

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

**A POLI(ADP-RIBÓZ) POLIMERÁZ-1 ÉS A POLI(ADP-RIBÓZ)
GLIKOHIDROLÁZ SZEREPÉNEK VIZSGÁLATA A SEJTHALÁL ÉS A
GYULLADÁSOS MEDIÁTOROK EXPRESSZIÓJÁNAK
SZABÁLYOZÁSÁSBAN**

Erdélyi Katalin

Témavezető: Dr. Virág László



DEBRECENI EGYETEM
Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

Debrecen, 2009

Témavezető

Prof. Dr. Virág László, az MTA doktora

Doktori Iskola:

Molekuláris Orvostudomány

Doktori Program:

Jelátviteli folyamatok sejt- és molekuláris biológiája

A szigorlati bizottság tagjai:

A bizottság elnöke:

Prof. Dr. Csernoch László, az MTA doktora

Bizottsági tagok:

Dr. Bíró Tamás, Ph.D.

Dr. Geiszt Miklós, Ph.D.

A védési bizottság tagjai:

A bizottság elnöke:

Prof. Dr. Csernoch László, az MTA doktora

Bizottsági tagok:

Dr. Bácsi Attila, Ph.D.

Ifj. Dr. Gallyas Ferenc, az MTA doktora

A védés helye és ideje:

Debreceni Egyetem OEC, Orvos- és Egészségtudományi Centrum,
I. Belgyógyászati Klinika tanterme
2010. január 11. 13 óra

1. BEVEZETÉS

1.1. Poli(ADP-ribóz) metabolizmus

A poli(ADP-ribozil)áció egy dinamikus poszttranszlációs módosítás, melynek szerepet tulajdonítanak olyan biológiai folyamatokban, mint a genomi integritás fenntartása, replikáció-, génexpresszió-, kromatinszerkezet- és differenciáció szabályozása valamint sejthalál. A jelenség emlős sejtekben, növényekben és alacsonyabbrendű eukariótákban egyaránt megfigyelhető, hiányzik azonban az élesztőkben és a terminálisan differenciódott granulocitákban.

A fehérjemódosítást a poli(ADP-ribóz) polimeráz (PARP) enzimesalád tagjai katalizálják. A család legjobban tanulmányozott tagja a PARP-1. Ez a 116 kDa méretű enzim az egyik legnagyobb mennyiségben előforduló sejtmagi fehérje. A PARP-1 főleg egy- vagy kétszálú DNS törés hatására aktiválódik, homodimereket alkot, és a DNS-törésekhez kapcsolódik. Az aktivált PARP-1 a NAD⁺-ot nikotinamidra és ADP-ribózra hasítja, majd az ADP-ribóz részt a megfelelő akceptor fehérjék glutamát vagy aszpartát oldalláncához csatolja és elágazó, néhány ADP-ribóz egységtől akár 200 egységnyi hosszúságú polimereket szintetizál.

Eddig több mint 30 PARP-1 szubsztrátot azonosítottak: hisztonok, DNS ligáz, DNS polimeráz, DNS topoizomeráz, DNS-dependens protein kináz, transzkripciósi faktorok, DNS hibajavító fehérjék. Érdekes módon a poli-ADP-ribóziláció legjelentősebb akceptora a PARP-1 maga. Ilyenkor a polimerek a fehérje automodifikációs doménjára kerülnek, melynek következtében a PARP-1 inaktiválódik és leválik a DNS-ről.

A poli(ADP-ribóz) polimerek élettideje nagyon rövid. Lebontásukat a poli(ADP-ribóz) glikohidroláz (PARG), az ADP-ribozil hidroláz (ARH3) és az ADP-ribozil protein liáz enzimek végzik.

1.2. A PARG általános szerepe

Bár Miwa és Sugimura már 1971-ben leírták a PARG-ot, még jelenleg is kevés ismerettel rendelkezünk sejtekben betöltött pontos funkciójáról. A 2000-es évek elejéig több *in vitro* rendszerben is azt találták, hogy a tanninok (gallotannin, ellagitannin) potenciális gátlószerei lehetnek a PARG-nak. A tanninvegyületek természetben előforduló, vízzoldékony polifenolok. Szerkezetük alapján két fő csoportra oszthatjuk őket: kondenzált és hidrolizálható tanninokra. A legegyszerűbb hidrolizálható tanninok a gallotanninok, melyek a galluszsavnak glükózzal

észtrifikált vegyületei. Ezek a feltételezett PARP gátlószerke két, PARP-1-mediált citotoxikus rendszerben is védelmet nyújtottak: N-metil-D-aszpartát (NMDA)-val stimulált idegsejtekben illetve oxidatív károsodást szenvedett HaCaT keratinocitákban. Utóbbi esetben a poli(ADP-ribóz) polimerek felhalmozódásáról is beszámoltak.

A gallotannin és a többi tanninvegyület számos jótékony - gyulladáscsökkentő, antivirális - hatását már régóta ismerjük. A gyulladáscsökkentő hatás háttérében a tanninok gyökfogy tulajdonsága állhat, emellett megfigyelték, hogy bizonyos gyulladási mediátorok - citokinek, indukálható nitrogén-monoxid szintáz (iNOS) ciklooxygenáz-2 (COX-2) szintézisét is gátolják. Ezeket a megfigyeléseket elsősorban mononukleáris sejtekben illetve makrofágokban vizsgálták, nincs irodalmi adatunk epitél-, endotélsejtekre vonatkozó hatásokról.

1.3. A poli-ADP-riboziláció sokrétű biológiai szerepe

1.3.1. A PARP-1 és PARP szerepe a DNS hibajavításban

Számos tanulmány támasztja alá, hogy osztódó sejteket ért kismértékű DNS károsodás esetén a poli-ADP-riboziláció jelentős mértékben hozzájárul a sejtek túléléséhez. A PARP-1-et emiatt túlélési faktornak tekintik ezekben a modellekben.

Endogén reaktív oxigéngyökök, oxidatív ágensek, ionizáló sugárzás egy- illetve kétszálú DNS törést okoznak. Ugyanilyen törések keletkeznek DNS hibajavítás, rekombináció illetve replikáció során is. Bázis kivágásos hibajavítás során a DNS glikozidáz és endonukleázok a sérülés helyén átmenetileg szintén egyszálú DNS törést okoznak.

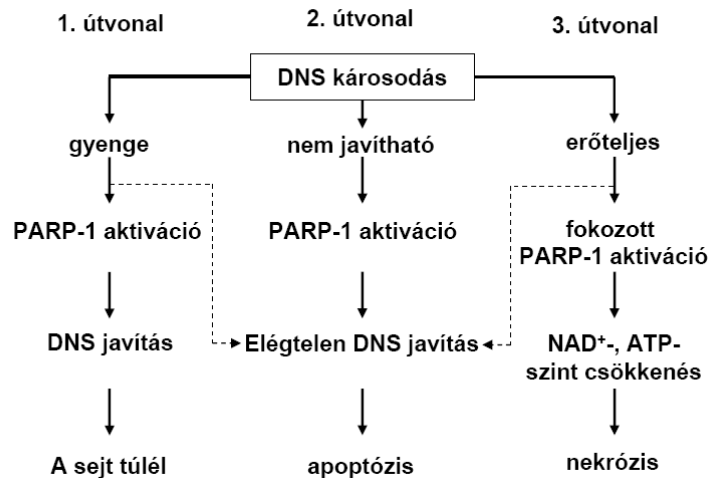
DNS törés hatására PARP-1 aktiváció történik és a sérülés helyén a hisztonok poli-ADP-ribozilálódása a kromatinszerkezet átmeneti fellazulását eredményezi, így a DNS könnyebben hozzáférhetővé válik a hibajavító enzimek számára. Az egyszálú hibajavítás egyik kulcsfehérjeje az XRCC-1 szintén szubsztrátja a PARP-1-nek. Ez a fehérje, bár enzimaktivitással nem rendelkezik, felületén kihorgonyozási lehetőséget biztosít a DNS ligáz illetve a DNS polimeráz számára, melyek végül elvégzik a hibajavítást. Megfigyelések szerint a PARP-1 fehérje hiánya illetve enzimaktivitás gátlása a DNS hibajavítási folyamatokat jelentős mértékben lassítja.

A PARP enzim hibajavítási folyamatokban betöltött szerepének tisztázása még jelenleg is zajlik. Bebizonyították, hogy a PARP kölcsönhat az XRCC-1-gyel és megfigyelték, hogy γ -sugárzással illetve alkiláló ágensekkel szemben a PARP hiányos egerek érzékenyebbek.

1.3.2. PARP-1 szerepe a sejthalálban

A sejtek elhalásának több típusát különböztetjük meg: alapvetően morfológiai jellemzők alapján beszélünk apoptózisról, nekrozisról és autofágiáról. A nekrotikus sejthalálra jellemző a sejttérfogat növekedése, a plazmamembrán integritásának megszűnése és a sejttartalom kiszabadulása. Ez a „szivárgás” gyulladós folyamatot indukálhat a sejt környezetében. Ezzel szemben az apoptózisra a kompakt sejtmorfológia, a kromatin kondenzációja, a sejtmembrán épségének megőrzése, illetve az apoptotikus sejtek fagocitózissal történő gyors eltávolítása jellemző. Az autofágiát autofagoszómák kialakulása jellemzi, melyek túlzott felhalmozódása egy alternatív programozott sejthalálhoz vezet. Szemben a nekrozissal, az apoptózis egy energiaigényes folyamat melynek klasszikus mediátorai a kaspázok (cysteine-**asp**artic acid proteases), melyek specifikus proteáz aktivitásuk révén inaktíválnak meghatározott sejtes folyamatokat. Ennek egyik példája a PARP-1 kaspáz-3 és kaspáz-7 által történő hasítása az apoptotikus folyamat kezdeti fázisában. Az ily módon inaktíválódott PARP-1 a későbbiekben, a DNS DNázokkal történő feldarabolódása során, nem fog hiábavaló hibajavítási folyamatokat „indítványozni”, így nem fog energiát fogyasztani és az amúgy ATP-függő apoptotikus folyamatok rendben lezajlanak.

A PARP aktivációt a DNS károsító szerek citotoxikus hatásával először Berger és munkatársai hozták összefüggésbe. Eszerint, fokozott mértékű DNS károsodás túlzott PARP aktivációt eredményez, melynek következtében a sejt NAD^+ -készlete a polimer szintézis miatt nagymértékben lecsökken. A NAD^+ újrászintézise energiaigényes folyamat, következésképpen a sejt ATP készlete is lecsökken. Az ATP hiánya gátolja a glikolízis kezdeti lépéseit, a NAD^+ hiánya pedig a mitokondriális elektrontranszportláncot állítja le, ami a mitokondriális membránpotenciál összeomlásához vezet. A fenti folyamatok eredményeképpen sejt-diszfunkció, majd sejtpusztulás következik be. Ezt a jelenséget már számos betegség patomechanizmusában leírták: neurodegeneratív betegségek, kardiovaszkuláris diszfunkció, gyulladás különböző formái. A PARP-1 farmakológiai gátlása vagy genetikai hiánya markáns védelmet nyújtott ebben a sejt-„öngyilkossági” modellben, emellett megfigyelték a sejtek apoptózisra való nagyobb hajlamát is (1. ábra).



1. ábra A DNS károsodás mértéke meghatározza a sejt további sorsát: túlélés, apoptózis vagy nekrosis. Gyenge mértékű DNS károsodás esetén a poli-ADP-riboziláció segíti a DNS hibajavítást és a sejt túlél (1. útvonál). Ha azonban nem tud megbirkózni a hibákkal a sejt beindítja apoptotikus-sejthalál programját (2. útvonál). Nagymértékű DNS károsodás esetén fokozott PARP-aktiváció, következésképpen fokozott NAD^+ - és ATP-fogyás következik be, ami a sejthalál nekrotikus formájához vezet (3. útvonál). A PARP-1 farmakológiai gátlása vagy genetikai hiánya apoptotikus irányba tereli a folyamatokat (szaggatott nyíl) mivel az elégtelen DNS-hibajavítás (1. útvonál) vagy túlzott PARP-1 aktiváció elmaradása megőrzi a sejt energiakészletét az apoptotikus folyamatok számára (3. útvonál) (Virág és Szabó, 2002).

Az apoptózis kaszpázoktól független útvonálában kitüntetett szerepe van a mitokondriumnak. Nemrégiben tisztázták az AIF (apoptosis-inducing factor) szerepét: nyugalmi állapotban az AIF a mitokondium külső és belső membránja között helyezkedik el és feltehetően oxidoreduktáz funkcióval bír. Bizonyos körülmények között azonban, az AIF a mitokondiumból kiszabadul, a sejtmagba transzlokálódik és részt vesz a DNS fragmentálódásában (önmagában nem képes nukleázként viselkedni, ezt a hatást endonukleázok sejtmagba történő „toborzásával” illetve azokkal való kölcsönhatása révén képes kifejteni). Néhány évvel ezelőtt megfigyelték, hogy PARP-1 deficiens egerekből származó primer fibroblasztokban DNS károsító N-metil-N-nitro-N-nitrozoguanidin (MNNG) kezelést követően - melyről ismert, hogy PARP-1 aktiváló hatású - az AIF sejtmagba történő transzlokációja elmarad. Valina és Ted Dawson munkacsoportja szerint a poli(ADP-ribóz) polimerek fontos szerepet játszanak az AIF által szabályozott apoptotikus folyamatban.

1.3.3. A PARP-1 szerepe a transzkripció szabályozásában és a gyulladásban

A PARP-1 fehérje kölcsönhatását, illetve szabályozó szerepét már számos transzkripciós faktoral kapcsolatban tisztázták: AP-2, YY1, Oct-1, TEF-1, B-MYB stb. Számos közlemény foglalkozik a PARP-1 két - a gyulladásos mediátorok expressziójában kulcsszerepet játszó - transzkripciós faktor: az NF- κ B és az AP-1 kölcsönhatásával. Az NF- κ B esetében ennek a kölcsönhatásnak egyik legnyilvánvalóbb bizonyítéka, hogy a PARP-1 hiányos egerekben az NF- κ B-dependens gyulladásos mediátorok expressziója elmarad.

Citokinek

A citokinek olyan gyulladásos mediátorok melyeket elsősorban endotél-, epithelsejtek valamint makrofágok termelnek és a sejtek közötti kommunikációban játszanak fontos szerepet. Alapvetően fehérjeszerkezetűek, sejt felszíni receptorokon keresztül fejtik ki hatásukat és elsősorban NF- κ B, valamint AP-1 aktiváción keresztül fokozzák vagy gátolják további citokinek, kemokinek, illetve azok receptorainak expresszióját. A tüdő lokális gyulladásos folyamatainak szabályozásában jelentős szerepet játszik két kulcsfontosságú citokin: a tumor nekrosis faktor-alfa (TNF α) és az interleukin-1béta (IL-1 β).

Kemokinek

A kemokinek 8-12 kDa méretű, bázikus fehérjék melyek legfontosabb feladata a fehérvérsejtek migrációjának szabályozása. Közel 50 kemokint és 19 kemokinreceptort ismerünk. A gyulladásos kemokinek feladata, hogy a monocitákat, leukocitákat és neutrofileket az érpályákból a szövetek felé irányítsák és gyulladás során azok elvándorlását megakadályozzák.

A PARP-1 szerepe a gyulladásos válaszban

Számos tanulmány bemutatta, hogy PARP gátlók jelenlétében bizonyos kemokinek és citokinek expressziója kisebb mértékű. PARP-1 hiányos egerekből származó fibroblasztokban lipopoliszacharid (LPS) és interferon-gamma (IFN- γ) kezelés hatására az iNOS expressziója elmaradt. A PARP-1 gátlása mindemellett gátolta sejtadhéziós molekulák (ICAM-1, P-szelektin, E-szelektin) expresszióját citokinnal stimulált endotelsejtekben. Kemokinek és adhéziós molekulák csökkent mértékű expressziója okozhatja gyulladásos immunsejtek kisebb mértékű vándorlását, mely végeredményben csökkenti a gyulladásos válasz kialakulását.

de Murcia munkacsoportja figyelte meg elsőként, hogy PARP-1 hiányos állatokban az endotoxin rezisztencia hátterében az NF- κ B csökkent mértékű transzaktivációja szerepelhet. Mindemellett, TNF α kezelés hatására az NF- κ B nukleáris transzlokációja nem mutatott eltérést vad típusú és knock out egyedekben, viszont a transzkripció faktor DNS-hez való kötődése elmaradt a PARP-1 hiányos sejtekben. Így bizonyították először, hogy a PARP-1 szükséges az NF- κ B által szabályozott génextpressziós folyamatokban. Az irodalmi adatok alapján úgy tűnik, hogy a PARP-1 és az NF- κ B közötti interakcióhoz nincs szükség a PARP-1 katalitikus aktivitására, de az NF- κ B-nek a konszenzus szekvenciához kötődéséhez szükséges PARP enzimaktivitás.

A PARP-1 szerepét az AP-1 mediált transzkripcióban is valószínűsítik. Zingarelli és munkatársai megfigyelték, hogy oxidatív stressznek kitett, illetve IL-1-gyel kezelt PARP-1 deficiens fibroblasztokban kisebb mértékű az AP-1 aktiváció. Microarray kísérletekben azt tapasztalták, hogy az AP-1 mediált gyulladási mediátorok és hő sokk-fehérjék expressziója megváltozik PARP-1 deficiens állatokban.

Mindezekből látszik, hogy a PARP-1 és a poli-ADP-riboziláció a gyulladási válasz kialakításában fontos szerepet játszik, mindemellett annak mechanizmusa és mértéke nagyfokú sejt-, szöveti- és stimulus-dependenciát mutat. Emellett nincs irodalmi adat a PARG esetleges szerepéről ezekben a gyulladási modellekben.

2. CÉLKITŰZÉS

Munkánk során az alábbi kérdések megválaszolását tűztük ki célul:

- 2.1 Egy PARP-1 specifikus gátlószer, a PJ34, illetve a PARG inhibitor, gallotannin, hatásának vizsgálata TNF α és IL-1 β indukált citokin és kemokin-expresszió szabályozásában A549 tüdő epitelsejtekben.
- 2.2 A PARP-1 és a PARG szerepének vizsgálata hidrogén-peroxid által kiváltott sejthalálban A549 sejtekben.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Sejtvonalak és kezelések

A kísérleteket A549, humán II-es típusú tüdő epitelsejteken végeztük. A PJ34-et (a PARP-1 specifikus gátlószerét) 10 μ M-os míg a gallotannint (GT) 30 μ M-os végkoncentrációban alkalmaztuk; az előkezelések minden esetben fél óráig tartottak. A citokin stimulációt 20 ng/ml TNF α -val illetve 5 ng/ml IL-1 β -val hajtottuk végre. A kezelések alatt, illetve előtt a sejteket 12 órán át FBS-mentes tápoldatban tartottuk. A lentivírusok előállítására HEK293T sejteket használtunk. A mezenchimális őssejteket köldökzsinórból izoláltuk és 10% FBS-t tartalmazó DMEM tápoldatban tenyésztettük, a donor megfelelő tájékoztatása után (DE OEC Etikai Bizottság, 2754-2008 engedélyeztetési szám).

3.2. Lentivírusok termelése és az A549 sejtek fertőzése

shRNS-mediált stabil géncsendesítéshez a Sigma által forgalmazott lentivírus alapú rendszert választottuk. Az öt különböző, PARP-1 illetve PARG specifikus short-hairpin RNS-t, (shRNS) pLKO.1-puro lentivírusba klónoztuk, illetve baktériumsejtekbe transzformálva szereztük be. A baktériumsejteket felszaporítottuk majd plazmidot tisztítottunk belőlük a gyártó utasítása szerint. Ezeket a plazmidokat először tranziens módon PEI reagens segítségével HEK293T sejtekbe transzfektáltuk majd a csendesítés hatékonyságát PCR, illetve Western blot technikával ellenőriztük. A kapott eredmények alapján a PARP-1 és a PARG csendesítést legjobban kialakító szekvenciákat kiválasztottuk és csomagoló plazmidokkal kotranszfektáltuk HEK293T sejtekbe. 48 óra múlva a sejtek felülúszóját begyűjtöttük majd 45 μ m-es nitrocellulóz szűrőn átszűrtük. A vírustiter meghatározásához A549 sejteket használtunk. A fertőzést követően 48 órával a sejteket puromicinnel szelektáltuk majd hét nappal később a sejteket fixáltuk, hemotoxilinnal megfestettük végül a telepek megszámláltuk. A kapott telepszám, a hígítás valamint a kiindulási sejtszámok alapján meghatároztuk a vírustitert. PARP-1 és PARG gének stabil géncsendesítésének kialakításához 10 MOI-val fertőztük a sejteket, 24 órán keresztül, majd 5 μ g/ml puromicin jelenlétében szelektáltunk. A kontroll sejtvonal esetében üres, gátló szekvenciát nem tartalmazó plazmidot használtunk.

3.3. Macroarray

A TNF α /IL-1 β indukált kemokin és citokin génexpressziós változást nylon membrán alapú tematikus makroarray (Superarray) segítségével vizsgáltuk. A 4 órás kezelést követően a sejtekből RNS-t izoláltunk SV Total RNA Isolation Sytem (Promega) kit segítségével, a gyártó utasítása szerint. Az RNS tisztaságát és koncentrációját fotometriásan határoztuk meg. A cDNS próba szintéziséhez a makroarray kit GEPrimer mixét és reverz transzkriptázát használtuk. A PCR-ral történő cDNS amplifikáció után a próbákat a membránhoz hibridizáltuk. Az egyes gének relatív expressziós változását az β -aktin és GAPDH intenzitásához normáltuk, az egyes csoportokat pedig a kezeletlen kontrollhoz hasonlítottuk.

3.4. RNS izolálás és RT-PCR

A totál RNS izolálást a továbbiakban TRIZOL reagenssel végeztük. Az RNS koncentrációját és tisztaságát fotometriásan határoztuk meg, majd 2 μ g totál RNS-t reverz transzkripcióval cDNS-be írtunk 37°C-on egy órán keresztül. A kemokin és citokin valamint a PARP-1 és PARG mRNS vizsgálatához a cDNS-eket PCR reakcióval amplifikáltuk. A PCR termékeket mérettől függően 1-2% agaróz gélen választottuk el, majd etídium-bromid festést alkalmazva, UV fényben detektáltuk azokat. A PCR reakciókhoz használt primereket a UniGene adatbázisa alapján terveztük.

3.5. Valós idejű mRNS analízis

A kvantitatív PCR-t ABI PRISM 7500 detektáló rendszerrel végeztük (Applied Biosystems). A SYBR Green Master Mix reagenst az Applied Biosystem-től szereztük be és az általuk javasolt protokollt követtük. Az mRNS relatív mennyiségét a $2^{-\Delta\Delta C_t}$ módszer segítségével határoztuk meg, belső kontrollként β -aktint használva.

3.6. Sejtmag kivonat preparálása EMSA analízishez

A sejteket a kezelést követően PBS-sel mostuk, majd felkapartuk és centrifugálással összegyűjtöttük. A sejteket hipotóniás „A” pufferben (10 mM HEPES pH 7.9, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF, proteáz gátlószerek) szuszpendáltuk majd jégen állni hagytuk 15 percen keresztül. 0.5% Nonidet P-40 (NP-40) hozzáadását követően

rövid ideig erőteljesen vortexeltük majd centrifugáltuk. A csapadékot -mely tartalmazta a sejtmagokat - hipertóniás „B” pufferben (20 mM HEPES pH 7.9, 420 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 1mM DTT, 0.5 mM PMSF, proteáz gátlók) inkubáltuk tovább, jégen, időnkénti vortexeléssel. A sejtmag extraktumot ezek után centrifugálással a felülúszóból nyertük ki. A fehérjék koncentrációját Coomassie Plus Protein Assay (Pierce Biotechnologie) reagens segítségével határoztuk meg.

3.7. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

Az oligonukleotid próbákat kit segítségével jelöltük (Biotin 3'End DNA labeling kit; Pierce Biotechnologie Inc.) majd hibridizáltuk. A gél-shift elvégzését LightShift Chemiluminescent EMSA kit (Pierce Biotechnologie Inc.) segítségével hajtottuk végre, követve a gyártó utasításait. A sejtmag kivonat-nukleinsav komplexet nem-denaturáló gélben futtattuk 1 órán keresztül, 100V feszültséget alkalmazva. A gélt ezután Bio Bond-Plus nylon membránra transzferáltuk majd UV-keresztköttővel rögzítettük a DNS-t. A membrán üres kötőhelyeit blokkoltuk, majd streptavidin peroxidázzal inkubáltuk. A detektálást, intenzív mosást követően, kemiluminiscens szubsztráttal végeztük.

3.8. Western blot vizsgálat

A poli(ADP-ribóz) polimerek vizsgálatához 8%-os SDS poliakrilamid gélt használtunk. Minden egyéb vizsgálat során 10%-os SDS-poliakrilamid gélt alkalmaztunk. Mintánként 20 µg fehérjét vittünk géltre. Az elválasztást követően a gélt nitrocellulóz membránra blottoltuk, majd annak nemkötő helyeit 5%-os sovány tejpor oldattal blokkoltuk. Az elsődleges antitesteket 1%-os sovány tejporos TBSTw oldatban, egy éjszakán keresztül, 1000-szeres hígításban alkalmaztuk. Másnap, intenzív mosást követően a membránt peroxidázzal konjugált anti-egér-IgG vagy anitnyúl-IgG antitesttel inkubáltuk 5000-szeres hígításban egy órán keresztül. Mosást követően, kemiluminiscens szubsztrátot alkalmazva a jeleket fényérzékeny filmmel detektáltuk.

3.9. Immunofluoreszcens festés

Az NF-κB sejtmagi lokalizációját NF-κB p65 elleni antitesttel vizsgáltuk. A poli(ADP-ribóz) polimerek detektálásához monoklonális anti-poli(ADP-ribóz) ellenanyagot használtunk. A sejteket üveg fedőlemezen növesztettük, kezelést követően PBS-sel mostuk majd felszálló

alkoholsorral fixáltuk. A sejteket ezután PBS-sel rehidráltuk, majd lószérumot tartalmazó PBS-TritonX (PBSTx) oldattal egy órán át szobahőmérsékleten blokkoltuk. Az első antitestet blokkoló oldatban hígítottuk, egy éjszakán keresztül 4°C-on inkubáltuk. Mosást követően biotinnal konjugált anti-egér-, illetve anti-nyúl IgG ellenanyagot használtunk, blokkoló oldatban hígítva. A biotint egy harmadik lépésben, mosást követően, streptavidin-Alexa488-al (Molecular Probes) detektáltuk. A fedőlemezeket anti-fade médiummal rögzítettük tárgylemezre és kamerával felszerelt fluoszcens mikroszkóppal (Zeiss Axiolab) vizsgáltuk.

3.10. A poli(ADP-ribóz) polimerek immuncitokémiai vizsgálata

A gátló RNS-sel fertőzött A549 sejtek funkció-kiesését hidrogén-peroxid kezelést követő poli(ADP-ribóz) polimer detektálással vizsgáltuk. Kezelést követően a fedőlemezre növesztett sejteket PBS-el mostuk, majd metanollal 10 percig fixáltuk. A sejtek endogén peroxidáz aktivitását hidrogén-peroxid - metanolos kezeléssel elimináltuk. Mosást követően a sejteket 1% BSA-t tartalmazó PBSTx-el blokkoltuk, majd polimer ellenes antitesttel inkubáltuk. Második ellenanyagként anti-egér-biotin ellenanyagot használtunk, blokkoló oldatban hígítva. Mosást követően az antitesteket ABC detektáló rendszerrel (Vector Laboratories), 3,3'-diaminobenzidén (DAB) szubsztráttal detektáltuk. A fedőlemezeket Mowiol-lal rögzítettük tárgylemezre, majd kamerával felszerelt fénymikroszkóppal vizsgáltuk.

3.11. Foszfataz aktivitás mérése

A protein foszfataz 1 (PP1) és 2A (PP2A) katalitikus alegységeit nyúl-vázizomból preparáltuk. A foszfatazokat 5 percig előinkubáltuk különböző koncentrációjú GT-al majd aktivitásukat ³²P-vel jelzett miozin könnyűlánc kináz szubsztrát jelenlétében mértük. A szubsztrátból felszabaduló ³²P_i-t a fehérjék triklór-ecetsavval (TCA) történő kicsapását és centrifugálását követően a felülúszóból folyadékszintillációs számlálóval mértük meg.

3.12. ABTS-assay

Az antioxidáns kapacitás méréséhez ABTS' dekolozációs módszert alkalmaztuk. A 2,2'-azino-bisz-(3-etilbenzotiazolin-6-szulfonsav)-at (ABTS) egy éjszakán át sötétben káliumperszulfáttal gyökké generáltuk. Másnap, a keletkezett intenzív zöld színű terméket Glicin-HCl-dal hígítottuk. 96 lyukú mikrotiter lemezben 140 µl hígított ABTS' oldathoz 10 µl

vizsgálni kívánt anyagot mértünk. Az elszíntelenedés mértéke arányos volt a vizsgált anyag antioxidáns kapacitásával. Referenciának L-aszkorinsavat használtunk. Az oldat abszorbanciáját 405 nm-es hullámhosszon mikroplate olvasóval mértük.

3.13. DHR-assay

Tesztvegyületek peroxinitrit gyökbefogó képességét dihidrorodamin festék (DHR123) oxidációjának követésével mértük fluorimetriásan (ex/em: 485/527) mikroplate lemezen.

3.14. PARP aktivitás mérése

A sejteket 6 lyukú edényben tenyésztettük és 20 perc hidrogén-peroxid kezelést követően a médiumot 0,5 ml aktivitásmérő pufferre cseréltük: 56 mM Hepes pH 7.5, 28 mM KCl, 28 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 0.01% digitonin és 0.125 μM ³H-NAD⁺. 30 perccel később a sejteket begyűjtöttük és jég hideg, 50%-os TCA-val kicsaptuk. A csapadékot 2% SDS, 0.1 M NaOH oldatban egy éjszakán át szolubilizáltuk, a beépült radioaktivitást folyadékszintillációs számlálóval mértük.

3.15. A sejtek életképességének vizsgálata (MTT teszt)

A sejteket 96 lyukú tenyésztőedényben növesztettük. Hidrogén-peroxid kezelést követően a sejtekhez metil-tiazol-tetrazolium (MTT) reagenst adtunk 0,5 mg/ml végkoncentrációban. Egy óra elteltével a médiumot a sejtekről eltávolítottuk, a keletkezett foramzán kristályokat dimetil-szulfoxidban (DMSO) feloldottuk. Az oldat színét fotometriásan mértük 550 nm-es hullámhosszon.

3.16. Intracelluláris NAD⁺ szint meghatározása

A sejteket 6 lyukú tenyésztőedényben növesztettük, hidrogén-peroxid kezelést követően 0,5 M perklórsavval extraháltuk, majd 3 M KOH/125 mM Gly-Gly pufferben (pH 7.4) neutralizáltuk. Centrifugálást követően a felülúszót reakciópufferbe mértük (1 mM 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolium bromid, 0.9 mM fenazine metaszulfát, 13 U/ml alkohol dehidrogenáz, 100 mM nikotinamid és 5.7 % etanol 61 mM Gly-Gly pufferben pH 7.4). A keletkezett szín intenzitását 10 perc elteltével, 560 nm-es hullámhosszon, fotométerrel határoztuk

meg. Az intracelluláris NAD^+ tartalmat standard görbe segítségével állapítottuk meg, annak csökkenését kezeletlen sejtekhez viszonyítva százalékosan fejeztük ki.

3.17. Intracelluláris ATP szint meghatározása

Az intracelluláris ATP koncentrációt luminometriás módszerrel, ApoSENSOR Cell Viability Assay Kit (BioVision) kit segítségével határoztuk meg, követve a gyártó utasítását. Az ATP szint csökkenést a kezeletlen sejtekhez viszonyítottuk és százalékosan fejeztük ki.

3.18. Klonogén-assay

Szuszpenzióban lévő sejteket 1 órán át hidrogén-peroxiddal kezeltük 37°C -on. Mosást követően a sejteket 6 lyukú tenyésztőedénybe szélesztettük növekvő hígítással. Tíz nappal később a sejteket 4%-os formalinnal fixáltuk, majd hemotoxilinnal festettük 10 percig. Mosást követően a tenyésztőedényeket megszáritottuk és a kolóniákat megszámloltuk.

3.19. Propidium-jodid felvétel

Hidrogén-peroxid kezelést követően a sejteket $5\ \mu\text{g/ml}$ propidium joddal inkubáltuk 15 percig. Ezt követően a már úszó és a még letapadt sejteket begyűjtöttük, centrifugáltuk, PBS-el mostuk, majd áramlási citometriával elemeztük.

3.20. Kaszpáz aktivitás meghatározása

Kaspáz-3-szerű aktivitást fluorogén tetrapeptid-amino-4-metil-kumarin szubsztrát segítségével mértük. Hidrogén-peroxid kezelést követően a már úszó és a még letapadt sejteket begyűjtöttük, PBS-sel mostuk, majd lizáltuk őket. A lizátumhoz reakciópuffert mértünk mely tartalmazta a kaszpáz-3 specifikus DEVD-AMC szubsztátot. A reakciót 37°C -on egy órán át folytattuk, majd mértük a kinaszt AMC fluoreszcenciáját (ex/em: 380/460).

3.21. DNS fragmentáció kimutatása

Az internukleoszomális DNS fragmentációt kvantitatív módon, ELISA technikával határoztuk meg kit (Cell Death Detection ELISA Plus; Roche Molecular Biochemicals) segítségével, követve a gyártó utasításait. Kezelést követően a már úszó és a még letapadt sejteket begyűjtöttük, lízis pufferben szuszpendáltuk, majd 30 percig állni hagytuk. A sejtmagok

ülepítése után a citoplazmatikus mononukleoszóma- és oligonukleoszóma-asszociált hiszton-DNS komplexeket ELISA technikával, fotometriásan, ABTS' szubsztráttal (405 nm) detektáltuk.

3.22. Giemsa festés

A sejteket üveg fedőlemezen növesztettük majd a hidrogén-peroxid kezelést követően PBS-el mostuk és 4%-os formalinnal fixáltuk őket. Mosást követően a sejteket May-Grünwald-Giemsa oldattal festettük 10 percig, majd kamerával felszerelt mikroszkóppal vizsgáltuk őket.

3.23. Mitokondriális membránpotenciál mérése

Hidrogén-peroxid kezelést követően a sejteket PBS-el mostuk majd 1 μ M JC-1, mitokondriális membránpotenciál-szenzitív festékkel 30 percen keresztül töltöttük. A sejteket ezután kamerával felszerelt fluoreszcens mikroszkópban vizsgáltuk.

3.24. Comet analízis

DNS egyszálú törése után a sejtek alkalikus közegben, elektroforézist követően jellegzetes „üstökös” képződményt mutatnak. Szuszpenzióban lévő sejteket kezeltünk hidrogén-peroxiddal, majd alacsony olvadáspontú agarózba ágyaztuk őket üveg fedőlemezen. Az agaróz megszilárdulása után a sejteket lízáló oldatba helyeztük. Az elektroforézist követően a sejteket etídium-bromiddal festettük és kamerával felszerelt fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk.

3.25. A549 sejtek frakcionálása Western blot analízishez

Hidrogén-peroxid kezelést követően a már úszó és a még letapadt sejteket begyűjtöttük, PBS-el mostuk, majd 4 térfogategységnyi homogenizáló pufferben (0.5 M szaharóz, 20 mM HEPES, pH 7.5, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA és proteáz gátlók) felvettük őket. A sejtuszuszpenziót Dounce homogenizátorral NP-40 jelenlétében tovább homogenizáltuk. A lizátumot centrifugáltuk, a csapadékban lévő sejtmagokat 3 térfogategységnyi „A” pufferben (0.5 M szaharóz, 10 mM HEPES, pH 7.9, 3.3 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0.5 mM DTT és proteáz gátlók) szuszpendáltuk majd centrifugáltuk. A csapadékot ezután 2,5 térfogat „B” pufferben („A” puffer, kivéve 0.35 M szaharóz) szuszpendáltuk, centrifugáltuk, majd ismételen „B” pufferben felvettük és szonikáltuk. Így nyertük a „nuclear” frakciót. A legelső centrifugálás után kapott felülúszót

tekintettük a „postnuclear” frakciónak. A fehérje koncentrációját BCA módszerrel határoztuk meg, majd, a kapott frakciókat Western blot módszerrel tovább vizsgáltuk.

Statisztikai analízis

A kísérleteket legalább három különböző alkalommal elvégeztük. A kapott eredményeket Student t-tesztnek vetettük alá. A $p < 0.05$ alatti értékeket tekintettük szignifikánsnak.

4. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉSÜK

4.1. A PARP-1 specifikus gátlószer (PJ34), illetve a PARG inhibitor, gallotannin (GT), hatásának vizsgálata TNF α és IL-1 β indukált citokin és kemokin-expresszió szabályozásában A549 tüdő epitelsejtekben

4.1.1. A GT szignifikánsan csökkentette kemokinek és citokinek génexpresszióját immunstimulált A549 sejtekben

A sejteket specifikus PARP-1 gátlószerrel (PJ34) és egy PARG inhibitor vegyülettel gallotanninnal (GT) kezeltük elő, majd nylon-membrán alapú tematikus makroarray segítségével megvizsgáltuk azok hatását TNF α -val és IL-1 β -val stimulált A549 sejtekben. A citokin kezelés hatására 12 gén expressziója legalább kétszeresére nőtt (CXCR4, IL-1 α , IL-1 β , IL-6, MCP-1, MIP-3 α , MIP-1 β , RANTES, MCP-2, ENA-78, GCP-2, Fractalkin) míg két citokin receptor expressziója (CCR4, CCR5) csökkent A549 sejtekben. A GT, egyetlen kemokin gén kivételével (MIP-3 α), a génexpressziós változásokat szignifikáns módon gátolta. PJ34 előkezelés hatására a Fractalkin gén expressziója megemelkedett, azonban a többi gén expressziója nem változott. Eredményeinket RT-PCR technikával is megerősítettük 7 kiválasztott gén esetében, illetve az IL-8 kemokinnal kiegészítve.

4.1.2. A GT és a PJ34 csökkenti az NF- κ B aktivációját, de eltérő módon

Az NF- κ B és az AP-1 kulcsfontosságú transzkripciós faktorok a TNF α /IL-1 β jelátviteli útvonalában és számos kemokin és citokin génexpresszióját szabályozzák. EMSA vizsgálattal megállapítottuk, hogy citokin kezelést követően az NF- κ B hozzákötődik konszenzus szekvenciájához. GT illetve PJ34 előkezelést követően azonban ez a transzaktiváció elmarad. Immuncitokémiai vizsgálatokkal megállapítottuk, hogy az NF- κ B nukleáris transzlokációja zavartalan PJ34 jelenlétében, azonban GT jelenlétében elmarad. Ennek hátterében az állhat, hogy a GT gátolta az NF- κ B inhibitor fehérjének (I κ B) foszforilációját a citoplazmában és ily módon azok nem válnak le a transzkripciós faktorról. Az NF- κ B GT általi gátlása tehát már a citoplazmában megtörténik, az I κ B kinázok gátlásának szintjén vagy még attól is feljebb. PJ34 jelenlétében az NF- κ B DNS-hez való kötődése szintén elmaradt, arra utalva, hogy a PARP aktiváció szükséges a génexpressziós hatás kifejtéséhez.

Mivel azonban PJ34 jelenlétében nem tapasztunk jelentős kemokin-citokin géneexpressziós csökkenést, feltételezzük, hogy az általunk választott modellben az AP-1 jelátviteli útvonala hangsúlyosabb.

4.1.3. A GT fokozta a JNK-cJun útvonalat, gátolta azonban az AP-1 transzaktivációt

Az activator protein-1 (AP-1) transzkripció faktor dimer természetű, stimulus hiányában a monomerjei (c-Jun, c-Fos, FosB, JunB, Fra-1, Fra-2 stb.) a citoplazmában vagy akár a magban is megtalálhatók. TNF α /IL1 β kezelés hatására egy bonyolult foszforilációs kaszkád aktiválódik a sejtekben. Ezek legfontosabb tagjait, a mitogén aktivált protein kinázokat (MAPK), három nagyobb csoportba sorolhatjuk: JNK, p38MAPK és ERK1/2. Ezek a kinázok foszforiláció (MAPKK) révén aktiválódnak és targetjeiket szintén foszforilációval aktiválják. Ezek közé a target-fehérjék közé tartoznak az AP-1 transzkripció faktor monomerjei. A c-Jun a JNK által foszforilálódik, majd ennek következtében konformációs változáson megy keresztül, ami segíti a dimerizációt, majd a DNS-hez való kötődését. A549 sejtekben egy „alap” AP-1 aktivitást detektáltunk EMSA-vizsgálattal. Ez az aktivitás fokozható volt TNF α /IL1- β kezeléssel, amit a PJ34 jelenléte nem befolyásolt, azonban GT jelenlétében megszűnt. Western blot analízissel kimutattuk a JNK és targetjének, a c-Jun-nak időbeni foszforilációját. Érdekes módon a GT önmagában fokozta ezeknek a fehérjéknek a foszforilációját, ami nem volt tovább növelhető citokin kezeléssel. Tudjuk, hogy c-Jun heterodimert alkothat az ATF2-vel is, mely fehérje elsősorban a p38MAPK szubsztrátja. TNF α /IL1- β kezelés hatására megfigyeltük mindkét fehérje időbeni foszforilációját, melyet a GT önmagában is kiváltott és a citokinek jelenlétében tovább nem fokozott. Hasonló eredményt kaptunk az ERK1/2 és annak egyik targetjének, a CREB-nek a foszforilálódását illetően is.

Megállapítható tehát hogy a GT önmagában is fokozza a MAPK jelátvitel egyes kulcsfehérjének foszforilációját, ami citokinek jelenlétében tovább nem fokozódik. A PJ34-nek semmilyen hatása nem volt a foszforilációs folyamatokra illetve az AP-1 aktivációra.

4.1.4. A GT gátolja a protein foszfatázokat

GT jelenlétében tapasztalt fokozott foszforiláció háttérben protein foszfatázok csökkent aktivitását feltételeztük. Ezért tisztított protein foszfatáz 1 (PP1) és protein foszfatáz 2A (PP2A) katalitikus alegységeinek aktivitását mértük radioaktívan jelzett miozin könnyűlánc szubsztát

segítségével GT jelenlétében. A GT koncentrációfüggő módon, jelentős mértékben gátolta a PP1c-t, kisebb mértékben pedig a PP2Ac-t.

Valószínűsítjük tehát, hogy a MAPK kinázok és azok szubsztrátjainak fokozott foszforilációinak háttérben a GT protein foszfatázokat gátló hatása húzódik.

4.1.5. A GT nem befolyásolja a poli-ADP-ribozilációt az általunk választott modellben

Immunitokémiai és Western blot módszerrel vizsgáltuk a citokinek és a GT poli-ADP-ribóz metabolizmusra kifejtett hatását. Megállapítottuk, hogy a citokinek nem fokozzák a poli(ADP-ribóz) polimerek szintézisét illetve, hogy a GT nem okozott polimer-akkumulációt.

Az általunk használt modellben tehát a poli-ADP-ribozilációs metabolizmusnak nem jutott kitüntetett szerep. Megjegyezzük azonban, hogy a rendelkezésünkre álló technikák segítségével csak „markáns” változásokat tudunk kimutatni. A poli-ADP-riboziláció egyedi fehérjék szintjén történő változását nem állt módunkban tanulmányozni, így ennek esetleges szerepét helytelen lenne teljes mértékben elvetni.

4.1.6. A GT erőteljes antioxidáns vegyület

A GT gyulladáscsökkentő szerepét részben magyarázhatja erőteljes antioxidáns tulajdonsága. Tekintve, hogy mindkét általunk vizsgált transzkripció faktor redox-szenzitív, úgy gondoltuk, hogy a GT gyökfogó tulajdonságával is hozzájárulhat a sejtek redox-háztartásának helyreállításához. Megvizsgáltuk mind a PJ34 mind a GT hatását különböző antioxidáns-mérő rendszerekben (ABTS dekolozáció és DHR-oxidáció). A GT mindkét rendszerben erőteljes antioxidánsnak bizonyult, a PJ34-nek szintén volt ilyen hatása azonban csak jóval, a kísérleteinkben alkalmazott koncentráció felett.

4.2. A PARP-1 és a PARG szerepének vizsgálata hidrogén-peroxid által kiváltott sejthalálban A549 sejtekben

4.2.1. Lentivírus alapú géncsendesítési módszerrel létrehoztuk a PARP-1 és PARG stabil deplécióját A549 sejtekben

A549 sejtek lentivirális partikulumokkal való fertőzésével stabil RNS interferenciát valósítottunk meg. A leghatékonyabb, csendesítéshez szükséges szekvenciákat előzetesen tranziens transzfekcióval választottuk ki. A vírustiter meghatározását sejtes rendszerben

végeztük. A kontroll sejtvonalat „üres” lentivírussal fertőztük. A géncsendesítés hatásosságát mRNS szinten hagyományos RT-PCR-ral valamint valós idejű kvantitatív PCR-ral is elvégeztük. A PARP-1 fehérje deplécióját Western blot technikával mutattuk ki. Hozzáférhető antitest hiányában ugyanezt a PARG esetében nem tudtuk elvégezni. Immuncitokémiai módszerrel azonban elvégeztünk egy funkciókiesési vizsgálatot melyben megállapítottuk a PARG fehérje hiányát.

4.2.2. Az shPARG sejtek jelentős késéssel hidrolizálják a poli(ADP-ribóz) polimereket

A sejtvonalak funkcionális jellemzését immuncitokémiai és Western blot vizsgálatokkal is elvégeztük. A sejteket hidrogén-peroxiddal kezeltük majd egy korai és egy későbbi időpontban vizsgáltuk a poli(ADP-ribóz) polimerek jelenlétét, arra specifikus antitesttel. Normál esetben, az oxidáns hatására poli(ADP-ribóz) polimerek keletkeznek, elsősorban a PARP-1 működése következtében. Ezeknek a polimereknek az életideje azonban meglehetősen rövid, lebontásuk kulcsenzime a PARG. Kontroll és normál A549 sejtekben a kezelést követő korai időpontban jelentős mennyiségű polimert detektáltunk a sejtmagban, melyeket a későbbi időpontban már nem láttunk. shPARP-1 sejtekben elmaradt a polimerek szintézise, shPARG sejtekben viszont a polimerek még a későbbi időpontokban is masszívan jelen voltak. Kísérleteink alapján elmondható, hogy mind a PARP-1 mind a PARG gének csendesítése megfelelő, valamint, hogy a kontroll sejtvonal nem mutat eltérést a normál sejtvonalhoz képest.

Emellett radioaktív $^3\text{H-NAD}^+$ beépüléssel megvizsgáltuk az egyes sejtvonalak PARP aktivitását. shPARP-1 sejtekben jelentős aktivitáscsökkenést tapasztaltunk alapállapotban és hidrogén-peroxid kezelést követően is. Ezzel szemben az shPARG sejtek alapaktivitást illetően nem mutattak eltérést, viszont a hidrogén-peroxid kezelés után a PARP aktivitásuk alacsonyabb volt, kontroll sejtekhez viszonyítva. Ennek oka a PARP-1 fokozott auto-modifikált állapota lehet.

4.2.3. Az shPARP-1 és shPARG sejtek rezisztensek a hidrogén-peroxid által kiváltott sejthalállal szemben

A hidrogén-peroxid koncentrációfüggő módon csökkentette a kontroll sejtek életképességét. A hidrogén-peroxid citotoxikus hatásával szemben az shPARP-1 nagyobb, az shPARG sejtek kisebb, de szignifikáns védelmet mutattak. Hasonló mintázatot kaptunk a sejtek intracelluláris NAD^+ illetve ATP szintjeinek mérése során. Kontroll sejtekben a viabilitás

csökkenése kivédhető volt trikarbonsav-ciklus-szubsztrátokkal (piruvát és α -keto-glutarát), utalva arra, hogy a magas hidrogén-peroxid koncentráció következtében a glikolítikus útvonal zavart szenved. Emellett vizsgáltuk a mitokondriális membránpotenciál változását és azt tapasztaltuk, hogy az mindkét géncsendesített sejtvonalban még igen magas hidrogén-peroxid koncentráció mellett is megőrződött.

4.2.4. A PARP-1 és a PARG összehangolt működése szabályozza az apoptózis-nekrózis átmenetet oxidatív ágenssel kiváltott sejthalálban

A sejthalál típusának meghatározása végett először a sejtek plazmamembrán-integritásának változását vizsgáltuk. Hidrogén-peroxid kezelést követően a kontroll sejtek koncentrációfüggő módon egyre nagyobb propidium-jodid felvétellel válaszoltak. Az shPARP-1 sejtek még nagy koncentráció esetén is ép membránnal rendelkeztek, az shPARG sejtek esetében szintén szignifikáns védelmet tapasztaltunk. Ezzel párhuzamosan vizsgáltunk néhány, apoptózisra jellemző paramétert: DNS fragmentációt és kaszpáz aktivitást. Növekvő hidrogén-peroxid kezelés hatására a kontroll sejtekben egyre nagyobb mértékű DNS fragmentációt és kaszpáz aktivitást tapasztaltunk; adott koncentráció felett azonban ezek az apoptózisra jellemző paraméterek jelentős mértékben csökkentek (ugyanezeknél a hidrogén-peroxid koncentrációknál azonban jelentősen nőtt a propidium-jodid felvétel). shPARP-1 és shPARG sejtekben azonban ez az „átcsapás” csak jóval magasabb koncentrációnál jelentkezett.

Mindemellett megfigyeltük, hogy az shPARG sejtek érzékenyebbek voltak apoptózissal szemben.

4.2.5. A549 sejtekben a hidrogén-peroxid kaszpáz dependens és AIF independens apoptózist okoz

Az apoptózis típusának megállapítása végett először vizsgáltuk a DNS fragmentációt kaszpáz gátlószer, zVAD-fmk jelenlétében. Megállapítottuk, hogy mindhárom sejttípusban a kaszpázgátlószer koncentrációfüggő módon védett a DNS fragmentálódásával szemben. A legújabb kutatási eredmények szerint a poli-ADP-ribosilációnak fontos szerepe van az AIF mediált apoptózisban. Ezért mindhárom sejttípusban megvizsgáltuk az AIF transzlokációt növekvő hidrogén-peroxid koncentráció mellett. Konfokális mikroszkópiával végzett

vizsgálataink szerint az AIF sejtmagi transzlokációja mindhárom sejttípusban elmarad. Mindezt sejtfractionálással és Western blot vizsgálattal is megerősítettük.

A PARG és PARP-1 fehérjék hiánya tehát védelmet nyújtott nagy dózisú hidrogén-peroxiddal kiváltott nekrozissal szemben és fokozta az apoptotikus paraméterek értékeit. PARP-1 esetében mindez megfelel a már korábban leírt irodalmi adatoknak. Nagyfokú DNS károsodás esetén a PARP túlzott aktivációja fokozott NAD⁺ és ATP szint csökkenést eredményez, mely energetikai katasztrófához vezet és nekrotikus sejthalált okoz. shPARP-1 sejtekben mindez elmarad. shPARG sejtekben a rezisztencia hátterében az automodifikált és ezáltal inaktív PARP-1 állhat.

4.2.6. Az oxidatív stressz által okozott DNS törés javításához a PARP-1 és a PARG összehangolt működése szükséges

A poli-ADP-riboziláció szerepét legkorábban a DNS hibajavításban feltételezték. Comet analízissel történt vizsgálataink alapján elmondható, hogy a hidrogén-peroxid kezelés - koncentrációfüggő módon - DNS törést okoz. Ez a törés azonban normál körülmények között, hibajavító rendszerek összehangolt működése folytán kb. egy órán belül kijavítódik. Azt tapasztaltuk, hogy az shPARP-1 sejtekben a javítás folyamata elhúzódik. shPARG sejtekben az általunk vizsgált időpontban még egyáltalán nem tapasztaltuk a hibák kijavítását. Ez a megfigyelésünk összhangban állt a klonogenitási-assay-vel kapott eredményünkkel, melyben megállapítottuk, hogy az shPARG sejtek hosszútávú túlélése oxidatív károsodást követően jelentős mértékben romlik.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

A poli-ADP-riboziláció, melyet poli(ADP-ribóz) polimerázok (PARP) katalizálnak, egy reverzibilis poszttranszlációs módosítás fehérjék glutamát és aszpartát oldalláncán. A jelenséget elsősorban DNS károsodást követően figyelhetjük meg, melyet okozhat ionizáló sugárzás, alkiláló és oxidatív ágens. A DNS törés hatására aktiválódott PARP-1 szubsztrátjából, a NAD^+ -ból ADP-ribózt hasít ki, és ezekből az egységekből hosszú, elágazó láncot szintetizál. A folyamat reverzibilitásáért elsősorban a poli(ADP-ribóz) glikohidroláz (PARG) felel, mely ADP-ribóz egységekre bontja a láncot.

Kísérleteink első felében a poli-ADP-riboziláció esetleges szabályozó mechanizmusát vizsgáltuk citokinekkal stimulált A549 sejtekben. A sejteket specifikus PARP-1 gátlószerrel (PJ34) és egy PARG inhibitor vegyülettel (gallotannin, GT) kezeltük elő. A citokin kezelés hatására kemokinek és további citokin gének expressziója jelentős mértékben nőtt, melyet a GT fokozottabb, a PJ34 pedig kis mértékben gátolt. A citokinek génexpressziós hatásukat az NF- κ B és az AP-1 transzkripciós faktorokon keresztül fejtették ki. Mind a GT, mind a PJ34 gátolta a NF- κ B transzaktivációját; a GT gátolta az I κ B foszforilálódását, és emiatt az NF- κ B sejtmagba történő transzlokációját, míg a PJ34 gátolta az NF- κ B DNS-hez való kötődését. A GT gátolta az AP-1 DNS-hez való kötődését is, ez a hatás a citokin kezelés hiányában is fennállt. Érdekes módon azonban, a GT önmagában is kiváltotta az AP-1 egyik komponensének, a cJun-nak a foszforilálódását, sőt indukálta a JNK, p38MAPK és ERK valamint azok targetjeinek foszforilálódását. Feltételezzük, hogy a jelenség háttérében foszfatáz enzimek (PP1 és PP2A) gátlása áll. Megállapítottuk továbbá, hogy a citokin kezelés nem okozott jelentős poli-ADP-ribóz szintézist, a polimerek akkumulációját pedig nem tudtuk megfigyelni GT jelenlétében.

A PARG további vizsgálata céljából stabil géncsendesítést valósítottunk meg A549 sejtekben. Mind a PARG, mind a PARP-1 gén csendesítése rezisztenciát okozott nagy dózisú hidrogén peroxid kezeléssel kiváltott citotoxicitással szemben. Ez a védelem azonban csak rövidtávon érvényesült. Megfigyeltük, hogy alacsonyabb, apoptózist indukáló hidrogén peroxid kezeléssel szemben mind a PARG, mind a PARP-1 csendesített sejtek érzékenyebbek, ennek háttérében pedig azok elégtelen DNS hibajavítását igazoltuk. Az apoptózist az általunk vizsgált rendszerben kaszpáz-függőnek és az AIF-függetlennek találtuk. A PARP-1 és a PARG csendesített sejtvonalak hasonló viselkedése arra utal, hogy a PARG hiánya fokozza a PARP-1 gátló hatású auto-poli-ADP-ribozilációját.

6. KÖZLEMÉNYEK

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:

Erdélyi K, Bakondi E, Gergely P, Szabó C, Virág L: Pathophysiologic role of oxidative stress-induced poly(ADP-ribose) polymerase-1 activation: focus on the cell death and transcriptional regulation. *Cell. Mol. Life Sci.* **62**(7-8):751-9. (2005) Review.

IF: 4,812

Erdélyi K, Kiss A, Bakondi E, Bai P, Szabó C, Gergely P, Erdődi F, Virág L: Gallotannin inhibits the expression of chemokines and inflammatory cytokines in A549 cells. *Mol Pharmacol.* **68**(3):895-904. (2005)

IF: 5,080

Erdélyi K, Bai P, Kovács I, Szabó É, Mocsár G, Kakuk A, Szabó Cs, Gergely P, Virág L: Dual role of poly(ADP-ribose) glycohydrolase in the regulation of cell death in oxidatively stressed A549 cells. *FASEB J.* **23**(10):3553-63. (2009)

IF: 7,049

Egyéb közlemények:

Bakondi E, Bai P, **Erdélyi K**, Szabó C, Gergely P, Virág L: Cytoprotective effect of gallotannin in oxidatively stressed HaCaT keratinocytes: the role of poly(ADP-ribose) metabolism. *Exp Dermatol.* **13** (3):170-8. (2004)

IF: 2,040

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

IF: 1,847

Bai P, Hegedűs C, **Erdélyi K**, Szabó E, Bakondi E, Gergely S, Szabó C, Virág L: Protein tyrosine nitration and poly(ADP-ribose) polymerase activation in N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine-treated thymocytes: Implication for cytotoxicity. *Toxicol Lett.* **15**;170(3):203-13. (2007)

IF: 2,826

Poszterek:

Erdélyi K, Gergely P, Virág L: A poli-ADP-riboziláció szerepe A549 tüdőepitélsejtek gyulladáshoz kemokin- és citokinexpressziójának vizsgálatában. *Magyar Biokémiai Egyesület, Molekuláris Biológiai Szakosztálya 9. Munkaértekezlete* Sopron (2004)

Erdélyi K, Bak I, Bakondi E, Dinya Z, Antus S, Tótsaki Á, Gergely P, Virág L: Characterization of the antioxidant, cytoprotective and cardioprotective effect of cherry, blackberry and sour cherry tannins. *Free radicals and diseases: gene expression, cellular metabolism and pathophysiology* Spetses (2004)

Bakondi E, **Erdélyi K**, Gergely P, Virág L: Gallotannin regulates poly(ADP-ribose) metabolism and protects against cytotoxicity in oxidatively stressed HaCaT keratinocyte cells. *Free radicals and diseases: gene expression, cellular metabolism and pathophysiology* Spetses (2004)

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

Erdélyi K, Bakondi E, Szabó C, Gergely P, Virág L: Suppression of chemokine and inflammatory cytokine expression by gallotannin in A549 cells is not related to inhibition of poly(ADP-ribose) glycohydrolase. *30th FEBS Congress and 9th IUBMB Conference* Budapest (2005)

Erdélyi K, Gergely P, Virág L: A poly(ADP-ribóz) glikohidroláz siRNS-sel történő gátlásának következményei A549 sejtekben. *Magyar Biokémiai Egyesület, Molekuláris Biológiai Szakosztálya 10. Munkaértekezlete* Pécs (2006)

Erdélyi K, Gergely P, Virág L: A poli(ADP-ribóz) szerepének vizsgálata a sejthalálban. *Genetikai és fejlődésbiológiai napok* Balatonfüred (2007)

Erdélyi K, Bai P, Hegedűs C, Gergely P, Virág L: Poli(ADP-ribóz) polimerek és a poli(ADP-ribóz)glikohidroláz sejthalálban való lehetséges szerepének vizsgálata A549 sejtekben. *Magyar Biokémiai Egyesület, Molekuláris Biológiai Szakosztálya 11. Munkaértekezlete* Szeged (2008)

Előadások:

Bai P, **Erdélyi K**, Bakondi E, Hegedűs C, Gergely P, Szabó C, Virág L: Potential role of peroxynitrite in the poly(ADP-ribose) polymerase-mediated cytotoxicity caused by the alkylating agent N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine in thymocytes. *Poly-ADP-ribosylation in Health and Disease, FEBS Advanced Course* Debrecen (2003)

Erdélyi K: A poli-ADP-riboziláció szerepe A549 tüdőepitélsejtek gyulladáshoz citokin- és kemokinexpressziójának szabályozásában. *PhD és TDK Tudományos Diáktalálkozója* Debrecen (2004)

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

Erdélyi K: A gallotannin hatása A549 sejtek gyulladáscitokin és kemokin expressziójára. *PhD és TDK Tudományos Diáktalálkozója Debrecen* (2005)

Erdélyi K, Bai P, Kovács I, Gergely P, Virág L: A poli(ADP-ribóz) polimeráz-1 (PARP1) és a poli(ADP-ribóz) glikohidroláz (PARG) szerepének vizsgálata A549 sejtekben lentivirális géncsendesítéssel. *Membrán-transzport konferencia Sümeg* (2008)