció kialakításában (Soriano és mtsai., 2001). Véleményünk szerint hasonló mechanizmusok állnak a PARP-gátlás anti-inflammatorikus hatása mögött CHS-ben is. Számos, a bőrben megtalálható és oda vándorló gyulladós sejt képes ROI és RNI termelésére (Okayama, 2005; Trouba és mtsai., 2002; Virag és mtsai., 2002). Az oxidatív stressz DNS-törést okozhat, ezáltal aktiválhatja a PARP-1-et endotél sejtekben, ami a NAD⁺ és az ATP depléciójával endoteliális diszfunkció kialakulásához vezethet. A PARP inhibitorok kétféleképpen módosíthatják a fenti folyamatot. Meggátolhatják az energia metabolitok deplécióját és csökkenthetik a gyulladás során termelődő ROI és RNI mennyiségét. Mivel a legtöbb reaktív intermediert az infiltráló granulociták termelik, ezek gyulladós területre történő migrációjának gátlásával csökken a ROI/RNI mennyisége. Eredményeink (peroxidáz festés, MPO aktivitás) is azt mutatják, hogy a PARP gátlásának hatására csökken a granulociták kilépése a keringésből. A fehérvérsejtek érpályából való kilépését különböző adhéziós molekulák expressziója közvetíti a sejtfelszínen és az endotélen. A PARP enzimek hatással vannak különböző adhéziós molekulák, mint például az ICAM-1 expressziójára, endotél sejteken és citokinnel stimulált HaCaT keratinocitákon (Szabó és mtsai., 2001; Zingarelli és mtsai., 1998). Ezért valószínű, hogy a PARP gátlása befolyásolja az infiltráló sejtek adhézióját az érendotélhez, ami hatással van a gyulladás

mértékére CHS-ben. A PARP gátlása a gyulladásosejtekben csökkenti a gyulladásosemediátorok (citokinek, kemokinek, iNOS, stb.) expresszióját is, a PARP-1 az NF- κ B transzkripciós faktor koaktivátoraként vesz részt a fenti folyamatokban.

A mátrix metalloproteinázok (MMP) is gyulladásosemediátornak tekinthetők, mivel az MMP inhibitorok gyulladásosecsökkentő hatását bizonyították számos gyulladásosemodellben, így CHS-ben is (Hu és mtsai., 2007). Az MMP-k az infiltráló sejtek mozgását segítik az extracelluláris mátrixban. Az MMP9 expressziója proinflammatorikus citokinekkel (TNF α , IL-1 β) indukálható (Li és mtsai., 2007), termelésére több sejttípus is képes: keratinociták (Lamar és mtsai., 2007), granulociták (Matsuzaki és mtsai., 2006), dendritikus sejtek (Zozulya és mtsai., 2007). Mivel az MMP-expressziót az NF- κ B szabályozza (Bond és mtsai., 1998), az MMP9 expressziójának PARP-inhibitorok általi gátlása is a PARP koaktivátor szerepének következménye. Ezen kívül, a TIMP-2 expressziójának csökkenése is MMP-aktivációhoz vezet.

A PMA-val kiváltott irritatív dermatitisben a PARP inhibitor szignifikánsan - bár a CHS-ben tapasztalható képest kisebb mértékben - csökkentette a fülek duzzanatát, és gátolta a sejtes infiltrációt (21. ábra). Eredményeink arra utalnak, hogy a PARP mind az antigén által kiváltott immunmediált gyulladást, mind a nem antigén-specifikus általános gyulladásoseútvonalakat modulálja. Az előzőekben bemutattuk, hogy a PMA kezelés timociták esetében a PARP gátlásához vezet. Felmerülhet, hogy ebben az esetben is gátolja a PMA a PARP aktivitását, aminek következménye lehet PARP inhibitor kezelés kisebb mértékű védelme a CHS-hez képest, valamint a gyulladásose reakciók a PARP-tól független módon is kialakulhattak. Azonban az is lehetséges, hogy a PMA ebben az esetben nem gátolja a PARP-ot, hiszen Jurkat T limfoid sejtvonalon és adherens sejteken (A549 tüdőepitél sejtvonal, HaCaT keratinocita sejtvonal) sem tudtunk PARP-gátlást kimutatni PMA hatására. Ezen kívül, Singh és mtsai (1985a,b) fibroblasztokban és humán monocitákban a PARP-1 aktivációját tapasztalták a PKC aktivációjának hatására.

Eredményeink alapján a kontakt hiperszenzitivitási reakcióban bekövetkező gyulladásose folyamatokat a PARP-aktivitás közvetíti. A PARP többféleképpen módosítja a gyulladásose reakciókat. Fokozza a fehérvérsejtek migrációját, a gyulladásose citokinek, kemokinek és az MMP-k termelődését. Eredményeinket a 23. ábrán foglaltuk össze.



23. ábra A PARP szerepe a CHS gyulladási folyamataiban

Aktivált leukociták a mátrix metalloproteinázok aktivitásának következtében kilépnek az érpályából. Reaktív oxigén/nitrogén intermediereket, valamint proinflammatorikus citokineket termelnek, melyek a rezidens - és az infiltráló sejtekben aktiválják a PARP-ot. A PARP aktivációja hozzájárul az NF- κ B aktivációjához, ami a gyulladási mediátorok transzkripcióját szabályozza. A ROI/RNI az endotheliumi sejtekben és a bőr rezidens sejtjeiben PARP aktivációt és következményes sejt-diszfunkciót okoz, amely megnövekedett vaszkuláris permeabilitáshoz vezet.

8. KONKLÚZIÓK

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

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

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

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

A PARP-1 szerepének vizsgálata a kontakt hiperszenzitivitás gyulladós folyamataiban

1. A PARP szerepet játszik a CHS során kialakuló ödémaképződés, a neutrofil infiltráció, citokin expresszió és az MMP aktiváció folyamataiban.
2. A PARP irritatív dermatitisben is befolyásolja a duzzanat és neutrofil infiltráció mértékét. Tehát a PARP mind az antigén által kiváltott immunmediált gyulladást, mind a nem antigén-specifikus általános gyulladós útvonalakat modulálja.

9. IRODALOMJEGYZÉK

- Aguiar RC, Yakushijin Y, Kharbanda S, Salgia R, Fletcher JA, et al. (2000): BAL is a novel risk-related gene in diffuse large B-cell lymphomas that enhances cellular migration. *Blood* **96**:4328–4334.
- Akiyama T, Takasawa S, Nata K, Kobayashi S, Abe M, Shervani NJ, Ikeda T, Nakagawa K, Unno M, Matsuno S, Okamoto H. (2001): Activation of Reg gene, a gene for insulin-producing beta -cell regeneration: poly(ADP-ribose) polymerase binds Reg promoter and regulates the transcription by autopoly(ADP-ribosylation). *Proc Natl Acad Sci U S A.* **98**(1):48-53.
- Albert JM, Cao C, Kim KW, Willey CD, Geng L, Xiao D, Wang H, Sandler A, Johnson DH, Colevas AD, Low J, Rothenberg ML, Lu B. (2007): Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase enhances cell death and improves tumor growth delay in irradiated lung cancer models. *Clin Cancer Res.* **13**(10):3033-42.
- Alessandrini, A., Namura, S., Moskowitz, M. A. & Bonventre, J. V. (1999): MEK1 protein kinase inhibition protects against damage resulting from focal cerebral ischemia *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 12866–12869.
- Alvarez-Gonzalez, R. & F. R. Althaus (1989): Poly (ADPribose) catabolism in mammalian cells exposed to DNA damaging agents. *Mutat Res*, **218**: 67-74
- Alvarez-Gonzalez, R. & M. K. Jacobson: Characterization of polymers of adenosine diphosphate ribose generated in vitro and *in vivo* (1987): *Biochemistry*, **26**: 3218-24
- Ame JC, Spenlehauer C, de Murcia G. (2004) The PARP superfamily. *Bioessays* **26**: 882-893
- Andrabi SA, Kim NS, Yu SW, Wang H, Koh DW, Sasaki M, Klaus JA, Otsuka T, Zhang Z, Koehler RC, Hurn PD, Poirier GG, Dawson VL, Dawson TM. (2006): Poly(ADP-ribose) (PAR) polymer is a death signal. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **103**(48):18308-13.
- Andreone, Teresa L., O'Connor, Michael, Denenberg, Alvin, Hake, Paul W., Zingarelli, Basilia (2003): Poly(ADP-Ribose) Polymerase-1 Regulates Activation of Activator protein-1 in Murine Fibroblasts. *J Immunol* **170**: 2113-2120
- Aravind, L. & E. V. Koonin (2000): SAP - a putative DNA binding motif involved in chromosomal organization. *Trends Biochem Sci*, **25**: 112-4
- Ariumi, Y., Masutani, M., Copeland, T.D., Mimori, T., Sugimura, T., Shimotohno, K., Ueda, K., Hatanaka, M. and Noda, M. (1999) Suppression of the poly(ADP-ribose) polymerase activity by DNA-dependent protein kinase in vitro. *Oncogene* **18**: 4616–4625.

- Ariumi, Y., Ueda, K., Misutani, M., Copeland, T.D., Noda, M., Hatanaka, M., Shimotohno, K. (1998): *In vivo* phosphorylation of poly(ADP-ribose) polymerase is independent of its activation. *Febs letters* **436**: 288-292.
- Augustin, A., C. Spenlehauer, H. Dumond, J. Menissier-De Murcia, M. Piel, A. C. Schmit, F. Apiou, J. L. Vonesch, M. Kock, M. Bornens & G. De Murcia (2003): PARP-3 localizes preferentially to the daughter centriole and interferes with the G1/S cell cycle progression. *J Cell Sci*, **116**: 1551-62
- Bahtia M, Kirkland JB, Meckling-Gill KA (1995) Modulation of poly(ADP-ribose) polymerase during neutrophilic and monocytic differentiation of promyelocytic (NB4) and myelocytic (HL-60) leukaemic cells. *Biochem J*. **308**:131-137.
- Bai, P., Bakondi, E., Szabo, E., Gergely, P., Szabo, C., Virag, L. (2001): Partial protection by poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors from nitroxyl-induced cytotoxicity in thymocytes. *Free Radic. Biol. Med.* **31**: 1616–1623.
- Bai, P., Hegedus, C., Erdelyi, K., Szabo, E., Bakondi, E., Gergely, S., Szabo, C. and Virag, L.: (2007) Protein tyrosine nitration and poly(ADP-ribose) polymerase activation in N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-treated thymocytes: implication for cytotoxicity. *Toxicol. Lett.* **170**: 203–213.
- Bauer PI, Farkas G, Mihalik R, Kopper L, Kun E, Farago A (1994) Phosphorylation of poly(ADP-ribose) polymerase protein in peripheral lymphocytes stimulated with phytohemagglutinin. *Biochem Biophys Res Commun* **1223**:234-239.
- Bauer, P. I., E. Kenesi, J. Mendeleyev & E. Kun (2005): The influence of ATP on poly (ADP-ribose) metabolism. *Int J Mol Med*, **16**: 321-4
- Bauer, P.I., Buki, K.G., Kun, E.: Selective augmentation of histone H1 phosphorylation sites by interaction of poly(ADP-ribose) polymerase and cdc2-kinase (2001): Comparison with protein kinase C. *International Journal of Molecular Medicine* **8**: 691-693
- Bauer, P.I., Farkas, G., Buday, L., Mikala, G., Meszaros, G., Kun, E. and Farago, A. (1992) Inhibition of DNA binding by the phosphorylation of poly ADP-ribose polymerase protein catalysed by protein kinase C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **187**: 730–736.
- Beckert, S., Farrahi, F., Ghani, QP., Aslam, R., Scheuenstuhl, H., Coerper, S., Königsrainer, A., Hunt, TK., Hussain, MZ. (2006): IGF-I-induced VEGF expression in HUVEC involves phosphorylation and inhibition of poly(ADP-ribose)polymerase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **341**: 67–72
- Beckert, S., Farrahi, F., Perveen, G.Q., Aslam, R., Scheuenstuhl, H., Coerper, S., Königsrainer, A., Hunt, T.K. and Hussain, M.Z. (2006): IGF-I-induced VEGF expression in HUVEC involves phosphorylation and inhibition of poly(ADP-ribose)polymerase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **341**: 67–72.

- Beckman, J.S., Koppenol, W.H. (1996): Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am. J. Physiol.* **271**: C1424–C1437.
- Berger NA, Sims JL, Catino DM, Berger SJ (1983): Poly(ADP-ribose) polymerase mediates suicide response to massive DNA damage: studies in normal and DNA-repair defective cells. *Princess Takamatsu Symp.* **13**:219-226.
- Berger SJ, Sudar DC, Berger NA (1986): Metabolic consequences of DNA damage: DNA damage induces alterations in glucose metabolism by activation of poly(ADP-ribose) polymerase. *Biochem Biophys Res Commun.* **134**:227-232.
- Berger, N. A. (1985): Poly (ADP-ribose) in the cellular response to DNA damage. *Radiat Res*, **101**: 4-15
- 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.* **13**: 219–226.
- Bergeron MJ, Leclerc S, Laniel MA, Poirier GG, Guerin SL (1997): Transcriptional regulation of the rat poly(ADP-ribose) polymerase gene by Sp1. *Eur J Biochem.* **250**:342-353.
- Bhuyan, B.K., (1970): The action of streptozotocin on mammalian cells. *Cancer Res.* **30**: 2017–2023.
- Blasiak, J., Trzeciak, A., Gasiorowska, A., Drzewoski, J., Malecka-Panas, E. (2002): Vitamin C and quercetin modulate DNA-damaging effect of *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (MNNG). *Plant Foods Hum. Nutr.* **57**: 53–61.
- Bond M, Fabunmi RP, Baker AH, Newby AC (1998): Synergistic upregulation of metalloproteinase-9 by growth factors and inflammatory cytokines: an absolute requirement for transcription factor NF-kappa B. *FEBS Lett* **435**: 29-34
- Boulares AH, Zoltoski AJ, Sherif ZA, Jolly P, Massaro D, Smulson ME. (2003): Gene knockout or pharmacological inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase-1 prevents lung inflammation in a murine model of asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol.* **28**(3):322-9.
- Boulikas T (1990): Poly(ADP-ribosylated) histones in chromatin preincubation. *J Biol Chem.* **265**:14638-14647.
- Bredehorst, R., A. M. Ferro & H. Hilz (1978): Determination of ADP-ribose and poly (ADP-ribose) by a new radioimmunoassay. *Eur J Biochem*, **82**: 115-21
- Brochu G, Duchaine C, Thibeault L, Lagueux J, Shah GM, Poirier GG (1994): Mode of action of poly(ADP-ribose) glycohydrolase. *Biochim Biophys Acta.* **1219**(2):342-350.

- Burkle A. (2001): Physiology and pathophysiology of poly(ADP-ribosylation). *Bioessays* **23**:795-806.
- Butler AJ and Ordahl P (1999): Poly(ADP-Ribose) Polymerase Binds with Transcription Enhancer Factor 1 to MCAT1 Elements To Regulate Muscle-Specific Transcription. *Molecular and cellular biology* **19**(1):296-306.
- Byun, H.S., Park, K.A., Won, M., Yang, K.J., Shin, S., Piao, L., Kwak, J.Y., Lee, Z.W., Park, J., Seok, J.H., Liu, Z.G. and Hur, G.M. (2006): Phorbol 12-myristate 13-acetate protects against tumor necrosis factor (TNF)-induced necrotic cell death by modulating the recruitment of TNF receptor 1-associated death domain and receptor-interacting protein into the TNF receptor 1 signaling complex: implication for the regulatory role of protein kinase C. *Mol. Pharmacol.* **70**: 1099–1108.
- Carling, D. (2004): The AMP-activated protein kinase cascade—a unifying system for energy control, *Trends Biochem. Sci.* **29**(1): 18–24.
- Cervellera MN and Sala A (2000): Poly(ADP-ribose) polymerase is a B-MYB coactivator. *J Biol Chem.* **275**:10692-10696.
- Chang WJ and Alvarez-Gonzalez R. (2001): The sequence-specific DNA binding of NF-kappa B is reversibly regulated by the automodification reaction of poly (ADP-ribose) polymerase. *J Biol Chem.* **276**(50):47664-47670.
- Chao, D., Severson, D.L., Zwiers, H. and Hollenberg, M.D. (1994): Radiolabelling of bovine myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate (MARCKS) in an ADP-ribosylation reaction. *Biochem. Cell Biol.* **72**: 391–396.
- Chi NW and Lodish HF (2000): Tankyrase is a Golgi-associated mitogen-activated protein kinase substrate that interactss with IRAP in GLUT4 vesicles. *J Biol Chem.* **275**:38437-38444.
- Chiarugi A. (2002): Inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase-1 suppress transcriptional activation in lymphocytes and ameliorate autoimmune encephalomyelitis in rats. *Br J Pharmacol.* **137**(6):761-70.
- Chiarugi A, Moskowitz MA. (2003): Poly(ADP-ribose) polymerase-1 activity promotes NF-kappaB-driven transcription and microglial activation: implication for neurodegenerative disorders. *J Neurochem.* **85**(2):306-17.
- Cipriani, G., E. Rapizzi, A. Vannacci, R. Rizzuto, F. Moroni & A. Chiarugi (2005): Nuclear poly (ADP-ribose) polymerase-1 rapidly triggers mitochondrial dysfunction. *J Biol Chem,* **280**: 17227-34

- Cole, K.K., Perez-Polo, J.R. (2002): Poly(ADP-ribose) polymerase inhibition prevents both apoptotic-like delayed neuronal death and necrosis after H₂O₂ injury. *J. Neurochem.* **82**: 19–29.
- D'Amours, D., S. Desnoyers, I. D'Silva & G. G. Poirier (1999): Poly (ADP-ribosylation) reactions in the regulation of nuclear functions. *Biochem J*, **342** (Pt 2): 249-68
- Dantzer F, de la Rubia G, Ménissier-de Murcia J, Hostomsky Z, de Murcia G, Scribeur V (2000): Base excision repair is impaired in mammalian cells lacking poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Biochemistry.* **39**:7559-7569.
- Dantzer F, Nasheuer HP, Vonesch JL, de Murcia G, Ménissier-de Murcia J (1998): Functional association of poly(ADP-ribose) polymerase with DNA polymerase α -primase complex: a link between DNA strand break detection and DNA replication. *Nucleic Acids Research* **26(8)**:1891–1898.
- de Murcia G and Ménissier-de Murcia J (1994): Poly(ADP-ribose polymerase: a molecular nick sensor. *TIBS* **19**:172-176.
- de Murcia G, Scribeur V, Moliente M, Saulier B, Poch O, Masson M, Niedergang C, Ménissier-de Murcia J (1994): Structure and function of poly(ADP-ribose) polymerase. *Mol Cell Biochem.* **138**:15-24.
- de Murcia, J.M., C. Niedergang, C. Trucco, M. Ricoul, B. Dutrillaux, M. Mark, F.J. Oliver, M. Masson, A. Dierich, M. LeMeur, C. Walztinger, P. Chambon, G. de Murcia (1997): Requirement of poly(ADP-ribose) polymerase in recovery from DNA damage in mice and in cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**: 7303–7307.
- de Murcia, M., J, Ricoul M, Tartier L, Niedergang C, Huber A, Dantzer F, Schreiber V, Ame JC, Dierich A, LeMeur M, Sabatier L, Chambon P, de Murcia G (2003): Functional interaction between PARP-1 and PARP-2 in chromosome stability and embryonic development in mouse. *EMBO J.* **22(9)**:2255-2263.
- Delaney, C.A., Dunger, A., Di Matteo, M., Cunningham, J.M., Green, M.H., Green, I.C., (1995): Comparison of inhibition of glucose-stimulated insulin secretion in rat islets of Langerhans by streptozotocin and methyl and ethyl nitrosoureas and methanesulphonates. Lack of correlation with nitric oxide-releasing or O₆-alkylating ability. *Biochem. Pharmacol.* **50**: 2015–2020.
- Deliconstantinos G, Villiotou V, Stavrides J C. (1996a): Alterations of nitric oxide synthase and xanthine oxidase activities of human keratinocytes by ultraviolet B radiation. Potential role for peroxynitrite in skin inflammation. *Biochem Pharmacol* **51**: 1727-1738.
- Deliconstantinos G, Villiotou V, Stavrides J C. (1996b): Increase of particulate nitric oxide synthase activity and peroxynitrite synthesis in UVB-irradiated keratinocyte membranes. *Biochem J* **320**: 997-1003.

- Deliconstantinos G, Villiotou V, Stavrides J C. (1996c): Nitric oxide and peroxy-nitrite released by ultraviolet B-irradiated human endothelial cells are possibly involved in skin erythema and inflammation. *Exp Physiol* **81**:1021-1033.
- Deliconstantinos G, Villiotou V, Stavrides J C. (1995): Release by ultraviolet B (UVB) radiation of nitric oxide (NO) from human keratinocytes: a potential role for nitric oxide in erythema production. *Br J Pharmacol*. **114**: 1257-1265.
- Desmarais, Y., L. Menard, J. Lagueux & G. G. Poirier (1991): Enzymological properties of poly (ADP-ribose)polymerase: characterization of automodification sites and NADase activity. *Biochim Biophys Acta*, **1078**, 179-86
- di Meglio S, Denegri M, Vallefucio S, Tramontano F, Scovassi AI, Quesada P. (2003): Poly(ADPR) polymerase-1 and poly(ADPR) glycohydrolase level and distribution in differentiating rat germinal cells. *Mol Cell Biochem*. **248(1-2)**:85-91.
- Drew, L., Kumar, R., Bandyopadhyay, D. and Gupta, S. (1998): Inhibition of the protein kinase C pathway promotes anti-CD95-induced apoptosis in Jurkat T cells. *Int. Immunol*. **10**: 877–889.
- Du, X., Matsumura, T., Edelstein, D., Rossetti, L., Zsengeller, Z., Szabo, C. and Brownlee, M. (2003): Inhibition of GAPDH activity by poly(ADP-ribose) polymerase activates three major pathways of hyperglycemic damage in endothelial cells. *J. Clin. Invest*. **112**: 1049–1057.
- Durkacz BW, Lunec J, Grindley H, Griffin S, Horner O, Simm A (1992): Murine melanoma cell differentiation and melanogenesis induced by poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Exp Cell Res*. **202(2)**:287-291.
- Eastman A. (1995): Assays of DNA fragmentation, endonucleases, and intracellular pH and Ca²⁺ associated with apoptosis. *Methods Cell Biol* **46**, 41.
- Edinger AL, Thompson CB. (2004): Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr Opin Cell Biol*. **16(6)**:663-9.
- Efron DT, Most D, Barbul A. (2000): Role of nitric oxide in wound healing. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. **3(3)**:197-204
- Exley R, Gordon J, Clemens MJ (1987): Induction of B-cell differentiation antigens in interferon- or phorbol ester-treated Daudi cells is impaired by inhibitors of ADP-ribosyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **84(18)**:6467-6470.
- Feron O. (1999): Endothelial nitric oxide synthase expression and its functionality. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. **2(4)**:291-6.

- Ferro, A. M. & B. M. Olivera (1982): Poly (ADP-ribosylation) in vitro. Reaction parameters and enzyme mechanism. *J Biol Chem*, **257**: 7808-13
- 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.* **277**: F428–F436.
- Francis GE, Gray DA, Berney JJ, Wing MA, Guimaraes JE, Hoffbrand AV (1983): Role of ADP-ribosyl transferase in differentiation of human granulocyte-macrophage progenitors to the macrophage lineage. *Blood*. **62(5)**:1055-1062.
- Germain M, Affar EB, D`Amours D, Dixit VM, Salvesen GS, Poirier GG (1999): Cleavage of automodified poly(ADP-ribose) polymerase during apoptosis. Evidence for involvement of caspase-7. *J Biol Chem*. **274**:28379-28384.
- Glover, J. N., R. S. Williams & M. S. Lee (2004): Interactions between BRCT repeats and phosphoproteins: tangled up in two. *Trends Biochem Sci.* **29**, 579-85
- Grabbe S, Steinert M, Mahnke K, Schwartz A, Luger TA, Schwarz T (1996): Dissection of antigenic and irritative effects of epicutaneously applied haptens in mice. Evidence that not the antigenic component but nonspecific proinflammatory effects of haptens determine the concentration-dependent elicitation of allergic contact dermatitis. *J Clin Invest* **98**: 1158-1164
- Gradwohl G, Mazen A, de Murcia G (1987): Poly(ADP-ribose) polymerase forms loops with DNA. *Biochem Biophys Res Commun.* **148(3)**:913-919.
- Greenacre S A, Evans P, Halliwell B, Brain S D. (1999): Formation and loss of nitrated proteins in peroxynitrite-treated rat skin in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* **262**: 781-786.
- Gu, H., J.D. Marth, P.C. Orban, H. Mossmann, K. Rajewsky (1994): Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting, *Science* **265**: 103–106.
- Gubina, E., Rinaudo, M.S., Szallasi, Z., Blumberg, P.M. and Mufson, R.A. (1998): Overexpression of protein kinase C isoform epsilon but not delta in human interleukin-3-dependent cells suppresses apoptosis and induces bcl-2 expression. *Blood* **91**: 823–829.
- 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.* **96**: 13978–13982.
- Haince JF, Rouleau M, Poirier GG. (2006): Transcription. Gene expression needs a break to unwind before carrying on. *Science*. **312(5781)**:1752-3.
- Halmosi R, Berente Z, Osz E, Toth K, Literati-Nagy P, Sumegi B. (2001): Effect of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors on the ischemia-reperfusion-induced oxidative

cell damage and mitochondrial metabolism in Langendorff heart perfusion system. *Mol Pharmacol.* **59(6)**:1497-505.

Hassa, P. O. & M. O. Hottiger (2002): The functional role of poly (ADP-ribose)polymerase 1 as novel coactivator of NF-kappaB in inflammatory disorders. *Cell Mol Life Sci*, **59**: 1534-53

Hassa, P. O., M. Covic, S. Hasan, R. Imhof & M. O. Hottiger (2001): The enzymatic and DNA binding activity of PARP-1 are not required for NF-kappa B coactivator function. *J Biol Chem*, **276**: 45588-97

Hassa, P. O., S. S. Haenni, C. Buerki, N. I. Meier, W. S. Lane, H. Owen, M. Gersbach, R. Imhof & M. O. Hottiger (2005): Acetylation of poly (ADP-ribose) polymerase-1 by p300/CREB-binding protein regulates coactivation of NF-kappaB-dependent transcription. *J Biol Chem*, **280**: 40450-64

Hassa, P. O., S. S. Haenni, M. Elser & M. O. Hottiger: Nuclear ADP-ribosylation reactions in mammalian cells (2006): where are we today and where are we going? *Microbiol Mol Biol Rev*, **70**: 789-829

Hassa, P.O., Hottiger, Michael O. (2008): The diverse biological roles of mammalian PARPs, a small but powerful family of poly-ADP-ribose polymerases. *Frontiers in Bioscience* **13**: 3046-3082

Hattoni Y, Nishigori C, Tanaka T, et al. (1996): 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine is increased in epidermal cells of hairless mice after chronic ultraviolet B exposure. *J Invest Dermatol* **107**: 733-737.

Herceg Z and Wang ZQ (1999): Failure of poly(ADP-ribose) polymerase cleavage by caspases leads to induction of necrosis and enhanced apoptosis. *Mol Cell Biol.* **19**:5124-5133.

Homburg S, Visochek L, Moran N, Dantzer F, Priel E, Asculai E, Schwartz D, Rotter V, Dekel N, Cohen-Armon M. (2000): A fast signal-induced activation of Poly(ADP-ribose) polymerase: a novel downstream target of phospholipase C. *J Cell Biol.* **150(2)**:293-307.

Hu J, Van den Steen PE, Sang QX, Opdenakker G (2007): Matrix metalloproteinase inhibitors as therapy for inflammatory and vascular diseases. *Nat Rev Drug Discov* **6**: 480-498

Huletsky, A., G. de Murcia, S. Muller, M. Hengartner, L. Menard, D. Lamarre & G. G. Poirier (1989): The effect of poly (ADP-ribosylation) on native and H1-depleted chromatin. A role of poly (ADP-ribosylation) on core nucleosome structure. *J Biol Chem*, **264**: 8878-86

- Hussain RF, Nouri AM, Oliver RT. (1993): A new approach for measurement of cytotoxicity using colorimetric assay. *J Immunol Methods*. **160(1)**:89-96.
- Ischiropoulos, H., (2003): Biological selectivity and functional aspects of protein tyrosine nitration. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **305**, 776–783.
- Jacobson EL, Giacomoni PU, Roberts MJ, Wondrak GT, Jacobson MK. (2001): Optimizing the energy status of skin cells during solar radiation. *J Photochem Photobiol B*. **63(1-3)**:141-7.
- Jagtap P, Szabo C (2005): Poly(ADP-ribose) polymerase and the therapeutic effects of its inhibitors. *Nat Rev Drug Discov* **4**: 421-440
- Jagtap, P., Soriano, F.G., Virag, L., Liaudet, L., Mabley, J., Szabo, E., Hasko, G., Marton, A., Lorigados, C.B., Gallyas Jr., F., Sumegi, B., Hoyt, D.G., Baloglu, E., VanDuzer, J., Salzman, A.L., Southan, G.J., Szabo, C., (2002): Novel phenanthridinone inhibitors of poly (adenosine 5'-diphosphate-ribose) synthetase: potent cytoprotective and antishock agents. *Crit. Care Med.* **30**: 1071–1082.
- Jonsson GG, Menard L, Jacobson EL, Poirier GG, Jacobson MK (1988): Effect of hyperthermia on poly(adenosine diphosphate-ribose) glycohydrolase. *Cancer Res.* **48**:4240-4243.
- Joyeux, M., Baxter, G.F., Thomas, D.L., Ribuot, C. and Yellon, D.M. (1997): Protein kinase C is involved in resistance to myocardial infarction induced by heat stress. *J. Mol. Cell Cardiol.* **29**: 3311–3319.
- Ju, B.-G., Solum, D., Song, E.J., Lee, K.J., Rose, D.W., Glass, C. K., Rosenfeld, M. G. (2006): *Cell* **119**: 815-829
- Juarez-Salinas, H., Sims, J.L., Jacobson, M.K., (1979): Poly(ADPribose) levels in carcinogen-treated cells. *Nature* **282**: 740–741.
- Kanai M, Uchida M, Hanai S, Uematsu N, Uchida K, Miwa M (2000): Poly(ADP-ribose) polymerase localizes to the centrosomes and chromosomes. *Biochem Biophys Res Commun.* **278(2)**:385-389.
- Kannan P, Yu Y, Wankhade S, Tainsky MA (1999): Poly(ADP-ribose) polymerase is a coactivator for AP-2-mediated transcriptional activation. *Nucleic Acid Research* **27(3)**:866-874.
- Kasper B, D'Hondt V, Vereecken P, Awada A. (2007): Novel treatment strategies for malignant melanoma: a new beginning? *Crit Rev Oncol Hematol.* **62(1)**:16-22.
- Kauppinen, T. M., W. Y. Chan, S. W. Suh, A. K. Wiggins, E. J. Huang & R. A. Swanson (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*, **103**: 7136-41

- Kawaichi M, Ueda K, Hayashi O (1981): Multiple auto poly(ADP-ribosyl)ation of rat liver poly(ADP-ribose) synthase. Mode of modification and properties of automodified synthase. *J Biol Chem.* **256**:9483-9489.
- Keil, C., T. Grobe & S. L. Oei (2006): MNNG-induced cell death is controlled by interactions between PARP-1, poly(ADP-ribose) glycohydrolase, and XRCC1. *J Biol Chem*, **281**: 34394-405
- Kickhoefer, V. A., A. C. Siva, N. L. Kedersha, E. M. Inman, C. Ruland, M. Streuli & L. H. Rome (1999): The 193-kD vault protein, VPARP, is a novel poly (ADP-ribose) polymerase. *J Cell Biol*, **146**: 917-28
- Kim, M. Y., S. Mauro, N. Gevry, J. T. Lis & W. L. Kraus (2004): NAD⁺-dependent modulation of chromatin structure and transcription by nucleosome binding properties of PARP-1. *Cell*, **119**: 803-14
- Kloner RA, Przyklenk K, Whittaker P. (1989): Deleterious effects of oxygen radicals in ischemia/reperfusion. Resolved and unresolved issues. *Circulation.* **80(5)**:1115-27.
- Kobayashi, D., Watanabe, N., Yamauchi, N., Tsuji, N., Sato, T., Sasaki, H., Okamoto, T. and Niitsu, Y. (1997): Protein kinase C inhibitors augment tumor-necrosis-factor-induced apoptosis in normal human diploid cells. *Chemotherapy* **43**: 415–423.
- Kofler, J., T. Otsuka, Z. Zhang, R. Noppens, M. R. Grafe, D. W. Koh, V. L. Dawson, J. M. de Murcia, P. D. Hurn & R. J. Traystman (2006): Differential effect of PARP-2 deletion on brain injury after focal and global cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, **26**: 135-41
- Kojima, H., Sakurai, K., Kikuchi, K., Kawahara, S., Kirino, Y., Nagoshi, H., Hirata, Y., Nagano, T., (1998): Development of a fluorescent indicator for nitric oxide based on the fluorescein chromophore. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **46**: 373–375.
- Kolb, H., Kiesel, U., Kroncke, K.D., Kolb-Bachofen, V., (1991): Suppression of low dose streptozotocin induced diabetes in mice by administration of a nitric oxide synthase inhibitor. *Life Sci.* **49**: L213–L217.
- Kovacs K, Toth A, Deres P, Kalai T, Hideg K, Gallyas F Jr, Sumegi B. (2006): Critical role of PI3-kinase/Akt activation in the PARP inhibitor induced heart function recovery during ischemia-reperfusion. *Biochem Pharmacol.* **71(4)**:441-52.
- Koyama H, Iwata H, Kuwabara Y, Iwase H, Kobayashi S, Fujii Y (2000): Gelatinolytic activity of matrix metalloproteinase-2 and -9 in oesophageal carcinoma; a study using in situ zymography. *Eur J Cancer* **36(16)**:2164-2170.
- Kraus WL, Lis JT. (2003): PARP goes transcription. *Cell* **113**: 677–83.

- Krippeit-Drews P, Lang F, Häussinger D, Drews G. (1994): H₂O₂ induced hyperpolarization of pancreatic B-cells. *Pflugers Arch.* **426(6)**:552-4.
- Krishnakumar, R., Gamble M.J., Frizzell, K.M., Berrocal, J.G., Kininis, M., Kraus, W.L. (2008): Reciprocal binding of PARP-1 and histone H1 at promoters specifies transcriptional outcome. *Science* **319**: 819-821.
- Kumari SR, Mendoza-Alvarez H, Alvarez-Gonzales (1998): Functional interactions of p53 with poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) during apoptosis following DNA damage: covalent poly(ADP-ribosylation) of p53 by exogenous PARP and noncovalent binding of p53 to the M_r 85,000 proteolytic fragment. *Cancer Res.* **58**:5075-5078.
- Kwon, N.S., Lee, S.H., Choi, C.S., Kho, T., Lee, H.S., (1994): Nitric oxide generation from streptozotocin. *FASEB J.* **8**: 529–533.
- Lamar JM, Iyer V, Dipersio CM (2008) Integrin alpha3beta1 Potentiates TGFbeta-Mediated Induction of MMP-9 in Immortalized Keratinocytes. *J Invest Dermatol.* **128**:575-86
- Langelier MF, Servent KM, Rogers EE, Pascal JM. (2008): A third zinc-binding domain of human poly(ADP-ribose) polymerase-1 coordinates DNA-dependent enzyme activation. *J Biol Chem.* **283(7)**:4105-14.
- Li H, Liang J, Castrillon DH, DePinho RA, Olson EN, Liu ZP (2007): FoxO4 regulates tumor necrosis factor alpha-directed smooth muscle cell migration by activating matrix metalloproteinase 9 gene transcription. *Mol Cell Biol* **27**: 2676-2686
- Li, P.F., Maasch, C., Haller, H., Dietz, R. and von, H.R. (1999): Requirement for protein kinase C in reactive oxygen species-induced apoptosis of vascular smooth muscle cells. *Circulation* **100**: 967–973.
- Liaudet, L., Pacher, P., Mabley, J.G., Virag, L., Soriano, F.G., Hasko, G., Szabo, C. (2002): Activation of poly(ADP-Ribose) polymerase-1 is a central mechanism of lipopolysaccharide-induced acute lung inflammation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **165**: 372–377.
- Lindahl T, Satoh MS, Poirier GG, Klungland A (1995): Post-translational modification of poly(ADP-ribose) polymerase induced by DNS strand breaks. *TIBS* **20**:405-411.
- Liu, Y., B. E. Snow, V. A. Kickhoefer, N. Erdmann, W. Zhou, A. Wakeham, M. Gomez, L. H. Rome & L. Harrington (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*, **24**: 5314-23
- Lukic, M.L., Stosic-Grujicic, S., Ostojic, N., Chan, W.L., Liew, F.Y. (1991): Inhibition of nitric oxide generation affects the induction of diabetes by streptozocin in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **178**: 913–920.

- Lyons RJ, Deane R, Lynch DK, Ye ZS, Sanderson GM, Eyre HJ, Sutherland GR, Daly RJ (2001): Identification of a novel human tankyrase through its interaction with the adaptor protein Grb14. *J Biol Chem.* **276**:17172-17180.
- Ma Q, Baldwin KT, Renzelli AJ, 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.* **289**(2):499-506.
- Mansat, V., Laurent, G., Levade, T., Beltaieb, A. and Jaffrezou, J.P. (1997): The protein kinase C activators phorbol esters and phosphatidylserine inhibit neutral sphingomyelinase activation, ceramide generation, and apoptosis triggered by daunorubicin. *Cancer Res.* **57**: 5300–5304.
- Margison, G.P., Santibanez Koref, M.F., Povey, A.C., (2002): Mechanisms of carcinogenicity/chemotherapy by O6-methylguanine. *Mutagenesis* **17**: 483–487.
- Massberg, S., Messner, K. (1998): The nature of ischemia/reperfusion injury. *Transplant. Proc.* **30** (8): 4217-4223
- Masutani M, Nozaki T, Nishiyama E, Shimokawa T, Tachi Y, Suzuki H, Nakagama H, Wakabayashi K, Sugimura T (1999): Function of poly(ADP-ribose) polymerase in response to DNA damage: gene-disruption study in mice. *Mol Cell Biochem.* **193**:149–152.
- Masutani M, Nozaki T, Watanabe M, Ochiya T, Hasegawa F, Nakagama H, Suzuki H, Sugimura T (2001): Involvement of poly(ADP-ribose) polymerase in trophoblastic cell differentiation during tumorigenesis. *Mutat Res.* **477**(1-2):111-117.
- Mathis G, Althaus FR. (1987): Release of core DNA from nucleosomal core particles following (ADP-ribose)n-modification in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* **143**(3): 1049-54.
- Matsuzaki T, Amakawa K, Yamaguchi K, Ishizaka A, Terashima T, Matsumaru A, et al. (2006) Effects of diesel exhaust particles on human neutrophil activation. *Exp Lung Res* **32**: 427-439
- Mikuni, T., Tatsuta, M., Kamachi, M. (1992): Hydroxyl free radical production by the reaction of *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine with hydrogen peroxide without exposure to light. *Biochem. Cell Biol.* **70**: 262–268.
- Murata, M., Takahashi, A., Saito, I., Kawanishi, S. (1999): Site-specific DNA methylation and apoptosis: induction by diabetogenic streptozotocin. *Biochem. Pharmacol.* **57**: 881–887.

- Nagale A (1995): Poly(ADP-ribosyl)ation as a fail-safe, transcription-independent, suicide mechanism in acutely DNA-damaged cells: a hypothesis. *Radiat Environ Biophys* **34**:251-254.
- Nevaldine, B., J.A. Longo, P.J. Hahn (1997): The scid defect results in much slower repair of DNA double-strand breaks but not high levels of residual breaks, *Radiat. Res.* **147**: 535–540.
- Nie J, Sakamoto S, Song D, Qu Z, Ota K, Taniguchi T (1998): Interaction of Oct-1 and automodification domain of poly(ADP-ribose) synthetase. *FEBS Lett.* **424(1-2)**:27-32.
- Niknahad, H., O'Brien, P.J., 1995. Cytotoxicity induced by *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine may involve *S*-nitrosyl glutathione and nitric oxide. *Xenobiotica* **25**: 91–101.
- Nishio A, Nakanishi S, Doull J, Uyeki EM (1983): Enhanced chondrocytic differentiation in chick limb bud cell cultures by inhibitors of poly(ADP-ribose) synthetase. *Biochem Biophys Res Commun.* **111(2)**:750-759.
- Noel, G., N. Giocanti, M. Fernet, F. Megnin-Chanet, V. Favaudon (2003): Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP-1) is not involved in DNA double-strand break recovery, *BMC Cell. Biol.* **47**.
- Oei SL, Griesenbeck J, Schweiger M, Babich V, Kropotov A, Tomilin N. (1997): Interaction of the transcription factor YY1 with human poly(ADP-ribosyl) transferase. *Biochem Biophys Res Commun.* **240(1)**:108-111.
- Oka J, Ueda K, Hayaishi O, Komura H, Nakanishi K (1984): ADP-ribosyl protein lyase. Purification, properties and identification of the product. *J Biol Chem.* **259**:986-995.
- Oka S, Kato J, Moss J. (2006): Identification and characterization of a mammalian 39-kDa poly(ADP-ribose) glycohydrolase. *J Biol Chem.* **281(2)**:705-13.
- Okayama Y (2005): Oxidative stress in allergic and inflammatory skin diseases. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* **4**: 517-519
- Oliver FJ, de Murcia MJ, Nacci C, Decker P, Andriantsitohaina R, Muller S, de La Rubia G, Stoclet JC, de Murcia G (1999): Resistance to endotoxic shock as a consequence of defective NF-kappaB activation in poly(ADP-ribose) polymerase-1 deficient mice. *EMBO J.* **18**:4446-4454.
- Ormerod A D, Copeland P, Hay I, Husain A, Ewen S W. (1999): The inflammatory and cytotoxic effects of a nitric oxide releasing cream on normal skin. *J Invest Dermatol* **113**: 392-397.

- Otto H, Reche PA, Bazan F, Dittmar K, Haag F, Koch-Nolte F. (2005): In silico characterization of the family of PARP-like poly(ADP-ribose)transferases (pARTs). *BMC Genomics*. **6**:139.
- Pacher, P. and Szabo, C. (2007): Role of poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP-1) in cardiovascular diseases: the therapeutic potential of PARP inhibitors. *Cardiovasc. Drug Rev.* **25**: 235–260.
- Pacher, P., Beckman, J.S., Liaudet, L. (2007): Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol. Rev.* **87**: 315–424.
- Parsons, J.L., I.I. Dianova, S.L. Allinson, G.L. Dianov (2005): Poly(ADP-ribose) polymerase-1 protects excessive DNA strand breaks from deterioration during repair in human cell extracts, *FEBS J.* **272**: 2012–2021.
- Pfeiffer, S., Lass, A., Schmidt, K., Mayer, B. (2001): Protein tyrosine nitration in cytokine-activated murine macrophages. Involvement of a peroxidase/nitrite pathway rather than peroxynitrite. *J. Biol. Chem.* **276**: 34051–34058.
- Pieper AA, Brat DJ, Krug DK, Watkins CC, Gupta A, Blackshaw S, Verma A, Wang ZQ, Snyder SH. (1999): Poly(ADP-ribose) polymerase-deficient mice are protected from streptozotocin-induced diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96(6)**:3059-64.
- Perkins ND, Felzien LK, Betts JC, Leung K, Beach DH, Nabel GJ. (1997): Regulation of NF-kappaB by cyclin-dependent kinases associated with the p300 coactivator. *Science.* **275(5299)**:523-7.
- Radi R, Beckman J S, Bush K M, Freeman B A. (1991a): Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J Biol Chem* **266**: 4244-4250.
- Radi R, Beckman J S, Bush K M, Freeman B A. (1991b): Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch Biochem Biophys* **288**: 481-487.
- Rawlingson A, Greenacre S A, Brain S D. (2000): Generation of peroxynitrite in localised, moderate temperature burns. *Burns* **26**: 223-227.
- Ricciarelli, R., Palomba, L., Cantoni, O. and Azzi, A. (1998): 3-Aminobenzamide inhibition of protein kinase C at a cellular level. *FEBS Lett.* **431**: 465–467.
- Richardson DS, Allen PD, Kelsey SM, Newland AC (1999): Effects of PARP inhibition on drug Fas-induced apoptosis in leukaemic cells. *Adv Exp Med Biol.* **457**:267-279.
- Robertson KD. (2002): DNA methylation and chromatin - unraveling the tangled web. *Oncogene.* **21(35)**:5361-79.

- Robichova, S., Slamenova, D. (2002): Effects of vitamins C and E on cytotoxicity induced by *N*-nitroso compounds, *N*-nitrosomorpholine and *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine in Caco-2 and V79 cell lines. *Cancer Lett.* **182**: 11–18.
- Romert, L., Jenssen, D. (1987): Mechanism of *N*-acetylcysteine (NAC) and other thiols as both positive and negative modifiers of MNNG-induced mutagenicity in V79 Chinese hamster cells. *Carcinogenesis* **8**: 1531–1535.
- Ross R, Gillitzer C, Kleinz R, Schwing J, Kleinert H, Förstermann U, Reske-Kunz AB. (1998): Involvement of NO in contact hypersensitivity. *Int Immunol.* **10(1)**:61-9.
- Ruscetti, T., Lehnert, B.E., Halbhook, J., Le, T.H., Hoekstra, M.F., Chen, D.J. and Peterson, S.R. (1998): Stimulation of the DNA-dependent protein kinase by poly(ADP-ribose) polymerase. *J. Biol. Chem.* **273**: 14461–14467.
- Salgo M G, Stone K, Squadrito G L, Battista J R, Pryor W A. (1995): Peroxynitrite causes DNA nicks in plasmid pBR322. *Biochem Biophys Res Commun* **210**: 1025-1030.
- Sallmann FR, Vodenicharov MD, Wang ZQ, Poirier GG (2000): Characterization of sPARP-1. An alternative product of PARP-1 gene with poly(ADP-ribose) polymerase activity independent of DNA strand breaks. *J Biol Chem.* **275(20)**:15504-15511.
- Samson, L. and J. Cairns (1977): A new pathway for DNA repair in *Escherichia coli*. *Nature* **267**, 281–283.
- Sastry SS and Kun E (1990): The interaction of adenosine diphosphoribosyl transferase (ADPRT) with a cruciform DNA. *Biochem Biophys Res Commun.* **167(2)**:842-847.
- Saxena A, Saffery R, Wong LH, Kalitsis P, Choo KH (2002): Centromere proteins Cenpa, Cenpb, and Bub3 interact with poly(ADP-ribose) polymerase-1 protein and are poly(ADP-ribosyl)ated. *J Biol Chem.* **277(30)**:26921-26926.
- Schmitz, A.A., Pleschke, J.M., Kleczkowska, H.E., Althaus, F.R. and Vergeres, G. (1998): Poly(ADP-ribose) modulates the properties of MARCKS proteins. *Biochemistry* **37**, 9520–9527.
- Schreiber V, Ame JC, Dolle P, Schultz I, Rinaldi B, Fraulob V, Menissier-de Murcia J, de Murcia G (2002): Poly(ADP-ribose) polymerase-2 (PARP-2) is required for efficient base excision DNA repair in association with PARP-1 and XRCC1. *J Biol Chem.* **277(25)**:23028-23036.
- Schreiber V, Hunting D, Trucco C, Gowans B, Grunwald D, de Murcia G, Ménissier-de Murcia J (1995): A dominant-negative mutant of human poly(ADP-ribose) polymerase affects cell recovery, apoptosis and sister chromatid exchange following DNA damage. *Proc Natl Acad Sci USA.* **92**:4753-4757.

- Shieh WM, Ame JC, Wilson, MV, Wang ZQ, Koh DW, Jacobson MK, Jacobson EL (1998): Poly (ADP-ribose) polymerase null mouse cells can synthesize ADP-ribose polymers. *J Biol Chem.* **273**:30069-30072.
- Simbulan-Rosenthal CM, Rosenthal DS, Hilz Z, Hickey R, Malkas L, Applegern N, Wu Y, Bers G, Smulson ME (1996): The expression of poly(ADP-ribose) polymerase during differentiation-linked DNA replication reveals that it is a component of the multiprotein DNA replication complex. *Biochemistry.* **35**:11622-116333.
- Singer, B. and J. T. Kusmierek (1982): Chemical mutagenesis. *Annu. Rev. Biochem.* **51**: 655–693.
- Singh, N., Poirier, G. and Cerutti, P. (1985a): Tumor promoter phorbol-12-myristate-13-acetate induces poly(ADP)-ribosylation in fibroblasts. *EMBO J.* **4**: 1491–1494.
- Singh, N., Poirier, G. and Cerutti, P. (1985b): Tumor promoter phorbol-12-myristate-13-acetate induces poly ADP-ribosylation in human monocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **126**: 1208–1214.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L. (1988): A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* **175**: 184–191
- Smith GCM and Jackson SP (1999): The DNA-dependent protein kinase. *Genes Dev.* **13**: 916–934.
- Smith S and de Lange T (2000): Tankyrase promotes telomere elongation in human cells. *Curr Biol* **10**:1299-1302.
- Smith S, Giriati I, Scmitt A, de Lange T (1998): Tankyrase, a poly(ADP-ribose) polymerase at human telomeres. *Science* **282**:1484-1487.
- Soldani, C. and Scovassi, A.I. (2002): Poly(ADP-ribose) polymerase-1 cleavage during apoptosis: An update. *Apoptosis* **7**: 321–328.
- Soldatenkov VA and Smulson M (2000): Poly(ADP-ribose) Polymerase in DNA Damage-Response Pathway: Implications for Radiation Oncology. *Int. J. Cancer (Radiat. Oncol. Invest)* **90**:59–67.
- Soriano FG, Virag L, Szabo C (2001): Diabetic endothelial dysfunction: role of reactive oxygen and nitrogen species production and poly(ADP-ribose) polymerase activation. *J Mol Med* **79**:437-448
- Szabó C, Lim LH, Cuzzocrea S, Getting SJ, Zingarelli B, Flower RJ, Salzman AL, Perretti M. (1997): Inhibition of poly (ADP-ribose) synthetase attenuates neutrophil recruitment and exerts antiinflammatory effects. *J Exp Med.* **186**(7):1041-9.

- Szabó E, Virag L, Bakondi E, Gyure L, Hasko G, Bai P, Hunyadi J, Gergely P, Szabo C (2001): Peroxynitrite production, DNA breakage, and poly(ADP-ribose) polymerase activation in a mouse model of oxazolone-induced contact hypersensitivity. *J Invest Dermatol* **117**: 74-80
- Tanaka, Y., Koide, S.S., Yoshihara, K. and Kamiya, T. (1987): Poly (ADP-ribose) synthetase is phosphorylated by protein kinase C in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **148**: 709–717.
- Tanaka, Y., Shimizu, H., Sato, N., Mori, M., Shimomura, Y. (1995): Involvement of spontaneous nitric oxide production in the diabetogenic action of streptozotocin. *Pharmacology* **50**: 69–73.
- Tanuma S, Yagi T, Johnson GS (1985): Endogenous ADP ribosylation of high mobility group proteins 1 and 2 and histone H1 following in intact cells. *Arch Biochem Biophys* **237**:38-42.
- Tebbs, R.S., M.L. Flannery, J.J. Meneses, A. Hartmann, J.D. Tucker, L.H. Thompson, J.E. Cleaver, R.A. Pedersen (1999): Requirement for the Xrcc1 DNA base excision repair gene during early mouse development, *Dev. Biol.* **208**: 513–529.
- Tentori L, Turriziani M, Franco D, Serafino A, Levati L, Roy R, Bonmassar E, Graziani G (1999): Treatment with temozolomide and poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors induces early apoptosis and increases base excision repair gene transcripts in leukaemic cells resistant to triazene compounds. *Leukemia* **13**:901-909.
- Tentori L, Leonetti C, Scarsella M, D'Amati G, Vergati M, Portarena I, Xu W, Kalish V, Zupi G, Zhang J, Graziani G. (2003): Systemic administration of GPI 15427, a novel poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor, increases the antitumor activity of temozolomide against intracranial melanoma, glioma, lymphoma. *Clin Cancer Res.* **9(14)**:5370-9.
- Tentori L, Leonetti C, Scarsella M, et al. (2005): Poly(ADP-ribose) glycolhydrolase inhibitor as chemosensitizer of malignant melanoma for temozolomide. *Clin Cancer Res* **41**:2948–57.
- Tewari M, Quan LT, O'Rourke K, Desnoyers S, Zeng Z, Beidler DR, Poirier GG, Salvesen GS, Dixit VM (1995): Yama/CPP32 beta, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase. *Cell* **81**:801-809.
- The Sidney Kimmel Comprehensive Cancer Center at Johns Hopkins (2002): Biological Link Between Diet and Colon Cancer Uncovered.
<http://www.hopkinskimmeltcancercenter.org/labresearch/article.cfm?rpID=2&arID=14>
- Thomas, G., Ramwell, P.W., (1989): Streptozotocin: a nitric oxide carrying molecule and its effect on vasodilation. *Eur. J. Pharmacol.* **161**: 279–280.

- Trouba KJ, Hamadeh HK, Amin RP, Germolec DR (2002): Oxidative stress and its role in skin disease. *Antioxid Redox Signal* **4**: 665-673
- Turk, J., Corbett, J.A., Ramanadham, S., Bohrer, A., McDaniel, M.L. (1993): Biochemical evidence for nitric oxide formation from streptozotocin in isolated pancreatic islets. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **197**, 1458–1464.
- Um S C, Suzuki S, Toyokuni S, Uchida K, Hiai H, Nishimura Y. (1999): Formation of 4-hydroxy-2-nonenal-modified proteins and 3-nitro-L- tyrosine in rat island skin flaps during and after ischemia. *Ann Plast Surg* **42**: 293-298.
- Urbanek, P., J. Paces, J. Kralova, M. Dvorak & V. Paces (2002): Cloning and expression of PARP-3 (Adprt3) and U3-55k, two genes closely linked on mouse chromosome 9. *Folia Biol (Praha)*, **48**: 182-91
- Vanags, D. M.; Pörn-Ares, M.; Coppola, S.; Burgess, D. H.; Orenius, S. (1996): Protease involvement in fodrin cleavage and phosphatidylserine exposure in apoptosis. *J. Biol. Chem.* **271**:31075–31085
- van Empel, V. P., A. T. Bertrand, R. van der Nagel, S. Kostin, P. A. Doevendans, H. J. Crijns, E. de Wit, W. Sluiter, S. L. Ackerman & L. J. De Windt (2005): Downregulation of apoptosis-inducing factor in harlequin mutant mice sensitizes the myocardium to oxidative stress-related cell death and pressure overload-induced decompensation. *Circ Res*, **96**: e92-e101
- van Wijk, S. J. & G. J. Hageman (2005): Poly (ADP-ribose) polymerase-1 mediated caspase-independent cell death after ischemia/reperfusion. *Free Radic Biol Med*, **39**: 81-90
- Virag L and Szabo C (2001): Purines inhibit poly(ADP-ribose) polymerase activation and modulate oxidant-induced cell death. *FASEB J.* **15(1)**:99-107.
- Virag L, Bai P, Bak I, Pacher P, Mabley JG, Liaudet L, et al. (2004): Effects of poly(ADPribose) polymerase inhibition on inflammatory cell migration in a murine model of asthma. *Med Sci Monit* **10**: BR77-BR83
- Virag L, Szabo C (2002): The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Pharmacol Rev* **54**: 375-429
- Virag L, Szabo E, Bakondi E, Bai P, Gergely P, Hunyadi J, et al. (2002): Nitric oxideperoxynitrite-poly(ADP-ribose) polymerase pathway in the skin. *Exp Dermatol* **11**: 189- 202
- Virag, L., Kerekgyarto, C. and Fachel, J. (1995): A simple, rapid and sensitive fluorimetric assay for the measurement of cellmediated cytotoxicity. *J. Immunol. Meth.* **185**: 199–208.

- Virag, L., Marmer, D.J., Szabo, C. (1998a): Crucial role of apopain in the peroxynitrite-induced apoptotic DNA fragmentation. *Free Radic. Biol. Med.* **25**: 1075–1082.
- Virag, L., Salzman, A.L., Szabo, C., (1998b): Poly(ADP-ribose) synthetase activation mediates mitochondrial injury during oxidant-induced cell death. *J. Immunol.* **161**: 3753–3759.
- Virag, L., Scott, G.S., Antal-Szalmas, P., O'Connor, M., Ohshima, H., Szabo, C. (1999): Requirement of intracellular calcium mobilization for peroxynitrite-induced poly(ADP-ribose) synthetase activation and cytotoxicity. *Mol. Pharmacol.* **56**: 824–833.
- Virag, L., Scott, G.S., Cuzzocrea, S., Marmer, D., Salzman, A.L., Szabo, C. (1998c): Peroxynitrite-induced thymocyte apoptosis: the role of caspases and poly (ADP-ribose) synthetase (PARS) activation. *Immunology* **94**: 345–355.
- Virag, L., Szabo, E., Gergely, P., Szabo, C. (2003): Peroxynitrite-induced cytotoxicity: mechanism and opportunities for intervention. *Toxicol. Lett.* **140–141**: 113–124.
- Virág L, Bai P, Bak I, Pacher P, Mabley JG, Liaudet L, Bakondi E, Gergely P, Kollai M, Szabó C. (2004): Effects of poly(ADP-ribose) polymerase inhibition on inflammatory cell migration in a murine model of asthma. *Med Sci Monit.* **10(3)**:BR77-83.
- Virág L. (2005): Structure and function of poly(ADP-ribose) polymerase-1: role in oxidative stress-related pathologies. *Curr Vasc Pharmacol.* **3(3)**:209-14.
- Vodenicharov, M.D., F.R. Sallmann, M.S. Satoh, G.G. Poirier (2000): Base excision repair is efficient in cells lacking poly(ADP-ribose) polymerase 1, *Nucleic Acids Res.* **28**: 3887–3896.
- Wacker, D.A., Ruhl, D.D., Balagamwala E.H., Hope, K.M., Zhang, T., Kraus, W.L. (2007): The DNA binding and catalytic domains of poly(ADP-ribose) polymerase 1 cooperate in the regulation of chromatin structure and transcription. *Molecular and cellular biology.* **27(21)**: 7475-7485.
- Walker, John W., Jijon, HB., Madsen KL. (2006): AMP-activated protein kinase is a positive regulator of poly(ADP-ribose) polymerase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **341**: 67–72
- Wang, M., W. Wu, B. Rosidi, L. Zhang, H. Wang, G. Iliakis (2006): PARP-1 and Ku compete for repair of DNA double strand breaks by distinct NHEJ pathways, *Nucleic Acids Res.* **34**: 6170–6182.
- Wang, Z. Q., B. Auer, L. Stingl, H. Berghammer, D. Haidacher, M. Schweiger & E. F. Wagner (1995): Mice lacking ADPRT and poly (ADP-ribosylation) develop normally but are susceptible to skin disease. *Genes Dev,* **9**: 509-20

- Watson AJ, Askew JN, Benson RS (1995): Poly(adenosine diphosphate ribose) polymerase inhibition prevents necrosis induced by H₂O₂ but not apoptosis. *Gastroenterology*. **109**:472-482.
- Weinberg, J. M. (1991): The cell biology of ischemic renal injury. *Kidney Int.* **39 (3)**: 476-500
- Wielckens, K., R. Bredehorst, P. Adamietz & H. Hilz (1982): Mono ADP-ribosylation and poly ADP-ribosylation of proteins in normal and malignant tissues. *Adv Enzyme Regul*, **20**: 23-37
- Wilson, G.L., Patton, N.J., McCord, J.M., Mullins, D.W., Mossman, B.T. (1984): Mechanisms of streptozotocin- and alloxan-induced damage in rat B cells. *Diabetologia* **27**: 587-591.
- Woodhouse, B. C., Dianov, G. L. (2008): Poly ADP-ribose polymerase-1: An international molecule of mystery. *DNA repair* **7**: 1077-1086
- Xu Y, Kim SO, Li Y, Han J. (2006): Autophagy contributes to caspase-independent macrophage cell death. *J Biol Chem.* **281(28)**:19179-87.
- Yamasaki K, Edington HD, McClosky C, Tzeng E, Lizonova A, Kovesdi I, Steed DL, Billiar TR. (1998): Reversal of impaired wound repair in iNOS-deficient mice by topical adenoviral-mediated iNOS gene transfer. *J Clin Invest.* **101(5)**:967-71.
- Ye, H., C. Cande, N. C. Stephanou, S. Jiang, S. Gurbuxani, N. Larochette, E. Daugas, C. Garrido, G. Kroemer & H. Wu (2002): DNA binding is required for the apoptogenic action of apoptosis inducing factor. *Nat Struct Biol*, **9**: 680-4
- Yiang, G.T., Yu, Y.L., Hu, S.C., Chen, M.H., Wang, J.J. and Wei, C.W. (2008): PKC and MEK pathways inhibit caspase-9/-3-mediated cytotoxicity in differentiated cells. *FEBS Lett.* **582**: 881-885.
- Ying W and Swanson RA (2000): The poly(ADP-ribose) glycohydrolase inhibitor gallotannin blocks oxidative astrocyte death. *Neuroreport.* **11(7)**:1385-1388.
- Ying W, Sevigny MB, Chen Y, Swanson RA (2001): Poly(ADP-ribose) glycohydrolase mediates oxidative and excitotoxic neuronal death. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **98(21)**:12227-12232.
- Yu, S. W., S. A. Andrabi, H. Wang, N. S. Kim, G. G. Poirier, T. M. Dawson & V. L. Dawson (2006): Apoptosis-inducing factor mediates poly (ADP-ribose) (PAR) polymer-induced cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**: 18314-9
- Yu, S.W., Wang, H., Poitras, M.F., Coombs, C., Bowers, W.J., Federoff, H.J., Poirier, G.G., Dawson, T.M., Dawson, V.L. (2002): Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. *Science* **297**: 259-263.

- Zardo G, Caiafa P. (1998): The unmethylated state of CpG islands in mouse fibroblasts depends on the poly(ADP-ribosylation) process. *J Biol Chem.* **273(26)**:16517-20.
- Zhang R, Hirsch O, Mohsen M, Samuni A. (1994): Effects of nitroxide stable radicals on juglone cytotoxicity. *Arch Biochem Biophys.* **312(2)**:385-91.
- Zhang, S., Y. Lin, Y. S. Kim, M. P. Hande, Z. G. Liu & H. M. Shen (2007): c-Jun N-terminal kinase mediates hydrogen peroxide-induced cell death via sustained poly (ADPribose) polymerase-1 activation. *Cell Death Differ*, **14**: 1001-10
- Zhu F, Jin CX, Song T, Yang J, Guo L, Yu YN (2003): Response of human REV3 gene to gastric cancer inducing carcinogen N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine and its role in mutagenesis. *World J Gastroenterol.* **9(5)**:888-93.
- Ziegler M and Oei SL (2001): A cellular survival switch: poly(ADP-ribosylation) stimulates DNA repair and silences transcription. *Bioessays.* **23(6)**:543-548.
- Ziegler, M. (2000): New functions of a long-known molecule. Emerging roles of NAD in cellular signaling. *Eur J Biochem*, **267**:1550-64
- Zingarelli B, Salzman AL, Szabo C (1998): Genetic disruption of poly (ADP-ribose) synthetase inhibits the expression of P-selectin and intercellular adhesion molecule-1 in myocardial ischemia/reperfusion injury. *Circ Res* **83**: 85-94
- Zong, W. X. & C. B. Thompson (2006): Necrotic death as a cell fate. *Genes Dev*, **20**: 1-15
- Zong, W. X., D. Ditsworth, D. E. Bauer, Z. Q. Wang & C. B. Thompson (2004): Alkylating DNA damage stimulates a regulated form of necrotic cell death. *Genes Dev*, **18**: 1272-82
- Zozulya AL, Reinke E, Baiu DC, Karman J, Sandor M, Fabry Z (2007): Dendritic cell transmigration through brain microvessel endothelium is regulated by MIP-1alpha chemokine and matrix metalloproteinases. *J Immunol* **178**: 520-529

10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetem szeretném kifejezni elsősorban Dr. Virág László témavezetőmnek, aki az elmúlt évek során nagyon sok hasznos tapasztalatot adott át nekem. Köszönöm segítségét, amit Ph. D. ösztöndíjam ideje alatt és a disszertációm írásához nyújtott.

Szeretném megköszönni intézetvezetőmnek, Gergely Pál Professzor Úrnak, hogy kutatómunkám elvégzéséhez biztosította számomra a szükséges feltételeket.

Munkatársaimnak: Bai Péternek, Bakondi Edinának, Erdélyi Katalinnak, Herbály Mihálynének, Lakatos Petrának, Kovács Katalinnak, Kovács Istvánnak, Sipos Adriennek és Brunyánszki Attilának szakmai segítségükért és a laborban a jó hangulat kialakításáért tartozom köszönettel.

Köszönet illeti Dr. Wim Buurmant (University of Maastricht), amiért a nitrotirozin antitestet biztosította számunkra, valamint Dr. Bíró Tamást, Tóth I. Balázst és Dr. Füzi Mártát a PKC izoformák azonosításában nyújtott segítségükért. Köszönöm Dr. Bai Péternek az áramlási citometriás mérésekben, a mátrix metalloproteinázzal kapcsolatos vizsgálatokban és a citokin expressziós vizsgálatokban, Herbály Mihálynének az immunfluoreszcens vizsgálatokban és Erdélyi Katalinnak a nitrotirozin kimutatásában végzett segítő munkáját. Szeretném megköszönni Oláh Gábornak és Dr. Szabó Csabának, hogy az immunprecipitációs vizsgálataim megerősítésében segítséget nyújtottak.

Köszönöm menyasszonyom, Gregus Andrea támogatását, türelmét, építő kritikáját.

Köszönettel tartozom szüleimnek, nagyszüleimnek és húgomnak, hogy a nyugodt háttérrel megteremtették számomra, s mindig támogattak és mindig volt idejük rám.

11. ÖSSZEFOGLALÁS

Az MNNG egy alkiláló hatású citosztatikum, mely különböző sejtekben fokozott poli(ADP-ribozil)ációt okoz. Munkánk első részében az MNNG PARP-aktiváló és citotoxikus hatásának mechanizmusát vizsgáltuk egér timocitákban. MNNG kezelés hatására DNS törést, a PARP aktivitás növekedését, valamint nagy mértékű citotoxicitást figyeltünk meg. Ezek a hatások megelőzhetők voltak tiolos antioxidánsokkal (glutation, N-acetilcisztein). A PARP gátlása csökkentette a nekrozist, és ezzel egyidejűleg fokozta az apoptotikus paramétereit. Az MNNG vizes oldatában nitrit/nitrát keletkezését figyeltük meg, valamint MNNG-vel kezelt timocitákban jelentős mennyiségű nitrált fehérjét mutattunk ki, ami peroxinitrit képződést jelez. A timocitákban az MNNG által kiváltott citotoxicitás hasonlít a peroxinitrit hatásához, ezért megvizsgáltuk, hogy a peroxinitrit felelős-e az MNNG citotoxikus hatásaiért. További vizsgálatainkban azt tapasztaltuk, hogy sem az NO, sem a peroxinitrit közvetlenül nem befolyásolja az MNNG citotoxikus hatását.

Bár a PARP-1 főleg DNS sérülés hatására aktiválódik, de leírtak alternatív (foszforiláció révén bekövetkező) aktivációt is. Ismert volt, hogy a protein kináz C (PKC) *in vitro* képes foszforilálni a PARP-1-et. Munkánk során bebizonyítottuk, hogy ez a foszforiláció az élő szervezetben is végbemegy, hatására a PARP-1 gátolt működését figyeltük meg. Citotoxicitási vizsgálatainkban a PKC aktivációja csökkentette a sejtpusztulást. A PKC aktivátor forbolészter citoprotektív hatása PKC gátlószerekkel kivédhető volt. Ennek alapján elmondható, hogy az MNNG által kiváltott DNS törés PARP aktivációhoz és PARP függő sejthalálhoz vezet. A PKC a PARP-1 foszforilációjával gátolja annak aktivitását és ennek révén citoprotektív hatású.

A kontakt hiperszenzitivitás (CHS) egy késleltetett hiperszenzitivitási reakció. Fontos szerepet játszik benne a proinflammatorikus citokinek termelődése, limfociták és granulociták infiltrációja, melyhez erős oxidatív stressz társul. Irodalmi adatok alapján a poli(ADP-ribóz) polimeráz gátlása vagy hiánya jelentősen csökkenti a gyulladásos reakciókat. A PARP-1 CHS-ben betöltött szerepét oxazolonnal szenzitizált egérmodellen vizsgáltuk. A PARP gátlása mérsékelte az ödémaképződést, az infiltráló sejtek számát, a proinflammatorikus citokinek/kemokinek indukcióját és a mátrix-metalloproteináz (MMP) aktivitást is. A PARP gátlása kisebb mértékben csökkentette a gyulladást irritatív dermatitisben, ami arra utal, hogy a PARP mind az antigén specifikus immunválaszt, mind az általános gyulladásos útvonalakat modulálja.

12. SUMMARY

MNNG is an alkylating agent, which induces enhanced poly(ADP-ribosylation) in different cell types. In the first part of our work we have investigated the mechanism of the PARP-activating and cytotoxic effects of MNNG. After MNNG treatment, DNA breakage, increased PARP activity and cytotoxicity could be observed. These effects have been abolished by pretreatment of the cells with thiol antioxidants (glutathione or *N*-acetylcysteine). Inhibition of PARP decreased necrosis but apoptotic parameters increased simultaneously. In aqueous solution of MNNG we found nitrite/nitrate production. Moreover, in MNNG-treated thymocytes intense protein tyrosine nitration could be observed. As MNNG-induced cytotoxicity in thymocytes showed many similarities to peroxynitrite-induced cell death, therefore we have investigated whether peroxynitrite was responsible for the cytotoxicity induced by MNNG. We found that neither NO nor peroxynitrite contributed to MNNG-induced cytotoxicity.

Although PARP-1 is activated mainly by DNA damage, alternative phosphorylation-dependent activation has also been described. It is known, that protein kinase C (PKC) is able to phosphorylate PARP-1 *in vitro*. In our work, we showed PKC-mediated phosphorylation also takes place in a cellular setting leading to inhibition of PARP-1 activity and to reduced cytotoxicity. Cytoprotective effect of PKC-activating phorbol ester was reversed by PKC inhibitors. Our results demonstrate that MNNG-induced DNA breakage leads to PARP activation and PARP-dependent cytotoxicity. PKC inhibits PARP activation by phosphorylation, and thus exerts a cytoprotective effect.

Contact hypersensitivity (CHS) is a form of delayed type of hypersensitivity. Production of proinflammatory cytokines, cellular infiltration by lymphocytes and granulocytes are important events of this process. Infiltration is accompanied by strong oxidative stress. Inhibition of PARP activity or knocking out the PARP-1 gene has been shown to suppress inflammatory reactions. We have investigated the role of PARP-1 in the mouse model of oxazolone-induced CHS. Inhibition of PARP decreased edema, the number of infiltrating cells, induction of proinflammatory cytokines and activity of matrix metalloproteinases. The PARP inhibitor had similar but milder effect in irritant dermatitis indicating that PARP modulates both the antigen-specific immune response and the general inflammatory pathways.

13. PUBLIKÁCIÓS LISTA

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

Bai P, **Hegedűs C**, Erdélyi K, Szabó E, Bakondi E, Gergely S, Szabó C, Virág L. (2007): Protein tyrosine nitration and poly(ADP-ribose) polymerase activation in N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine-treated thymocytes: implication for cytotoxicity. *Toxicol Lett.* **170(3)**:203-13 IF.: 2,83

Hegedűs C, Lakatos P, Oláh G, Tóth BI, 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.* **582(12)**:1672-1678. IF.: 3,26

Bai P, **Hegedűs C**, Szabó E, Gyüre L, Bakondi E, Brunyánszki A, Gergely S, Szabó C, Virág L. (2008): Poly(ADP-Ribose) Polymerase Mediates Inflammation in a Mouse Model of Contact Hypersensitivity. *J Invest Dermatol.* 2008 Jul 17. PMID: 18633442 IF.: 4,83

14. FÜGGELÉK (KÖZLEMÉNYEK MÁSOLATAI)