

Ph.D. értekezés

**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 Orvosi Vegytani Intézet
Debrecen, 2003**

TARTALOMJEGYZÉK

Oldalszám

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	4
BEVEZETÉS	5
1. Oxidatív stressz: reaktív oxigén és nitrogén tartalmú intermedierek (ROI és RNI) termelődésének szövetkárosító hatásai	5
2. A peroxinitrit képződése és biológiai szerepe	5
3. Oxidatív stressz hatása a sejtek iontranszportjára	6
4. Oxidatív stressz hatása a sejtek kalcium homeosztázisára	8
5. A poli(ADP-ribóz) metabolizmus szerepe az oxidatív stresszel indukált sejthalálban	9
5.1. A poli(ADP-ribóz)polimeráz felépítése és működése	9
5.2. A poli(ADP-ribóz) metabolizmus szabályozása	10
5.3. A PARP enzimcsalád	12
5.4. A PARP szerepe a DNS hibajavításban	13
5.5. A PARP szerepe a transzkripcióban	14
5.6. A PARP szerepe a sejtciklus szabályozásában	14
5.7. A PARP szerepe a sejthalálban	15
5.8. PARG gátló szerek alkalmazásának terápiás lehetőségei	16
CÉLKITŰZÉSEK	17
ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	18
1. Anyagok	18
2. Állatok	18
3. Sejttenyésztés	19
4. <i>In vivo</i> hidrogén-peroxid kezelés és fagyasztott metszetek készítése	19
5. Makrofágok izolálása egerek hasüregéből és a hidrogén-peroxid kezelés	20
6. Az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció mérése	20
7. Citotoxicitási vizsgálatok	20
8. Sejtes PARP aktivitás mérése [^3H]-NAD $^{+}$ felhasználásával	21
9. Sejtes PARP aktivitás enzimecitokémiai kimutatása	22
10. PARP aktivitás kimutatása enzimhisztokémiai módszerrel	23
11. PARP aktivitás vizsgálata sejtes ELISA módszerrel	23
11. Kaszpáz aktivitás meghatározása	23
12. Poli(ADP-ribóz) kimutatása immuncitokémiai módszerrel	24

13. Sejtek NAD ⁺ koncentrációjának meghatározása	24
14. Statisztikai elemzés	25
EREDMÉNYEK	26
1. A PARP aktiváció kimutatása biotinnal-jelölt NAD ⁺ felhasználásával	26
1.1. A biotinnal jelölt NAD ⁺ felhasználásán alapuló módszer specifikitása	26
1.2. A PARP aktivitás kimutatása J774 makrofágokban enzimcitokémiai módszerrel	27
1.3. A PARP aktivitás fokozódásának meghatározása J774 makrofágokban sejtes ELISA módszerrel	28
1.4. PARP aktivitás kimutatása bőrben enzimhisztokémiai módszerrel	29
2. Gallotannin hatása a PARG és PARP enzimek aktivitására	30
2.1. A gallotannin citoprotektív hatása az oxidatív stresszben	30
2.2. A gallotannin hatása a PARP aktivációra	33
2.3. A gallotannin hatása a HaCaT sejtek poli(ADP-ribóz) tartalmára	34
2.4. Az intracelluláris NAD ⁺ mennyiségének változása oxidatív stressz során a gallotanninnal kezelt HaCaT sejtekben	35
3. Az intracelluláris Ca ²⁺ koncentráció szerepe az oxidatív stressz által indukált citotoxicitásban	37
3.1. A peroxinitrit hatása az intracelluláris Ca ²⁺ -koncentrációra	37
3.2.a. A kalciumjel szerepe a peroxinitrit citotoxikus hatásában	38
3.2.b. Hidrogén-peroxid és szuperoxid-anionnal indukált oxidatív stressz vizsgálata	38
3.3. Összefüggés a sejtdenzitás és az oxidatív stresszel szemben mutatott érzékenység között	40
3.4. A Ca ²⁺ -mobilizáció és a sejtdenzitás hatása a peroxinitrit által indukált PARP aktivációra	41
3.5. A Ca ²⁺ -mobilizáció és a sejtdenzitás hatása a peroxinitrit által kiváltott kaszpáz-3 aktiválódásra	42
MEGBESZÉLÉS	44
IRODALOM	51
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	61
ÖSSZEFOGLALÁS	62
SUMMARY	63
KÖZLEMÉNYEK	64

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

3-AB	3-amino-benzamid
ABC	avidin-biotin peroxidáz complex
BAPTA-AM	bis-(o-amino-fenoxi)etán-N,N,N',N'-tetraecetsav-metil észter
cNOS	konstitutív nitrogén-monoxid szintetáz
DAB	diamino-benzidin
DMSO	dimetil-szulfoxid
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
eNOS	endoteliális nitrogén-monoxid szintetáz
GT	galotannin
IFN- γ	interferon- γ
INH ₂ BP	jodo-amino-benzpiron
iNOS	indukálható nitrogén-monoxid szintetáz
LDH	laktát dehidrogenáz
MRC	multiprotein replication complex
MTT	3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il) 2,5-difenil-tetrazolium-bromid
NAD ⁺	nikotinamid-adenin-dinukleotid
NF- κ B	nuclear factor kappa B
NLS	nuclear localisation signal
NMDA	N-metil-D-aszpartát
nNOS	neuronális nitrogén-monoxid szintetáz
NO	nitrogén-monoxid
NOS	nitrogén-monoxid szintetáz
O ₂ ⁻	szuperoxid gyök-anion
OH [•]	hidroxil gyök
ONOO ⁻	peroxinitrit
PARG	poli(ADP-ribóz) glikohidroláz
PARP	poli(ADP-ribóz) polimeráz
PARP ^{-/-}	PARP deficiens (knock out)
PARP ^{+/+}	vad típusú PARP génekkel rendelkező
PI	propidium-jodid
PJ-34	N-(oxo-5,6-dihidro-fenantridin-2-yl)-N,N-dimetil-acetamid
SIN-1	3-morfolino-sydnominimint
sPARP	short PARP
TNF- α	tumor nekrosis faktor- α
TRF-1	telomer repeat binding factor-1
vPARP	vault-PARP

BEVEZETÉS

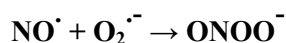
1. Oxidatív stressz: reaktív oxigén és nitrogén tartalmú intermedierek (ROI és RNI) termelődésének szövetkárosító hatásai

Az elmúlt évek kutatási eredményei számos újabb bizonyítékkal támasztották alá a reaktív oxigén- és nitrogéntartalmú intermedierek aktív részvételét különböző kórfolyamatok kialakulásában. Ezen reaktív intermedierek fokozott mértékű termelődését tapasztalták például gyulladásos folyamatok során, sugárzásnak kitett sejtes és szövetes rendszerekben, iszkémia-reperfundált szívben, májban, vesében és agyban is. (Kloner és mtsai, 1989, Koliwad és mtsai, 1996, Krippeit-Drews és mtsai, 1994, Lafon-Cazal és mtsai, 1993). Az utóbbi években kimutatták, hogy több bőrbetegség, mint például a napégés után kialakuló eritéma, kontakt hiperszenzitivitási reakció, pszoriázis kialakulásában is jelentős szerepet töltenek be egyes oxigén és nitrogén tartalmú reaktív intermedierek (Virág és mtsai, 2002). A reaktív oxigén és nitrogén tartalmú intermedierek többféleképpen is képesek károsítani a szöveteket. Többek között gátolják a mitokondriális légzési lánc folyamatát, lipid peroxidációt okoznak, ioncsatornákat inaktívnak és fehérjéket oxidálnak. Az ebbe a vegyületcsoportba tartozó, legalaposabban tanulmányozott reaktív intermedierek között említendő: a szuperoxid gyök-anion ($O_2^{\cdot-}$), a hidrogén-peroxid (H_2O_2), a hidroxil gyök ($OH^{\cdot}$), a nitrogén-monoxid ($NO^{\cdot}$), valamint a peroxinitrit ($ONOO^{\cdot}$). Kísérleteink során elsősorban a peroxinitrittel és a hidrogén-peroxiddal kiváltott oxidatív stressz hatásainak vizsgálatát tűztük ki célul.

2. A peroxinitrit képződése és biológiai szerepe

A peroxinitrit a nitrogén-monoxid és a szuperoxid gyök-anion egyesülése során képződő reaktív vegyület (Beckman és Koppenol, 1996, Groves, 1999). Amennyiben fokozódik a szuperoxid vagy a nitrogén-monoxid ($NO^{\cdot}$) (esetleg mindkét reaktáns) termelődése, akkor a peroxinitrit képződésének valószínűsége jelentősen megnő (Szabó, 1996). Az elmúlt néhány év kutatásainak eredményei azt mutatják, hogy a nitrogén-monoxid fontos mediátora számos fiziológiai és patofiziológiai folyamatnak. Több irodalmi hivatkozást találhatunk többek között a bőrszövetben betöltött szerepéről (Weller, 1997, Virág és mtsai, 2002). Az NO a nitrogén-monoxid szintáz (NOS) enzimesalád tagjai által katalizált reakcióban képződik az L-arginin guanidino-csoportjának enzimatis

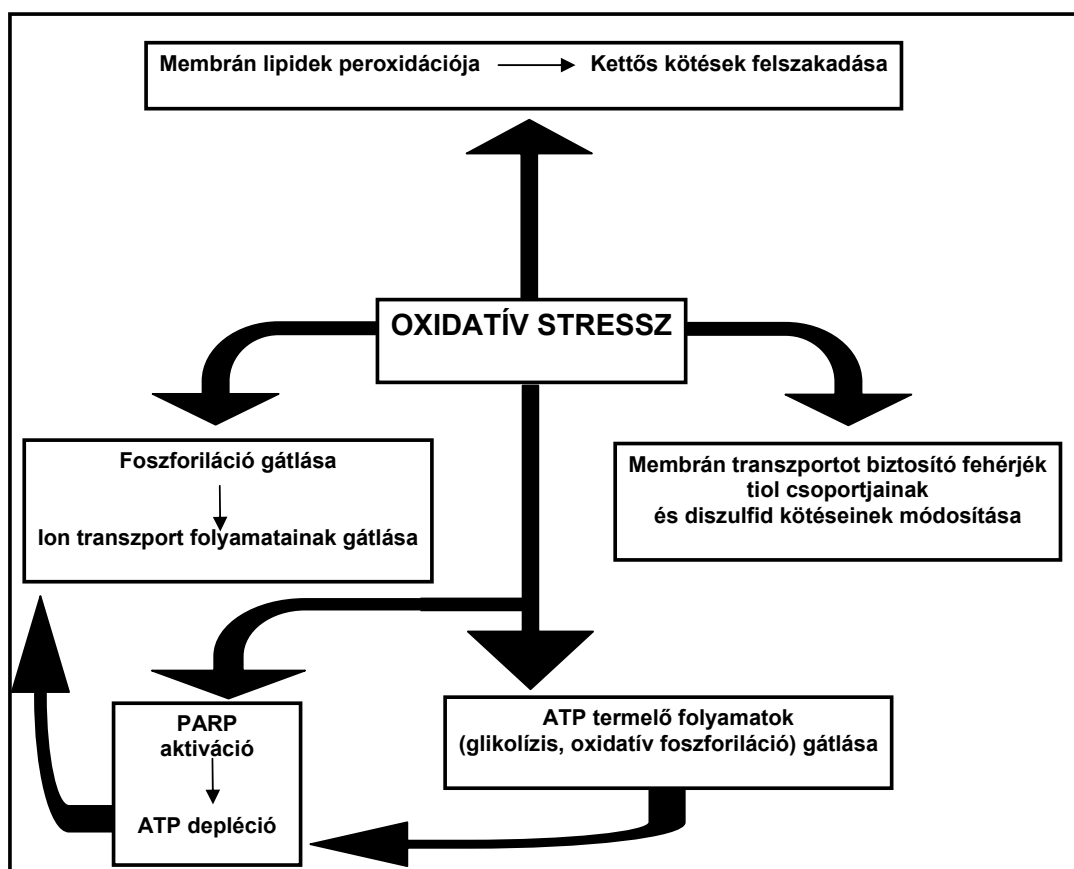
oxidációja során (Marletta és mtsai, 1998). A kis mennyiségű NO termelésére képes konstitutív NOS (cNOS) enzimek, (endoteliális és neuronális NOS : eNOS és nNOS) mellett fontos szerepet tölt be az indukálható NO-szintáz (iNOS). Ha valamilyen stimulus (elsősorban gyulladásos folyamatok) hatására aktiválódik az iNOS, akkor jelentős mértékben fokozódik az NO termelődés (Weller, 1997, Virág és mtsai, 2002). A nagy mennyiségben képződő NO a szuperoxid-diszmutázzal (SOD) verseng a sejtekben folyamatosan termelődő szuperoxidért (mitokondriális légzési lánc, NADPH-oxidáz, xantin-oxidáz). Olyan körülmények között, amikor a nitrogén-monoxid termelődés megnő, akkor az NO reagál a szuperoxiddal, és peroxinitrit képződik (Beckman és Koppenol, 1996).



Eddigi ismereteink alapján a fenti reakcióban képződő peroxinitrit mediátora számos, fokozott NO termelődés eredményeként fellépő kórfolyamatnak, pl. sokk, reperfüziót követő sérülések, gyulladásos folyamatok (Szabó, 1996). Kísérleti adatok szerint a bőrben is termelődik peroxinitrit (Virág és mtsai, 2002). Kimutatták a peroxinitrit képződését a napégés után kialakuló eritémában (Hattori és mtsai, 1996), a különböző eredetű égési sérülésekben (Rawlingson és mtsai, 2000), a kontakt hiperszenzitivitási reakcióban (Szabó és mtsai, 2001), és szisztémás szklerózisban (Virág és mtsai, 2002). A peroxinitrit egyik legjellegzetesebb, ezáltal kimutatására legalkalmasabb, reakciója az egyes fehérjék aromás oldalláncainak (tirozin és triptofán) nitrálása (Alvarez és mtsai, 1996, Crow és mtsai, 1995). A tirozil-oldalláncok nitrálása meggátolja a jelátviteli folyamatokhoz elengedhetetlen tirozil-foszforilációs reakciókat (Gow és mtsai, 1996, Kong és mtsai, 1996), ami zavart okoz az egyes sejtfolyamatok szabályozásában.

3. Oxidatív stressz hatása a sejtek iontranszportjára

Régi megfigyelés, hogy az említett reaktív intermedierek membrán depolarizációt okoznak. A reaktív intermedierek hatására a membránstruktúrában bekövetkező változások az oxidatív stressz korai stádiumában tapasztalható jelenségek. Ezeknek a folyamatoknak a pontos mechanizmusa még nem ismert, feltételezhető, hogy azok valamilyen módon a reaktív intermediereknek az iontranszportra gyakorolt hatásának eredményeként alakulhatnak ki (1.ábra).



1.ábra. Oxidatív stressz hatása a membrán transzportfolyamataira

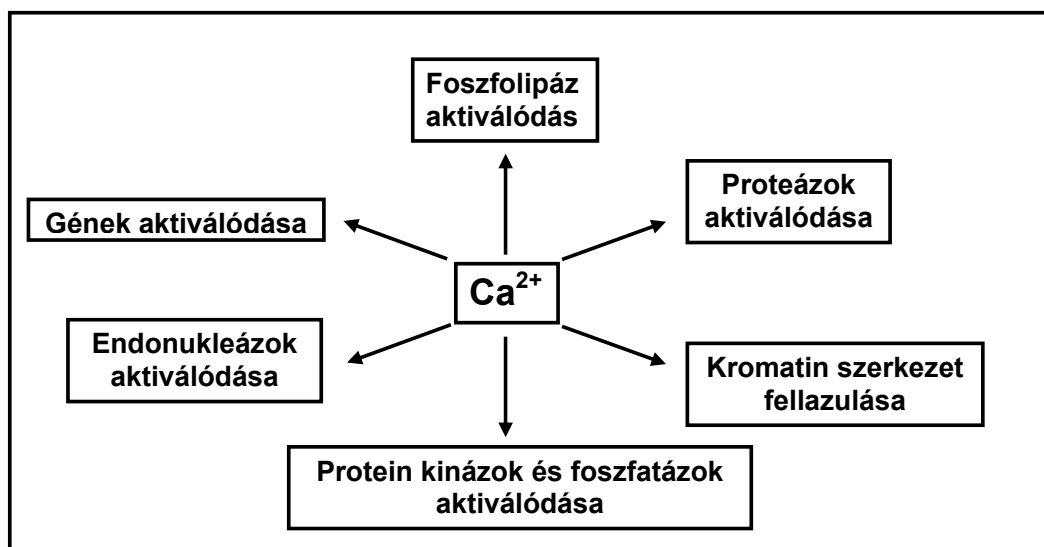
Az oxidatív intermedierek targetjeként azonosítottak egy 106 kDa tömegű Ca^{2+} -csatorna fehérjét (Stuart és mtsai, 1991, Xiong és mtsai, 1992), a dihidropiridin receptor (DHPR) és rianodin receptor (RyR) Ca^{2+} -csatornákat (Oba és mtsai, 1992), valamint egyes K^{+} -csatornákat (Koong és mtsai, 1993, Kuo és mtsai, 1993). Az oxidatív stressz iontranszport folyamatokra gyakorolt közvetett hatásai a membránt alkotó lipidek szerkezetében okozott változásoknak is tulajdoníthatók. A membrán-lipidek oxidatív stressz hatására bekövetkező peroxidációja változásokat indukál a $\text{K}^{+}_{\text{ATP}}$ csatorna és a Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPáz működésében (Hayashi és mtsai, 1989). Az iontranszport folyamatokban az oxidatív stressz által kiváltott stimulációt (Boraso és mtsai, 1994), illetve gátlást a transzportfehérjék tiol oldalláncainak módosítása is okozhatja (Cai és Sauvé, 1997). A tiol-oldalláncok oxidációjának eredményeként megváltozik a fehérje konformációja, ami vagy indukálja annak működését, vagy gátolja iontranszport

funkcióját. A csatorna- és pumpafehérjék szerkezetében bekövetkező módosulások hatására megváltozik azok funkciója és/vagy a regulációs alegységek hozzáférhetősége is.

Megfigyelések szerint oxidatív stresszhatást követően több esetben is jelentős mértékben csökken az ATP koncentrációja. Ez lehet egyrészt annak következménye, hogy a reaktív intermedierek közvetlen gátlóhatást fejtenek ki az ATP termelő glikolízis és oxidatív foszforiláció folyamatára (Hyslop és mtsai, 1988), illetve közvetett módon indukálhatják az ATP lebontását ADP-re és foszfátra (Tokube és mtsai, 1996). Az ATP koncentrációban bekövetkező változás, pedig jelentős mértékben módosítja az ATP-függő ioncsatornák, illetve ATPázok aktivitását is.

4. Oxidatív stressz hatása a sejtek kalcium homeosztázisára

A kalciumion, mint másodlagos hírvivő fontos szerepet tölt be mind az intracelluláris mind pedig a sejtek közötti kommunikációt irányító folyamatok szabályozásában. Ismeretes, hogy a kalciumjel meghatározó szerepet tölt be a sejtek oxidatív stresszel szemben mutatott érzékenységeinek szabályozásában (Nicotera, 1998), továbbá az általunk is tanulmányozott, peroxinitrit által kiváltott citotoxicitás folyamatában (Virág és mtsai, 1999, Guiterrez-Martin és mtsai, 2002). Az oxidatív stressz hatására fellépő károsodások kialakulása sok esetben az intracelluláris kalciumkoncentrációban bekövetkező növekedésre, ezáltal a kalcium-hírvivő rendszerben fellépő módosulásokra vezethetőek vissza (Goldhaber, 1996, Goldhaber és Weiss, 1992). A kalcium homeosztázis zavarai, az intracelluláris kalcium felhalmozódásához, ezzel pedig végeredményben a sejt halálához vezethet. Kísérleti tapasztalatok szerint a kalcium intracelluláris kompartmentekben történő túlzott felhalmozódásának következménye többek között a specifikus proteázok aktiválódása, a citoskeletális hálózat összeomlása, a mitokondriális rendszerben fellépő zavarok és a DNS károsodása (Nicotera és mtsai, 1992). Bizonyított, hogy a kalciumnak szerepe van az apoptotikus sejthalál kiváltásában is. Különböző apoptózis modellekben több kalcium-függő mechanizmust is kimutattak, amelyek az egyes „apoptotikus markerek” kialakulásához vezetnek (Nicotera és mtsai, 1994). (2.ábra).



2.ábra. A kalcium lehetséges szerepe az apoptózis szabályozásában

Számos *in vitro* apoptózis modellben tapasztalták az intracelluláris kalcium homeosztázis felborulását és a kalcium-függő endonukleázok aktiválódását (Nicotera és mtsai, 1994). Kimutatták, hogy thapsigarginnal indukált apoptózis során a kromatinkondenzációban és az apoptotikus testek képződésében is fontos szerepe van a kalciumnak (Jiang és mtsai, 1994). Nicotera és mtsai (1994) igazolták, hogy a kalcium szerepet játszik a kromatinszerkezet fellazításában is. Ennek következtében a kromoszóma egyes részei hozzáférhetővé válnak a DNázok számára is (Villaponteau és mtsai, 1986). A kalcium- és magnézium-függő endonukleázok internukleosomális hasításának eredménye az apoptózisra jellemző DNS létra képződése. További bizonyítékul szolgál az a megfigyelés, hogy a kromatinszerkezet tömörségét fokozó anyagok (pl. poliaminok) gátolják az apoptózist (Brüne és mtsai, 1991). Az oxidatív stressz által kiváltott sejthalálban tehát a kalcium sokrétű szerepet játszik.

5. A poli(ADP-ribóz) metabolizmus szerepe az oxidatív stresszel indukált sejthalálban

5.1. A poli(ADP-ribóz)polimeráz felépítése és működése

Az oxidatív stressz károsodást okozhat a DNS szerkezetében is. Az ilyen módon előidézett, elsősorban egyszálú DNS törés aktiválja a poli(ADP-ribóz) polimeráz-1 (PARP-1) enzimet (Virág és mtsai, 2002, Burkle, 2001). A PARP-1 a sejtmagban lokalizálódó, és ott az egyik legnagyobb mennyiségben előforduló enzim. A fehérje (116kDa) három

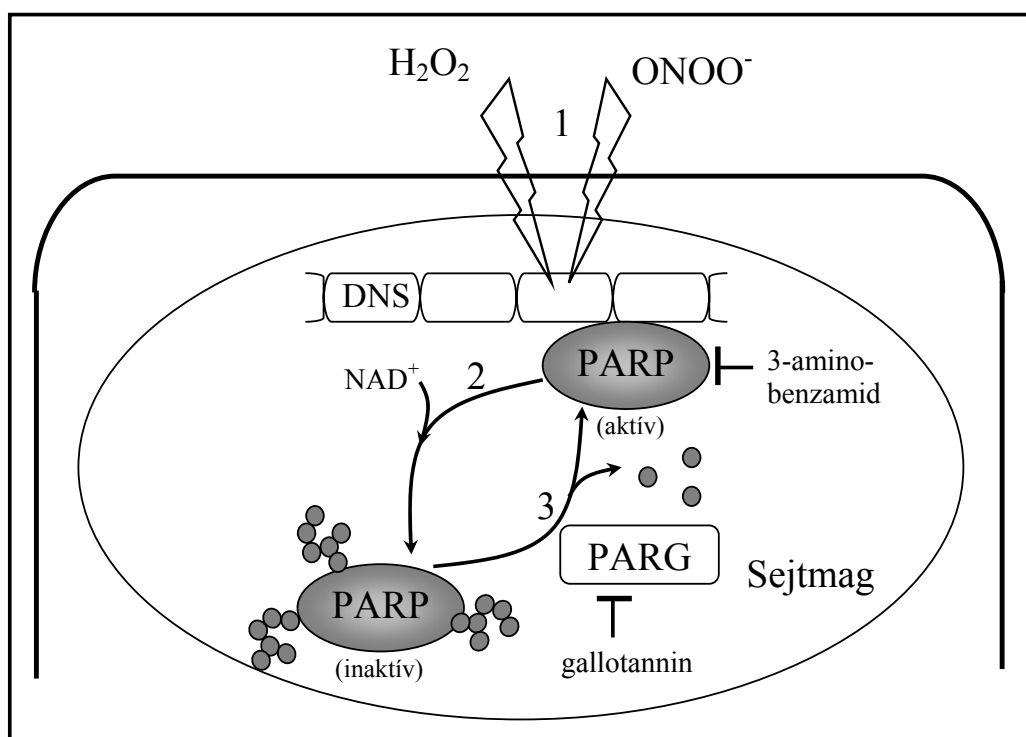
doménból áll. 1. Az N-terminális végén a DNS kötő doménban található két cinkujj motívum; 2. a C-terminális végén található a katalitikus domén (Mazen és mtsai, 1989, de Murcia és Menisser de Murcia, 1994, de Murcia és mtsai, 1994, Schreiber és mtsai, 1995, Smith, 2001); 3. a kettő között helyezkedik el az önszabályozó domén, amely az enzim auto-poli-ADP-ribozilációs helyeként funkcionál. A legnagyobb mértékben konzervált régió az enzim C-terminális, katalitikus domént tartalmazó része. Ezen belül is elkülöníthető egy ötven aminosavból álló szekvencia, amely nagy fokú homológiát mutat a különböző fajok között. A PARP-1 elsősorban egyszálú DNS törések hatására történő aktiválódása után a második cinkujj doménon keresztül hozzákötődik a sérült DNS szakaszhoz. Ezután homodimereket alkotva katalizálja a szubsztátjából, a NAD^+ -ból lehasított ADP-ribóz egységekből felépített, több száz monomerből álló, elágazó poli(ADP-ribóz) lánc szintézisét.

A poli-ADP-ribóz polimer specifikus akceptora lehet több magfehérje is. A legfőbb akceptor azonban maga a PARP-1. Ebben az esetben auto-poli-ADP-ribozilációról beszélünk, amely folyamat hatására az enzim aktivitása gátlódik. Amennyiben a poli-ADP-riboziláció akceptora valamely más fehérje, akkor a folyamatot transz-poli-ADP-ribozilációnak nevezzük. A poli-ADP-riboziláció hatására az egyes akceptorfehérjék szerkezete és ennek eredményeként funkciójuk is megváltozik. Ez az alapja a PARP-1 transzkripció folyamatokban betöltött szerepének. Ilyenkor a transz-poli-ADP-ribozilációs folyamatok akceptorai a hisztonok, amiken a polimerizációs reakció eredményeként negatív töltésmintázat alakul ki. Ezért a hisztonok és a DNS között taszító hatás alakul ki (mindkettő negatív töltésű), a kromatinállomány fellazul, ami lehetővé teszi a transzkripciót (Tanuma és mtsai, 1985, Nagele 1995). A hisztonokon kívül még számos, magban lokalizálódó és a transz-poli-ADP-ribozilációs folyamat akceptoraként működő fehérjét is azonosítottak. Ilyen például több, transzkripció szabályozó faktor, illetve a DNS-repair-ben résztvevő fehérje (Oliver és mtsai, 1999, Cervellera és Sala, 2000, Ariumi és mtsai, 1999, Wesierska-Gadek és mtsai, 1996, Kumari és mtsai, 1998, Malanga és mtsai, 1998, Simbulan-Rosenthal és mtsai, 1999, 2001, Wesierska-Gadek és Schmid, 2001, Tong és mtsai, 2001).

5.2. A poli(ADP ribóz) metabolizmus szabályozása

A poli(ADP-ribóz) metabolizmusát szabályozó enzimek közül a poli(ADP-ribóz) polimerázok mellett napjainkban egyre intenzívebben tanulmányozzák a katabolikus poli(ADP-ribóz) glikohidrolázt (PARG) is. A PARP-1 enzimmel (illetve a PARP

családdal) ellentétben a PARG enzimről kevés adattal rendelkezünk. Az utóbbi néhány év során a PARG egyre intenzívebb érdeklődés tárgyává vált. Ennek elsősorban az az oka, hogy több megfigyelés szerint, PARG gátlószerekkel a PARP inhibitorokhoz hasonló citoprotektív hatás érhető el. A DNS sérülés hatására bekövetkező PARP aktiválódást követően rövid időn belül aktiválódik a PARG is. Ez az enzim a poli(ADP-ribóz) polimerek hidrolízissel történő lebontását végzi, és így biztosítja az automodifikáció következtében inaktiválódó PARP aktív állapotának helyreállítását is (3.ábra).



3.ábra. A PARG lehetséges szerepe a poli(ADP-ribóz) metabolizmus szabályozásában

1. oxidatív stressz hatására DNS sérülés történik, 2. a DNS törés aktiválja a PARP-ot, mely szubsztrátként NAD^+ -ot használva poli(ADP-ribóz) láncokat szintetizál specifikus akceptor fehérjéken és saját magán. Az auto-poli-ADP-riboziláció előrehaladtával az önmagán szintetizált polimer mérete nő, ami az enzim inaktiválódását eredményezi, 3. a PARG a PARP-on szintetizált polimer lebontásával helyreállítja annak aktív állapotát

A PARG felfedezését követően (Miwa és Sugimura, 1971) hosszú ideig úgy gondolták, hogy az enzim csak exoglikozidáz aktivitással rendelkezik, vagyis a láncvégi monomer egységeket hasítja le a polimerről. Elsőként Ikejima és Gill munkacsoportja (Ikejima és Gill, 1988) igazolta a PARG endoglikozidáz aktivitását, melynek révén

nagyobb oligo(ADP-ribóz) fragmentek eltávolítására is képes. A PARC enzimaktivitását több tényező befolyásolja. Ezek egyike a polimerlánc(ok) hossza. Tapasztalatok szerint a hosszú polimereknek mind a láncvégi, mind a láncközi glikozidos kötéseit hasítja, míg a rövidebb polimerekről csupán a terminális ADP-ribóz egységeket távolítja el (Brochu és mtsai, 1994). A láncban található elágazási pontok helye szintén meghatározó szerepű (Althaus, 1992). Más kutatócsoportok tapasztalatai szerint a hisztonok (elsősorban H1) szintén befolyásolhatják a méreteloszlást, valamint az elágazások gyakoriságát (Naegeli és Althaus, 1991). Brochu és mtsai megfigyelései szerint a hisztonok dózisfüggő módon gátolják az enzim exoglikozidáz és endoglikozidáz aktivitását (Brochu és mtsai, 1994).

5.3. A PARP enzimcsalád

Hosszú ideig csak a PARP-1-et tartották számon, mint poli-ADP-ribózilációt katalizáló enzimet. Azonban miután PARP-1 hiányos sejtekben is tapasztaltak PARP aktivitást (Shieh és mtsai), elkezdődött azoknak az enzimeknek az azonosítása, amelyek ezért az aktivitásért felelősek. Napjainkig már tíznél is több PARP aktivitással rendelkező, különböző enzimet azonosítottak. Ezeknek az enzimeknek a kutatása még kezdeti stádiumban van, így kevés információ áll rendelkezésre doménszerkezetükről, biológiai szerepükről, sejten belüli lokalizációjukról, és DNS kötő képességükről. Az enzimcsalád egyes tagjai kizárólag a PARP-1 C-terminális végén található katalitikus doménnel mutatnak különböző mértékű homológiát. Az alábbiakban csak röviden ismertetem az enzimcsalád néhány, újabban felfedezett tagját (Smith, 2001):

PARP-2: a sejtmagban lokalizálódó enzim, a PARP-1 C-terminális doménjével 60%-os homológiát mutat, bár DNS sérülés hatására aktiválódik és képes kötődni a DNS-hez, DNS kötő doménjének szerkezete eltérő a PARP-1étől.

PARP-3: a legkevésbé ismert és legkisebb PARP, a centroszómákban található

sPARP (short PARP): feltételezések szerint a PARP-1 egy alternatív splicing variánsának tekinthető, a sejtmagban található, aktiválódásához nincs szükség DNS törésre.

vPARP (vault-PARP): a gyakorlatilag valamennyi eukarióta sejtben megtalálható, ribonukleoproteinekből felépülő, úgynevezett „vault-komplex” alkotóeleme. Nincs DNS kötő doménje. Bár alapvetően a citoplazmában található, kimutatták, hogy előfordul a sejtmag pórusainak citoplazma felőli oldalához kötődve is. A pontos funkciója ugyan nem ismert, de az említettek alapján feltételezhető, hogy a sejtmag transzportfolyamataiban is lehet szerepe.

tankiráz-1: a telomer komplex alkotóeleme, a telomerek replikációjának szabályozásában van szerepe. Működése során hozzákötődik a TRF1-hez (telomer repeat binding factor), mely a telomerreplikációt katalizáló telomeráz egyik negatív szabályozója. Ezt követően a tankiráz-1 poli-ADP-ribozilálja önmagát és a TRF1-et. Ennek hatására a TRF1 leválik a DNS-ről, a telomerstruktúra megváltozik és hozzáférhető lesz a telomeráz számára. A tankiráz-1 telomerek replikációját, (a telomerek hosszát) szabályozó szerepét bizonyítja az is, hogy tankiráz-1-et overexpresszáló sejtekben nem tapasztaltak telomerhossz csökkenést.

tankiráz-2: a tankiráz-1 homológjaként (több, mint 80% azonosság) tartják számon, lokalizációja, és funkciója pontosan még nem ismert.

5.4. A PARP szerepe a DNS hibajavításban

A PARP-1 fontos szerepet tölt be a kisebb mértékű, még korrigálható genotoxikus sérülések esetében is (Menisser-de Murcia és mtsai, 1997, Althaus és mtsai, 1999). Több, PARP gátláson alapuló farmakológiai tanulmányban is bizonyították a PARP-1 szerepét a DNS hibajavításban (Burkle, 2001, Ziegler és Oei, 2001). Park és munkatársai 1983-ban például kimutatták, hogy alkiláló szerrel kezelt sejtekben a PARP inhibitor 3-amino-benzamid egyéb hatások mellett késlelteti a DNS törések ligálását, és fokozza a nem replikációs DNS szintézist. Kísérletekkel igazolták, hogy PARP gátlószerek hatására a sejtek érzékenyebbé válnak a DNS károsodás citotoxikus hatásával szemben (Szabó, 2000). A knock out állatokkal, valamint a belőlük előállított sejtvonalakkal végzett kísérletek egyértelműen bizonyították a poli-ADP-riboziláció szerepét a DNS hibajavításban: a PARP hiányos egerek fokozottan érzékenyen reagáltak ionizáló sugárzással és alkiláló szerrel történő kezelésre. Továbbá, ezekből a knock out állatokból létrehozott embrionális fibroblasztokban az alkiláló szerek lényegesen nagyobb mértékben gátolták a proliferációt, mint a vad típusú sejtekben (de Murcia és mtsai, 1997). PARP knock out fibroblasztokban a DNS törések ligálását is lassúbbnak találták a vad típusúakban tapasztaltnál képest (Dantzer és mtsai, 2000). A PARP-1 DNS repair-ben betöltött funkciójának egyik komponense a sérült DNS szakasz megjelölése a repair enzimek számára. A DNS károsodást követően a PARP-1 DNS-kötő doménjével kapcsolódik a sérült szakaszhoz, és ennek hatására az enzim aktiválódik (Satoh és Lindhal, 1992, Molinete és mtsai, 1993). A továbbiakban a PARP-1 automodifikációjának hatására az enzim aktivitása egyre csökken. a még sérült helyhez kapcsolódó, nagy láncot hordozó PARP-1 megjelöli a repair-enzimek számára a károsodás helyét. Az aktiválódott PARP lebontja a polimert, valószínűleg először nagyobb részeket hasít le a láncból, majd ezután

kezdi „aprítani” és végül az ADP-ribózil protein-liáz nevű enzim lehasítja az utolsó, közvetlenül a PARP-1-hez kapcsolódó ADP-ribóz egységet (Althaus és Richter, 1987). Egyértelműen kitűnik mindezekből, hogy mennyire fontos az (ADP-ribóz) metabolizmus egyensúlyához a PARP-1 és a PARG jól összehangolt működése.

5.5. A PARP szerepe a transzkripcióban

Több munkacsoport számos kísérleti eredménye bizonyítja a PARP-1 szerepét a transzkripcióban (de Murcia és mtsai, 1986, Lindahl és mtsai, 1995). A PARP transzkripciót szabályozó egyik funkciója a kromatinszerkezetet módosító hatása. A poli-ADP-ribózilált hisztonok negatív töltést nyernek, és ennek eredményeként taszító hatás lép fel a DNS és a hisztonok között. A meglazult hiszton-DNS kapcsolat hatására az átírandó DNS szakasz hozzáférhetővé válik, lehetővé téve ezzel a transzkripciót (Althaus és mtsai, 1994). Kimutatták, hogy különböző sejttípusokban PARP inhibitorokkal (nikotin-amid, 3-amino-benzamid, INH₂BP) gátolt PARP aktivitás következtében csökken a citokinekkal stimulált iNOS expresszió mértéke (Hauschildt és mtsai, 1991, 1992, Pellat-Deceunynck és mtsai, 1994). Olivier és mtsai, 1999-ben közzölt eredményei további bizonyítékkul szolgáltak a PARP transzkripcióban betöltött szerepét illetően. A PARP gátlásának gyulladásgátló hatása régóta ismert. Abból a feltételezésből indultak ki, hogy közvetlen kapcsolat van a gyulladással folyamatokban termelődő mediátor proteinek expresszióját indukáló NF- κ B és a PARP-1 között. Kimutatták, hogy PARP-1 hiányos sejtekben az NF- κ B függő transzkripció gátolt. Irodalomban közzölt adatok szerint a PARP-1 NF- κ B ko-aktivátorként betöltött funkciójának nem feltétele a PARP-1 enzimaktivitása, hanem a hatás a két fehérje között kialakuló direkt interakció eredménye (Hassa és mtsai, 2001, Chang és Alvarez-Gonzalez, 2001).

5.6. A PARP szerepe a sejtciklus szabályozásában

A PARP replikációban betöltött szerepét számos kísérleti megfigyelés bizonyítja. Többben kimutatták, hogy osztódó sejtek magjában a poli-ADP-ribóz metabolizmus felgyorsul (Tanuma és mtsai, 1978, Kanai és mtsai, 1981). Az is ismert, hogy a PARP szerepet játszik az MRC (multiprotein replication complex) képződésében, valamint bizonyították több, a replikációt szabályozó faktorról (DNS polimeráz, topoizomeráz I és II), hogy poli-ADP-ribózilálódik (Simbulan-Rosenthal és mtsai, 1996). A hisztonok poli-ADP-ribózilációja a DNS replikáció során a kromatinszerkezet fellazítását segíti (Boulikas,

1990). A PARP replikációban betöltött szerepére utal az a megfigyelés is, hogy PARP hiányos egerekből származó fibroblaszt sejtek lassabban növekedtek a vad típusúakhoz képest. Ismert a PARP differenciálódást szabályozó hatása is. Több sejtmmodellben végzett kísérlet is bizonyítja hogy PARP gátló szerekkel befolyásolható a differenciálódás iránya. Meg kell azonban említeni, hogy az egyes differenciálódási modellekben a PARP gátlása nem egyszer ellenkező hatást eredményezett.

5.7. A PARP szerepe a sejthalálban

A PARP aktiváció sejthalálban betöltött szerepére vonatkozóan alkotta meg Berger munkacsoportja (1983, 1986) az úgynevezett sejtöngyilkossági hipotézist („suicide hypothesis”). Ennek lényege az, hogy fokozott PARP aktiváció során az enzim elfogyasztja a sejtek NAD^+ készletét ami következetesen ATP depléciót okoz és végül a sejt halálát eredményezi. A poli-ADP-riboziláció tanulmányozásának egyik központi kérdése az, hogy a PARP aktiváció valójában apoptotikus vagy nekrotikus sejthalált indukál.

Apoptózist több módon is lehet indukálni (sejtfelszíni receptorok-mint például Fas-ligand, TNF, TRAIL-ligandkötése, DNS károsító ágensek: alkiláló szerek, ionizáló sugárzás...). Az apoptózis általános ismérvei a kompakt morfológia, kromatin kondenzáció, apoptotikus testek képződése, melyeket a fagociták rövid idő alatt eliminálnak. Fontos tényező, hogy apoptózis során a plazmamembrán megőrzi épségét. Az apoptózisban fontos szerepet játszanak a mitokondriumból kiáramló apoptogén faktorok (citokróm c, apoptózis indukáló faktor) és az apoptózis egyik fő végrehajtó rendszerének tagjai, a kaszpáz enzimes család proteázai. A kaszpázoknak az egyik elsőként azonosított szubsztrátja a PARP volt (Kaufmann és mtsai, 1993). Ez a megfigyelés az oka annak, hogy a PARP szerepét elsősorban az apoptózisban vizsgálták. Apoptózis során a PARP-ot a kaszpáz-3 és a kaszpáz-7 egy 89 kDa-os (p89) és egy 24 kDa-os (p24) fragmentre hasítja (Tewari és mtsai, 1995), aminek eredményeként a DNS kötő domén lehasad a katalitikus doménról és így az enzim inaktiválódik. Ez a hasítás minden bizonnyal azért szükséges, mert ezáltal megakadályozható, hogy az apoptózis későbbi stádiumában bekövetkező DNS fragmentálódás hatására aktiválódjon a PARP, és elfogyassza az apoptózis energiaigényes folyamataihoz szükséges ATP-t (Herceg és Wang, 1999). Mindezek ismeretében nyilvánvaló, hogy a PARP által végzett poli-ADP-riboziláció szabályozó hatása csak még a kaszpázok aktiválódását megelőzően, az apoptózis korai stádiumában érvényesülhet. A különféle PARP gátló szerekkel végzett kísérletek eredményei sok esetben ellentmondóak.

Az alkalmazott kísérleti modelltól függően a PARP gátlás hatására tapasztaltak mind apoptózis gátlást (Tanaka és mtsai, 1995, Richardson és mtsai, 1999), mind fokozódást (Tentori és mtsai, 1999). Bizonyos esetekben pedig nem is tapasztaltak befolyásoló hatást (Watson és mtsai, 1995).

A nekrotikus sejthalál legfontosabb jellemzője, hogy az apoptózissal ellentétben a nekrosis során a plazmamembrán integritása megszűnik, és a sejtterfogot jelentősen megnő, a sejtartalom kiszivárog a környezetbe, ami további gyulladást stimulál. Mivel apoptózis során az apoptotikus sejtet a makrofágok fagocitózis útján gyorsan eltávolítják a szövetből, amennyiben még sikerül a nekrotikus sejthalált apoptózis útvonalára terelni, az mindenképpen terápiás előnnyel járhat. Fontos azonban szem előtt tartani azt is, hogy a két sejthalálforma nem különíthető el teljesen egymástól, hanem valójában egy folyamat két végpontjának tekinthetjük azokat (Bonfoco és mtsai, 1995, Nicotera és mtsai, 1999). Megfigyelések szerint, különösen oxidatív stressz hatására indukált sejthalálformák esetében enyhe stimulus apoptózist, míg intenzív nekrozist vált ki. A PARP nekrosisban betöltött szerepe feltehetőleg az enzim fokozott aktivációjának eredményeként bekövetkező NAD^+/ATP depléciót okozó hatásával értelmezhető, hisz a sejtes energakészletek kimerítése révén az apoptózis folyamatát a nekrosis irányába terelheti.

5.8. PARG gátló szerek alkalmazásának terápiás lehetőségei

Irodalmi adatok szerint ADP-ribózzal és cAMP-vel is gátolható a PARG (Miwa és mtsai, 1974, Tanuma és mtsai, 1986, Hatekayema és mtsai, 1986), azonban ezek nem hatékony vagy specifikus inhibitorai az enzimnek. Jelenlegi ismereteink szerint a legjobb PARG gátlószerek a különféle tanninszármazékok. Ezek a vegyületek kémiai szerkezetük alapján három fő csoportba sorolhatóak: gallotanninok, ellagitanninok és kondenzált A leghatékonyabb PARG inhibitornak az ellagitannin oligomerek bizonyultak, gátlóképességük a makromolekulát alkotó monomerek számával arányosan nő (Kazumasa és mtsai, 1993). Egér asztrocitákon és neuronokon végzett kísérletekben kimutatták a gallotannin és a nobotanin B citoprotektív hatását hidrogén-peroxiddal és N-metil D-aszpartáttal (NMDA) kiváltott oxidatív stressz modellben (Ying és Swanson, 2000). Hasonló védő hatást tapasztaltak alkilálószerrek hatására kialakuló károsodások esetében is (Ying és mtsai, 2001). A PARP inhibitorok már számos kórképben (stroke, szívinfarktus, diabetes, sokk, gyulladásos betegségek, stb.) egyértelműen jótékony hatásúnak bizonyultak, ezért felvetődik a PARG gátlószerek farmakológiai hasznosságának lehetősége is mindezen betegségekben (Ying és Swanson, 2000, Ying és mtsai, 2001).

CÉLKITŰZÉSEK

Munkánk során az alábbi problémák megoldását és 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 szövetes rendszerekben.
2. PARP aktivitás kimutatása oxidatív stressznek kitett sejtekben biotinilált NAD alkalmazásán alapuló módszerrel.

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

3. Okoz-e a peroxinitrit intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció emelkedést HaCaT sejtekben?
4. Kimutatható-e PARP aktiváció oxidatív kezelést követően HaCaT sejtekben?
5. Hozzájárul-e az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció megnövekedése az oxidatív stressz által kiváltott citotoxicitáshoz?
6. Befolyásolja-e a sejtdenzitás a HaCaT keratinociták oxidatív stressz iránti érzékenységet?
7. A PARP gátló gallotannin hatásának vizsgálata az oxidatív stressz által kiváltott citotoxicitásban.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

1. Anyagok

A sejtek intracelluláris Ca^{2+} -koncentrációját vagy Tyrode-oldatban (137 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 0,5 mM MgCl_2 , 1,8 mM CaCl_2 , 11,8 mM HEPES-NaOH, 1g/l glükóz, pH=7.4), vagy kalcium-mentes Tyrode-oldatban (az előbbivel azonos összetételű oldat, azonban a CaCl_2 helyett 1mM EGTA-t tartalmazott) mértük. A peroxinitritet (Calbiochem, San Diego, CA, USA) módosított (HEPES- és glükóz-mentes) Tyrode-oldatban (pH=11, ugyanis a magas pH gátolja a peroxinitrit bomlását) hígítottuk közvetlenül a felhasználást megelőzően. A 3-morpholino-sydnonimint (SIN-1) szintén módosított Tyrode-oldatban oldottuk azzal a módosítással, hogy a pH-t ez esetben 7,5-re állítottuk. Ellenőriztük, hogy a hígításra használt oldatoknak, valamint a peroxinitrit bomlástermékeinek önmagukban van-e módosító hatása a HaCaT sejtek intracelluláris Ca^{2+} -koncentrációjára. A mérés során használt Fura-2 a Molecular Probes-től (Eugene, Oregon, USA) származik.

A PARP aktivitás mérése során használt biotinilált- NAD^+ és TACS-Sapphire szubsztrátok a Trevigen-től (Gaithersburg, MD, USA) származtak. A PJ-34 (2-szubsztituált 6(5H)-fenantridion) nevű PARP gátlószert az Inotek Pharmaceuticals, Beverly, MA, USA állította elő (Jagtap és mtsai, 2002).

A metszetek készítéséhez használt fagyasztó médium Shandon (Pittsburgh, PA, USA) termék volt. A Nuclear Fast Red és Vectamount a Vector Laboratories-től (Burlingame, CA, USA) származott. A tríciummal jelölt $[^3\text{H}]\text{NAD}^+$ a NEN Life Science Products (Boston, MA, USA) terméke volt.

Minden egyéb vegyszer, amelynek forrását külön nem neveztük meg a Sigma Aldrich (Budapest) cégtől származott.

2. Állatok

Az állatkísérleteket az Egyesült Államok Nemzeti Egészségügyi Intézetének (NIH), „Útmutató laboratóriumi állatok gondozásáról és felhasználásáról” című kiadványának előírásait követve végeztük. A PARP aktivitás szövetszövetekben történő kimutatásához C57/BL6 egereket használtunk. A PARP aktivitás peritoneális makrofágokban történő kimutatását $\text{PARP}^{-/-}$ és vad típusú $\text{PARP}^{+/+}$ egerekben végeztük, az állatok Dr. Z. Q. Wang (Institut für Molekulare Pathologie, Wien, Ausztria) laboratóriumából származtak. A kísérleti állatok igény szerinti víz- és táplálékfelvételét minden esetben biztosítottuk.

3. Sejtenyésztés

A HaCaT sejteket RPMI 1640 médiumban (Gibco, Scotland, UK) tenyésztettük. A médium 10 % magzati borjú szérumot (FCS), 10 mM glutamint, 10 mM HEPES-t (pH=7,4) és 10 µl/ml antibiotikum-antimikotikum oldatot (Gibco, Scotland, UK) tartalmazott. A kalciumkoncentráció mérésekhez a sejteket 2x5 percig mostuk (137 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 6,9 mM NaHCO₃, 0,5 mM Na₂EDTA és 1g/l glükóz, pH=7,4), majd 37°C-on 10 percig kezeltük tripszinnel (Gibco, Scotland, UK). Ezt követően FCS-tartalmú RPMI 1640 oldattal közömbösítettük a tripszint, a HaCaT sejteket centrifugálással (10 perc, 1000 x g) összegyűjtöttük, és szuszpendáltuk a fenti pufferben. A sejteket (1-2 x 10⁵/ml) steril fedőlemezekre szélesztettük a kalciumkoncentráció meghatározásához. A kaszpáz aktivitás és a PARP aktivitás méréséhez 12 lyukú szövettenyésztő plate-en, a citotoxicitási vizsgálatokhoz 96 lyukú plate-en, a poli(ADP-ribóz) immuncitokémiához és a propidium-jodid felvételhez 12 lyukú szövettenyésztő plate-ben lévő steril fedőlemezekten tenyésztettük a sejteket, majd felhasználásig 37°C-on, 5%-os CO₂ tartalmú termosztátban tartottuk.

A J774 sejteket szintén RPMI 1640 médiumban tenyésztettük. A sejteket mostuk 0,1 M PBS-sel (pH=7,4) (Gibco, Scotland, UK), majd 37°C-on 10 percig kezeltük tripszinnel. Ezt követően az említett összetételű RPMI 1640 oldattal közömbösítettük a tripszint. A makrofágokat a [³H]-jelölt-NAD⁺ beépülésének méréséhez 12 lyukú szövettenyésztő plate-re, a sejtes ELISA méréshez 96 lyukú szövettenyésztő plate-re és a biotilált NAD⁺ beépülésének méréséhez 12 lyukú szövettenyésztő plate-ben lévő fedőlemezekre szélesztettük. A mintákat felhasználásig 37°C-on, 5%-os CO₂ tartalmú termosztátban tartottuk.

3. *In vivo* hidrogén-peroxid kezelés és fagyasztott metszetek készítése

Négy-négy egeret osztottunk két kísérleti csoportba (kontroll és hidrogén-peroxiddal kezelt állatok). Az állatok hátáról epiláló krémmel távolítottuk el a szőrzetet. A következő napon 50 µl PBS-ben (pH=7,4) oldott 250 nmol H₂O₂-dal kezeltük az egerek hátbőrét. A kontroll csoport állatainak hátbőrét az előzőekkel azonos módon csak PBS oldattal kezeltük, majd harminc perc elteltével az állatokat szén-dioxiddal megöltük, a hátbőrüket azonnal kimetszettük és fagyasztó médiumban -70°C-on fagyasztottuk.

4. Makrofágok izolálása egerek hasüregéből és a hidrogén-peroxid kezelés

A vad típusú (PARP^{+/+}) és PARP-hiányos (PARP^{-/-}) egereket szén-dioxiddal megöltük, majd 10 ml RPMI médiummal kimostuk a hasüregüket. Az így összegyűjtött makrofágokat tartalmazó szuszpenziót szobahőmérsékleten centrifugáltuk (250xg, 10 perc). A sejteket ezután friss RPMI oldatban szuszpendáltuk, majd osztott tárgylemezen 37°C-on 2 órás inkubációt követően eltávolítottuk azokat a sejteket, amelyek nem tapadtak ki. A kitapadt sejteket további 1 órán át 37°C-on inkubáltuk RPMI-ben. Ezután a sejteket 30 percig 37°C-on előkezeltük 5 mM 3-AB, 5 µM PJ-34, vagy kontrollként PBS oldattal, majd 200 µM hidrogén-peroxiddal kezeltük a makrofágokat.

5. Az intracelluláris Ca²⁺-koncentráció mérése

Az intracelluláris Ca²⁺-koncentrációban bekövetkező változások kimutatására irányuló vizsgálatok a DE OEC Élettani Intézetben történtek. A kísérleteket Csernoch László és Gönczi Mónika, Bíró és mtsai (1998), valamint Csernoch és mtsai (2000) módszere alapján Fura-2 felhasználásával végezte. A módszer szerint 1 órán keresztül 37°C-on történő inkubálással töltötték fel a 12 lyukú sejtenyésző plate-ben a fedőlemezekben tenyésztett HaCaT sejteket 5 µM Fura-2 reagenssel. A fluoreszcens festék egyenletes intracelluláris eloszlása érdekében a sejteket normál Tyrode oldatban fél órán keresztül szobahőmérsékleten inkubálták. A méréseket inverz fluoreszcens mikroszkóppal (Diaphot, Nikon, Japán) végezték. A gerjesztési hullámhossz 340 és 380 nm volt, amelyet kettős hullámhosszú monokromátorban (Deltascan, Photon Technology International, USA) állítottak elő. Az emissziót 510 nm hullámhosszon detektálták. Az intracelluláris kalciumkoncentrációt a két gerjesztési hullámhosszon mért fluoreszcencia intenzitások hányadosából (F₃₄₀/F₃₈₀) számították (Grynkiewicz és mtsai, 1985) és az intracelluláris Ca²⁺-koncentrációkat *in vivo* kalibrációs görbe felhasználásával határozták meg (Csernoch és mtsai, 2002).

6. Citotoxicitási vizsgálatok

A citotoxicitást három módszerrel (MTT redukció, LDH kiszabadulás, propidium-jodid felvétel) határoztuk meg. A sejtek mitokondriális enzimaktivitásának mérésén alapuló **kolorimetriás MTT tesztet** az irodalomban korábbiakban leírtak alapján (Szabó és mtsai 2001) végeztük. Ennek során a HaCaT sejteket 96 lyukú szövettenyésztő plate-en 30 percig előkezeltük 0-2,5 µM BAPTA-AM, 5 mM glutation (redukált forma), 5 mM N-

acetyl-cisztein, illetve 2,5 kU/ml szuperoxid diszmutáz + 4 kU/ml kataláz oldatokkal. Ezt követően kezeltük a sejteket különböző koncentrációjú peroxinitrittel, a peroxinitritet kibocsájtó SIN-1-gyel, a hidrogén-peroxiddal, illetve a szuperoxidot termelő xantin + xantin-oxidáz rendszerrel (500 μ M xantin + 10 mU/ml xantin-oxidáz). Az oxidatív stresszt kiváltó vegyületeket olyan koncentrációkban alkalmaztuk, hogy a kezelés a sejtek túlélőképességét 20-40 %-ra csökkentse, mivel ez az a tartomány, ahol a citoprotektív hatás vizsgálatára irányuló mérések a legérzékenyebbek. A négy órás kezelést követően 0,5 mg/ml MTT oldatban (3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]2,5-difenil-tetrazolium bromid) inkubáltuk a sejteket további 1 órán át. A sejteken lévő médiumot eltávolítottuk és a képződött formazán kristályokat feloldottuk 100 μ l DMSO-ban. Az abszorbanciát Multiscan MS plate-reader készülékkel (Labsystem, Vaanta, Finnország) 550 nm mérési hullámhosszon és 690 nm referencia hullámhosszon határoztuk meg.

A citotoxicitás egy másik jellemző paraméterét a **laktát-dehidrogenáz felszabadulást** a kereskedelmi forgalomban kapható „LDH activity assay kit” (Roche, Basel, Svájc) segítségével mértük. A módszer a kezelés következtében sérült sejtekből kiszabaduló laktát-dehidrogenáz spektrofotometriás mérésén alapszik. A mérést 96 lyukú szövettenyésztő plate-en végeztük, követve a gyártó utasításait.

Az oxidatív stressz által kiváltott citotoxicitás mértékét **propidium-jodid felvétellel** is követtük. Ismeretes, hogy a propidium-jodid kizárólag a sérült membránnal rendelkező sejtekbe jut be, és a DNS-hez kötődve fluoreszkál. Így a kezeletlen és a különböző módon kezelt sejt kultúrákban a festődő sejtek száma jelzi az oxidatív stressz által kiváltott citotoxicitás mértékét. A 12 lyukú szövettenyésztő plate-ben, a fedőlemezekben tenyésztett sejteket 37°C-on 4 órán át kezeltük különböző koncentrációjú peroxinitrittel, illetve hidrogén-peroxiddal. Ezt követően a médiumot 5 μ g/ml propidium-jodidot (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) tartalmazó RPMI oldatra cseréltük, és 37°C-on 30 percig tartó inkubálás után a mintákat PBS-sel mostuk (2x5 perc), majd a fedőlemezeket Vectashield-del (Vetor Laboratories, Burlingame, CA, USA) rögzítettük tárgylemezen. A mikroszkópos vizsgálatokat Zeiss AxioLab mikroszkóppal végeztük, a felvételeket Zeiss AxioCam kamerával rögzítettük.

7. Sejtes PARP aktivitás mérése [3 H]-NAD $^+$ felhasználásával

A PARP aktivitást a korábbiakban leírt módon (Szabó és mtsai, 2001) határoztuk meg. A húsz perces peroxinitrit kezelés után a sejtek médiumát eltávolítottuk, és 500 μ l

PARP reakcióelegyre (56 mM HEPES, 28 mM KCl, 28 mM NaCl, 2mM MgCl₂, 0,01 % digitonin, és 0,125 μ M ³H-NAD⁺ [0,5 μ Ci/ml] pH=7,5) cseréltük. Majd 37°C-on 10 percig tartó inkubálást követően a sejteket felkapartuk és Eppendorf csövekbe raktuk. Ezután 200 μ l jéghideg 50 % triklór-ecetsav (TCA) hozzáadásával kicsaptuk a fehérjéket, a mintákat 4 órán át 4°C-on tartottuk, és centrifugáltuk (10000 x g, 10 perc). A csapadékot kétszer mostuk jéghideg 5 % TCA oldattal, majd hozzáadtunk 250 μ l 2 % SDS / 0,1 M NaOH oldatot, és egy éjszakán át 37°C-on oldódni hagytuk. Másnap a mintákból készített oldatot az Eppendorf csövekből 7-7 ml ScintiSafe Plus szcintillációs folyadékhoz adtuk. A radioaktivitást folyadékszscintillációs számlálóban (Wallach, Gaithersburg, MD, USA) mértük.

8. Sejtes PARP aktivitás enzimeitokémiai kimutatása

A sejtes PARP aktivitás *in situ* meghatározását elvégeztük a biotinnal jelölt NAD⁺ szubsztrát beépülésén alapuló enzimeitokémiai módszerrel is. Ennek során a 12 lyukú szövettenyésztő plate-ben, a fedőlemezekben tenyésztett sejteket 20 percig kezeltük különböző koncentrációjú peroxinitrittel, illetve hidrogén-peroxiddal. Ezt követően a médiumot PARP reakcióelegyre cseréltük (56 mM HEPES pH=8,0, 28 mM KCl, 28 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, amelyhez közvetlenül a felhasználás előtt még 0,01 % digitonint és 12,5 μ M biotinilált-NAD⁺-ot [R&D Systems, Minneapolis, MN, USA] adtunk). A sejteket 37°C-on 1 óráig inkubáltuk, majd 95 % etanollal -20°C-on 10 percig fixáltuk, ezután a PARP aktivitást (-20°C-on 10 percig) 10 % TCA kezeléssel blokkoltuk. Ezt követően 10 percig rehidratáltuk a sejteket szobahőmérsékleten PBS oldatban (pH=7,4). Az endogén peroxidáz aktivitást 0,5 % H₂O₂ / metanol elegyének 15 perces inkubálásával blokkoltuk. A sejteket ezután PBS oldattal mostuk (2x5 perc), majd a nem specifikus fehérjekötődések blokkolásához a sejteket szobahőmérsékleten 30 percig inkubáltuk 1 % BSA-t és 0,1 % Triton-X-t tartalmazó PBS oldatban. Kétszeri PBS - 0,1 % Triton-X mosást követően a beépült biotint (1:100 arányban hígítva PBS - 0,1 % Triton-X oldatban) streptavidinnal konjugált peroxidázzal (Trevigen, Gaithersburg, MD, USA) mutattuk ki. A sejteket PBS oldattal mostuk (4x5 perc), majd a színreakciót nikkel-DAB (3,3'-diamino-benzidin) szubsztráttal végeztük: a sejteket szobahőmérsékleten 4 percig inkubáltuk nikkel-DAB oldatban (95 mg DAB, 1,6 g NaCl, 2 g nikkel-szulfát és 25 μ l 30 % hidrogén-peroxid 0,1 M acetát pufferben pH=6,0 oldva). A festődés intenzitásának növeléséhez a mintákat TRIS-kobalt oldatban (1,2 g TRIS pH=7,2 és 1 g kobalt-klorid 200 ml desztillált vízben) 5

percig inkubáltuk. A fedőlemezeket glicerinnel rögzítettük a tárgylemezeken. Egyes kísérletekben a polimerláncba beépült biotint fluoreszcens módszerrel, streptavidinnel konjugált AlexaFluor⁴⁸⁸ fluorokrómmal (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) 1:100 arányban hígítva PBS – 0,1 % Triton-X oldatban is kimutattuk. Szobahőmérsékleten harminc percig tartó inkubálás után a mintákat PBS-sel mostuk (2x5 perc), majd a fedőlemezeket Vectashield-del rögzítettük tárgylemezen.

9. PARP aktivitás kimutatása enzimhisztokémiai módszerrel

A PARP aktivitás kimutatását elvégeztük bőrszöveten is. Ennek során a fagyasztott metszeteket (10 µm) -20°C-on 10 percig fixáltuk 95 % etanolban, majd mostuk PBS (pH=7,4) oldatban. A metszeteket 15 percig permeabilizáltuk 1 % Triton X-100-at tartalmazó TRIS pufferben (pH=8,0). Az enzimreakciót és a színreakciót az enzimcitokémiai módszernél leírtakkal azonos módon végeztük.

10. PARP aktivitás vizsgálata sejtes ELISA módszerrel

A mérést 96 lyukú szövettenyésztő plate-en végeztük. Ennek során a J774 makrofágokban 20 perces hidrogén-peroxid kezeléssel (100 - 400 µM) PARP aktivációt indukáltunk. Ezt követően a médiumot PARP reakció pufferre (56 mM HEPES, 28 mM KCl, 28 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 0,01 % digitonin és 12,5 µM biotinilált NAD⁺ pH=8,0) cseréltük. 37°C-on egy órán keresztül tartó inkubáció után a puffert eltávolítottuk, és 200 µl jéghideg 95 % etanolban -20°C-on 10 percig fixáltuk a sejteket. Az endogén peroxidáz aktivitást 0,5% hidrogén-peroxidot tartalmazó metanolban 15 percig tartó kezeléssel gátoltuk. PBS oldattal (300 µl) mostuk a makrofágokat, majd 37°C-on 30 percig 1 % BSA/PBS oldatban blokkoltuk a nem specifikus kötődések kialakulását. PBS mosást követően a beépült biotint streptavidinnel konjugált peroxidázzal (Trevigen, Gaithersburg, MD) (1:500 arányban hígítva 1 % BSA-t tartalmazó PBS oldattal) mutattuk ki. Harminc perces inkubációt (37°C) követően a színreakciót mintánként 100 µl TACS-Saphire szubsztráttal (Trevigen, Gaithersburg, MD) végeztük. Az abszorbanciát mikroplate spektrofotométerrel határoztuk meg (Molecular Devices; Sunnyvale, CA).

11. Kaszpáz aktivitás meghatározása

A kaszpáz aktivitást a kereskedelmi forgalomban kapható kittel (Calbiochem, San Diego, CA) mértük, a gyártó utasításait követve. Az áramlási citometriás meghatározás

során PhiPhiLux fluorogén peptidszubsztrátot használtunk. Ez a két fluorokrómmal konjugált peptid tartalmazza a kaszpáz-3 szerű proteináz enzimek hasítási helyéül szolgáló DEVD szekvenciát. Az intakt peptidben a fluorokrómok egymást „quenchem”, míg a kaszpázok hasítása után a festékek egymástól eltávolodnak, és fluoreszcencia növekedésük mérhető lesz. Kísérleteink során a 6 órán át tartó peroxinitrit kezelést követően felkapartuk, majd centrifugáltuk a sejteket. A felülúszó eltávolítása után a mintákat szuszpendáltuk a szubsztrátot tartalmazó oldatban, majd 37°C-on, 1 órás inkubációt követően a kaszpáz aktivitást áramlási citometriás méréssel határoztuk meg.

12. Poli(ADP-ribóz) kimutatása immuncitokémiai módszerrel

A PARP által szintetizált polimert az irodalomban leírtak alapján (Bürkle és mtsai, 1993) immuncitokémiai módszerrel mutattuk ki. A 12 lyukú szövettenyésztő plate-ben, a fedőlemezekben tenyésztett HaCaT sejteket 37°C-on 20 percig kezeltük különböző koncentrációjú peroxinitrittel, illetve hidrogén-peroxiddal. Ezt követően jéghideg, 10 % triklórecetsavval -20°C-on 10 percig fixáltuk, majd dehidráltuk a sejteket -20°C-on 70 %, 90 % és 100 % etanollal 5-5 percig. A rehidráltat szobahőmérsékleten 10 perces 0,1 M PBS (pH=7.4) oldattal történő inkubációval végeztük. Az aspecifikus kötődéseket 5 % lószérumban (Vetor Laboratories, Burlingame, CA, USA) szobahőmérsékleten 1 órás inkubálással blokkoltuk. A poli(ADP-ribóz) kimutatásához egér monoklonális antitestet használtunk, amit Dr. Alexander Bürkle-től (University of Konstanz, Németország) kaptunk. A primer antitesttel 1:300 hígításban 4°C-on egy éjszakán keresztül inkubáltuk a sejteket. A mintákat másnap mostuk PBS oldattal (5x5 perc), és lóban termeltetett biotinilált anti-egér IgG-vel (Vetor Laboratories, Burlingame, CA, USA) (1:200 hígításban) szobahőmérsékleten 1 órán át tartó inkubációt követően PBS oldattal (2x5 perc) mostuk a nem kötődött antitestek eltávolítása érdekében. Az immunreakciót avidin-biotin komplex (ABC: Vetor Laboratories, Burlingame, CA, USA) alkalmazásával mutattuk ki. Az előhívást Ni-DAB szubsztráttal végeztük. Ezt követően a fedőlemezeket glicerinnel rögzítettük tárgylemezen.

13. Sejtek NAD⁺ koncentrációjának meghatározása

A sejtekben megtalálható NAD⁺ mennyiségét a korábbiakban közölt módon végeztük (Ying és mtsai 2001) az alábbi módosításokkal. A peroxinitrit, illetve hidrogén-peroxid kezelést követően a sejteket 0,5 M HClO₄ oldatban feltártuk, majd az lizátumot 3 M KCl - 125 mM glicil-glicin pufferrel (pH=7,4) semlegesítettük. Centrifugálás (10,000 x

g, 5 perc) után 20 µl felülúszót adtunk 230 µl - előzőleg 37°C-on 10 percig előinkubált - NAD⁺-reakcióelegyhez (összetétele: 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). Az abszorbanciát a reakció indításakor és azt követően tíz perccel Multiscan MS plate-reader készülékkel (Labsystem, Finnország) 560 nm-en mértük.

14. 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.

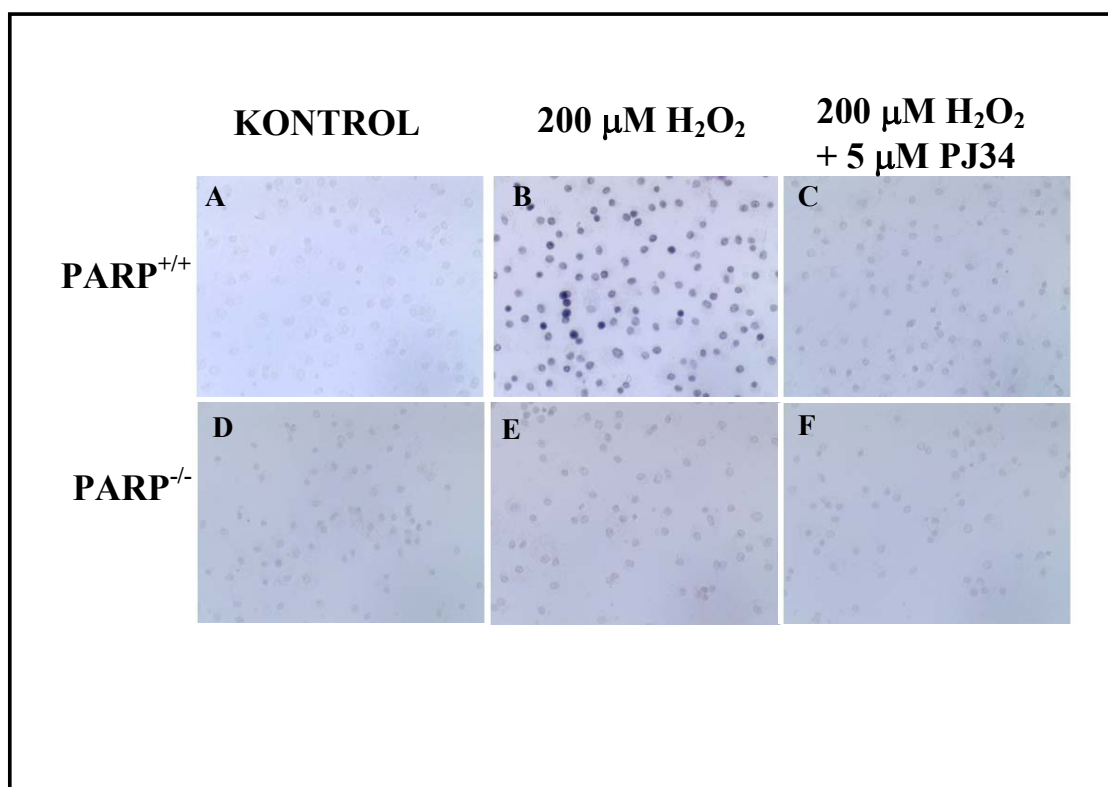
EREDMÉNYEK

1. PARP aktiváció kimutatása biotinnal-jelölt NAD^+ felhasználásával

A PARP aktivitás kimutatására leggyakrabban alkalmazott módszerben (Schraufstatter és mtsai, 1986) [^3H]-mal jelölt NAD^+ -ot használnak. 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.

1.1. A biotinnal jelölt NAD^+ felhasználásán alapuló módszer specifitása

Első lépésben azt kívántuk igazolni, hogy módszerünkkel a PARP működése során a polimerláncba beépített – előzőleg jelölt – ADP-ribóz egységeket detektáljuk. Ennek érdekében vad típusú és PARP-1 hiányos egerek hasüregéből izolált makrofágokon végeztünk immuncitokémiai vizsgálatot (1.1. ábra). Hidrogén- peroxiddal ($200\ \mu\text{M}$) történő kezelést követően kizárólag a vad típusú makrofág sejtek magjaiban tapasztaltuk a PARP aktivitás fokozódását. A biotinnal jelölt NAD^+ beépülése specifikus PARP gátlószerekkel, 3-aminobenzamiddal és PJ-34-gyel, teljes mértékben gátolható volt. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a biotinnal jelölt NAD^+ polimerláncba történő beépülése valóban a PARP-1 működésének tulajdonítható.

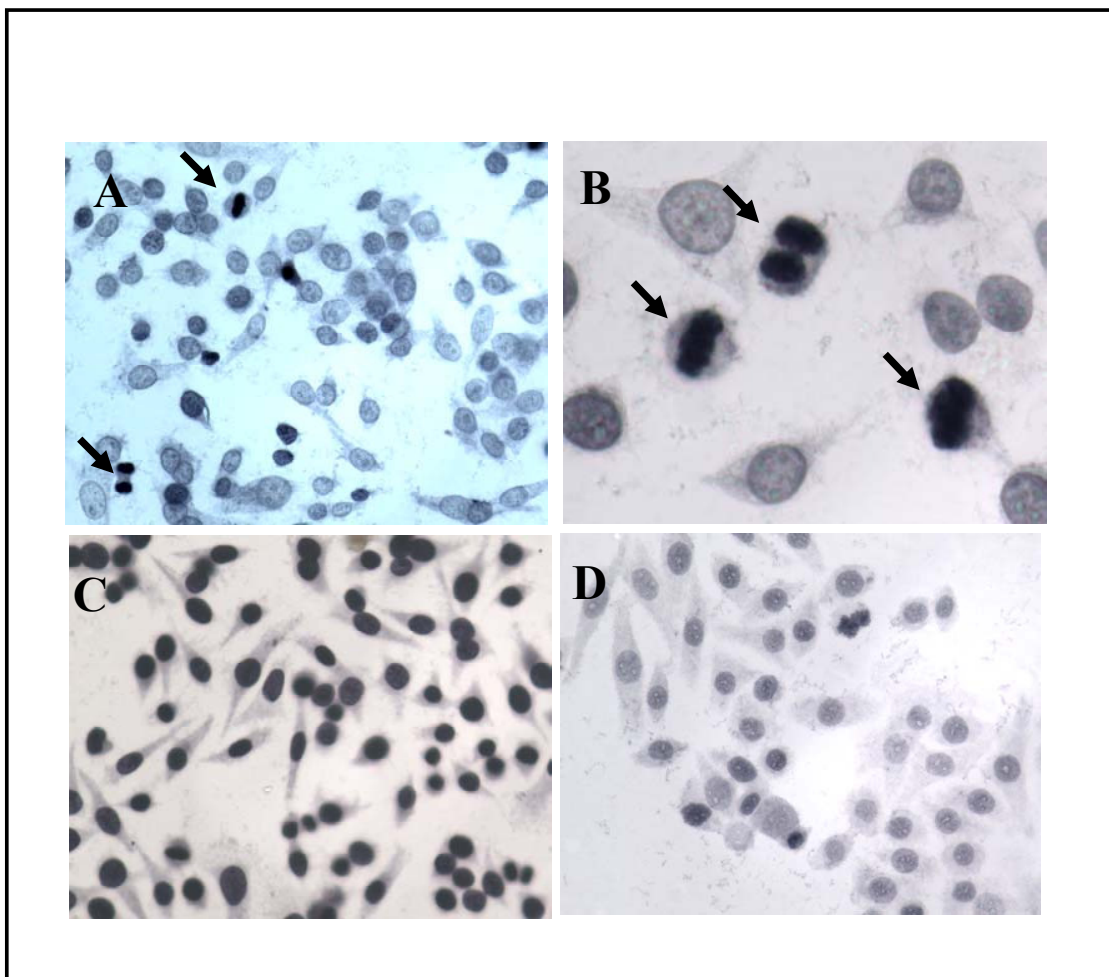


1.1. ábra. A hidrogén-peroxid által kiváltott poli-ADP-riboziláció kimutatása peritoneális egér makrofágokban enzimidokémiai módszerrel

A vad típusú ($\text{PARP}^{+/+}$) (B) és PARP hiányos ($\text{PARP}^{-/-}$) (E) egerek hasüregéből izolált makrofágokat $200 \mu\text{M}$ hidrogén-peroxiddal kezeltük. A sejtes PARP aktivitást a beépült, biotinnal jelölt NAD^+ detektálásán alapuló, enzimidokémiai módszerrel mutattuk ki. Hidrogén-peroxiddal történő kezelést követően kizárólag a vad típusú makrofág sejtek magjaiban tapasztaltuk a PARP aktivitás fokozódását. A PARP enzim ismert inhibitorával, PJ-34-gyel (C, F) a biotinnal jelölt NAD^+ beépülése teljes mértékben gátolható volt.

1.2. A PARP aktivitás kimutatása J774 makrofágokban enzimidokémiai módszerrel

A biotinnal jelölt NAD^+ szubsztrát felhasználásával történő enzimidokémiai festést tenyésztett J774 makrofág sejteken is elvégeztük. Az 1.2. ábrán szerint a festődés minden esetben elsősorban a sejtek magjaiban figyelhető meg. Ez arra utal, hogy a biotinilált- NAD^+ metabolizmusáért felelős enzim a sejtmagban lokalizálódik. Csekély mértékű festődés a sejtek többségében megfigyelhető, ami azt jelzi, hogy a poli-ADP-riboziláció külső stimulustól mentes körülmények között is folyamatosan lejátsszódik a sejtekben. Az interfázisban lévő sejtekkel ellentétben az osztódó sejtekben rendkívül intenzív magfestődést tapasztaltunk. A PARP inhibitor PJ-34-gyel történő előkezelés gátolta az enzimaktivitást.



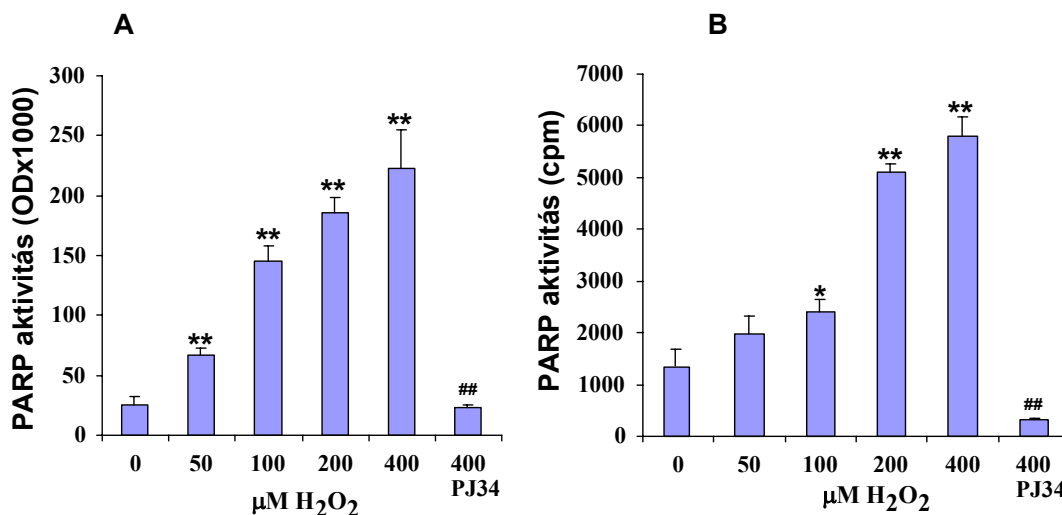
1.2. ábra. Hidrogén-peroxid által kiváltott poli-ADP-ribóziláció kimutatása J774 makrofágokban enzimidokémiai módszerrel

A kezeletlen (A, B) és az 500 μM hidrogén-peroxiddal kezelt (C, D) sejtekben a beépült, biotinnal jelölt NAD^+ detektálásán alapuló enzimidokémiai módszerrel mutattuk ki a PARP aktivitást. A hidrogén peroxiddal kezelt sejtekben kimutatott fokozott poli-ADP-ribózilációt (C) a PARP inhibitor PJ-34 (5 μM) gyakorlatilag a kontrollnak megfelelő szintre csökkentette (D).

1.3. A PARP aktivitás fokozódásának meghatározása J774 makrofágokban sejtes ELISA módszerrel

Az általunk kidolgozott sejtes ELISA módszer alkalmas a PARP aktivitás kvantitatív meghatározására is. 96 lyukú szövettenyésztő plate-en tenyésztett J774 makrofágokat kezeltünk különböző koncentrációjú hidrogén-peroxiddal (50-400 μM), és

mértük a kezelés hatására bekövetkező abszorbancia-változást. Hidrogén-peroxid kezelést követően a PARP aktivitás a hidrogén-peroxid koncentrációjával arányosan fokozódott (1.3. ábra).



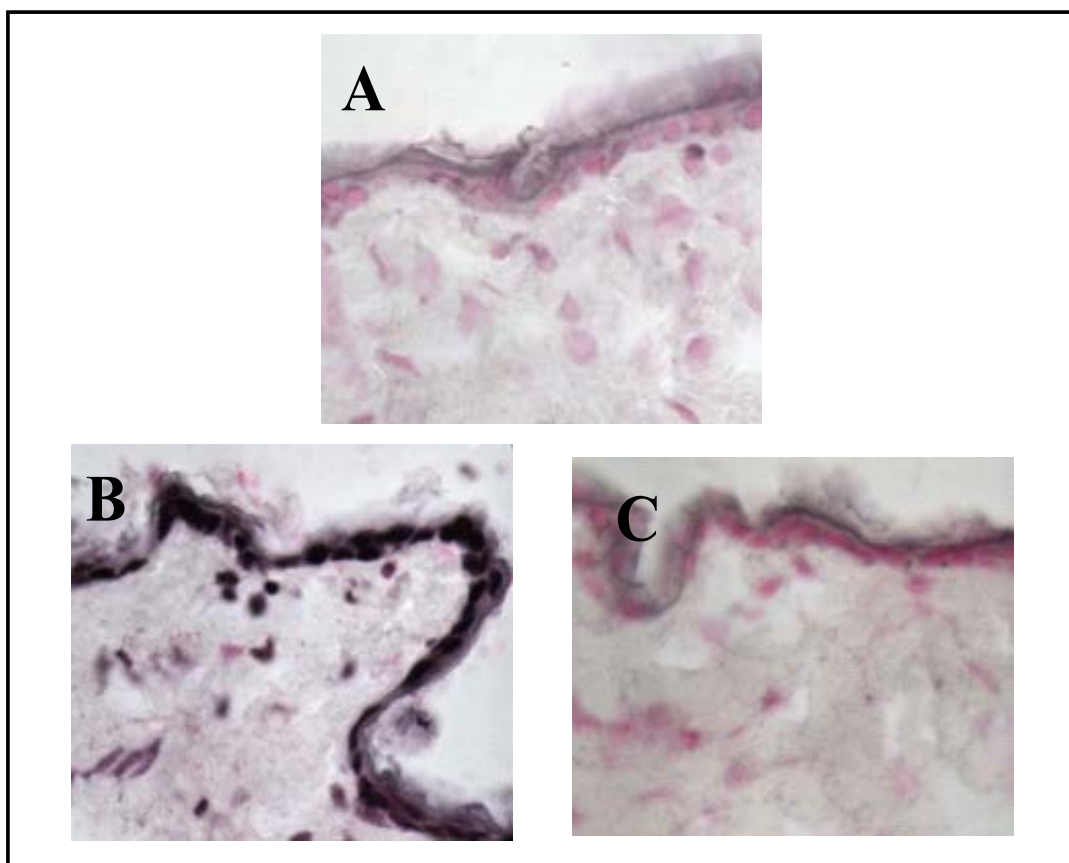
1.3. ábra. Hidrogén-peroxid által kiváltott PARP aktivitás kvantitatív meghatározása J774 makrofágokban

Az ábrán feltüntetett koncentrációkban kezeltük a J774 sejteket hidrogén-peroxiddal. Az oxidatív stressz által indukált PARP aktivitás mértékét sejtes ELISA módszerrel (A) és a beépült, [³H]-NAD⁺ beépülésének meghatározásán alapuló módszerrel (B) mértük. A két mérés egymással jó korrelációt ($r^2 = 0,92$) mutatott. Az adatok 4 reprezentatív mérés átlagát, ($\pm$ SD) mutatják be. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ a kontrollhoz képest szignifikáns emelkedés; ## $p < 0,01$ a gátlószer szignifikáns hatása)

A PARP inhibitor PJ34 az alkalmazott rendszerben kimutatott PARP aktivitást gátolta. Az általunk kidolgozott sejtes ELISA módszerrel kapott eredmények jó korrelációt ($r^2 = 0,92$) mutattak a hagyományos, [³H] radioaktív izotóppal jelölt NAD⁺ beépülés kimutatásán alapuló PARP aktivitásmérések eredményeivel.

1.4. PARP aktivitás kimutatása bőrben enzimhisztokémiai módszerrel

Módszerünk nemcsak sejtes rendszerekben, hanem szövetminták estében is alkalmazható a PARP aktivitás kimutatására. Ennek érdekében hidrogén-peroxiddal kezelt egerek hátbőréből készített fagyasztott metszeteken végeztünk enzimhisztokémiai vizsgálatokat. A kontroll egerek bőréből készített metszetekhez képest a kezelt állatok esetében jelentős PARP aktivitásfokozódás volt megfigyelhető, amit az intenzív festődés jelzett (1.4. ábra). PARP inhibitorok, 3-aminobenzamid és PJ-34, gátolták a biotinilált-NAD⁺ beépülését, bizonyítva ezzel, hogy a festődés valóban PARP aktivitást detektál.



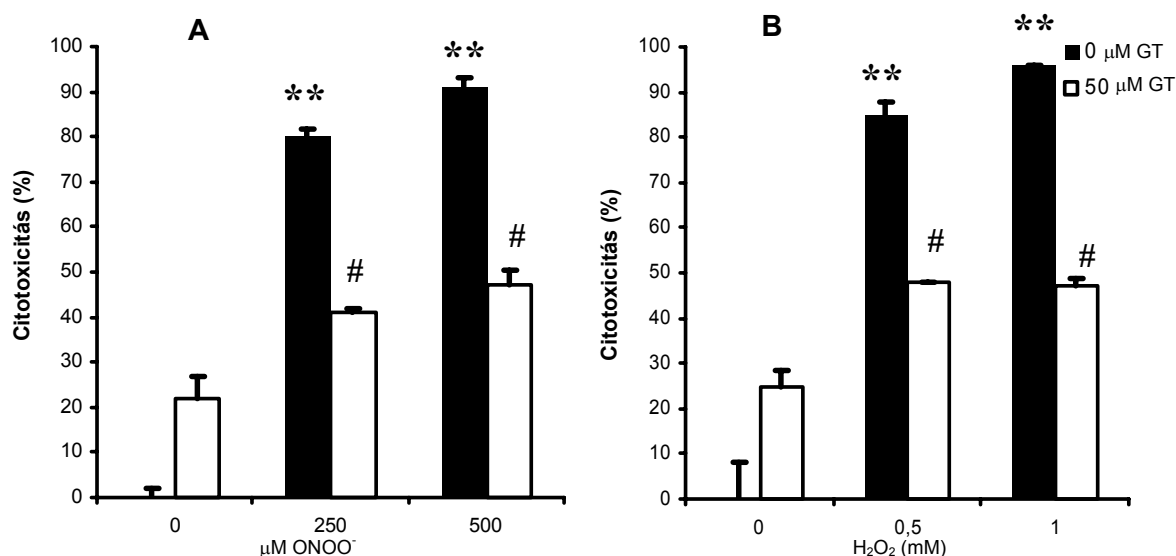
1.4. ábra. PARP aktivitás kimutatása hidrogén-peroxiddal kezelt egerek bőrben enzimhisztokémiai módszerrel

A kezeletlen (A) és a hidrogén-peroxiddal kezelt (B, C) egerek bőrből készített fagyasztott metszetekben a biotinnal jelölt NAD^+ detektálásán alapuló enzimcitokémiai módszerrel mutattuk ki a PARP aktivitást. (C) 5mM PARP inhibitor 3-amino-benzamiddal előkezelt metszet.

2. Gallotannin hatása a PARG és PARP enzimek aktivitására

2.1. A gallotannin citoprotektív hatása az oxidatív stresszben

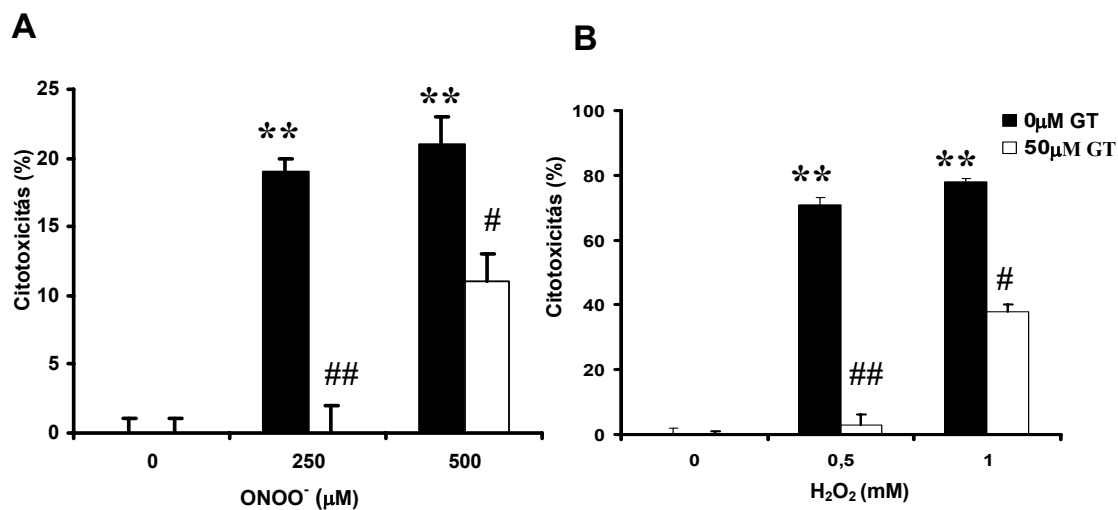
Kísérleteink első lépéseként azt vizsgáltuk, hogy a PARP aktiváció módosításával befolyásolható-e az oxidatív tényezők károsító hatása. Ennek érdekében azt vizsgáltuk, hogy a PARG inhibitoroként ismert gallotannin rendelkezik-e a PARP gátlószerekéhez hasonló citoprotektív hatással. Méréseink eredményei alátámasztják a gallotannin oxidatív stresszben feltételezett védő szerepét. Mind a hidrogén-peroxiddal, mind a peroxinitrittel kezelt sejtek esetében az oxidatív stressz által kiváltott – a korábbiakban már ismertetett **MTT módszerrel** detektált – citotoxicitás minden esetben jelentős mértékben csökkent a gallotanninnal előkezelt sejtekben (2.1.a. ábra).



2.1.a. ábra. Oxidatív stressz hatása a HaCaT sejtek viabilitására

A HaCaT keratinocitákat 37°C-on 30 percig előkezeltük 50 μM gallotanninnal (GT), majd az ábrán feltüntetett koncentrációjú hidrogén-peroxiddal, illetve peroxinitrittel oxidatív stresszt indukáltunk a sejtekben. Négy óra után MTT teszttel vizsgáltuk a mitokondriális enzimaktivitást. Ahogyan az látható, mind a peroxinitrit (**A**), mind pedig a hidrogén-peroxid (**B**) által kiváltott nagy mértékű citotoxicitás szignifikáns mértékben lecsökkent a gallotanninnal kezelt sejtek esetében. Az adatok 4 reprezentatív mérés átlagát, ($\pm$ SD) mutatják be. (** $p < 0,01$ a kontrollhoz képest szignifikáns növekedés és; # $p < 0,05$ a gallotannin szignifikáns hatása)

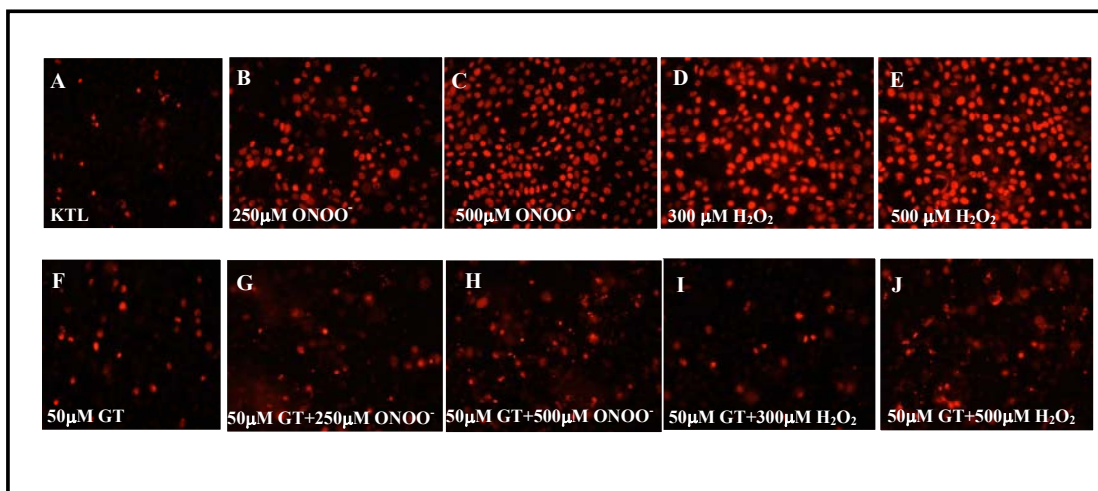
A citotoxicitás egy másik jellemző paramétere a sejtmembrán károsodásnak tulajdonítható **laktát-dehidrogenáz felszabadulás**. Kimutattuk, hogy már 50 μM gallotannin szignifikáns módon csökkentette a sejtekből kiáramló laktát-dehidrogenáz mennyiségét. (2.1.b. ábra)



2.1.b. ábra. Oxidatív stressz hatása a HaCaT keratinociták sejtmembrán integritására

A HaCaT keratinocitákat 37°C-on 30 percig előkezeltük 50 μM gallotanninnal (GT), majd az ábrán feltüntetett koncentrációkban kezeltük a sejteket hidrogén-peroxiddal, illetve peroxinitrittel. Négy óra után a citotoxicitás mértékét LDH módszerrel határoztuk meg. Az MTT módszer eredményeivel összhangban az LDH teszt eredményei is alátámasztják a gallotannin citoprotektív hatását mind peroxinitrit **(A)** mind pedig hidrogén-peroxid **(B)** által kiváltott oxidatív stressz esetében. Az adatok 6 reprezentatív mérés átlagát, ($\pm$ SD) mutatják be. (** $p < 0,01$ a kontrollhoz képest szignifikáns növekedés; ## $p < 0,01$ a gallotannin szignifikáns hatása)

A **propidium-jodid felvételén** alapuló citotoxicitási módszer is hasonló eredményeket mutatott. A módszer alapja az, hogy a fluorokróm propidium-jodid kizárólag a sérült membránnal rendelkező sejtek DNS-éhez kötődik. Így a kezeletlen és a különböző módon kezelt sejtkultúrákban a festődő sejtek száma jelzi az oxidatív stressz által kiváltott citotoxicitás mértékét. A gallotannin fokozta a sejtmembrán oxidatív stressz elleni védelmét, amit a propidium-jodiddal festődött sejtek számának jelentős mértékű csökkenése jelzett. (2.1.c. ábra)



2.1.c. ábra. Oxidatív stressz hatása a HaCaT keratinociták propidium-jodid felvételére

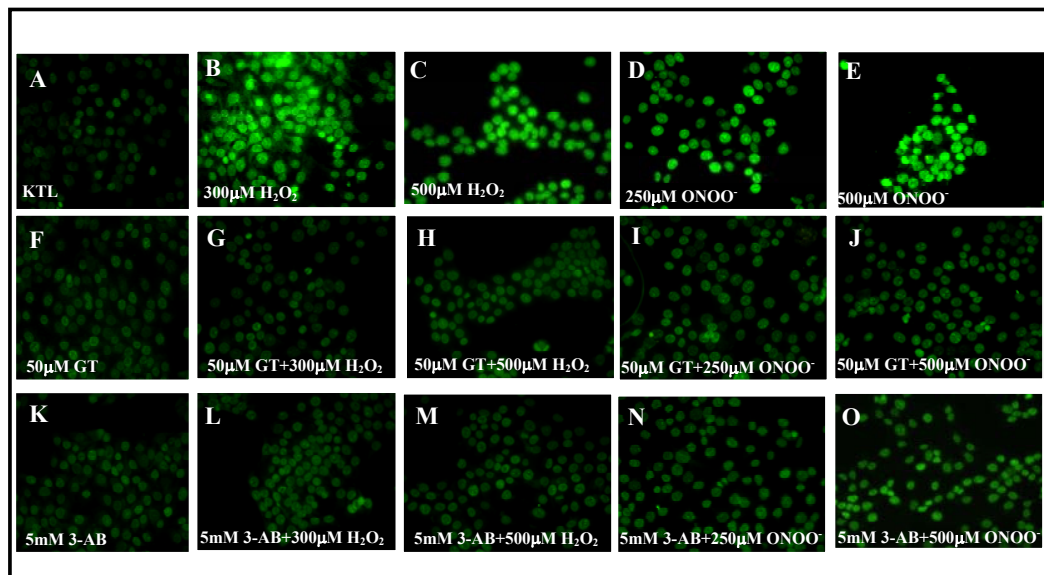
A HaCaT keratinocitákat 37°C-on 30 perces 50 μM gallotannin (GT) kezelést követően, az ábrán feltüntetett koncentrációjú hidrogén-peroxiddal, illetve peroxinitrittel oxidatív stresszt indukáltunk a sejtekben. Négy óra után a citotoxicitás mértékét a sejtek propidium-jodid festődése alapján mutattuk ki. A peroxinitrit- (B, C) és hidrogén-peroxid-kezelés (D, E) egyaránt nagy mértékben toxikus hatásúnak bizonyult, mely hatást a gallotannin előkezelés egyértelműen lecsökkentette a kontroll sejtekben (A) kimutatható szintre (G, H, I, J). Önmagában 50 μM gallotannin nem bizonyult citotoxikus hatásúnak (F).

Mindhárom citotoxicitást detektáló módszer eredményei arra engednek következtetni, hogy a PARC inhibitor gallotannin valóban citoprotektív hatású az oxidatív stressz-szel szemben.

2.2. 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-ribosiláció) folyamatának gátlása, vagy legalábbis visszaszorítása már számos kórfolyamat esetében citoprotektív hatású (Pacher és mtsai, 2002, Mabley és mtsai, 2001LAP). A biotinilált- NAD^+ beépülés detektálásán alapuló, *in situ* PARP aktivációt kimutató módszerünkkel kapott eredmények szerint mind a hidrogén-peroxid, mind a peroxinitrit által indukált oxidatív stresszt követő, jelentős mértékben fokozott PARP aktiváció teljes mértékben gátolható volt 50 μM gallotanninnal csakúgy, mint a jól ismert

PARP inhibitor 3-aminobezamiddal. A kezeletlen, valamint a kizárólag gallotannin, illetve 3-AB kezelést kapott sejtek önmagukban minimális PARP aktivitást mutattak (2.2. ábra).

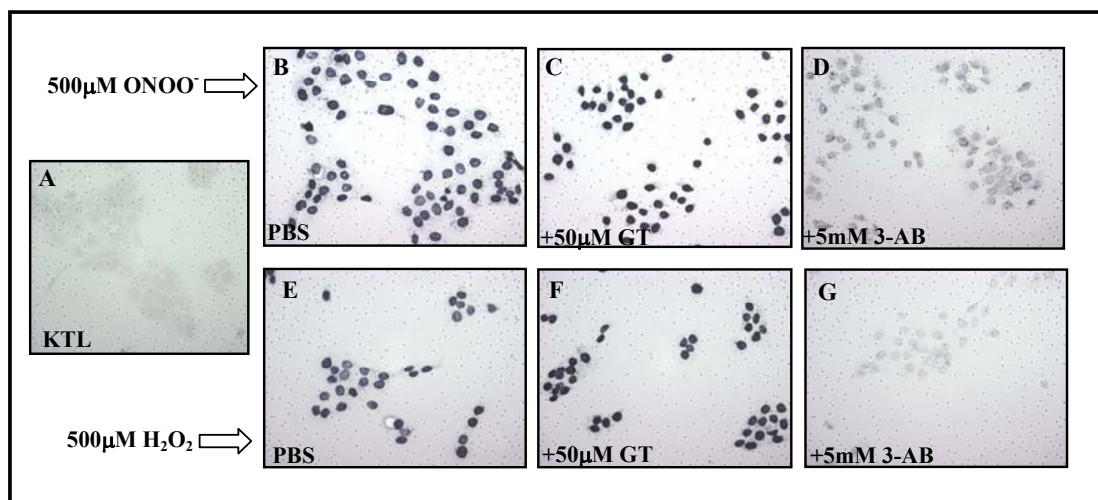


2.2. ábra Oxidatív stressz által stimulált PARP aktiváció kimutatása HaCaT keratinocitákban

Az ábrán feltüntetett koncentrációkban 20 percig 37°C-on kezeltük a HaCaT sejteket hidrogén-peroxiddal, illetve peroxinitrittel, majd a PARP aktivitás kimutatását enzimmikémiai módszerrel, biotinnal jelölt NAD^+ szubsztrát felhasználásával végeztük. A kontroll sejtekben (A) tapasztalható képest jelentős PARP enzimaktivitást figyeltünk meg a hidrogén-peroxid (B, C) és peroxinitrittel (D, E) kezelt sejtekben. Mind a PARP inhibitor 3-AB (L, M) és (N, O) mind pedig a PARP inhibitor gallotannin (G, H) és (I, J) gátolta a hidrogén-peroxid és peroxinitrit által kiváltott PARP aktivációt HaCaT sejtekben.

2.3. 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, mint azt a polimer immuncitokémiai módszerrel történő detektálásával kimutattuk. A PARP inhibitor 3-aminobenzamid jelenlétében nem tapasztaltunk kimutatható mértékű ADP-ribózilációt (3.3. ábra). Ezzel ellentétben, a gallotannin előkezelés nem csökkentette, hanem kissé fokozta az immuncitokémiával kimutatható poli(ADP-ribóz) mennyiségét. A kizárólag gallotannin kezelésben részesült sejtek esetében nem tapasztaltunk számottevő poli(ADP-ribóz) akkumulációt, ami arra utal, hogy a HaCaT sejtekben nem folyik jelentős mértékű bazális poli(ADP-ribóz) szintézis.

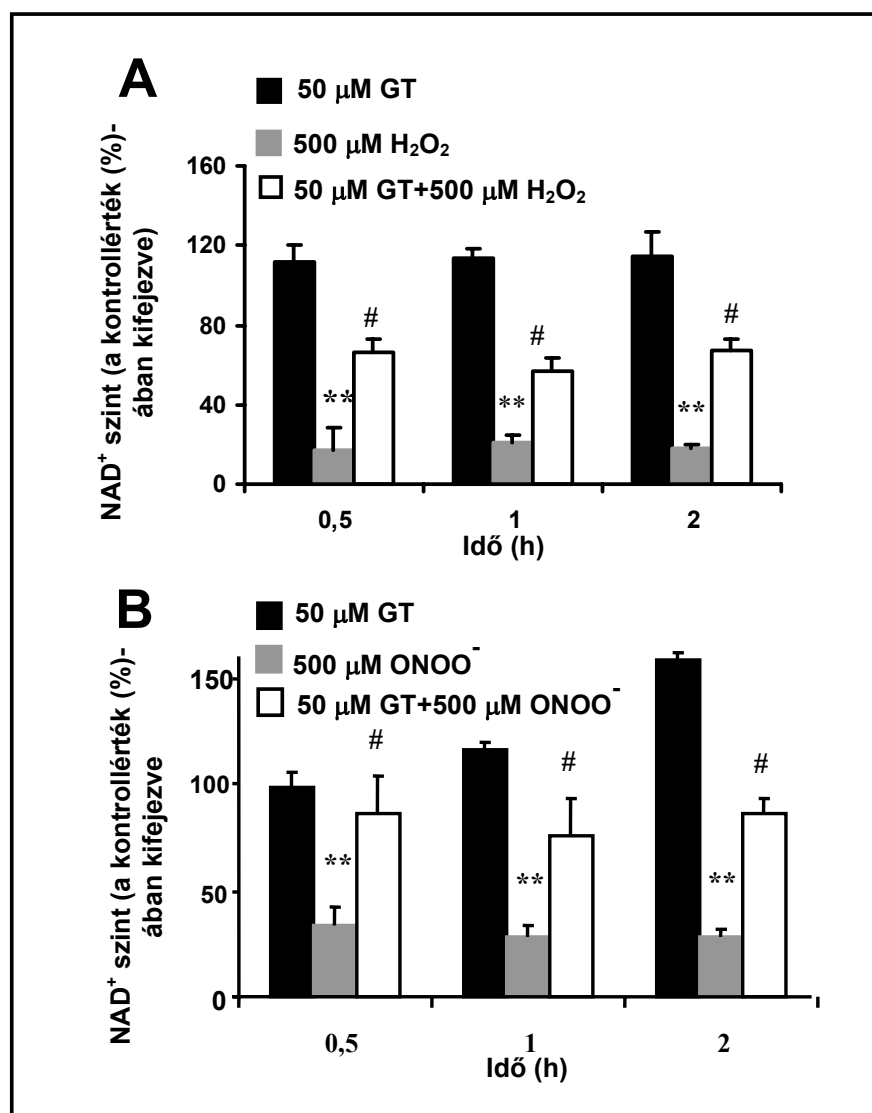


2.3. ábra. Oxidatív stressz hatása a HaCaT keratinociták poli(ADP-ribóz) akkumulációjára

A HaCaT sejtekben 37°C-on 20 percig tartó 500 μM peroxinitrit (B) és 500 μM hidrogén-peroxid (E) kezelés hatására a kontroll sejtekhez (A) képest megfigyelhető fokozott poli(ADP-ribóz) akkumulációt poli(ADP-ribóz) immuncitokémiai módszerrel mutattuk ki. A PARP inhibitor 3-aminobenzamid (3-AB) mindkét esetben gátolta a poli(ADP-ribóz) akkumulációt (egészen pontosan: közvetlenül annak szintézisét) (D, G). Ezzel ellentétben a PARP inhibitor gallotannin fokozta a termék akkumulációját (C, F). Önmagában sem 5 mM 3-AB, sem pedig 50 μM gallotannin nem okozott számottevő poli(ADP-ribóz) akkumulációt (az ábrán nem feltüntetett eredmény).

2.4. 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 peroxinitrrel kezelt sejtek esetében mérhető nagy mértékű NAD^+ felhasználást a gallotannin előkezelés szignifikáns módon csökkentette (2.4. ábra).



2.4. ábra. Oxidatív stressz hatása a HaCaT keratinociták NAD⁺ koncentrációjára

A peroxinitrittel és hidrogén-peroxiddal indukált oxidatív stresszt követően az ábrán feltüntetett időpontokban mértük a kontroll és a gallotanninnal kezelt sejtekben a NAD⁺ -koncentrációt. 500μM hidrogén-peroxid- (A) és 500μM peroxinitrit-kezelés (B) egyaránt jelentős mértékben lecsökkentette a HaCaT sejtekben mérhető NAD⁺ -koncentrációt. A gallotannin előkezelés hatására szignifikánsan kevésbé csökkent a hidrogén-peroxid- (A) és peroxinitrit kezelést (B) követően a sejtekben mérhető NAD⁺ mennyisége. Az adatok 6 reprezentatív mérés átlagát, (± SD) mutatják be. (*p<0,05, **p<0,01 a kontrollhoz képest szignifikáns csökkenés; (#p<0,05 a gallotannin szignifikáns hatása)

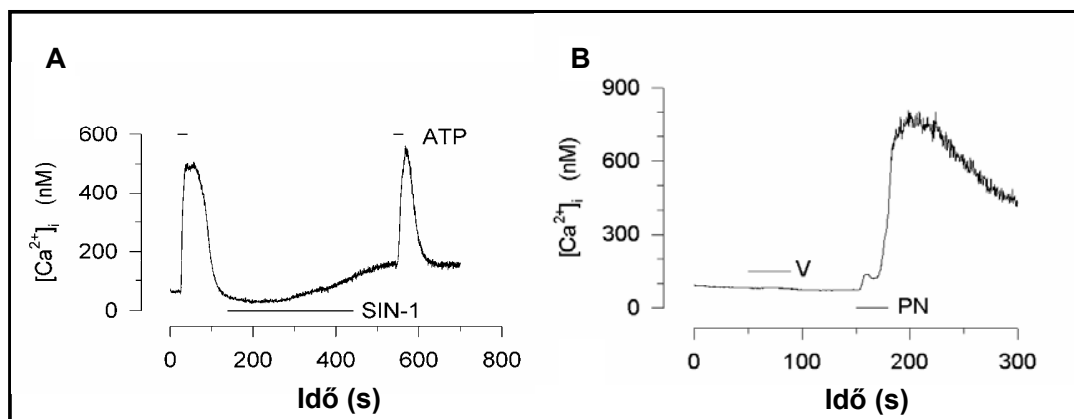
A gallotannin előkezelés esetében tapasztalt fokozott mértékű poli(ADP-ribóz) akkumuláció, illetve mérsékelt NAD⁺ felhasználás, valamint a PARP aktiváció gátlása alátámasztja azon feltételezésünket, hogy a gallotannin a PARP enzimet közvetett módon

gátolja: megakadályozza a PARP termékének, a lebontását, ami az enzim autoinhibícióját okozza.

3. Az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció szerepe az oxidatív stressz által indukált citotoxicitásban

3.1. A peroxinitrit hatása az intracelluláris Ca^{2+} -koncentrációra

Kísérleteink első lépésében azt vizsgáltuk, hogy a peroxinitrit donor SIN-1 okoz-e változást a HaCaT sejtek intracelluláris Ca^{2+} -koncentrációjában. Ennek érdekében peroxinitrit-donor SIN-1-gyel különböző koncentrációkban kezelt sejtekben mérték az intracelluláris Ca^{2+} -koncentrációt a kezelést megelőzően és azt követően.



3.1. ábra. A peroxinitrit hatása az intracelluláris Ca^{2+} -koncentrációra

A peroxinitrit donor SIN-1 (A) és az autentikus peroxinitrit (B) jelentős növekedést okozott a sejtek intracelluláris kalcium koncentrációjában

A kapott eredmények szerint a SIN-1 kezelés hatására az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció jelentős mértékben megnőtt (3.1. ábra). Ezután kérdésként merült fel az, hogy milyen forrásokból származhat a citoplazmába kerülő nagy mennyiségű Ca^{2+} ? Ezért munkatársaink megismételték az előző kísérletet azzal a módosítással, hogy az extracelluláris tér nem tartalmazott Ca^{2+} -t. Ilyen körülmények között a SIN-1-gyel történő kezelést követően kizárólag az intracelluláris raktárak jöhettek szóba, mint potenciális Ca^{2+} -források. A mérési eredmények az előzőekben tapasztaltnál kisebb mértékű intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció-növekedést mutattak. Ezek alapján arra következtetünk, hogy a SIN-1 hatására a citoplazmába áramló Ca^{2+} ionok elsődleges forrása elsősorban az extracelluláris Ca^{2+} , az intracelluláris raktárakból felszabaduló Ca^{2+} mennyisége csak kisebb mértékben járul hozzá a mért Ca^{2+} -koncentráció növekedéséhez.

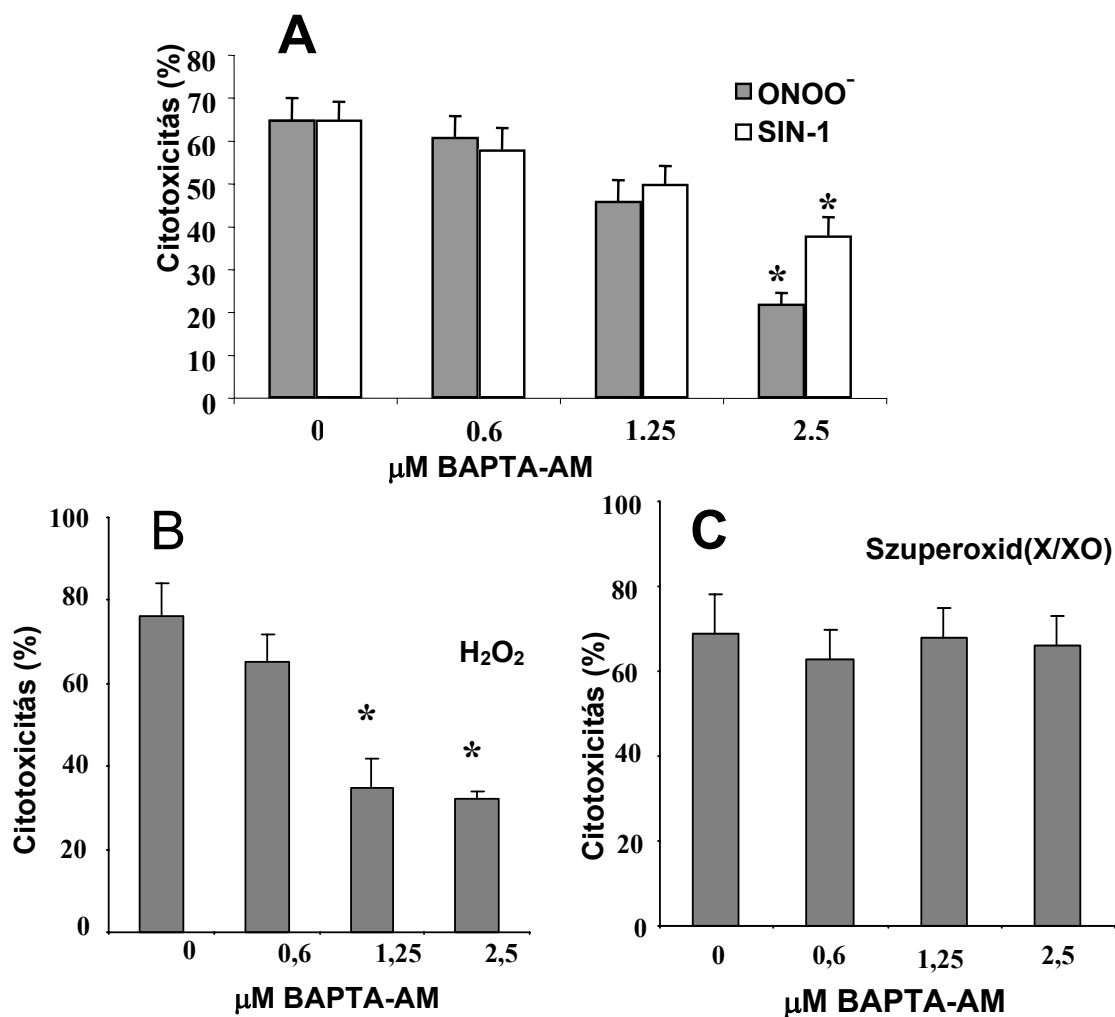
Vizsgálták az autentikus peroxinitrit hatását is a sejtekre. A 3.1. ábra szerint már 10 μM peroxinitrit hatására szignifikánsan megnőtt az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció, és a peroxinitrit közegből történő eltávolítása után sem változott jelentős mértékben. Ezen megfigyelések alapján feltételezhető, hogy a kísérletekben tapasztalt jelenségek a peroxinitrit membránkárosító hatásának tulajdoníthatóak. Az a tény, hogy a peroxinitrit rendszerből történő eltávolítást követően az oxidatív stressz által kiváltott intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció rendkívül kis mértékben ugyan, de mégis csökkent, arra utal, hogy bár a sejtmembrán nagy részben sérült, ám károsodása nem teljes mértékű. Kontroll kísérletekben sem a peroxinitrit oldószereként használt puffer ($\text{pH}=11$), sem a peroxinitrit bomlástermékei nem eredményeztek számottevő változást az intracelluláris Ca^{2+} -koncentrációban.

3.2.a. A kalciumjel szerepe a peroxinitrit citotoxikus hatásában

Korábbi munkánk során már igazoltuk, a peroxinitrit HaCaT sejtekre gyakorolt citotoxikus hatását (Szabó és mtsai 2001). A továbbiakban azt vizsgáltuk, hogy a peroxinitrit által kiváltott Ca^{2+} -mobilizáció hozzájárul-e az oxidáns citotoxikus hatásához. A mitokondriális enzimaktivitás detektálásán alapuló 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 (3.2. ábra). Hasonló, bár kisebb mértékű citoprotektív hatást tapasztaltunk BAPTA-AM előkezelés esetében a peroxinitrit-donor SIN-1-gyel kiváltott oxidatív stressz esetében. A citotoxicitási vizsgálatok eredményei alapján joggal feltételezhető, hogy az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció növekedése hozzájárul a peroxinitrit által stimulált citotoxicitáshoz.

3.2.b. Hidrogén-peroxid és szuperoxid-anionnal indukált oxidatív stressz vizsgálata

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 (3.2. ábra). 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. A szuperoxid-anion által kiváltott sejthalál ezzel szemben egyértelműen gátolható gyökfogó vegyületekkel (N-acetil-cisztein, redukált glutation és szuperoxid-diszmutáz/kataláz rendszer).

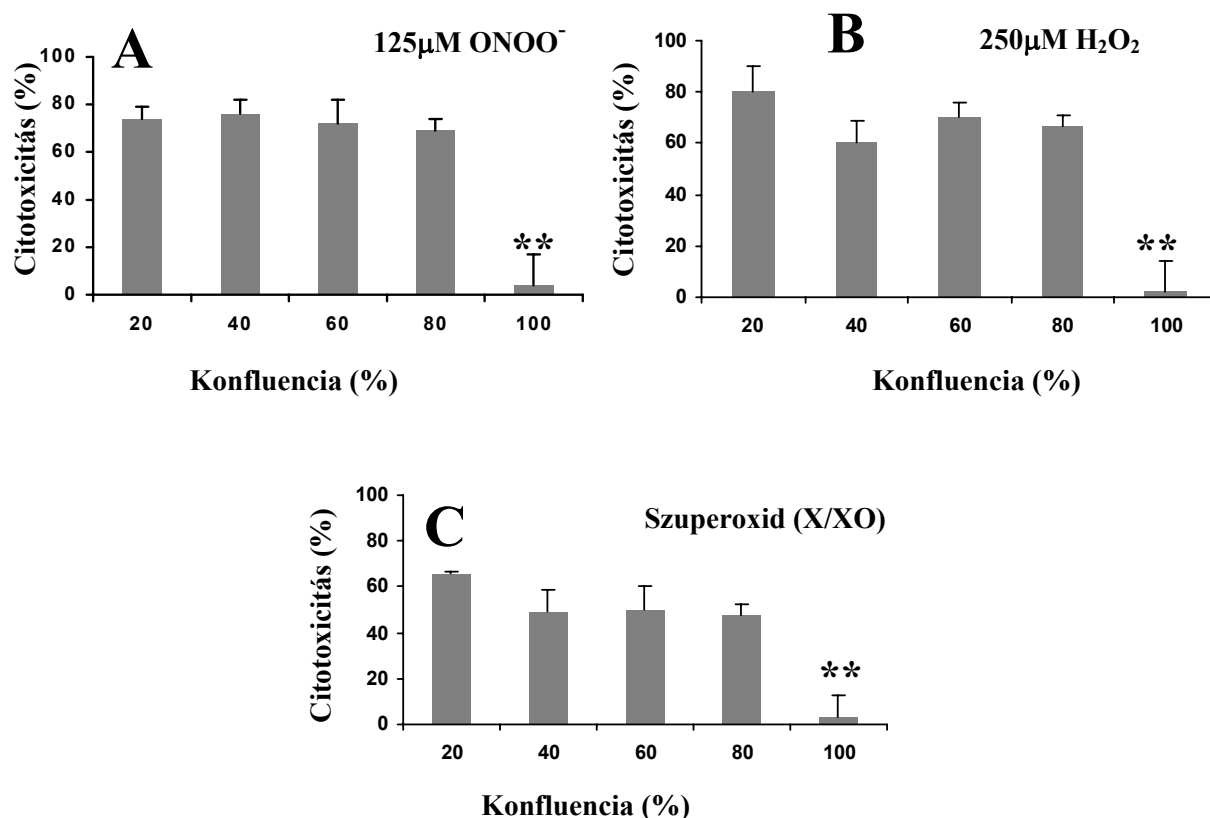


3.2. ábra. A kalcium mobilizáció szerepe az oxidatív stressz által kiváltott citotoxicitásban

A 96 lyukú szövettenyésztő plate-en tenyésztett sejteket (80% konfluencia) kezeltük 125 μ M peroxinitrittel, 2,5 mM SIN-1-gyel, 250 μ M hidrogén-peroxiddal és szuperoxiddal (500 μ M xantin + 10 mU/ml xantin-oxidáz). Négy óra elteltével MTT módszerrel meghatároztuk a kontrol és a 2,5 μ M BAPTA-AM-rel 30 percig előkezelt sejtek viabilitását. A BAPTA-AM előkezelés citoprotektív hatásának bizonyult a peroxinitrittel (A), a peroxinitrit donor SIN-1-gyel (B), és hidrogén-peroxiddal kiváltott oxidatív stressz esetében. A szuperoxiddal indukált (C) citotoxicitás esetében nem tapasztaltunk hasonló védőhatást. Az adatok 4 reprezentatív mérés átlagát, ($\pm$ SD) mutatják be. (* $p < 0,05$ a kontrollhoz képest szignifikáns csökkenés).

3.3. Összefüggés a sejtdenzitás és az oxidatív stresszel szemben mutatott érzékenység között

Ismeretes, hogy amint a HaCaT sejtek elérik a teljes konfluencia állapotát, differenciálódásnak indulnak. Ennek során számos sejtfunkciójuk módosul, és több tulajdonságukban is különbözővé válnak a még szubkonfluens sejt kultúra proliferálódó sejtjeitől (Ryle 1989). Ezért 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 sejt kultúrák (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 (3.3. ábra). Eredményeink alapján feltételezzük, hogy jelentős szerepe lehet a konfluens sejtek között fellépő direkt sejt-sejt kontaktus lehetőségének az oxidatív stressz elleni nagyfokú védelem kialakításában.



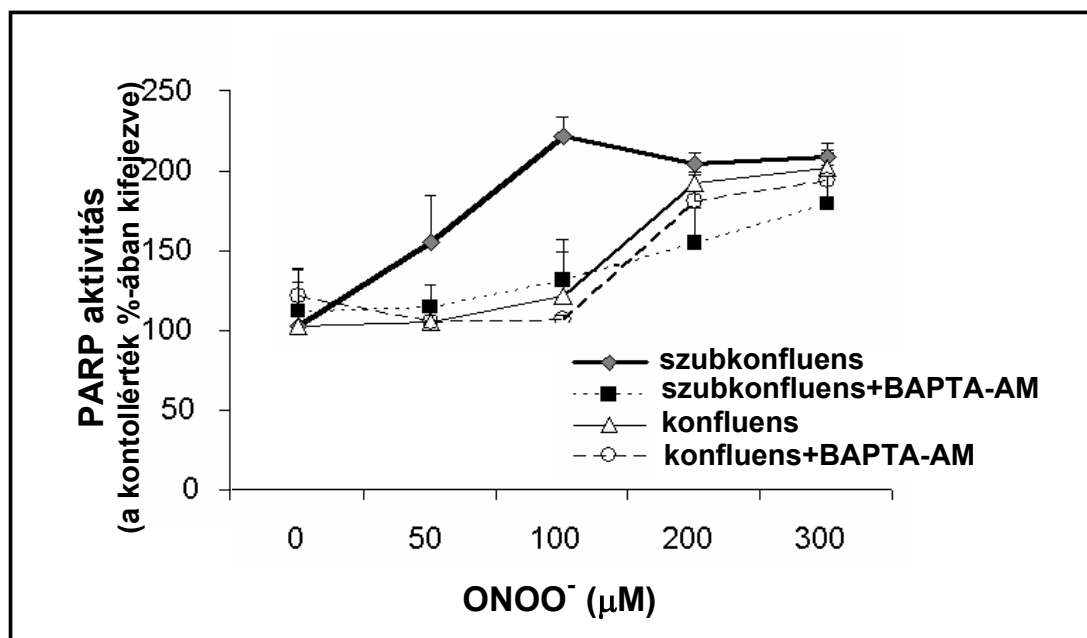
3.3. ábra. A sejtdenzitás hatása az oxidatív stressz által kiváltott citotoxicitásra HaCaT sejtekben

96 lyukú szövettenyésztő plate-en különböző (20-100%) konfluenciájú sejt kultúrákat kezeltünk 125 μM peroxinitrittel (A), 250 μM hidrogén-peroxiddal (B) és szuperoxiddal (C) (500 μM xantin + 10 mU/ml xantin-oxidáz). Négy óra elteltével az oxidatív stressz által kiváltott citotoxicitás mértékét MTT módszerrel határoztuk meg. Az ábrán feltüntetett eredmények alapján elmondható, hogy a posztkonfluens sejt kultúrák esetében az oxidatív stresszt kiváltó tényezőtől függetlenül, jelentősen kevesebb az elhalt sejtek száma, mint a még intenzíven proliferálódó szubkonfluens sejtenyészetek esetében. Az adatok 6 reprezentatív mérés átlagát, (± SD) mutatják be. (**p<0,01 a kontrollhoz képest szignifikáns csökkenés).

3.4. A Ca²⁺-mobilizáció és a sejtdenzitás hatása a peroxinitrit által indukált PARP aktivációra

Korábbi munkánkban (Virág és mtsai 2002) kimutattuk, hogy a peroxinitrit által kiváltott citotoxicitásban jelentős szerepe van a PARP aktivációnak. További kísérleteinkben azt vizsgáltuk, hogy az intracelluláris Ca²⁺-koncentráció és a sejtdenzitás milyen módon és mértékben befolyásolja a HaCaT sejtek PARP aktivitását. Az intracelluláris Ca²⁺-kelátor BAPTA-AM jelentős mértékben gátolta a peroxinitrittel stimulált PARP aktivációt (3.4. ábra). Peroxinitrit kezelést követően a konfluens sejt kultúrákban a PARP aktiváció mértéke jelentősen kisebb volt a szubkonfluens, illetve

BAPTA-AM előkezelést nem kapott kultúrákban tapasztalható képest. Önmagában a BAPTA-AM kezelés nem volt hatással a bazális PARP aktivitásra.

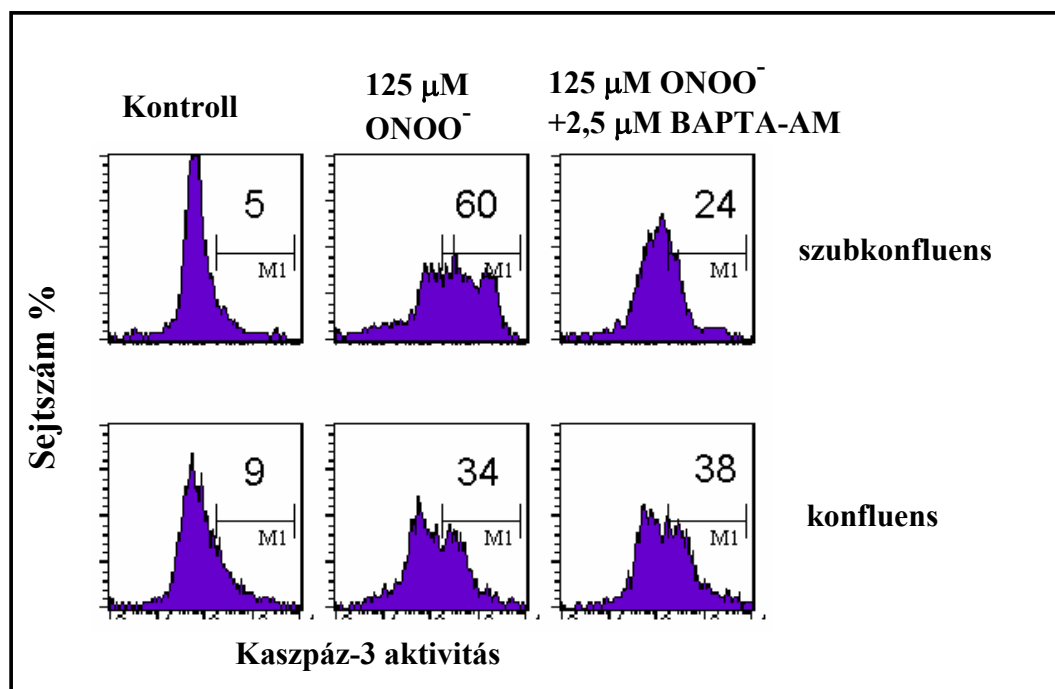


3.4. ábra. A BAPTA-AM és a sejtdenzitás hatása a peroxinitrit által kiváltott PARP aktivációra HaCaT sejtekben

Szubkonfluens (80%) (A) és konfluens (100%) (B) sejt kultúrákat kezeltünk 125 μM peroxinitrittel. Harminc perc elteltével a kontroll és a BAPTA-AM-mel (2,5 μM) kezelt sejtek PARP aktivitását a beépült [³H]-NAD⁺ mennyiségének mérésével határoztuk meg. Peroxinitrit kezelést követően a konfluens sejt kultúrákban a PARP aktiváció mértéke jelentősen kisebb volt a szubkonfluens, illetve BAPTA-AM előkezelést nem kapott kultúrákhoz képest. Az adatok 4 reprezentatív mérés átlagát, (± SD) mutatják be.

3.5. 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 (Virág et al. 1998a,b, Szabó et al. 2001). Korábbi kísérletekben kimutatták, hogy különféle sejt típusokban (HaCaT, timociták, fibroblasztok) a PARP aktiváció a sejthalál folyamatát az apoptózis felől a nekrosis irányába tereli. A PARP ugyanis működése során kimeríti a sejt NAD⁺ és ATP készletét, gátolva ezzel az apoptózis energia-igényes lépéseit (Virág és mtsai 1998a, b, Ha és Synder 1999, Filipovic és mtsai 1999). Ezért megvizsgáltuk, hogy a Ca²⁺-mobilizáció, illetve a sejtdenzitás hogyan befolyásolja a peroxinitrit által indukált kaspáz aktiválódást, ami az apoptotikus sejthalál egyik jellemző paramétere.



3.5. ábra. A BAPTA-AM és a sejtdenzitás hatása HaCaT sejtek peroxinitrit által kiváltott kaspáz-3 aktivációjára

Szubkonfluens (80%) (A) és konfluens (100%) (B) sejtkultúrákat kezeltünk 125 μM peroxinitrittel. Hat óra elteltével PhiPhiLuxTM fluorogén kaspáz-3 szubsztráttal kezeltük a sejteket. A kontroll és a BAPTA-AM-mel (2,5 μM) kezelt sejtekben áramlásos citometriás módszerrel mértük a kaspáz-3 aktivitás mértékét. a BAPTA-AM előkezelés a peroxinitrit által kiváltott kaspáz aktiválódást szignifikáns mértékben csökkentette az előkezelést nem kapott sejtekhez képest. A peroxinitrittel történő kezelést követően a konfluens sejtek kaspáz aktiválódása is jelentősen kisebb mértékű volt, mint a szubkonfluens sejtekben. Az adatok egy reprezentatív mérés eredményeit mutatják be. Az ábrán feltüntetett számértékek mutatják egy adott sejtpopulációban (100%) azon sejtek arányát (%), melyekben kaspáz-3 aktivitás detektálható.

Eredményeink szerint a peroxinitrit által kiváltott kaspáz aktiválódást a BAPTA-AM szignifikáns mértékben csökkentette. (3.5. ábra). A peroxinitrit kezelést követően a konfluens sejtek kaspáz aktivitása is jelentősen kisebb volt, mint a szubkonfluens sejtekben.

MEGBESZÉLÉS

Kísérleteink első részében célunk volt annak megvizsgálása, hogy a PARP aktivitásának gátlása miként befolyásolja az oxidatív stressz által kiváltott sejthalál folyamatát. A poli(ADP-ribóziláció) folyamata elengedhetetlen része a sejtproliferáció, a transzkripció, a fehérje degradáció és a sejthalál folyamatainak (Virág és Szabó, 2002). A PARP enzim vizsgálatára irányuló kísérletek hosszú ideig radioaktív izotóppal (^3H , ^{32}P) jelölt NAD^+ szubsztrát felhasználásával történtek. Munkacsoportunk kidolgozott egy olyan módszert, amelyhez nincs szükség radioaktív izotópra és egyaránt alkalmazható a PARP aktivitás meghatározására sejtes és szövetes rendszerekben. A módszer azon alapszik, hogy az enzimreakció során az alkalmazott biotinilált NAD^+ -ból lehasított, majd a polimerláncba beépült biotinnal jelölt ADP-ribóz egységek kimutatásával detektáljuk a PARP enzimaktivitását. J774 makrofágokon végzett kísérleteink alkalmával megfigyeltük, hogy a kezeletlen sejtekben a biotinnal jelzett poli-ADP-ribóz polimerek egyértelműen a sejtmagban mutathatóak ki. Ez a megfigyelés arra enged következtetni, hogy az általunk alkalmazott biotinnal jelölt NAD^+ specifikus szubsztrátja a magban lokalizálódó PARP-1 enzimnek. Az enzim ADP-ribóz egységekből hosszú és elágazó polimerláncokat szintetizál a magban található akceptorfehérjéken, illetve saját magán is. Korábban kimutatták (Zhang és Snyder, 1993), hogy *in vitro* kísérletekben az általunk is használt biotinnal jelölt NAD^+ szubsztrátként szolgálhat mono(ADP-ribózilációs) folyamatokban is. Ez a G-protein-kapcsolt reakció azonban a plazmamembránban zajlik, míg az általunk végzett enzimidokémiai festésekkel csak a sejtmagban mutattuk ki a biotinnal jelölt NAD^+ jelenlétét. Ez alapján elmondható, hogy rendszerünkben a jelölődés poli-ADP-ribózilálódást detektál.

Kísérleteink során megfigyeltük, hogy a mitózisban lévő J774 sejtek magjaiban az interfázisos sejtekhez viszonyítva rendkívül intenzív festődést tapasztalhatunk. A mitózis különböző fázisaiban lévő sejtekben a fokozott mértékű festődés egyértelműen a kondenzált kromatinállományra lokalizálódik. Az interkromatin régióban nem tapasztaltunk az előbbivel összemérhető mértékű festődést. Ez a megfigyelés jó összhangban áll azon korábbi kísérleti eredményekkel, amelyek a PARP szerepét igazolják a DNS replikáció folyamatában. Több munkacsoport (Ferro és mtsai, 1984, Bauer és mtsai, 2000, Bauer és Kun, 2000) is kimutatta, hogy a PARP enzim szabályozza a topoizoméráz-I enzim működését is. Egyéb, szintén a DNS replikációban részt vevő fehérjékhez úgy, mint

a DNS polimeráz-I-primáz komplexhez kötődve szintén szabályozza azok működését (Dantzer és mtsai, 1998). Simbulan-Rosenthal és mtsai (1999, 2001) eredményei szerint a PARP hiányos sejtek kultúráiban tetraploid populációk jelentek meg, ezzel szemben a vad típusú, PARP inhibitorokkal kezelt sejt kultúrákban ezt a jelenséget nem tapasztalták. Ez a megfigyelés azt bizonyítja, hogy valójában magának a PARP enzimnek a jelenléte, nem pedig a PARP enzimaktivitás az, ami szükséges a kromoszómák szerkezetének stabilizálásához. Korábbi kutatások eredményei azt mutatták, hogy a PARP enzim a sejtsztódás során a centroszómákban és kromoszómákban lokalizálódik (Kanai és mtsai, 2000), ami jó összhangban áll saját megfigyeléseinkkel, miszerint a mitotikus sejtek magjaiban fokozott poli-ADP-riboziláció/PARP aktivitás mutatható ki. Korábbi közleményekből már ismeretes, hogy az oxidatív stressz több sejt típusban PARP aktivációt indukál (Szabó és mtsai, 1998, Virág és mtsai, 1998). Saját kísérleteink során a hidrogén-peroxiddal kezelt J774 makrofágok sejtmagjaiban is fokozott PARP aktivitást mutattunk ki a polimerláncba beépült, biotinnal-jelölt ADP-ribóz egységek detektálásán alapuló módszerünkkel. A hidrogén-peroxid kezelés által kiváltott fokozott poli-ADP-ribozilációt a PARP inhibitor PJ-34 és 3-AB is gátolta. Ez a megfigyelés bizonyítja, hogy az általunk használt biotinnal-jelölt NAD^+ valóban specifikus szubsztátja a PARP-nak. Az elmúlt néhány év során összesen több mint tíz PARP aktivitással rendelkező enzim létezését mutatták ki, amelyeket a felfedezés sorrendje szerint neveztek el (Virág és Szabó 2002, Smith, 2001). A PARP enzimcsalád különböző tagjai eltérő doménszerkezettel és szubcelluláris lokalizációval rendelkeznek. Eltérő az affinitásuk a DNS-hez és az aktivációjukat előidéző stimulusok sem azonosak. Saját megfigyeléseink szerint az oxidatív stressz hatására kizárólag a vad típusú makrofágok magjaiban tapasztaltunk fokozott PARP aktivitásra utaló intenzív festődést. Ez a megfigyelés azt bizonyítja, hogy oxidatív stressz estében a PARP-1 enzim aktivációja okozza a fokozott poli-ADP-ribozilációt.

Az utóbbi évek során intenzív kutatások folynak a poli(ADP-ribóz)-glikohidroláz (PARG) működésének és biológiai szerepének felderítésére (Davidovic és mtsai, 2002, Ying és mtsai, 2001, Ying és Swanson, 2000). Leírták például asztrocitákban és idegsejtekben indukált oxidatív stressz alkalmával a tanninszerű vegyületek családjába tartozó PARG gátló gallotannin és nobotannin B citoprotektív hatását (Ying és mtsai, 2001, Ying és Swanson, 2000). Mindezek ismeretében, valamint HaCaT és A549 tüdő epitél sejteken végzett kísérleteink tapasztalatai alapján elmondhatjuk, hogy a PARG inhibitor vegyületek oxidatív stressz során tapasztalt citoprotektív hatása nem korlátozódik

egyetlen sejttípusra, hanem általános tulajdonság. A HaCaT sejteken végzett kísérleteinkben a nekrotikus sejthalál paramétereit detektáló mérések (LDH felszabadulás és propidium-jodid felvétel) eredményei azt mutatták, hogy a gallotannin szignifikáns mértékben gátolja az oxidatív stressz által kiváltott citotoxicitást.

Kimutattuk, hogy a PARG aktivitás gallotanninnal történő blokkolása által a PARP aktivitás is gátolható. A PARG az által, hogy biztosítja a PARP-1 aktív állapotát, hozzájárul a fokozott mértékű poli(ADP-ribóz) szintézishez, mely a sejt NAD⁺ készletének kimerítéséhez, végeredményben pedig a sejt halálához vezet. A PARG inhibitor gallotannin megakadályozza a PARP-1 aktív állapotának helyreállítását, így közvetett módon gátolódik a PARP-1 aktivitása is. Ez pedig csökkent poli-ADP-ribozilációt, vagyis csökkent NAD⁺ felhasználást eredményez, ami az előbbi tapasztalatok ismeretében növeli a sejtek túlélőképességét.

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. Kísérleti tapasztalataink szerint a gallotannin citoprotektív hatást biztosító koncentrációkban (20-50 μ M) alkalmazva 50%-os mértékben csökkentette a PARP aktivitást (nem közölt eredmény). Azt egyelőre még nem tudjuk, hogy ez a hatás valójában tényleges farmakológiai gátlásnak tulajdonítható, vagy pedig a gallotannin protein denaturáló hatásának (mely tulajdonság a tanninokra általánosan jellemző) eredménye. Mindezek ellenére nem valószínű, 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 az oxidatív stressz indukálását követően valamennyi reaktív intermediér mindenképpen bejutott a sejtekbe, és ott PARP aktivációt okozott. A polimer akkumuláció bizonyítja továbbá azt is, hogy PARP aktiváció történik gallotannin jelenlétében is.

Az általunk, valamint más munkacsoportok által végzett kísérletek eredményei is igazolják a PARP gátlószerek jótékony hatását különféle eredetű gyulladásos folyamatokban, iszkémia/reperfúzió, illetve sokkos állapotokban. Mindezen megfigyelések alapján feltételezhető, hogy a PARP inhibitorok gyógyászati alkalmazása hatékony módszer lehet számos betegség (agyvérzés, a miokardium iszkémia-reperfúziós károsodás, diabétesz, a diabéteszes endotéliális diszfunkciók) kezelésében (Virág és Szabó, 2002). Szem előtt kell azonban tartani azt a tényt is, hogy a PARP gátlás eredményeként fellépő különféle hatások jelentősen befolyásolhatják a DNS-repair irányító folyamatokat, és ezek

a változások a transzformált sejtek elszaporodását eredményezhetik (Tsutsumi és mtsai, 2001, Lubet és mtsai, 1986).

Igaz, hogy a PARP gátlásának biológiai hatásairól sem rendelkezünk kielégítő ismeretekkel, a PARG gátlószerek hatásmechanizmusáról gyakorlatilag semmiféle meggyőző információ nem létezik. Mindenesetre biztató az a megfigyelés, amely szerint számos betegségben bizonyították különféle tanninszármazékok (gallotannin és tanninsav) tumorelles hatását (Gali-Muhtasib és mtsai, 2001, Srivastava és mtsai, 2000, Kaul és Khanduja, 1998, Gali és mtsai, 1993, Perchellet és mtsai, 1992). Saját kísérleteink eredményei és más munkacsoportok tapasztalatai alapján feltételezzük, hogy a PARG inhibitorok gyógyászati alkalmazása hasonlóan jótékony hatásúnak bizonyulnak mindazon súlyos betegségek esetében, ahol a PARP gátlószerekkel már bizonyítottan kedvező hatásokat értek el.

További munkánkban azt vizsgáltuk, hogy van-e szerepe HaCaT sejtekben a Ca^{2+} intracelluláris koncentráció-változásának a peroxinitrit által kiváltott citotoxicitásban. Eredményeink szerint a peroxinitrittel vagy a peroxinitrit-donor SIN-1-gyel történő kezelést követően jelentős mértékben növekedett a HaCaT sejtek intracelluláris Ca^{2+} koncentrációja. Ez a felismerés összhangban van azon korábbi megfigyelésekkel, amelyek szerint a peroxinitrit-kezelés Ca^{2+} beáramlást indít el timocitákban, idegsejtekben, és izolált mitokondriumokban (Virág és mtsai, 1999, Ohkuma és mtsai, 2001, Packer és Murphy, 1994). Bár az említett – citoplazmába áramló – Ca^{2+} forrása nagyobb részben az extracelluláris tér, az intracelluláris kalciumraktárakból felszabaduló Ca^{2+} mennyisége is hozzájárul a kimutatott koncentrációnövekedéshez. Az extracelluláris térből a kalciumionok nagy mennyiségben történő beáramlása minden bizonnyal a peroxinitrit plazmamembránt károsító hatásának az eredménye.

Az intracelluláris Ca^{2+} -kelátor BAPTA-AM a peroxinitrit által kiváltott citotoxicitást szignifikánsan csökkentette. Ez egyértelműen bizonyítja a Ca^{2+} szerepét a sejthalál folyamatában. Mint azt további kísérleteink alkalmával kimutattuk, a BAPTA-AM védő hatása nem korlátozódik a peroxinitrittel kiváltott citotoxicitásra. A BAPTA-AM hasonló védőszerepet mutatott a hidrogén-peroxiddal történő kezelés esetében is. Ezen megfigyelések alapján elmondható, hogy a Ca^{2+} fontos szerepet tölt be az oxidatív stressz által kiváltott citotoxicitás folyamatában. Az általunk is megfigyelt jelenség, miszerint az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció csökkentésével visszaszorítható az oxidatív stressz által kiváltott citotoxicitás, összhangban áll más munkacsoportok korábbi tapasztalataival, akik kimutatták oxidatív stressz során a kalcium-kelátoroknak a vese tubuláris sejteire (Ueda és

Shah, 1992), a glutamáttal kezelt kortikális neuronokra (Frandsen és Schouboe, 1991), valamint az iszkémia okozta neuronális sérülésekre (Tymiansky és mtsai, 1993) gyakorolt védőhatását. Meglepő módon a szuperoxid által kiváltott citotoxicitással szemben a Ca^{2+} kelátor nem bizonyult védő hatásúnak. Ez arra utal, hogy az oxidatív stresszt különböző módon kiváltó tényezők eltérő citotoxicitási útvonalakat indítanak el.

Korábbi munkánk során már kimutattuk, hogy a peroxinitrit által kiváltott oxidatív stressz HaCaT sejtekben több, párhuzamos útvonalakon futó sejthalál folyamatot indít el (Szabó és mtsai, 2001). Az oxidáns kisebb koncentrációkban történő alkalmazása alapvetően a kaszpáz-mediált apoptózisnak kedvez. Nagyobb koncentrációjú peroxinitrit az apoptotikus útvonal helyett a poli-ADP-riboziláción keresztül nekrozis irányába tolja el a folyamatot (Szabó és mtsai, 2001). A PARP ugyanis a polimerizációs reakciói során elhasználja a sejtek NAD^+ és ATP tartalékait, ezért a jelentős mennyiségű energiát igénylő apoptotikus folyamatok gátlódnak (Virág és mtsai, 1998a, Ha és Synder, 1999, Karczewski és mtsai, 1999, Tasker és mtsai, 1997). Hasonló megfigyeléseket tettek korábban is timocitákon, Caco-2 vastagbél sejteken, valamint újszülött patkányok agyából készített metszeteken végzett vizsgálatok alkalmával (Virág és mtsai, 1999, Karczewski és mtsai, 1999, Tasker és mtsai, 1997). Mivel a PARP-1 működéséhez nincs szükség kalcium ionra (Virág és mtsai, 1999), valószínűsíthető, hogy a Ca^{2+} inkább a PARP aktivációját kiváltó jelátviteli folyamatokat szabályozza. Ezzel összhangban Cantoni és munkatársai azt találták, hogy tercier-butil-hidrogén-peroxiddal, illetve peroxinitrittel történő kezelést követően a ROI termelődése kalciumfüggő módon fokozódott U937 sejtek mitokondriumaiban (Guidarelli és mtsai, 1997, 2001). Egy másik megfigyelés szerint a DNS törésért inkább a másodlagosan képződő szabad gyökök tehetők felelőssé, mintsem közvetlenül maga a primer oxidatív stimulus (Guidarelli és mtsai, 1997, 2001). Ezek arra engednek következtetni, hogy feltehetően a kalciumion indítja el azt a folyamatot, amelynek eredménye a mitokondriumokban zajló reakciók egyensúlyának felborulása. Ennek következtében a mitokondriális ROI termelődés fokozódik a sejtekben, ami DNS töréseket és PARP aktivációt okoz.

Saját megfigyeléseink és más munkacsoportok eredményei is azt mutatták, hogy a PARP aktivációja tehető felelőssé az apoptotikus sejthalál nekrozis irányába történő eltolódásáért. Amellett, hogy a fokozott PARP aktivitás jelentős ATP felhasználással jár, működése során gyorsan üríti ki a sejtek energiaraktárait, a nagy koncentrációban jelenlévő kalciumionok ráadásul az ATP termelő folyamatokat (glikolízis, oxidatív foszforiláció) is gátolják, felgyorsítva ezzel a sejtek totális energia deplécióját, és végeredményben

nekrotikus halálát. Ismeretes, hogy a kalcium-kelátor vegyületek is gátolják a PARP aktivációt (Virág és mtsai, 1999), ezért arra számítottunk, hogy az általunk alkalmazott kalcium-kelátor, a BAPTA-AM a HaCaT sejtekben a peroxinitrit által kiváltott citotoxikus folyamatot az apoptózis irányába tereli. Ezzel szemben azt tapasztaltuk, hogy a peroxinitrit által kiváltott kaszpáz aktiváció a BAPTA-AM hatására szignifikáns mértékben csökkent. Mivel a kaszpáz aktivációhoz nem szükséges a kalciumion jelenléte (Stennicke és Salvesen, 1997), joggal feltételezhetjük, hogy a peroxinitrit által kiváltott apoptotikus sejthalál folyamatában az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció növekedésének a kaszpáz aktivációt megelőző lépésben lehet meghatározó szerepe.

A Ca^{2+} -mobilizáció, és az intracelluláris Ca^{2+} -koncentrációban bekövetkező változások szerepe az egyes apoptotikus útvonalak indukálásában még korántsem tisztázott. Elképzelhető, hogy oxidatív stressz hatására a citoszolba nagy koncentrációban beáramló Ca^{2+} mitokondriális membrándepolarizációt okoz, minek eredményeként a citokrómból kiáramlik a citoszolba, ahol az apoptoszóma képződésén keresztül aktiválódó kaszpáz-9 aktiválja a kaszpáz-3 effektor enzimet. Természetesen további vizsgálatok szükségesek annak felderítésére, hogy milyen mechanizmus szerint történik a peroxinitrit kezeléssel kiváltott Ca^{2+} -mobilizáció, és hogy konkrétan milyen Ca^{2+} -függő és/vagy független folyamatok határozzák meg az oxidatív stressz által indukált egyes citotoxicitási útvonalakat.

Kísérleteink során azt is megfigyeltük, hogy a HaCaT sejtek oxidatív stresszrel szemben mutatott érzékenysége függ a vizsgált sejt kultúra denzitásától. Bizonyos körülmények között, mint pl. a sebgyógyulásban, amikor megszűnik a keratinociták közötti kontaktus és a sejtek ismét proliferálnak, a keratinociták érzékenyebbek az oxidatív stresszrel szemben. Más kutatócsoportok hozzánk hasonlóan szintén tapasztalták több sejt típus esetében, hogy a konfluens és szubkonfluens tenyészetek sejtjei teljesen eltérő módon reagálnak egyes stimulusokra. Vessey és mtsai 1995-ben kimutatták, hogy az epidermiszt alkotó felszínben található nagymértékben differenciálódott keratinociták oxidatív stresszrel szemben rendkívül ellenállóak. Ez a megfigyelés szintén összhangban áll saját, *in vitro* kísérleteink eredményeivel. A konfluens sejtek oxidatív stresszrel szemben tanúsított nagyfokú ellenállóképessége a csökkent mértékű PARP aktivációnak és a kaszpáz-mediált apoptózis gátlásának a következménye.

Mindezen tapasztalatok ismeretében felvetődik a kérdés, hogy vajon a kalciumszignál és a sejt denzitásban bekövetkező változások által elindított jelátviteli folyamatok együttes hatásának lehet-e szerepe a HaCaT keratinociták oxidatív stresszrel

szemben mutatott érzékenysége szabályozásában? A kalciumjel szerepére vonatkozóan Yuspa és mtsai 1988-ban megállapították, hogy a felszíni keratinociták intracelluláris Ca^{2+} szintje egyértelműen nagyobb, mint a bazális sejteké. Az említett megfigyeléseknek látszólag ellentmondanak saját eredményeink, azonban feltételezésünk szerint nem az intracelluláris Ca^{2+} mennyisége, hanem sokkal inkább annak koncentrációjában bekövetkező *változások* szolgálnak a citotoxicitást kiváltó szignál forrásául. Ezek alapján érthető, hogy azokban a sejtekben, amelyekben az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció eredendően nagy, a peroxinitrit nem okoz olyan mértékű emelkedést, amely citotoxicitást okozna. Ezzel szemben a bazális réteg proliferálódó keratinocitáiban lényegesen kisebb az intracelluláris Ca^{2+} koncentrációja. Ebből adódóan ezek a sejtek nagyobb kalcium jellel és fokozott elhalással reagálnak a peroxinitrit kezelésre. Feltételezésünk szerint a szubkonfluens (proliferálódó) és a konfluens (differenciálódó) keratinociták oxidatív stresszel szemben mutatott eltérő érzékenysége háttérében a metabolizmus különbségei állhatnak. Az anyagcsere fontosságát támasztja alá az a megfigyelés is, amely szerint a Krebs-ciklusban szubsztrátként szereplő anyagok citoprotektív hatásúak az oxidatív stresszben (Ying és mtsai, 2002, Lee és mtsai, 2001), viszont a pentóz-foszfát útvonal gátlása ezzel ellentétes hatású (Le Goffe és mtsai 2002). Ez valószínűleg azzal magyarázható, hogy az alkalmazott kezelés hatására egyrészt fokozódik a sejtek energiafelhasználása, ugyanakkor az energiát szolgáltató metabolikus folyamatok gátoltak, így nincs lehetőség az energia utánpótlására. Ezek további figyelembe vételével és tapasztalataink alapján valószínűsíthető, hogy –legalábbis nagyrészt– a metabolikus folyamatokban fellelhető különbségekkel magyarázható a proliferálódó és konfluens sejt kultúrák peroxinitrittel szemben mutatott eltérő érzékenysége.

IRODALOM

Althaus F R, Hofferer L, Kleczkowska H E, Malanga M, Naegeli H, Panzeter P L, Realini C A (1994) Histone Shuttling by Poly ADP-Ribosylation. *Mol Cell Biochem* **138**: 53-59.

Althaus F R, Kleczkowska H E, Malanga M, Muntener C R, Pleschke J M, Ebner M, Auer B (1999) Poly ADP-ribosylation: a DNA break signal mechanism. *Mol Cell Biochem* **193**: 5-11.

Althaus FR (1992) Poly ADP-ribosylation: a histone shuttle mechanism in DNA excision repair. *J Cell Sci.* **102 (Pt 4)**:663-70. Review.

Althaus FR, Richter C (1987) ADP-ribosylation of proteins. Enzymology and biological significance. *Mol Biol Biochem Biophys.* **37**:1-237. Review.

Alvarez B, Rubbo H, Kirk M, Barnes S, Freeman B A, Radi R (1996) Peroxynitrite-dependent tryptophan nitration. *Chem Res Toxicol* **9**: 390-396.

Ariumi Y, Masutani M, Copeland T D, Mimori T, Sugimura T, Shimotohno K, Ueda K, Hatanaka M, Noda M (1999) Suppression of the Poly(ADP-Ribose) Polymerase Activity by DNA-Dependent Protein Kinase in Vitro. *Oncogene* **18**: 4616-4625.

Bauer PI, Buki KG, Comstock JA, Kun E. (2000) Activation of topoisomerase I by poly[ADP-ribose] polymerase. *Int.J.Mol.Med.* **5**:533-540

Bauer PI, Buki KG, Hakam A, Kun E (1990) Macromolecular association of ADP-ribosyltransferase and its correlation with enzymic activity. *Biochem J.* **270(1)**:17-26.

Bauer PI, Kun E. (2000) Binding of topo I to PARP I - antibody immunocomplex. *Int.J.Mol.Med.* **6**:153-154.

Beckman J S, Koppenol W H (1996) Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* **271(5 Pt 1)**: C1424-37.

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.

Berger S J, Sudar D C, Berger N A (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.

Bonfoco E, Kraine D, Ankarcrona M, Nicotera P, Lipton S A (1995) Apoptosis and Necrosis: Two Distinct Events Induced, Respectively, by Mild and Intense Insults With N-Methyl-D-Aspartate or Nitric Oxide/Superoxide in Cortical Cell Cultures. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 7162-7166.

Boulikas T (1990) Poly(ADP-Ribosylated) Histones in Chromatin Replication. *J Biol Chem* **265**: 14638-14647.

- Brüne B, Hartzell P, Nicotera P, Orrenius S (1991) Spermine prevents endonuclease activation and apoptosis in thymocytes. *Exp Cell Res* **195**: 323-329.
- Burkle A (2001) Physiology and pathophysiology of poly(ADP-ribosyl)ation. *Bioessays* **23**: 795-806.
- Burkle A, Chen G, Kupper J H, Grube K, Zeller W J (1993) Increased poly(ADP-ribosyl)ation in intact cells by cisplatin treatment. *Carcinogenesis* **14**: 559-561.
- Cervellera M N, Sala A (2000) Poly(ADP-Ribose) Polymerase Is a B-MYB Coactivator. *J Biol Chem* **275**: 10692-10696.
- Chang W J, 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 1. *J Biol Chem* **276**: 47664-47670.
- Crow J P, Beckman J S (1995) Reactions between nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: footprints of peroxynitrite in vivo. *Adv Pharmacol* **34**: 17-43.
- Dantzer F, Nasheuer HP, Vonesch JL, de Murcia G, Menissier de Murcia J (1998) Functional association of poly(ADP-ribose) polymerase with DNA polymerase alpha-primase complex: a link between DNA strand break detection and DNA replication. *Nucleic Acids Res* **26**: 1891-1898
- Davidovic L, Vodenicharov M, Affar E B, Poirier G G (2001) Importance of poly(ADP-ribose) glycohydrolase in the control of poly(ADP-ribose) metabolism. *Exp Cell Res* **268**: 7-13.
- de Murcia G, Huletsky A, Lamarre D, Gaudreau A, Pouyet J, Daune M, Poirier G G (1986) Modulation of Chromatin Superstructure Induced by Poly(ADP-Ribose) Synthesis and Degradation. *J Biol Chem* **261**: 7011-7017.
- de Murcia G, Menissier de Murcia J (1994) Poly(ADP-Ribose) Polymerase: a Molecular Nick-Sensor. *Trends Biochem Sci* **19**: 172-176.
- de Murcia G, Schreiber V, Molinete M, Saulier B, Poch O, Masson M, Niedergang C, Menissier de Murcia J (1994) Structure and Function of Poly(ADP-Ribose) Polymerase. *Mol Cell Biochem* **138**: 15-24.
- de Murcia J M, Niedergang C, Trucco C, Ricoul M, Dutrillaux B, Mark M, Oliver F J, Masson M, Dierich A, LeMeur M, Walztinger C, Chambon P, De Murcia G (1997) Requirement of Poly(ADP-Ribose) Polymerase in Recovery From DNA Damage in Mice and in Cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 7303-7307.
- Desmarais Y, Menard L, Lagueux J, Poirier GG (1991) Enzymological properties of poly(ADP-ribose)polymerase: characterization of automodification sites and NADase activity. *Biochim Biophys Acta*. **1078(2)**:179-86.
- Ferro AM, Thompson LH, Olivera BM (1984) Poly (ADP-ribosylation) and DNA topoisomerase I in different cell lines. *Adv Exp Med Biol* **179**:441-447

- Frandsen A, Schousboe A (1991) Dantrolene prevents glutamate cytotoxicity and Ca^{2+} release from intracellular stores in cultured cerebral cortical neurons. *J Neurochem* **56**: 1075-1078.
- Gali H U, Perchellet E M, Gao X M, Bottari V, Perchellet J P (1993) Antitumor-promoting effects of gallotannins extracted from various sources in mouse skin in vivo. *Anticancer Res.* **13**: 915-922.
- Gali-Muhtasib H U, Perchellet J P, Khatib S H (1998) Inhibitory effects of plant tannins on ultraviolet light-induced epidermal DNA synthesis in hairless mice. *Photochem Photobiol* **67**: 663-668.
- Gow A J, Duran D, Malcolm S, Ischiropoulos H (1996a) Effects of peroxynitrite-induced protein modifications on tyrosine phosphorylation and degradation. *FEBS Lett* **385**: 63-66.
- Guidarelli A, Clementi E, Sciorati C, Cattabeni F, Cantoni O (1997) Calcium-dependent mitochondrial formation of species mediating DNA single strand breakage in U937 cells exposed to sublethal concentrations of tert-butylhydroperoxide. *J Pharmacol Exp Ther* **283**:66-74.
- Guidarelli A, Fiorani M, Cantoni O (2000) Calcium-dependent mitochondrial formation of species promoting strand scission of genomic DNA in U937 cells exposed to tert-butylhydroperoxide: the role of arachidonic acid. *Free Radic Res* **33**: 477-487.
- Guidarelli A, Fiorani M, Cantoni O (2000) Calcium-dependent mitochondrial formation of species promoting strand scission of genomic DNA in U937 cells exposed to tert-butylhydroperoxide: the role of arachidonic acid. *Free Radic Res* **33**: 477-487.
- Gutierrez-Martin Y, Martin-Romero F J, Henao F, Gutierrez-Merino C (2002) Synaptosomal plasma membrane $\text{Ca}(2+)$ pump activity inhibition by repetitive micromolar ONOO(-) pulses. *Free Radic Biol Med* **32**: 46-55.
- 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 USA* **96**: 13978-13982.
- Hasko G, Mabley J G, Nemeth Z H, Pacher P, Deitch E A, Szabo C (2002) Poly(ADP-ribose) Polymerase is a Regulator of Chemokine Production: Relevance for the Pathogenesis of Shock and Inflammation. *Mol Med* **8**: 283-289.
- Hassa P O, Covic M, Hasan S, Imhof R and Hottiger M O (2001) The Enzymatic and DNA Binding Activity of PARP-1 Are Not Required for NF-Kappa B Coactivator Function. *J Biol Chem* **276**: 45588-45597.
- Hassa P O, Hottiger M O (1999) A role of poly (ADP-ribose) polymerase in NF-kappaB transcriptional activation. *Biol Chem* **380**: 953-959.
- Hatakeyama K, Nemoto Y, Ueda K, Hayaishi O (1986) Purification and characterization of poly(ADP-ribose) glycohydrolase. Different modes of action on large and small poly(ADP-ribose). *J Biol Chem.* **261**(32):14902-11.

- Hattori Y, Nishigori C, Tanaka T, Uchida K, Nikaido O, Osawa T, Hiai H, Imamura S, Toyokuni S (1996) 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine is increased in epidermal cells of hairless mice after chronic ultraviolet B exposure. *J Invest Dermatol* **107**: 733-737.
- Hauschildt S, Scheipers P, Bessler W G (1991) Inhibitors of Poly (ADP-Ribose) Polymerase Suppress Lipopolysaccharide-Induced Nitrite Formation in Macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* **179**: 865-871.
- Hauschildt S, Scheipers P, Bessler W G, Mulsch A (1992) Induction of Nitric Oxide Synthase in L929 Cells by Tumour-Necrosis Factor Alpha Is Prevented by Inhibitors of Poly(ADP-Ribose) Polymerase. *Biochem J* **288**: 255-600.
- Herceg Z, Wang Z G (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 A (2000) Fast Signal-Induced Activation of Poly(ADP-Ribose) Polymerase: a Novel Downstream Target of Phospholipase c. *J Cell Biol* **150**: 293-307.
- Ikejima M, Gill DM (1988) Poly(ADP-ribose) degradation by glycohydrolase starts with an endonucleolytic incision. *J Biol Chem.* **263(23)**:11037-40.
- Jagtap P, Soriano F G, Virág L, Liaudet L, Mabley J, Szabó E, Hasko G, Marton A, Lorigados C B, Gallyas F, Sumegi B, Huang H, Hoyt D G, Southan G J, Szabó C (2002) Novel Phenanthridinone Inhibitors of Poly(ADP-Ribose) Synthetase: Potent Cytoprotective and Anti-Shock Agents. *Crit Care Med* **30**: 1071-1082.
- Jiang S A, Chow S C, Nicotera P, Orrenius S (1994) Intracellular Ca^{2+} signals activate apoptosis in thymocytes. Studies using the Ca^{2+} -ATPase inhibitor, thapsigargin. *Exp Cell Res* **212**: 84-92.
- 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**:385–389
- Kanai Y, Tanuma S, Sugimura T (1981) Immunofluorescent Staining of Poly(ADP-Ribose) in Situ in HeLa Cell Chromosomes in the M Phase. *Proc Natl Acad Sci USA* **78**: 2801-2804.
- Karczewski J M, Peters J G, Noordhoek J (1999) Prevention of oxidant-induced cell death in Caco-2 colon carcinoma cells after inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase and Ca^{2+} chelation: involvement of a common mechanism. *Biochem Pharmacol* **57**: 19-26.
- Kas E, Poljac L, Adachi Y, Laemmli U K (1993) A model for chromatin opening: stimulation of topoisomerase II and restriction enzyme cleavage of chromatin by distamycin. *EMBO J* **12**: 115-126
- Kaufmann S H, Desnoyers S, Ottaviano Y, Davidson N E, Poirier G G (1993) Specific Proteolytic Cleavage of Poly(ADP-Ribose) Polymerase: an Early Marker of Chemotherapy-Induced Apoptosis. *Cancer Res* **53**: 3976-3985.

- Kirsten E, Bauer PI, Kun E (1991) Cellular regulation of ADP-ribosylation of proteins. IV. Conversion of poly(ADP-ribose) polymerase activity to NAD-glycohydrolase during retinoic acid-induced differentiation of HL60 cells. *Exp Cell Res*. **194**(1):1-8.
- Kong S K, Yim M B, Stadtman E R, Chock P B. (1996) Peroxynitrite disables the tyrosine phosphorylation regulatory mechanism: Lymphocyte-specific tyrosine kinase fails to phosphorylate nitrated cdc2(6-20)NH₂ peptide. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 3377-3382.
- Kumari S R, Mendoza-Alvarez H, Alvarez-Gonzalez R (1998) Functional Interactions of P53 With Poly(ADP-Ribose) Polymerase (PARP) During Apoptosis Following DNA Damage: Covalent Poly(ADP-Ribosyl)ation of P53 by Exogenous PARP and Noncovalent Binding of P53 to the M(r) 85,000 Proteolytic Fragment. *Cancer Res* **58**: 5075-5078.
- Le Goffe C, Vallette G, Charrier L, Candelon T, Bou-Hanna C, Bouhours J F, Labois C L (2002) Metabolic control of resistance of human epithelial cells to H₂O₂ and NO stresses. *Biochem J* **364**(Pt 2):349-359.
- Lee J Y, Kim Y H, Koh J Y (2001) Protection by pyruvate against transient forebrain ischemia in rats. *J Neurosci* **21**: RC171.
- Lindahl T, Satoh M S, Poirier G G, Klungland A (1995) Post-Translational Modification of Poly(ADP-Ribose) Polymerase Induced by DNA Strand Breaks. *Trends Biochem Sci* **20**: 405-411.
- Lubet R A, McCarvill J T, Schwartz J L, Putman D L, Schechtman L M (1986) Effects of 3-aminobenzamide on the induction of morphologic transformation by diverse compounds in Balb/3T3 cells in vitro. *Carcinogenesis* **7**: 71-75.
- Mabley J G, Jagtap P, Perretti M, Getting S J, Salzman A L, Virag L, Szabo E, Soriano F G, Liaudet L, Abdelkarim G E, Hasko G, Marton A, Southan G J, Szabo C (2001) Anti-inflammatory effects of a novel, potent inhibitor of poly(ADP-ribose) polymerase. *Inflamm Res* **50**: 561-569.
- Malanga M, Pleschke J M, Kleczkowska H E, Althaus F R (1998) Poly(ADP-Ribose) Binds to Specific Domains of P53 and Alters Its DNA Binding Functions. *J Biol Chem* **273**: 11839-11843.
- Marletta M A, Hurshman A R, Rusche K M. Catalysis by nitric oxide synthase. *Curr Opin Chem Biol* **2**: 656-663.
- Mazen A, Menissier-De Murcia J, Molinete M, Simonin F, Gradwohl G, Poirier G, De Murcia G (1989) Poly(ADP-Ribose)Polymerase: a Novel Finger Protein. *Nucleic Acids Res* **17**: 4689-4698.
- McConkey D J, Hartzell P, Nicotera P, Orrenius S (1989) Calcium-activated DNA fragmentation kills immature thymocytes. *FASEB J* **3**: 1843-1849.
- Menissier-de Murcia J, Niedergang C, Trucco C, Ricoul M, Dutrillaux B, Mark M, Oliver F J, Masson M, Dierich A, LeMeur M, Walztinger C, Chambon P, De Murcia G (1997). Requirement of poly(ADP-ribose) polymerase in recovery from DNA damage in mice and in cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 7303-7307.

- Miwa M, Sugimura T (1971) Splitting of the ribose-ribose linkage of poly(adenosine diphosphate-ribose) by a calf thymus extract. *J Biol Chem.* **246(20)**:6362-4.
- Miwa M, Tanaka M, Matsushima T, Sugimura T (1974) Purification and properties of glycohydrolase from calf thymus splitting ribose-ribose linkages of poly(adenosine diphosphate ribose). *J Biol Chem.* **249(11)**:3475-82.
- Molinete M, Vermeulen W, Burkle A, Menissier-de Murcia J, Kupper JH, Hoeijmakers JH, de Murcia G (1993) Overproduction of the poly(ADP-ribose) polymerase DNA-binding domain blocks alkylation-induced DNA repair synthesis in mammalian cells. *EMBO J.* **12**: 2109-2117
- Naegeli H, Althaus FR (1991) Regulation of poly(ADP-ribose) polymerase. Histone-specific adaptations of reaction products. *J Biol Chem.* **266(16)**:10596-601.
- Nagele 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.
- Nicotera P, Bellomo G, Orrenius S (1992) Calcium-mediated mechanisms in chemically induced cell death. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **32**: 449-470.
- Nicotera P, Leist M, Ferrando-May E (1999) Apoptosis and Necrosis: Different Execution of the Same Death. *Biochem Soc Symp* **66**: 69-73.
- Nicotera P, Orrenius S (1998) The role of calcium in apoptosis. *Cell Calcium* **23**: 173-180.
- Nicotera P, Zhivotovsky B, Bellomo G, Orrenius S (1994) Ion signalling in apoptosis. In: Schimke R T, Mihich E (eds) Apoptosis. New York, Plenum Press, pp 97-110. *Nucleic Acids Res* **26**:1891-1898
- Oliver F J, Menissier-De M J, Nacci C, Decker P, Andriantsitohaina R, Muller S, de La Rubia G, Stoclet J C, De Murcia G (1999) Resistance to endotoxic shock as a consequence of defective NF-kappaB activation in poly (ADP-ribose) polymerase-1 deficient mice. *EMBO J* **18**: 4446-4454.
- Pacher P, Liaudet L, Mabley J, Komjati K, Szabo C (2002) Pharmacologic inhibition of poly(adenosine diphosphate-ribose) polymerase may represent a novel therapeutic approach in chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol* **40**: 1006-1016.
- Packer M A, Murphy M P (1994) Peroxynitrite causes calcium efflux from mitochondria which is prevented by Cyclosporin A. *FEBS Lett* **345**: 237-240.
- Park S D, Kim C G, Kim M G (1983) Inhibitors of Poly(ADP-Ribose) Polymerase Enhance DNA Strand Breaks, Excision Repair, and Sister Chromatid Exchanges Induced by Alkylating Agents. *Environ Mutagen* **5**: 515-525.
- Pellat-Deceunynck C, Wietzerbin J, Drapier J C (1994) Nicotinamide Inhibits Nitric Oxide Synthase mRNA Induction in Activated Macrophages. *Biochem J* **297**: 53-58.

Perchellet J P, Gali H U, Perchellet E M, Klish D S, Armbrust A D (1992) Antitumor-promoting activities of tannic acid, ellagic acid, and several gallic acid derivatives in mouse skin. *Basic Life Sci* **59**: 783-801.

Rawlingson A, Greenacre S A, Brain S D (2000) Generation of peroxynitrite in localised, moderate temperature burns. *Burns* **26**: 223-227.

Richardson D S, Allen P D, Kelsey S M, Newland A C (1999) Effects of PARP Inhibition on Drug and Fas-Induced Apoptosis in Leukaemic Cells. *Adv Exp Med Biol* **457**: 267-279.

Satoh MS, Lindahl T (1992) Role of poly(ADP-ribose) formation in DNA repair. *Nature*. **356(6367)**:356-8.

Schreiber V, Hunting D, Trucco C, Gowans B, Grunwald D, De Murcia G, de Murcia J M (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.

Simbulan-Rosenthal C M, Rosenthal D S, Hilz H, Hickey R, Malkas L, Applegren N, Wu Y, Bers G, Smulson M E (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**: 11622-11633.

Simbulan-Rosenthal C M, Rosenthal D S, Luo R B, Samara R, Jung M, Dritschilo A, Spoonde A, Smulson M E (2001) Poly(ADP-Ribosyl)ation of P53 in Vitro and in Vivo Modulates Binding to Its DNA Consensus Sequence. *Neoplasia* **3**: 179-188.

Simbulan-Rosenthal C M, Rosenthal D S, Luo R, Smulson M E (1999) Poly(ADP-Ribosyl)ation of P53 During Apoptosis in Human Osteosarcoma Cells. *Cancer Res* **59**: 2190-2194.

Simbulan-Rosenthal CM, Haddad BR, Rosenthal DS, Weaver Z, Coleman A, Luo R, Young HM, Wang ZQ, Ried T, Smulson ME (1999) Chromosomal aberrations in PARP(—) mice: genome stabilization in immortalized cells by reintroduction of poly(ADP-ribose) polymerase cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**:13191–13196

Simbulan-Rosenthal CM, Rosenthal DS, Luo R, Li JH, Zhang J, Smulson ME (2001) Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase activity is insufficient to induce tetraploidy. *Nucleic Acids Res* **29**:841–849

Smith S (2001) The World According to PARP. *Trends Biochem Sci* **26**: 174-179.

Squier M K T, Miller A C K, Malkinson A M, Cohen J J (1994) Calpain activation in apoptosis. *J Cell Physiol* **159**: 229-237.

Stennicke H R, Salvesen G S (1997) Biochemical characteristics of caspases-3, -6, -7, and -8. *J Biol Chem* **272**: 25719-25723.

Szabó C (1996) The pathophysiological role of peroxynitrite in shock, inflammation, and ischemia-reperfusion injury. *Shock* **6**: 79-88.

Szabó C (1996) DNA strand breakage and activation of poly-ADP ribosyltransferase: a cytotoxic pathway triggered by peroxynitrite. *Free Radic Biol Med* **21**: 855-869.

Szabó C, Dawson VL (1998) Role of poly(ADP-ribose) synthetase in inflammation and ischaemia-reperfusion. *Trends Pharmacol Sci* **19**:287–298

Szabó C, Virág L, Cuzzocrea S, Scott GJ, Hake P, O'Connor MP, Zingarelli B, Salzman AL, Kun E (1998) Protection against peroxynitrite-induced fibroblast injury and arthritis development by inhibition of poly (ADP-ribose) synthetase. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**:3867–3872

Szabó É, Virág L, Bakondi E, Gyüre L, Haskó G, Bai P, Hunyadi J, Gergely P, Szabó 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, Yoshihara K, Tohno Y, Kojima K, Kameoka M, Kamiya T (1995) Inhibition and Down-Regulation of Poly(ADP-Ribose) Polymerase Results in a Marked Resistance of HL-60 Cells to Various Apoptosis-Inducers. *Cell Mol Biol (Noisy -le -grand)* **41**: 771-781.

Tanuma S I, Enomoto T, Yamada M A (1978) Changes in the Level of Poly ADP-Ribosylation During a Cell Cycle. *Exp Cell Res* **117**: 421-430.

Tanuma S, Kawashima K, Endo H (1986) Purification and properties of an (ADP-ribose)n glycohydrolase from guinea pig liver nuclei. *J Biol Chem.* **261(2)**:965-9.

Tasker R C, Sahota S K, Cotter F E, Williams S R (1998) Early postischemic dantrolene-induced amelioration of poly(ADP-ribose) polymerase-related bioenergetic failure in neonatal rat brain slices. *J Cereb Blood Flow Metab* **18**:1346-1356.

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 Leukemic Cells Resistant to Triazene Compounds. *Leukemia* **13**: 901-909.

Tewari M, Quan L T, O'Rourke K, Desnoyers S, Zeng Z, Beidler D R, Poirier G G, Salvesen G S, Dixit V M (1995) Yama/CPP32 Beta, a Mammalian Homolog of CED-3, Is a CrmA-Inhibitible Protease That Cleaves the Death Substrate Poly(ADP-Ribose) Polymerase. *Cell* **81**: 801-809.

Thibeault L, Hengartner M, Lagueux J, Poirier GG, Muller S (1992) Rearrangements of the nucleosome structure in chromatin by poly(ADP-ribose). *Biochim Biophys Acta.* **1121(3)**:317-24.

Tokube K, Kizosue T, Arita M (1996) Opening of cardiac K_{ATP} channel by oxygen free radicals produced by xanthine oxidase reaction. *Am J Physiol* **271**: H478-H489.

Tong W M, Hande M P, Lansdorp P M, Wang Z Q (2001) DNA Strand Break-Sensing Molecule Poly(ADP-Ribose) Polymerase Cooperates With P53 in Telomere Function, Chromosome Stability, and Tumor Suppression. *Mol Cell Bio* **21**: 4046-4054.

- Tsutsumi M, Masutani M, Nozaki T, Kusuoka O, Tsujiuchi T, Nakagama H, Suzuki H, Konishi Y, Sugimura T (2001) Increased susceptibility of poly(ADP-ribose) polymerase-1 knockout mice to nitrosamine carcinogenicity. *Carcinogenesis* **22**: 1-3.
- Tymianski M, Wallace M C, Spigelman I, Uno M, Carlen P L, Tator C H, Charlton M P (1993) Cell-permeant Ca^{2+} chelators reduce early excitotoxic and ischemic neuronal injury in vitro and in vivo. *Neuron* **11**: 221-235.
- Ueda N, Shah S V (1992) Role of intracellular calcium in hydrogen peroxide-induced renal tubular cell injury. *Am J Physiol* **263(2 Pt 2)**: F214-F221.
- Vessey D A, Lee K H, Boyer T D (1995) Differentiation-induced enhancement of the ability of cultured human keratinocytes to suppress oxidative stress. *J Invest Dermatol* **104**: 355-358.
- Villaponteau B, Pribil T M, Grant M H, Martinson H G (1986) Novobiocin induces the in vivo cleavage of active gene sequences in intact cells. *J Biol Chem* **261**: 10359-10365.
- 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.
- Virág L, Scott G S, Cuzzocrea S, Marmer D, Salzman A L, Szabó C (1998a) Peroxynitrite-induced thymocyte apoptosis: the role of caspases and poly-(ADP-ribose) synthetase (PARS) activation. *Immunology* **94**: 345-355.
- Virag L, Szabo C (2002). The Therapeutic Potential of Poly(ADP-Ribose) Polymerase Inhibitors. *Pharmacol Rev* **54**: 375-429.
- 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. *Exp Dermatol* **11**: 189-202.
- Watson A J, Askew J N, Benson R S (1995) Poly(Adenosine Diphosphate Ribose) Polymerase Inhibition Prevents Necrosis Induced by H_2O_2 but Not Apoptosis. *Gastroenterology* **109**: 472-482.
- Weik R, Neumcke B (1989) ATP-sensitive potassium channels in adult mouse skeletal muscle: characterization of the ATP-binding site. *J Membr Biol* **110**: 217-226.
- Weller R (1997) Nitric oxide--a newly discovered chemical transmitter in human skin. *Br J Dermatol*: **137**: 665-672.
- Weller R, Pattullo S, Smith L, Golden M, Ormerod A, Benjamin N (1996) Nitric oxide is generated on the skin surface by reduction of sweat nitrate. *J Invest Dermatol* **107**: 327-331.
- Wesierska-Gadek J, Schmid G (2001) Poly(ADP-Ribose) Polymerase-1 Regulates the Stability of the Wild-Type P53 Protein. *Cell Mol Biol Lett* **6**: 117-140.

Wesierska-Gadek J, Schmid G, Cerni C (1996) ADP-Ribosylation of Wild-Type P53 in Vitro: Binding of P53 Protein to Specific P53 Consensus Sequence Prevents Its Modification. *Biochem Biophys Res Commun* **224**: 96-102.

Xiong H, Buck E, Stuart J, Pessah I N, Salama G, Abramson J J (1992) Rose Bengal activates the Ca^{2+} release channel skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *Arch Biochem Biophys* **292**: 522-528.

Ying W, Chen Y, Alano C C, Swanson R A (2002) Tricarboxylic acid cycle substrates prevent PARP-mediated death of neurons and astrocytes. *J Cereb Blood Flow Metab* **22**: 774-779.

Ying W, Sevigny M B, Chen Y, Swanson R A (2001) Poly(ADP-ribose) glycohydrolase mediates oxidative and excitotoxic neuronal death. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 12227-12232.

Ying W, Sevigny M B, Chen Y, Swanson R A (2001) Poly(ADP-Ribose) Glycohydrolase Mediates Oxidative and Excitotoxic Neuronal Death. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 12227-12232.

Ying W, Swanson R A (2000) The poly(ADP-ribose) glycohydrolase inhibitor gallotannin blocks oxidative astrocyte death. *Neuroreport* **11**: 1385-1388.

Yuspa S H, Hennings H, Tucker R W, Jaken S, Kilkenny A E, Roop D R (1988) Signal transduction for proliferation and differentiation in keratinocytes. *Ann N Y Acad Sci* **548**: 191-196.

Zhang J, Snyder SH (1993) Purification of a nitric oxide-stimulated ADP-ribosylated protein using biotinylated beta-nicotinamide adenine dinucleotide. *Biochemistry* **32**:2228–2233

Zhivotovsky B, Cedervall B, Jiang S A, Nicotera P, Orrenius S (1994) Involvement of Ca^{2+} in the formation of high molecular weight DNA fragments in thymocyte apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* **202**: 120-127.

Ziegler M, Oei S L (2001) A Cellular Survival Switch: Poly(ADP-Ribosyl)ation Stimulates DNA Repair and Silences Transcription. *Bioessays* **23**: 543-548.

Zingarelli B, Salzman A L, 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.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsősorban témavezetőmnek, Dr. Virág Lászlónak tartozom sok köszönettel, aki az elmúlt néhány év során nagyon sok hasznos gyakorlati és elméleti tapasztalatot adott át nekem, mindvégig figyelemmel kísérte és segítette munkámat.

Szeretném megköszönni intézetvezetőmnek, Gergely Pál professzor úrnak a lehetőséget, hogy Ph.D. kutatómunkám elvégzéséhez biztosította számomra a szükséges feltételeket. Köszönöm a sok hasznos tanácsát, amikkel munkámat és előrehaladásomat nem egyszer segítette.

Intézetem valamennyi dolgozójának köszönöm, hogy mindig készségesen segítettek nekem, ha hozzájuk fordultam. Külön köszönetet szeretnék mondani Erdélyi Kata és Bai Péter Ph.D. hallgató kollégáimnak, akik a szakmai segítségen túl is sok mindenben igyekeztek segítségemre lenni.

Köszönettel tartozom szüleimnek, és öcsémnek Gábornak, akik próbáltak lehető legtöbb terhet levenni a vállamról, így lényegesen több időm és energiám maradhatott a munkámra.

Végül köszönöm férjemnek, Istvánnak a munkám és dolgozatom megírása során nyújtott segítséget, a figyelmet és elsősorban azt a nagy türelmet, amivel a dolgozatírás utolsó szakaszában nagyon sokat segített.

ÖSSZEFOGLALÁS

Számos kórfolyamat kialakulásában játszik jelentős szerepet, a reaktív oxigén- és nitrogén-tartalmú intermedierek (ROI, RNI) fokozott mértékű termelődésével jellemezhető oxidatív stressz. E reaktív intermedierek, mint pl. a peroxinitrit és a hidrogén-peroxid DNS töréseket okozva aktiválják a poli(ADP-ribóz) polimeráz (PARP-1) enzimet, mely szubsztrátját a NAD^+ -ot nikotinamidra és ADP-ribózra hasítja, majd az ADP-ribóz egységeket specifikus akceptor fehérjékhez kapcsolva elágazó polimereket szintetizál. A PARP-1-nek számos biológiai folyamatban (DNS hibajavítás, kromatinszerkezet, replikáció, transzkripció és telomerhossz szabályozása) tulajdonítanak szerepet. Azonban gyulladásos folyamatokban, sokkos állapotokban és reperfüzió alkalmával a fokozott mértékben termelődő reaktív intermedierek túlzott mértékű PARP aktivációt indukálnak, ami elsősorban a sejtek NAD^+ és ATP raktárainak kimerítésén keresztül nekrozist okoz. Munkacsoportunk kidolgozott három, a PARP aktivitás detektálására alkalmas: enzimeitokémiai, enzimhisztokémiai és sejtes ELISA módszert, melyekben biotinnal jelölt NAD^+ -ot használunk a PARP szubsztrátjaként. Megvizsgáltuk továbbá a poli(ADP-ribóz) katabolizmust szabályozó poli(ADP-ribóz) glikohidroláz (PARG) enzim szerepét az oxidatív stresszel indukált citotoxicitásban. Eredményeink szerint a PARG gátló gallotannin (GT) szignifikánsan csökkentette HaCaT sejtekben a peroxinitrittel/hidrogén-peroxiddal indukált citotoxicitást (csökkent LDH felszabadulás, propidium jodid felvétel és kaszpáz-3 aktivitás), gátolta a sejtek NAD^+ raktárainak kimerítését, fokozta a poli(ADP-ribóz) akkumulációt, s ezáltal gátolta a sejtek PARP aktivitását. További munkánk során a kalcium mobilizáció és a sejtdenzitás szerepét vizsgáltuk HaCaT keratinocitákban a peroxinitrittel és hidrogén-peroxiddal indukált citotoxicitásban. Kimutattuk, hogy a peroxinitrit jelentős növekedést okozott a sejtek intracelluláris kalcium koncentrációjában. A kalcium kelátor BAPTA-AM szignifikánsan csökkentette a peroxinitrittel és hidrogén-peroxiddal indukált citotoxicitást. Azt is megfigyeltük, hogy differenciálódó, konfluens keratinociták rezisztensek az oxidatív stresszel szemben. Tapasztalataink alapján az oxidatív stressz által kiváltott citotoxicitásban alapvető és valószínűleg egymással összefüggő szerepe van a Ca^{2+} homeosztázisnak, a sejtdenzitásnak és a poli-ADP-ribózilációnak.

SUMMARY

Various diseases are characterized by oxidative stress, when overproduction of reactive oxygen- and nitrogen-centered intermediates (ROI, RNI) occurs. Reactive species such as peroxynitrite and hydrogen peroxide are capable of causing DNA breakage triggering the activation of the DNA nick sensor enzyme poly(ADP-ribose) polymerase (PARP-1). Activated PARP-1 cleaves NAD^+ into nicotinamide and (ADP-ribose), then attaches ADP-ribose residues onto nuclear acceptor proteins, and synthesizes branching polymer chains. PARP-1 fulfills a great number of biological functions ranging from the regulation of DNA repair, chromatin structure, replication, transcription to facilitating telomere elongation. However, overactivation of PARP by ROI and RNI in inflammation, shock and reperfusion injury, leads to necrotic cell death mainly due to depletion of NAD^+ and ATP. We have developed three applications: enzyme cytochemistry, enzyme histochemistry and cellular ELISA to detect the activation of poly(ADP-ribose) polymerase in oxidatively stressed cells and tissues. The assays are based on the use of biotinylated NAD^+ as PARP substrate. Furthermore, we have investigated the role of poly(ADP-ribose) glycohydrolase (PARG), the main poly(ADP-ribose) catabolyzing enzyme in oxidative stress-induced cytotoxicity. We have found that inhibition of PARG by gallotannin (GT) provided significant cytoprotection to peroxynitrite/hydrogen peroxide treated HaCaT cells (decrease in LDH release, propidium iodide uptake and caspase-3 activation), inhibited depletion of cellular NAD^+ pools and caused the accumulation of poly(ADP-ribose) and inhibition of cellular PARP activity. Moreover, we have investigated the possible role of intracellular Ca^{2+} mobilization and high cell density, in the regulation of sensitivity of HaCaT keratinocytes to oxidative stress-induced cytotoxicity. First we have demonstrated that peroxynitrite triggered an elevation in intracellular calcium levels. Treatment of cells with the cell permeable calcium chelator BAPTA-AM provided significant cytoprotection against peroxynitrite/hydrogen peroxide-induced cytotoxicity. We have also observed that differentiating confluent keratinocytes were highly resistant to oxidative stress. Our results support a crucial role of Ca^{2+} homeostasis, cell density and poly(ADP-ribose) metabolism in the regulation of oxidative stress-induced cytotoxicity.

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

Idézhető absztraktok

Szabó É, **Bakondi E**, Bai P, Hunyadi J, Gergely P, Szabó C, Virág L: Regulation of oxidative stress-induced cytotoxicity in HaCaT keratinocytes. 2001 15 (Suppl 2):200 *J. Eur. Acad. Dermatol. Venerol.*