

Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

**Oxidatív stressz hatása a poli(ADP-ribóz) metabolizmusra és a kalcium homeosztázisra
humán keratinocita és egér makrofág sejtvonalakban**

Bakondi Edina

Témavezető: Dr. Virág László
egyetemi docens

Debreceni Egyetem
Orvos- és Egészségtudományi Centrum
Általános Orvostudományi Kar
Orvosi Vegytani Intézet
Debrecen, 2003

Bevezetés

A poli(ADP-ribóz) anyagcsere főbb jellemzői és kulcsenzime

A poli(ADP-ribóz) anyagcsere két alapvető folyamata az (ADP-ribóz)_n polimer szintézise és lebontása. A polimer szintézisére képes enzimeket poli(ADP-ribóz) polimerázoknak (PARP) nevezzük. Az általuk katalizált reakció során az enzimek a NAD⁺-ot ADP-ribózra és nikotinamidra hasítják, majd az ADP-ribóz egységeket megfelelő adapter fehérjék glutamát oldalláncjaihoz kapcsolva azokból hosszú elágazó láncú (ADP-ribóz)_n polimereket szintetizálnak. A polimer hossza néhány ADP-ribóz egységtől kb. 200 monomerig terjedhet. A polimer negatív töltéseket kölcsönöz az adapter fehérjéknek, ami megváltoztatja fiziko-kémiai sajátosságait és funkcióit.

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

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

A PARP-1 DNS károsodást felismerő és jelző enzim, ami DNS törések hatására aktiválódik. A PARP-1, főleg a második cinkujj doménen keresztül kötődve a károsodott DNS-hez homodimereket alkot és katalizálja a NAD⁺ hasítását és a polimer szintézisét. *In vivo* a poli-ADP-riboziláció egyik legfontosabb célfehérjéje maga a PARP-1. Az intermolekuláris auto-poli-ADP-riboziláció hatására a PARP-1 leválik a károsodott DNS-ről és enzimaktivitása gátlódik. Ha a polimer akceptora más fehérje, akkor transz-poli-ADP-ribozilációról beszélünk. A transz-poli-ADP-riboziláció fontos akceptorai a hisztonok,

amelyek a folyamat során negatív töltést nyernek, s az ennek következtében a DNS és a hisztonok között fellépő elektrosztatikus taszítás lazítja a kromatin szerkezetét. Számos egyéb magfehérje, pl. transzkripciós faktorok, DNS javító enzimek és adapter fehérjék poli-ADP-ribozilációját is kimutatták.

A poli-ADP-riboziláció szerepe a sejthalálban

A poli-ADP-riboziláció egy pleiotróp regulációs mechanizmus, amely számos sejtfunkciót, pl. a kromatinszerkezetet, a replikációt, transzkripciót, a proliferációt és a sejthalált is szabályozza. A PARP aktivációt először Berger munkacsoportja hozta összefüggésbe a DNS károsító ágensek citotoxikus hatásával. E sejtöngyilkossági hipotézis („suicide hypothesis”) szerint az intenzív PARP aktiváció elfogyasztja a sejtek NAD^+ tartalmát, ami következményes ATP deplációhoz és a sejt halálához vezet. Az utóbbi években a poli-ADP-riboziláció kutatás egyik központi kérdésévé vált, hogy a PARP aktiváció milyen típusú sejthalált vált ki. A sejthalál a kiváltó stimulus jellegétől, intenzitásától, az érintett sejt típus érzékenységétől és a moduláló tényezők aktivitásától függően alapvetően két formában zajlik le, melyeket apoptózisnak és onkózisnak hívnak. Míg a PARP-1 apoptózisban betöltött szerepe ellentmondásos, egyre inkább elfogadott az a nézet, hogy a PARP aktiváció révén megvalósuló sejtöngyilkosság onkózis formájában zajlik le. Az onkózist az apoptózistól elkülönítő legfontosabb ismérv a plazmamembrán integritásának megszűnése és a sejt térfogatának növekedése, szemben az apoptotikus sejt kompaktációjával.

Míg a PARP gátlás citoprotektív hatásai széles körűen dokumentáltak, a katabolikus enzim gátlásának hasonló hatására csak nemrég derült fény. Swanson munkacsoportjának eredményeiből tudjuk, hogy a PARG gátlószerként ismert gallotannin és nobotanin B védelmet nyújt az N-metil-D aszpartáttal vagy hidrogén peroxiddal kiváltott sejthalállal szemben. Ennek háttérében a poli(ADP-ribóz) gátolt lebontása és a PARP gátló hatású autopoli-ADP-ribozilációjának fokozódása feltételezhető.

A poli-ADP-riboziláció legfontosabb stimulusa: az oxidatív stressz

Számos nagy népcsoportot érintő betegségben ismeretes a reaktív oxigén és nitrogén tartalmú intermedierek (ROI és RNI). A ROI-k közül a hidroxilgyök a legreaktívabb speciesz, mely DNS károsító hatása révén a PARP aktivációnak is egyik fontos triggerre. A munkánk során gyakran alkalmazott másik genotoxikus ágens a nitrogén monoxid (NO) és a szuperoxid anion reakciója során keletkező peroxynitrit. A peroxynitrit keletkezését a szuperoxid és/vagy a nitrogén monoxid túltermelődése elősegíti. Kis mennyiségű szuperoxid folyamatosan

keletkezik a mitokondriális légzési lánc működése során és a NADPH oxidázok és a xantin oxidázok is termelik. Az egyetlen ismert biomolekula, amely hatékonyan versenyezhet a szuperoxid diszmutázzal a szuperoxidért, a nitrogén monoxid. A peroxinitrit reakcióba lép tiolokkal, lipid peroxidációt okoz, jelátviteli útvonalakat aktivál vagy gátol. A fehérjéket oxidáció és/vagy tirozin/triptofán nitrálás révén inaktiválhatja. DNS töréseket hozva létre a PARP aktivációnak is fontos triggere.

Célkitűzések

Munkánk során az alábbi kérdések megválaszolását tűztük ki célul:

I. Nem radioaktív technikán alapuló detektálási módszer kidolgozása a PARP aktivitás kimutatására biotinnal jelölt NAD⁺ szubsztrát felhasználásával

1. Az alkalmazott módszer alkalmasságának igazolása a PARP aktivitás kvalitatív kimutatására sejtes és szöveti rendszerekben.
2. Oxidatív stressz által kiváltott PARP aktiváció vizsgálata a biotinilált NAD⁺ felhasználásán alapuló módszerrel.

II. A poli(ADP-ribóz) anyagcsere szerepének vizsgálata oxidatív stressz által kiváltott citotoxicitásában HaCaT sejteken

3. Okoz-e a peroxinitrit intracelluláris Ca²⁺- koncentráció emelkedést HaCaT sejtekben?
4. Kimutatható-e PARP aktiváció oxidatív kezelést követően HaCaT sejtekben?
5. Hozzájárul-e az intracelluláris Ca²⁺koncentráció megnövekedése az oxidatív stressz által kiváltott citotoxicitáshoz?
6. Befolyásolja-e a sejtdenzitás a HaCaT keratinociták oxidatív stressz iránti érzékenységet?
7. A PARG gátló gallotannin hatásának vizsgálata oxidatív stressznek kitett HaCaT sejteken.

Módszerek

PARP aktiváció kimutatása sejtes rendszerben és szövetben

A PARP aktivitás detektálását elvégeztük 1) enzimcitokémiai és enzimhisztokémiai módszerrel, biotinilált NAD^+ szubsztrát felhasználásával. A detektálást peroxidázzal/fluoreszcens festékekkel konjugált streptavidinnel végeztük. 2) poli(ADP-ribóz) immuncitokémiai módszerrel, amikor az enzim végtermékét mutattuk ki monoklonális anti-poli(ADP-ribóz) antitest felhasználásával. Az immunreakciót lóban termelt biotinilált anti egér-IgG másodlagos ellenanyaggal (Vector Laboratories, Burlingam, CA, USA) és avidin-biotin peroxidáz komplex-szel (ABC) (Vector Laboratories, Burlingam, CA, USA) mutattuk ki. A színreakciót Ni-DAB szubsztráttal végeztük.

Citotoxicitás, sejtes PARP aktivitás és kaspáz aktivitás meghatározása

A citotoxicitás meghatározását 1) kolorimetriás MTT teszttel, 2) kereskedelmi forgalomban kapható LDH kittel (Roche, Basel, Svájc), és 3) propidium-jodid felvétellel végeztük. A PARP aktivitás mérését sejtes ELISA módszerrel, biotinilált NAD^+ szubsztrát felhasználásával, a polimer láncba beépült ADP-ribóz kvantitatív meghatározásával végeztük. A kaspáz aktivitást a kereskedelmi forgalomban kapható kittel (Calbiochem, San Diego, CA) mértük, a gyártó utasításait követve. Az áramlási citometriás meghatározás során PhiPhiLux fluorogén peptidszubsztrátot használtunk.

Sejtek NAD^+ koncentrációjának meghatározása

A peroxinitrit, illetve a hidrogén-peroxid kezelést követően a sejteket feltártuk, majd centrifugálás után a felülúszót NAD^+ -reakcióelegyhez (0,1 mM MTT, 0,9 mM fenazin-metaszulfát, 13 U/ml alkohol-dehidrogenáz, 100 mM nikotinamid, 5,7 % etanol 61 mM glicil-glicin pufferben pH=7,4) adtuk. A reakciót spektrofotometriásan detektáltuk.

Statisztikai elemzés

Az egyes ábrákon feltüntetett eredmények négy párhuzamos minta átlagát (\pm SD) reprezentálják. Valamennyi kísérletet legalább 3-4 alkalommal ismételtük. Az adott átlagértékek összehasonlításához Student t-tesztet, ANOVA-t, illetve Turkey post-hoc tesztet használtunk. A statisztikai kiértékelések során a különbségeket $p < 0,05$ esetében tekintettük szignifikánsnak.

Eredmények és megbeszélés

PARP aktiváció kimutatása biotinnal jelölt NAD⁺ felhasználásával

A PARP aktivitás kimutatására leggyakrabban alkalmazott módszerben [³H]-mal jelölt NAD⁺-ot használunk. Az általunk bevezetett, sejtes és szövetes rendszerekben egyaránt alkalmazható módszer alapja szintén a PARP működés eredményeként a polimerláncba beépített ADP-ribóz egységek kimutatása. Eljárásunkhoz nincs szükség radioaktív jelzésre, mert PARP szubsztrátként nem radioaktív izotóppal, hanem biotinnal jelölt NAD⁺-ot használunk. A módszer alkalmas a PARP aktiváció kvalitatív (immunhisztokémia vagy immuncitokémia), és kvantitatív (sejtes ELISA) értékelésére.

Elsőként azt igazoltuk, hogy módszerünkkel a PARP működése során a polimerláncba beépített – jelölt – ADP-ribóz egységeket detektáljuk. Vad típusú és PARP-1 hiányos egerek hasüregéből izolált makrofágokon végeztünk immuncitokémiai vizsgálatot. Hidrogén-peroxid kezelést követően kizárólag a vad típusú makrofág sejtek magjaiban tapasztaltuk a PARP aktivitás fokozódását. A biotinnal jelölt NAD⁺ beépülése specifikus PARP gátlószerekkel, 3-AB-vel és PJ-34-gyel, teljes mértékben gátolható volt, ami azt mutatja, hogy a biotinnal jelölt NAD⁺ polimerláncba történő beépülése valóban a PARP-1 működésének tulajdonítható.

Módszerünk szövetben is alkalmazható a PARP aktivitás kimutatására. Hidrogén-peroxiddal kezelt egerek hátbőréből készített fagyasztott metszeteken végeztünk enzimhisztokémiai vizsgálatokat. A kontrollhoz képest a kezelt állatok esetében jelentős PARP aktivitásfokozódás volt megfigyelhető. PARP inhibitorok, 3-aminobezamid és PJ-34, gátolták a biotinilált-NAD⁺ beépülését.

J774 makrofágokban hidrogén-peroxid kezelést követően a PARP aktivitás mértékét sejtes ELISA módszerrel határoztuk meg. A PARP aktivitás a hidrogén-peroxid koncentrációval arányosan fokozódott. A PARP inhibitor PJ34 az alkalmazott rendszerben kimutatott PARP aktivitást gátolta. A sejtes ELISA-val és a standard ³H-NAD inkorporációs assay-vel kapott mérések eredménye jó korrelációt ($r^2 = 0,92$) mutatott.

A gallotannin citoprotektív hatása az oxidatív stresszben:

Kísérleteink első lépéseként azt vizsgáltuk, hogy a PARP aktiváció módosításával befolyásolható-e az oxidatív tényezők károsító hatása. Ennek érdekében azt vizsgáltuk, hogy a PARP inhibitoroként ismert gallotannin rendelkezik-e a PARP gátlószerekéhez hasonló citoprotektív hatással. Méréseink eredményei (MTT-teszt, LDH felszabadulás, propidium-

jodid felvétel) alátámasztják a gallotannin oxidatív stresszben feltételezett védő szerepét: a gallotannin a hidrogén-peroxiddal/peroxinitrittel kezelt sejtekben szignifikáns módon csökkentette a sejtekből kiáramló laktát-dehidrogenáz mennyiségét, fokozta a sejtmembrán oxidatív stressz elleni védelmét, amit a propidium-jodiddal festődött sejtek számának jelentős mértékű csökkenése jelzett.

A gallotannin hatása a PARP aktivációra

Mint azt korábban igazoltuk, az oxidatív stressz hatására jelentős mértékű PARP aktiváció mutatható ki többek között HaCaT keratinocitákban is. A gallotannin citoprotektív hatásának felismerését követően azt vizsgáltuk, hogy a gallotannin befolyásolja-e a PARP aktivitását. Ismeretes, hogy a sejtek NAD^+ /ATP deplécióját okozó poli-ADP-riboziláció folyamatának gátlása, vagy legalábbis visszaszorítása már számos kórfolyamat esetében kedvező hatású. *In situ* PARP aktivációt kimutató módszerünkkel kapott eredmények szerint mind a hidrogén-peroxid, mind a peroxinitrit által indukált oxidatív stresszt követően, jelentős mértékben fokozott PARP aktiváció teljes mértékben gátolható volt 50 μM gallotanninnal csakúgy, mint a jól ismert PARP inhibitor 3-aminobezamiddal. Elmondható tehát, hogy a PARP aktivitás gallotanninnal történő blokkolása által a PARP aktivitás valóban, a specifikus PARP inhibitorokkal összevethető mértékben gátolható.

A gallotannin hatása a HaCaT sejtek poli(ADP-ribóz) tartalmára

Immuncitokémiai vizsgálataink szerint a hidrogén-peroxid és a peroxinitrit kezelés az ADP-ribóz polimer mennyiségének növekedéséhez vezetett. A PARP inhibitor 3-aminobenzamid jelenlétében, várakozásainknak megfelelően nem tapasztaltunk kimutatható mértékű ADP-ribozilációt. Ezzel ellentétben, a gallotannin előkezelés nem csökkentette, hanem kissé fokozta az immuncitokémiával kimutatható poli(ADP-ribóz) mennyiségét. Ez alátámasztja azt a feltételezést, miszerint a gallotannin gátolja a polimerek lebontását, ezzel pedig következetesen a PARP aktív állapotának helyreállítását is. Szem előtt kell azonban tartani hogy a gallotannin rendelkezik bizonyos mértékű antioxidáns hatással, valamint azt hogy közvetlen módon is képes gátolni a PARP-1-et. Nem valószínű azonban, hogy a gallotannin citoprotektív hatása kizárólag az antioxidáns hatásnak és a PARP-1-re gyakorolt közvetlen gátlásnak tulajdonítható. Ezt támasztják alá kísérleti eredményeink is, hiszen a gallotanninnal és peroxinitrittel vagy hidrogén-peroxiddal kezelt sejtekben kimutatott poli(ADP-ribóz) akkumuláció azt bizonyítja, hogy valamennyi reaktív speciesz mindenképpen bejutott a sejtekbe, és ott kezdeti PARP aktivációt okozott. A polimer

akkumuláció bizonyítja továbbá azt is, hogy PARP aktiváció történik gallotannin jelenlétében is.

Az intracelluláris NAD⁺ mennyiségének változása oxidatív stressz során a gallotanninnal kezelt HaCaT sejtekben

A gallotannin - valószínűleg a PARP poli-ADP-ribozilációjának fokozódása révén – gátolta a PARP aktivitását. A PARP enzimaktivitás gátlásának egy további bizonyítéka a csökkent mértékű szubsztrát (NAD⁺) felhasználás. Eredményeink szerint a hidrogén-peroxiddal, illetve peroxinitrittel kezelt sejtek esetében mérhető nagy mértékű NAD⁺ felhasználást a gallotannin előkezelés szignifikáns módon csökkentette.

A peroxinitrit hatása az intracelluláris Ca²⁺-koncentrációra

Kísérleteink első lépésében azt vizsgáltuk, hogy a peroxinitrit okoz-e változást a HaCaT sejtek intracelluláris Ca²⁺-koncentrációjában. A kapott eredmények szerint [Dr. Gönczi Mónika és Dr. Csernoch László, (DEOEC Élettani Intézet) mérései] a peroxinitrit kezelés hatására az intracelluláris Ca²⁺-koncentráció jelentős mértékben megnőtt. A citoplazmába áramló Ca²⁺ ionok elsődleges forrása elsősorban az extracelluláris Ca²⁺, az intracelluláris raktárakból felszabaduló Ca²⁺ mennyisége csak kisebb mértékben járul hozzá a mért Ca²⁺-koncentráció növekedéséhez.

A kalcium jel szerepe az oxidatív stressz citotoxikus hatásában

Korábbi munkánk során igazoltuk a peroxinitrit HaCaT sejtekre gyakorolt citotoxikus hatását. A továbbiakban azt vizsgáltuk, hogy a peroxinitrit által kiváltott Ca²⁺-mobilizáció hozzájárul-e az oxidáns citotoxikus hatásához. Az MTT viabilitási assay eredményei alapján kitűnik, hogy a peroxinitrit dóziszfüggő citotoxicitást okoz. Ezt a hatást szignifikáns mértékben csökkentette a membránpermeabilis kalciumkelátorral (BAPTA-AM, 2,5 μM) történő előkezelés. A citotoxicitási vizsgálatok eredményei alapján joggal feltételezhető, hogy az intracelluláris Ca²⁺-koncentráció növekedése hozzájárul a peroxinitrit által stimulált citotoxicitáshoz.

Az előbbi tapasztalatok után azt vizsgáltuk, hogy a fenti eredmények általánosíthatóak-e az oxidatív stressz-ágensek esetében is. Hidrogén-peroxid esetében is jelentős mértékű az oxidatív stresszel szembeni védelem a BAPTA-AM-mel kezelt sejtekben. Ezzel ellentétben, a szuperoxid-anion kezelést (xantin/xantin-oxidáz) követően lényegében nem volt kimutatható különbség a BAPTA-AM-mel előkezelt, illetve előkezelést nem kapott

sejtek között. Ez arra utal, hogy a különböző ROI/RNI ágensek eltérő citotoxicitási útvonalakat indítanak el.

Összefüggés a sejtdenzitás és az oxidatív stresszel szemben mutatott érzékenység között

Amint a HaCaT sejtek elérik a teljes konfluencia állapotát, differenciálódásnak indulnak. Ennek során számos sejtfunkciójuk módosul, és több tulajdonságuk is megváltozik. Megvizsgáltuk, hogy van-e kimutatható különbség a még szubkonfluens, proliferálódó és a már posztkonfluens, differenciálódó sejtek oxidatív stresszel szemben mutatott érzékenységében. Azt találtuk, hogy a szubkonfluens sejtkultúrák (20-80 % sejtdenzitás) közel azonos módon reagáltak a peroxinitrit, a hidrogén-peroxid vagy a szuperoxid-anion által indukált oxidatív stresszre, míg a konfluens sejtek (100 % sejtdenzitás) jelentős ellenállóképességet mutattak. Feltételezésünk szerint a szubkonfluens (proliferálódó) és a konfluens (differenciálódó) keratinociták oxidatív stresszel szemben mutatott eltérő érzékenységének hátterében a metabolizmus különbségei állhatnak.

A Ca^{2+} -mobilizáció és a sejtdenzitás hatása a peroxinitrit által indukált PARP aktivációra

Korábbi munkánkban kimutattuk, hogy a peroxinitrit által kiváltott citotoxicitásban jelentős szerepe van a PARP aktivációnak. Saját megfigyeléseink és más munkacsoportok eredményei is azt mutatták, hogy a PARP aktivációja tehető felelőssé az apoptotikus sejthalál nekrosis irányába történő eltolódásáért. Összhangban számos irodalmi adattal, feltételezésünk szerint a peroxinitrit által indukált Ca^{2+} szignál DNS törésen keresztül PARP aktivációt vált ki. A fokozott PARP aktivitás jelentős ATP felhasználással jár, működése során gyorsan üríti ki a sejtek energiaraktárait. Emellett a nagy koncentrációban jelenlévő kalciumionok ráadásul az ATP termelő folyamatokat is gátolják, felgyorsítva ezzel a sejtek totális energia deplécióját, és végeredményben nekrotikus halálát. További kísérleteinkben ezért azt vizsgáltuk, hogy az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció és a sejtdenzitás milyen módon és mértékben befolyásolja a HaCaT sejtek PARP aktivitását. Az intracelluláris Ca^{2+} -kelátor BAPTA-AM jelentős mértékben gátolta a peroxinitrittel stimulált PARP aktivációt. Peroxinitrit kezelést követően a konfluens sejtkultúrákban a PARP aktiváció mértéke jelentősen kisebb volt a szubkonfluens, illetve BAPTA-AM előkezelést nem kapott kultúrákban tapasztaltnál. Ezek a megfigyelések alátámasztják a Ca^{2+} és denzitás jelentős szerepét az oxidatív stresszel indukált, PARP aktiváción keresztül történő sejthalálban.

A Ca²⁺-mobilizáció és a sejtdenzitás hatása a peroxinitrit által kiváltott kaspáz-3 aktiválódásra

A peroxinitrit citotoxikus hatása részben apoptotikus, részben pedig a nekrotikus jellemzőket mutat. Korábbi kísérletekben kimutatták, hogy különféle sejttípusokban a PARP aktiváció az a tényező, amely a sejthalál folyamatát az apoptózis felől a nekrosis irányába tereli. Ezért megvizsgáltuk, hogy a Ca²⁺-mobilizáció, illetve a sejtdenzitás hogyan befolyásolja a peroxinitrit által indukált kaspáz aktiválódást, ami az apoptotikus sejthalál egyik jellemző paramétere. Eredményeink szerint a peroxinitrit által kiváltott kaspáz aktiválódást a BAPTA-AM szignifikáns mértékben csökkentette. A peroxinitrit kezelést követően a konfluens sejtek kaspáz aktivitása is jelentősen kisebb volt, mint a szubkonfluens sejtekben. Mivel a kaspáz aktivációhoz nem szükséges a kalciumion jelenléte, joggal feltételezhetjük, hogy a peroxinitrit által kiváltott apoptotikus sejthalál folyamatában az intracelluláris Ca²⁺ koncentráció növekedésének a kaspáz aktivációt megelőző lépésben lehet meghatározó szerepe.

Következtetések

1. A biotinnal jelölt NAD^+ alkalmas a PARP aktiváció kimutatására oxidatív stressznek kitett sejteken és szöveteken.
2. A gallotannin védelmet nyújt a peroxinitrit és hidrogénperoxid által kiváltott oxidatív stressz ellen.
3. A gallotannin hatására fokozott poli(ADP-ribóz) akkumuláció és csökkent PARP enzimaktivitás figyelhető meg.
4. A gallotannin citoprotektív hatása részben a PARG gátlásán keresztül történő PARP gátlásnak tulajdonítható.
5. A gallotannin és egyéb PARG inhibitorok gyógyászati alkalmazásával a már bizonyítottan jótékony hatású PARP inhibitorokhoz hasonló, kedvező eredményekre számíthatunk oxidatív stresszel jellemzett betegségekben.
6. Peroxinitrit hatására megnő az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció HaCaT sejtekben.
7. Az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció növekedése szerepet játszik a peroxinitrit által indukált citotoxicitásban.
8. A sejtdenzitás alapvetően befolyásolja a HaCaT sejtek oxidatív stresszérzékenységét.

Közlemények

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Bakondi E**, Bai P, Szabó É, Hunyadi J, Gergely P, Szabó C, Virág L: Detection of poly(ADP-ribose) polymerase activation in oxidatively stressed cells and tissues by using biotinylated NAD substrate. *J. Histochem. Cytochem.* 50(1):91-98, 2002
IF.: 2,718
2. **Bakondi E**, Gönczi M, Szabó É, Bai P, Gergely P, Kovács L, Hunyadi J, Szabó C, Csernoch L, Virág L: Intracellular calcium and cell density-dependent signalling regulate oxidative stress sensitivity of HaCaT keratinocytes. *J. Invest. Dermatol. (in press)*
IF.: 4,645
3. **Bakondi E**, Bai P, Szabó É, Gergely P, Hunyadi J, Szabó C, Virág L: Cytoprotective effect of gallotannin in oxidatively stressed HaCaT keratinocytes: the role of poly(ADP-ribose) metabolism. *Experimental Dermatology (in press)*
IF.: 2,234

Egyéb közlemények

4. Virág L, Szabó É, **Bakondi E**, Bai P, Gergely P, Hunyadi J, Szabó C: The nitric oxide – peroxynitrite - poly(ADP-ribose) polymerase pathway in the skin. *Experimental Dermatology* 11(3):189-202, 2002
IF.: 2,234
5. Bai P, **Bakondi E**, Szabó É, Gergely P, Szabó C, Virág L: Partial protection by poly(ADP-ribose)polymerase inhibitors from nitroxyl-induced cytotoxicity in thymocytes. *Free Rad. Biol. Med.* 15;31(12):1616-1623, 2001
IF.: 5,082
6. Szabó E, Virág L, **Bakondi E**, Gyüre L, Haskó G, Bai P, Hunyadi J, Gergely P, Szabó C: Peroxynitrite-induced poly(ADP-ribose) polymerase activation in keratinocytes: implications for contact hypersensitivity. *J. Invest. Dermatol.* 117(1):74-80, 2001
IF.: 4,645