

Bai Péter

**Reaktív nitrogén intermedierek által indukált poli(ADP-ribóz)
polimeráz és mátrix metalloproteináz aktiváció vizsgálata
in vitro és *in vivo***

Egyetemi doktori (Ph. D.) értekezés

Témavezető: Dr. Virág László

**Debreceni Egyetem, Orvos- és Egészségtudományi Centrum
Orvosi Vegytani Intézet**

2003

I. Tartalomjegyzék

I.	TARTALOMJEGYZÉK	1
II.	RÖVIDÍTÉSEK	3
III.	BEVEZETÉS	4
1.	NITROZATÍV STRESSZ ÉS SZABAD GYÖKÖK	4
A.	Reaktív nitrogén intermedierek: nitrogén monoxid, peroxinitrit és nitroxil	4
B.	A reaktív nitrogén intermedierek biokémiai hatásai	6
2.	A PARP GÉNCSALÁD	9
A.	A PARP-1 és a PARP család további tagjai	9
B.	A PARP-1 enzimológiája	11
C.	A PARP-1 funkciói	13
	<i>a) A PARP szerepe a genomi integritás fenntartásában, a DNS hibajavításban és a replikációban</i>	13
	<i>b) A PARP a génexpresszió és a differenciálódás szabályzásában</i>	16
	<i>c) A PARP szerepe a sejthalál során</i>	18
3.	OXIDATÍV STRESSZ PATOLÓGIAI SZEREPE	21
A.	A peroxinitrit és a nitroxil kórélettani hatásai	21
B.	Oxidatív stressz által kiváltott patológias enzimaktiváció: PARP és mátrix metalloproteináz aktiváció	22
C.	A doxorubicin által okozott kardiomiopátia és a reaktív nitrogén intermedierek	25
IV.	CÉLKITŰZÉS	27
V.	ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	28
1.	ANYAGOK	28
2.	ÁLLATOK	28
A.	Timocita preparálás és kezelés	28
B.	Akut doxorubicin kezelés	29
3.	MÓDSZEREK	29
A.	Egyszálú DNS törések kimutatása	29
B.	Radioaktív PARP aktivitásmérés	30
C.	Immunodotblot alapú poli(ADP-ribóz)meghatározás	30
D.	Citotoxicitás meghatározása	31
E.	Annexin-FITC - propidium jodid kettős jelölés	31
F.	A mitokondriális membrán depolarizációjának és a szuperoxid termelés kimutatása	31
G.	Kaspáz-3 aktivitás mérése	32
H.	A DNS fragmentáció kimutatása (DNS létra képződése)	32
I.	Nitro tirozin kimutatása Western blot segítségével	33
J.	Szérum laktát dehidrogenáz és kreatin kináz aktivitásának meghatározása	33
K.	Metalloproteináz zimográfia	33
4.	STATISZTIKAI ANALÍZIS	34

VI.	EREDMÉNYEK	35
1.	A NITROXIL ÁLTAL KIVÁLTOTT TIMOCITA SEJTHALÁL VIZSGÁLATA	35
A.	DNS törés és PARP aktiváció	35
B.	A nitroxil által kiváltott citotoxicitás és mitokondriális változások vizsgálata	38
C.	Nitroxil által kiváltott timocita sejthalál vizsgálata	41
D.	Tirozin nitrálódás vizsgálata	43
2.	A PARP ÉS SZABAD GYÖKÖK SZEREPE A DOXORUBICIN ÁLTAL OKOZOTT KARDIOMIOPÁTIÁBAN	44
A.	Szabad gyökök és a PARP szerepe kardiomiociták doxorubicin által kiváltott elhalásában	44
B.	Metalloproteináz aktiváció vizsgálata doxorubicin kardiomiopátiában	46
VII.	DISZKUSSZIÓ	48
1.	A NITROXIL CITOTOXICITÁSÁNAK VIZSGÁLATA	48
2.	A DOXORUBICIN ÁLTAL OKOZOTT KARDIOMIOPÁTIA VIZSGÁLATA	53
VIII.	KONKLÚZIÓK	58
IX.	IRODALOMJEGYZÉK	59
X.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	80
XI.	ÖSSZEFOGLALÁS	81
XII.	SUMMARY	82
XIII.	PUBLIKÁCIÓS LISTA	83
XIV.	FÜGGELÉK (KÖZLEMÉNYEK MÁSOLATAI)	86

II. Rövidítések

AIF – apoptózis indukáló faktor
APMA – 4-(acetoximerkurio)anilin
p-aminofenilmerkuri acetát
AS – Angeli só
ATM - ataxia-teleangiectasia gén
fehérjeterméke
BAPTA-AM - bis-(o-amino-fenoxi)etán-
N,N,N',N'-tetraecetsav-metil
észter
BER – báziskihasítási repair
CDK – ciklin-függő kináz
CK – kreatin kináz
Dio – 3,3'-dihexiloxakarbocianin jodid
DNS-PK – DNS-függő protein kináz
DOX – doxorubicin
ECL – enhanced chemiluminescence
EDTA – etilén-diamin-tetraecetsav
eNOS – endoteliális nitrogén-monoxid
szintáz
FITC – fluoreszcein izotiocianát
FCS – főtális borjúsavó
GSH – redukált glutation
HE – hidroetidin
iNOS – indukálható nitrogén-monoxid
szintáz
NFκB - nukleáris faktor kappa B

i.p. – intraperitoneális
LDH – laktát dehidrogenáz
MMP – mátrix metalloproteináz
MRC – multiprotein replikációs
komplex
NAD⁺ – nikotinamid adenin dinukleotid
nNOS – neuronális nitrogén-monoxid
szintáz
NO – nitrogén-monoxid
NO[•] – nitroxil
NOS – nitrogén-monoxid szintáz
PAR – poli(ADP-ribóz)
PARG – poli(ADP-ribóz) glikohidroláz
PARP – poli(ADP-ribóz) polimeráz
PI – propidium jodid
PMSF – fenil-metilszulfonil-fluorid
PNA – para-nitro-anilin
p.o. – per os
ROI – reaktív oxigén intermedier
RNI – reaktív nitrogén intermedier
SDS-PAGE – nátrium dodecil-szulfát
poliakrilamid gélelektroforézis
sPARP – short PARP
TCA – triklórecetsav
vPARP – vault PARP
3AB – 3-amino benzamid

III. Bevezetés

1. Nitroztatív stressz és szabad gyökök

Az elmúlt évtizedek biológiai kutatásainak legfontosabb eredményei közé tartozik a szabad gyökök *in vivo* jelenlétének kimutatása, illetve annak a felismerése, hogy ezek a vegyületek a sejtek fiziológiás, vagy patofiziológiás működése során jelentős szerepet játszanak. A szabad gyökök lehetnek oxigén-, illetve nitrogén-alapúak. Az előbbi esetben reaktív oxigén intermedierekről (ROI), az utóbbi esetben reaktív nitrogén intermedierekről (RNI) beszélünk.

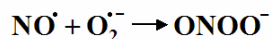
A. Reaktív nitrogén intermedierek: nitrogén-monoxid, peroxinitrit és nitroxil

Az NO-t élő rendszerekben a nitrogén-monoxid szintáz (NOS) enzimek termelik. A reakció két lépésből áll, a szubsztrát L-argininből NADPH és oxigén segítségével N^ω-hidroxi-L-arginin intermediereken át L-citrullin és NO képződik (Nathan, 1992). Jelenleg háromféle NOS izoforma ismert: a neuronális NOS (nNOS), az indukálható NOS (iNOS) és az endoteliális NOS (eNOS). Az nNOS elsősorban neuronokban található meg, az általa termelt NO ingerületátviteli folyamatokban játszik szerepet. A termelődő NO mennyisége a pmol-os nagyságrendbe esik. Az nNOS konstitutívan expresszálódik és elsősorban citoszolikus lokalizációjú. Az intracelluláris kalciumszint emelkedése aktiválja az nNOS-t (Knowles és Moncada, 1994). Az eNOS több tulajdonságában hasonlít az nNOS-hoz, így kalciumfüggésében, konstitutív jelenlétében és a termelődő NO mennyiségében, azonban az nNOS-sal ellentétben az eNOS membránkötött. Az eNOS által termelt NO az érfali simaizmon hat és az érfal relaxációjához vezet (Knowles és Moncada, 1994).

Jelentősen eltér az előző két izoformától az iNOS. Citoszolikus elhelyezkedésű és a nem indukált sejtekben nincs jelen. Az iNOS erősen köti a kalmódulint, ezért aktivitása gyakorlatilag kalcium függetlenné válik. Az iNOS regulációja expressziós szinten történik. Nagyságrendekkel nagyobb, nmol mennyiségű NO termelésére képes, mint az nNOS és az eNOS. Az iNOS által termelt NO elsődleges funkciója az immunocitotoxicitás (Moncada és mtsai, 1991, Lowenstein és mtsai, 1994).

Hosszú időn át az NO-t kétarcú molekulaként kezelték, amely képes mind citoprotektív, mind citotoxikus hatások kialakítására. További RNI-k - mint például a peroxinitrit – biológiai rendszerekben való jelenlétének felismerése után az NO-t inkább citoprotektív hatású vegyületnek tartják (Virág és Szabó, 2002).

Az NO reakcióba léphet molekuláris oxigénnel, szabad gyökökkel, tiol csoportokkal, illetve átmeneti fémekkel. Az NO szuperoxid-anionnal lezajló reakciójában képződő vegyületet peroxinitritnek nevezzük (Beckman és Koppenol, 1996, Groves, 1999), képződése az alábbi egyenlettel jellemezhető:



Az NO és a szuperoxid addíciójának reakciósebessége megközelíti a diffúziós limitet, vagyis majdnem minden NO - szuperoxid ütközés peroxinitrit képződéshez vezet. Mivel a szuperoxid féléletideje nagyságrendekkel rövidebb (kevesebb, mint egy ezredmásodperc), mint az NO féléletideje (néhány másodperc), a peroxinitritképződés csak állandó szuperoxid termelődés közben történhet. A peroxinitrit anion (ONOO⁻) protonálódik savas pH-n. A protonált forma homolitikusan bomlik, hidroxil gyököt, illetve nitrogén dioxidot képezve. A peroxinitrit egyébként nem igazi szabad gyök, mivel nem rendelkezik párosítatlan elektronnal.

Az NO egyelektronos redukciójával keletkezik a nitroxil anion (NO⁻). A nitroxil *in vivo* több reakció során termelődhet. NOS-ok is termelhetnek nitroxilt, a N^ω-hidroxi-L-arginin intermedier nem NO irányú metabolizmusával (Hobbs és mtsai, 1994, Schmidt és mtsai, 1996, Rusche és mtsai, 1998), különböző redox rendszerek (a kinon-hidrokinon, vagy a citokróm c) redukálhatják az NO-t (Sharpe és Cooper 1998, Ohshima és mtsai, 1998), illetve nitroxil felszabadulhat nitrozotiolokból, illetve nitrozohemoglobinból is (Gow és Stamler, 1998, Arnelle és Stamler, 1995). Savi pH-n a nitroxil bomlik, fiziológiás pH-n képes protonálódásra, így fiziológiás körülmények között a deprotonált és a protonált forma egyaránt jelen van (Bartberger és mtsai, 2001). A nitroxil eliminációja ezen kívül oxidációval történik, melyben a kinonok, réz ionok, illetve a citokróm-c játszhat szerepet (Buyukafsar és mtsai, 2001, Nelli és mtsai, 2000). Liochev

és Fridovich (2002) felvetette azt a lehetőséget is, hogy a réz-cink szuperoxid diszmutáz képes lehet a nitroxil oxidációjára egyik fémionjának redukciója árán.

B. A reaktív nitrogén intermedierek biokémiai hatásai

A szabad gyökök, így az RNI-k a biológiai molekulákat (lipidek, nukleinsavak, fehérjék) módosíthatják, így kémiai tulajdonságaik megváltoztatásán keresztül biológiai tulajdonságaik is megváltozhatnak. Ezen módosítások lehetnek reverzibilisek vagy irreverzibilisek.

A fehérjék esetében az aminosavoldallancok módosítása játssza a legfontosabb szerepet. A ROI-k oxidációra képesek, az RNI-k képesek oxidációra és nitrálásra is. A peroxinitrit hatásairól rendelkezünk a legbővebb ismeretekkel az RNI-k közül. A peroxinitrit több aminosav (metionin, cisztein, triptofán, tirozin) oxidatív módosítására képes (Perrin és Koppenol, 2000, Viner és mtsai, 1999, Kuhn és mtsai, 1999, Kuhn és Geddes, 1999, Stepien és mtsai, 2000). Ennek következtében több enzim és ioncsatorna inaktiválódik: a triptofán- és a tirozin-hidroxiláz (Kuhn és mtsai, 1999, Kuhn és Geddes, 1999), a mangán tartalmú szuperoxid diszmutáz, bár ez utóbbi esetben már a nitrálás is szerepet játszik (MacMillan-Crow és mtsai, 1998).

A peroxinitrit által kiváltott nitrálódás a tirozin és a triptofán oldallancokon történik (Alvarez és mtsai 1996, Crow és Beckman, 1995). Több körülmény (szén-dioxid jelenléte, a pH és a mikrokörnyezet) szabja meg, hogy nitrálódás vagy oxidáció zajlik-e le. A hidrofób környezet (membránok, membránkompartmentek) a nitrálódásnak, míg a hidrofíl környezet az oxidációnak kedvez (Zhang és mtsai, 2001, Tien és mtsai, 1999, Berlett és mtsai, 1998). A reakcióban képződő nitrotirozint eredetileg az *in vivo* termelődő peroxinitrit indikátorának tekintették, és tekintik sokan a mai napig (Beckman és Koppenol, 1996, Crow és Ischiropulos, 1996). Meg kell azonban jegyeznünk, hogy a tirozin nitrálódásnak más, peroxinitrittől független útvonalát is leírták. A réz-cink szuperoxid diszmutáz is katalizálhatja a peroxinitrit által kiváltott tirozin nitrálását (Ischiropulos és mtsai, 1992), nitrotirozin keletkezhet nitritből és hidrogén-peroxidból peroxidáz katalizálta reakcióban (Eiserich és mtsai, 1998, Sampson és mtsai, 1998). A nitrit és a hipoklórsav reakciójának termékei szintén nitrálhatják a tirozint (Eiserich és mtsai, 1996). Egyes enzimek katalitikus centrumában található tirozil gyököt az NO

önmagában is képes nitrálni (Guiett és mtsai, 1998, Gunter és mtsai, 1997). Emiatt a nitrotirozin megjelenését szerencsésebb az emelkedett nitrozatív stressz indikátorának tekinteni.

A fent említett biokémiai változásoknak hatása van az enzimműködésre is. A sejtbeli szignáltranszdukciós útvonalak egy része peroxinitrit hatására aktiválódhat, kinázok (Go és mtsai, 1999, Klotz és mtsai, 2000, Mallozzi és mtsai, 1999, Oh-hasi és mtsai, 1999, Schieke és mtsai, 1999), vagy a foszfolipáz A₂ (Palomba és mtsai, 2000) aktiválódásán keresztül. Más szignálútvonalak azonban gátolódhatnak, például a tirozin foszforiláció gátlásán keresztül. A tirozin fenolos hidroxilcsoportját ugyanis egyszerre képesek módosítani a protein kinázok és a peroxinitrit, ami a tirozin oldallánc foszforilációjához (tirozin kinázok esetében), vagy nitrálódásához vezethet (peroxinitrit estében).

A peroxinitrit reakcióba lép tiolokkal, illetve átmeneti fémekkel is, így a peroxinitrit az olyan enzimek működését módosítja a leghatékonyabban, melyek aktív centrumában tiolok vagy átmeneti fémek vannak (Beckman és Koppenol, 1996, Groves, 1999, Radi és mtsai, 1991).

A nitroxil is általában a tiolesoportokkal reagál az enzimekben (Bartberger és mtsai, 2001). A nitroxil képes az NMDA receptor inaktivációjára a Cys³⁹⁹ S-nitrozilálásán keresztül, emiatt neuroprotektív hatású (Kim és mtsai, 1999). A nitroxil az alkohol-dehidrogenáz enzim inaktivációjához vezet (Shoeman és mtsai, 2000). H9C2 sejtben nitroxil hatására az Nrf2 transzkripció faktor aktiválódik és a hem oxigenáz-1 expressziója indukálódik (Naughton és mtsai, 2002), míg az élesztő Ace1 fémtartalmú transzkripció faktora inaktiválódik nitroxil expozícióra (Cook és mtsai, 2003). Fémiontartalmú enzimek közül a nitroxil képes a báziskihasítási repair (BER) egyik fémtartalmú enzimét, az formamidopirimidin-DNS glikozilázt (Fpg) inaktiválni cink-ujjainak tönkrétével, illetve gátolni a P450-et (Miranda és mtsai, 2003).

Mind a peroxinitrit, mind a nitroxil esetében figyeltek meg citotoxikus hatást. A peroxinitrit citotoxikusnak mutatkozott számos sejtvonalon, például HaCaT keratinocitákon (Bakondi és mtsai, 2003a,b), Raw makrofágokon (Virág és Szabó, 2001), timocitákon (Virág és mtsai, 1998a). A nitroxil citotoxikusnak bizonyult neuronokon

(Vaananen és mtsai, 2003), MCF-7 humán tüdőrák sejtvonalon (Chazotte-Aubert és mtsai, 1999), V79 hörcsög tüdő fibroblaszt vonalon is. Ez utóbbi esetben glutation deplációval erősíthető volt a citotoxikus hatás (Wink és mtsai, 1998).

Az RNI-k biokémiai hatásai közé tartozik a DNS bázisainak módosítása, illetve a DNS szálainak törése is. Az oxidatív módosítások közül a legfontosabbak a 7,8-dihidro-8-oxoguanidin (Cadet és mtsai, 1997), és a 8-hidroxiiguanozin (Griffiths és mtsai, 1998), míg a nitrozatív módosítások közül a DNS nitrozatív deaminálása (Burney és mtsai, 1999).

A fentiekben tárgyalt gyökök közül a peroxinitrit, illetve a nitroxil esetében, a ROI-k közül pedig a hidroxilgyök és a hidrogén peroxid estében mutattak ki DNS törő képességet (Virág és Szabó, 2002).

A fenti biokémiai változások által elindított folyamatok közül a továbbiakban két oxidatív stressz által aktivált enzimszisztéma működését (poli-ADP-ribóz polimeráz, és mátrix metalloproteináz), illetve az RNI-k fiziológiai és patofiziológiai hatásait fogom részletesen tárgyalni.

A fejezetben tárgyalt ROI és RNI tulajdonságait és poli-ADP-ribóz polimeráz aktiváló képességét az alábbi táblázat (1. táblázat) foglalja össze.

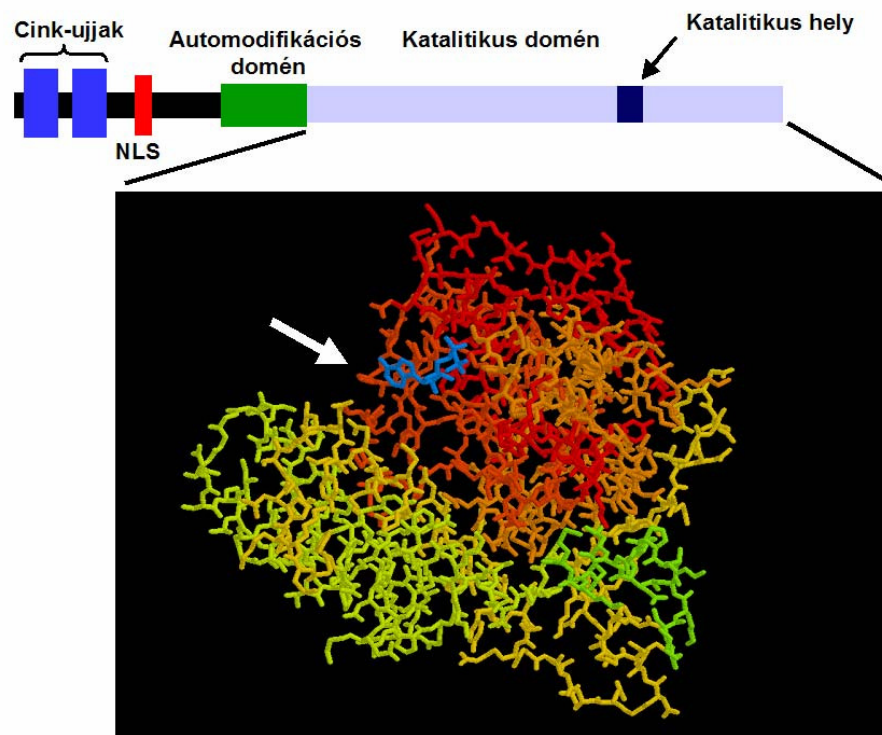
1. táblázat A dolgozatban szereplő, patofiziológiai jelentőséggel bíró reaktív intermedierek (Virág és Szabó, 2002 alapján)

ROI/RNI	Sejtbeli forrása	PARP aktiváló képesség és citotoxicitás
Szuperoxid anion	Mitokondriális légzési lánc, aktivált neutrofilok, makrofágok, xantin oxidáz, lipid peroxidáció, katekolamin autooxidáció.	Nem képes PARP aktivációra, citotoxicitása elsősorban PARP independens.
Nitrogén-monoxid	Nitrogén-monoxid szintetázok.	Nem okoz DNS törést vagy PARP aktivációt.
Peroxinitrit	A nitrogén-monoxid és a szuperoxid anion reakciójából keletkezik.	Erős DNS-törő és PARP aktiváló ágens. PARP independens útvonalakon is képes citotoxikus hatást kifejteni.
Nitroxil	Nitrogén monoxid	DNS szimpla és dupla szálú törését okozza.

2. A PARP géncsalád

A. A PARP-1 és a PARP család további tagjai

A PARP géncsalád elsőként felfedezett tagja a **PARP-1** enzim (EC 2.4.2.30). A PARP-1 az egyik legnagyobb mennyiségben található sejtmagi fehérje, mérete 116 kDa. A PARP-1 jellegzetesen moduláris felépítésű, N-terminálisán két cink-ujj motívum helyezkedik el, amely a PARP-1 DNS-hez való kötődésében játszik szerepet. A DNS kötő domént a nukleáris lokalizációs szignál, illetve az automodifikációs domén követi. A molekula C-terminálisán található a katalitikus domén (1. ábra).



1. ábra A PARP-1 vázlatos doménszerkezeti képe

A katalitikus domén szerkezeti képét a PubMed szerkezeti adatbázisából töltöttük le (Ruf és mtsai, 1998). A félgömb alakú domén bemélyedésében található a katalitikus hely, kékkel pedig a kristályosításhoz használt NAD^+ analóg mutatja a szubsztrát kapcsolódási helyét. Az NLS a nukleáris lokalizációs szignál helyét jelöli.

A PARP-1 széleskörűen elterjedt és konzervált enzim az eukarióták között. Ennek ellenére eddig nem sikerült kimutatni élesztőben, illetve differenciálódott granulocitákban. A legnagyobb fokú konzerváltságot egy 50 aminosavból álló PARP-ra jellemző szekvencia (PARP signature sequence) mutatja, mely a katalitikus doménben található és a gerincesek körében csaknem teljesen megegyezik (Virág és Szabó, 2002).

A PARP-1 vizsgálata során PARP-1^{-/-} sejtekben sikerült kimutatni további, bár alacsony mértékű PARP aktivitást (Shieh és mtsai, 1998). Ez a felismerés vezetett a további PARP izoformák felfedezéséhez. Az izoformák megegyeznek a PARP katalitikus domén jelenlétében, illetve a katalitikus domén jellemző szerkezetében, viszont a PARP-1-ben szereplő egyéb domének és motívumok hiányozhatnak, és helyüket más domének vehetik át. Ebből következően más funkciókkal is rendelkezhetnek, mint a PARP-1.

A **PARP-2** enzimet egyszerre klónozták meg két munkacsoport (Ame és mtsai, 1999, Johansson, 1999). A PARP-2 a PARP-1 méretének mintegy fele (62 kDa) és 40% homológiát mutat a PARP-1-gyel. Hiányzik belőle az automodifikációs domén, nem képes a hisztonok ADP-ribozilációjára, azonban képes auto-poli-ADP-ribozilációra. Részt vesz a DNS repair rendszerek (Schreiber és mtsai, 2002) és a centromerek működésében (Saxena és mtsai, 2002). Más vizsgálatok *in vivo* is bizonyították fontosságát a DNS javításában és az egyedfejlődésben (de Murcia és mtsai, 2003).

Az **sPARP** enzim létezésére már Johansson (1999) is tett utalást, azonban részletesen Sallmann és mtsai (2000) jellemezték. A molekulatömege 55 kDa, szekvenciája a PARP-1 katalitikus doménjével egyezik meg. Az irodalom nem egységes abban, hogy az sPARP a PARP-1 alternatív splice variánsa-e, vagy önálló gén terméke. Aktivitásához nem szükséges DNS törés, azonban a genotoxikus stressz stimulálja az sPARP-ot.

Ismeretlen funkciójú a vault PARP (**vPARP**). A vPARP egy ismeretlen funkciójú szubcelluláris struktúrához kapcsolódik, melyet „vault”-nak neveznek. A vPARP 192 kDa és a vault fő fehérjéjét, egy 100 kDa fehérjét képes poli-ADP-ribozilálni. A sejtbeli vPARP egy része nukleáris, illetve a mitotikus orsóhoz lokalizálódik (Kickhoefer és mtsai, 1999).

A **tankiráz-1** a telomerek meghosszabbításáért felelős telomerázzal áll kapcsolatban. Szerkezetére – a katalitikus doménen kívül – 24 ankirinszerű ismétlődés jellemző. Ezeken a motívumokkal kapcsolódik a tankiráz-1 a TRF1 (telomeric repeat binding factor-1) fehérjéhez és képes poli-ADP-ribozilálására. Ezen keresztül valószínűleg gátolja a TRF1 funkcióját, mert a tankiráz1-et overexpresszáló sejtekben nem rövidült a telomerhossz (Smith és mtsai, 1998, Smith és de Lange, 2000).

A **tankiráz-2** a sejtmagon kívül helyezkedik el, eredetileg a Golgival kapcsolatban lévő fehérjeként ismerték (Chi és Lodish, 2000, Lyons és mtsai, 2001). Minden eddig vizsgált szövetben megtalálható, overexpressziója 3-amino-benzamiddal (3AB) gátolható sejtnekrózishoz vezet (Kaminker és mtsai, 2001).

A **Ti-PARP** 2,3,7,8-tetraklorodibenzo-p-dioxin indukálható, cDNS-e egy 657 aminosavból álló fehérjét kódol, molekulatömege 75 kDa. A Ti-PARP nagyfokú hasonlóságot mutat az RM1 és a TIL fehérjékhez, melyek közül az előbbi a memória kialakulásában, az utóbbi a tumort infiltráló aktivált T sejtekben indukálódik. (Ma és mtsai, 2001)

A géncsalád további tagokkal fog szaporodni a közeljövőben. Gilbert de Murcia személyes közlése szerint a fentieken kívül még 11 PARP-szerű fehérjét találtak laboratóriumában, és minden fehérjéhez egy-egy gén tartozik. Ezek szerint legalább 18 ilyen gén létezik.

B. A PARP-1 enzimológiája

A PARP által termelt poli-ADP-ribóz (PAR) polimerek metabolizmusa egy teljes szubsztrátciklust alkot. A PARP aktivációja és a polimerek szintézise után a PARP gátolt állapotba kerül, majd a poli(ADP-ribóz) glikohidroláz és az ADP-ribozil protein liáz enzimek távolítják el a polimereket. A PARP-1 felelős a sejtbeli PARP aktivitás 95%-ért, az egyes izoformák aktivációja és inaktivációja különbözik, de jelenlegi tudásunk szerint enzimatis viselkedésük nem.

A PARP-1 főleg egy- vagy kétszálú DNS törés hatására aktiválódik, de a DNS meghajlása is aktiváló hatású lehet (Gradwohl és mtsai, 1987, Sastry és Kun, 1990). A PARP-1 homodimereket alkot és a DNS törésekhez kapcsolódik az N-terminális cink

ujjainak segítségével. Ez indukálja a PARP-1 enzimatis aktivációját (de Murcia és mtsai, 1994, de Murcia és de Murcia, 1994, Lindahl és mtsai, 1995, Schreiber és mtsai, 1995, Burkle, 2001, Smith, 2001).

Leírták más aktivációs utat is a PARP-1 esetében. Primer patkány neuronokban a foszfolipáz C aktivációja következtében megnövekvő 1,4,5,-triszfoszfát koncentráció hatására bekövetkező intracelluláris kalcium koncentráció növekedés vezet PARP aktivációhoz (Homburg és mtsai, 2000). Ez az útvonal a PARP gyors, DNS töréstől független aktivációjához vezet, azonban részletei nem ismertek.

Az aktivált PARP által katalizált enzimreakció a NAD^+ hasításával kezdődik ADP-ribózra és nikotinamidra (NAD glikohidroláz lépés), majd az ADP-ribóz részt a PARP megfelelő akceptor fehérjék glutamát oldalláncához csatolja és elágazó, néhány PAR egységtől akár 200 egységnyi hosszúságú polimereket szintetizál (ADP-ribóz polimeráz aktivitás) (Virág és Szabó, 2002). Egyes szerzők felvetik a lehetőségét, hogy a polimer hosszának mérésekor fellépő technikai akadályok miatt a méretet a szerzők alulbecslik, így az *in vivo* képződött polimerek hosszabbak is lehetnek (Gagne és mtsai, 2001).

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

Azonban a PAR egyik legfontosabb akceptora maga a PARP-1. A PAR a PARP-1 automodifikációs doménjére kerül, ami a PARP-1 enzimatis gátlásához, és a DNS-ről történő leválásához vezet (autoinhibíció) (Virág és Szabó, 2002).

A PAR féléletideje egy perc körül van, mivel katabolizmusa igen gyors. A polimerek eltávolítása a poli(ADP-ribóz) glikohidroláz (PARG) feladata (Davidovich és mtsai, 2001). A PARG nagy sebességét annak köszönheti, hogy képes exo- és endoglikozidázként is működni (Brochu és mtsai, 1994). Mivel a PARG K_m értéke nagy fragmentek iránt jóval kisebb, mint a kisebbek felé, ezért a PAR bontásánál az enzim

először a nagyobb darabokat hasítja le és csak azután tér rá a kisebbekre, ami jelentősen lecsökkenti a teljes PAR eltávolításához szükséges időt. A PARG, bár kis mennyiségben van jelen a sejtekben, magas specifikus aktivitása miatt képes a nagyságrendekkel nagyobb mennyiségben lévő PARP által szintetizált PAR gyors lebontására (Jonsson és mtsai, 1988). A PARG gátlása, a PARP hiper-ADP-ribozilált állapotához vezet, és következményesen a PARP gátlását eredményezi (Ying és Swanson, 2000, Ying és mtsai, 2001, Bakondi és mtsai, 2003).

A közvetlenül a fehérjéhez kapcsolódó utolsó, ún. proximális ADP-ribóz egységet az ADP-ribozil protein liáz távolítja el (Oka és mtsai, 1984). Jacobson eredményei azonban azt mutatják, hogy ezt a funkciót a PARG is képes ellátni (Jacobson, személyes közlés).

A PARP aktivitás sejtbeli szabályozása több szinten zajlik le. Erőteljes, hosszan ható genotoxikus stressz estén a PARP mennyisége változik a sejtben, ezek transzkripciós és poszttranszkripciós szabályzásra utalnak (Bergeron és mtsai, 1997, Tramontano és mtsai, 2000, Doucet-Chabeaud és mtsai, 2001). A kutatások az Sp1 transzkripciós faktor szerepét vetették fel a PARP transzkripciójában (Bergeron és mtsai, 1997).

A poszttranszlációs módosítások közül ki kell emelni az auto-poli-ADP-ribozilációt (Kawaichi és mtsai, 1981), illetve a PKC általi foszforilációt (Tanaka és mtsai, 1987, Bauer és mtsai, 1992, 1994). Az *in vivo* jelen lévő allosztérikus inhibitorok közül pedig ki kell emelnünk a nikotinamidot (a NAD⁺ hasítási terméke), illetve a purinokat, melyek ischaemia során érhetnek el PARP gátláshoz elégséges szintet (Virág és Szabó, 2001).

C. A PARP-1 funkciói

A PARP esetében az elsőként leírt funkció a DNS repairben való részvétel volt. Azóta egyre több funkciót ismerünk meg, mely a poli-ADP-ribozilációhoz kapcsolódik.

a) A PARP szerepe a genomi integritás fenntartásában, a DNS hibajavításban és a replikációban

A genomi integritás fogalmán azt értjük, hogy a genomban található információ károsodás nélkül kerül továbbadásra a leánysejtekbe.

A PARP-pal kapcsolatos korai megfigyelések közé tartozik, hogy a PARP farmakológiai gátlása érzékenyíti a sejteket a genotoxikus stresszre, vagyis ionizáló sugárzás, vagy alkilálószerrek hatására késik a DNS törések ligálása, emelkedik a testvérkromatidok cseréje (Park és mtsai, 1983). A testvérkromatidok cseréje akkor zajlik le, amikor a kijavítatlan DNS hibák akkumulálódnak, és emiatt leáll a replikáció (Screiber és mtsai, 1995). Hasonló eredmények születtek a PARP különböző molekuláris biológiai eszközökkel (antiszensz oligonukleotid technika, PARP DNS kötő domén overexpresszió) történő gátlásával is, illetve más DNS károsító hatásokra is, mint például a topoizomeráz I és II gátlása, vagy az UV sugárzás (Szabó és Virág, 2002).

A sejtes rendszerek vizsgálata után PARP-1^{-/-} egértörzsek megjelenése a fenti jelenségek *in vivo* vizsgálatát is lehetővé tette. Hasonlóan a fenti kísérletekhez a PARP-1^{-/-} egerek fokozottan érzékenyek voltak alkiláló ágensekkel, illetve ionizáló sugárzással szemben (de Murcia és mtsai, 1997).

A fenti eredményeket magyarázza, hogy a PARP-1 a DNS repair rendszerek közül a báziskihasítási rendszerrel (BER – base excision repair) kapcsolatban áll. A BER működése során a valamilyen módon módosított, így mutagén bázisok távolítódnak el és kerül a helyükre a megfelelő bázis. A BER aktivációja során a bázisokat egy glikoziláz enzim ismeri fel, és hasítja a nukleotidok β -N glikozilkötését. Azonban a más módon képződött bázis nélküli hely önmagában is képes a BER aktivációjára. A BER-nek kétféle útvonala létezik. Amennyiben csak egy bázis helyettesítéséről van szó, akkor „short patch repair”-ről, amennyiben több egymás utáni (10-15 nukleotid) cseréjéről van szó, akkor „long patch repair”-ről beszélünk. Emlős szervezetekre a short patch repair jellemzőbb, amely során egy-egy enzim először a bázis nélküli nukleotid 5' oldalán hasít, majd a másik a 3' oldalon. Az így keletkező rést a DNS polimeráz β foltozza be, és a DNS ligáz köti össze az elvágott szálát. A long patch repair akkor aktiválódik, amikor a short patch repair elakad. Ebben az esetben a hibás nukleotidot tartalmazó szál eltávolítódik az ép száltól és egy exonukleáz enzim kivágja a kitekert DNS szakaszt. A lyuk befoltozását nem csak a DNS polimeráz β végezheti el, hanem más DNS polimerázok is szerepet játszhatnak a folyamatban. A DNS szálak illesztése a DNS ligáz feladata (Lavrik és mtsai, 2001).

A PARP^{-/-} egerekből származó fibroblasztok esetében a PARP fehérje hiánya és a PARP aktivitás jelentős csökkenése elsősorban a long patch repair-t érintette, azonban jelentősen, 50%-kal csökkentette a short patch repair-t is (Dantzer és mtsai, 2000). Meg kell azonban említeni, hogy a PARP gátlás nem inaktiválja a BER-t, mindössze lassítja beindulását (Soldatenkov és Smulson, 2000). A kései beindulás oka lehet, hogy a PARP kölcsönhat a BER-ben résztvevő fehérjék egy részével, mint az XRCC1 (Masson és mtsai, 1998), a DNS polimeráz β , DNS ligáz III a cink ujj doméneken, vagy az automodifikációs doménben található BRCT motívumon keresztül (Szabó, 2000). Ezen kívül a PARP által szintetizált PAR felismerési szignálként szolgálhat a BER enzimeinek, illetve egyes szerzők szerint a PAR a BER energiaforrásként is funkcionálhat (Oei és Ziegler, 2000).

PARP aktivációt tapasztalhatunk a sejtciklus során is több alkalommal, az eddigi eredmények szerint valószínűleg szintén a genomi integritás védelme érdekében.

A replikáció során az MRC (multiprotein replication complex) kialakulásában is szerepet játszik a PARP (Dantzer és mtsai, 1998, Simbulan-Rosenthal és mtsai, 1996). Kölcsönhat az MRC több komponensével, a DNS polimeráz α -val és β -val, a DNS primázzal, a DNS helikázzal, a DNS ligázzal, a topoizomeráz I és II-vel (Dantzer és mtsai, 1998, Simbulan-Rosenthal és mtsai, 1996). Ezeken a fehérjéken kívül Simbulan-Rosenthal és mtsai (1996) 15 féle poli-ADP-ribozilálódó fehérjét mutattak ki az MRC komplexből. A PARP a DNS replikációs villában lokalizálódik, onnan tisztítható (de Murcia és mtsai, 1986). A PARP szerepét a replikációban a legtöbbször mint molekuláris kapcsolót képzelik el, amely a DNS szintézis helyszínén a hibákat, töréseket jelzi, leállítja a replikációt, illetve elindítja a hibajavítást (Dantzer és mtsai, 1998, Ziegler és Oei, Soldatenkov és Smulson, 2000).

A sejtciklus ellenőrzési pontjaiban is szerepe lehet a PARP-nak. Az ellenőrzési pontok kulcsfehérjéi közül a PARP kölcsönhat az ataxia-teleangiectasia gén fehérjeterméke (ATM), az ATR, a DNS függő protein kináz (DNA-PK), és a p53 fehérjékkel (Smith és Jackson, 1999). A p53 fehérje esetében a PARP szükséges a p53 gyors felszaporodásához, szekvenciaspecifikus DNS kötéséhez, illetve transzkripció aktivitásához. A p53 felszaporodása pedig a sejtciklus leállításához vezet (Soldatenkov és

Smulson, 2000). Masutani és mtsai (1999) *in vitro* vizsgálatokkal kimutatták, hogy a PARP ezen kívül a ciklin függő kinázok (CDK) aktivitásának gátlásával csökkentheti a retinoblasztóma fehérje foszforiláltságát, ami a sejtciklus közvetlen blokkolásához vezet.

A PARP gátlása a sejtosztódás során kromoszómaszegregációs problémákkal jár, gyakorivá válnak az aneuploid vagy tetraploid sejtek (Simbulan-Rosenthal és mtsai, 1996). A PARP-1 az osztódás során a kromoszómákkal és a centroszómális fehérjékkel (Cenpa, Cenpb, Bub3) asszociál (Saxena és mtsai, 2002, Kanai és mtsai, 2000). PAR festéssel a profázisban lévő sejtek erősen festődnek, a festődés a kromoszómák alakját rajzolja ki (Bakondi és mtsai, 2002). Olyan sejtekben, ahol előzőleg a PARP-ot gátolták a gamma sugárzás rendellenes rekombinációhoz vezetett (le Rhun és mtsai, 1998).

b) A PARP a génexpresszió és a differenciálódás szabályzásában

A sejt differenciáció során egy specializálatlan multi-, vagy pluripotens sejtből a génexpressziós mintázatának átrendeződésével egy adott feladat ellátására alkalmas erőteljesen specializált sejtek jönnek létre. Egy őssejtből többféle sejt típus alakulhat ki több átmeneti alakon keresztül.

A PARP szerepét leírták a vérképzési rendszer sejtjeinek differenciációjában (Bahtia és mtsai, 1995, Exley és mtsai, 1987, Francis és mtsai, 1983, Morioka és mtsai, 1979, Sugiura és mtsai, 1984, Terada és mtsai, 1979), a melanomasejtek differenciálódásában (Durkacz és mtsai, 1992), mesenchyma (Nishio és mtsai, 1983, Cherney és mtsai, 1985) és trophoblast sejtek differenciálódásában (Masutani és mtsai, 2001). A PARP szerepével együtt vetődött fel a PARG szerepe a hímivarsejtek differenciációjának koordinálásában (di Megilo és mtsai, 2003, Quesda és mtsai, 1996). A PARP fehérjemennyisége minden esetben korrelációt mutatott a differenciáció folyamatával, azonban jó okunk van feltételezni, hogy hasonlóan az ivarsejtdifferenciációhoz, a PARG mennyiségének változása is számottevő tényező lehet.

Több transzkripciós faktorról mutatták ki, hogy asszociálódik a PARP-pal, ezek az AP-2 (Kannan, 1999), az YY1 (Oei és mtsai, 1997), az oct-1 (Nie és mtsai, 1998), a TEF-1 (Butler és Ordahl, 1999), és a B-MYB (Cervellera és Sala, 2000). Az AP-2 és a

TEF-1 esetében sikerült kimutatni, hogy a transzkripciós faktorok aktivitásához szükséges a PARP és sikerült a komplex által specifikusan aktivált gének azonosítása is.

Az előzőeknél részletesebben jellemzett a PARP kölcsönhatása az NFκB transzkripciós faktorról. Az NFκB nyugalmi állapotában trimerként a citoplazmában található, ahol aktiváció hatására a trimer inhibitorikus tagja (IκB) foszforilálódik, majd leválik és proteolitikusan lebomlik. A felszabadult NFκB dimer (p50 és p65) a magba transzlokálódik, az NFκB válaszadó szekvenciákhoz kapcsolódik és az iniciációs komplex tagjaival asszociálódva különböző gének expresszióját fokozza. Az NFκB által regulált gének közé tartozik több proinflammatorikus gén is, mint az iNOS, vagy a proinflammatorikus citokinek (TNFα, IFNγ, stb.).

Az IκB foszforilációját, leválását és az NFκB dimer magi transzlokációját nem érinti a PARP genomi deléciója, azonban ekkor az NFκB nem képes a válaszadó szekvenciákhoz kapcsolódásra (Oliver és mtsai, 1999). Vagyis a PARP az NFκB preiniciációs komplex része, feltételezhetően kölcsönhat az NFκB mindkét alegységével (Hassa és mtsai, 2001) és hiányában nem megy végbe az NFκB aktivációja.

Érdekes kérdés, hogy a PARP aktivitása transzkripciót aktiváló hatású-e, leállítja-e, vagy nem érinti a transzkripciót. Az irodalom nem egységes ezzel a problémával kapcsolatban. *In vitro* módszerekkel vizsgálva az NFκB és a PARP kapcsolatát Hassa és munkatársai (2001) azt találták, hogy csak az NFκB és a PARP fizikai kapcsolata szükséges a transzkripció megindításához. Velük ellentétben Chang és Alvarez-Gonzales (2001) kísérletei szerint az NFκB DNS-hez kapcsolódása NAD⁺ függő volt, ami szerintük az NFκB poli-ADP-ribosilációjához volt köthető.

A sejtes rendszerek vizsgálata sem ad egyértelmű választ a PARP aktivitás és az NFκB függő transzkripció kapcsolatáról. A PARP aktivitás gátlása több sejttípuson az NFκB függő expresszió csökkenését eredményezte. Citokin stimulált HUVEC sejteken (humán umbilikális véna endothel sejtek) a PARP gátlása egyes adhéziós molekulák (ICAM-1, P-szelektin, E-szelektin) (Zingarelli és mtsai, 1998, Sharp és mtsai, 2001), illetve a citokin stimulált iNOS expressziót csökkentette (Hautschildt és mtsai, 1991, Pellat-Deceunynck és mtsai, 1994, Szabó és mtsai, 1998). Immunostimulált nyúl

szinoviális fibroblasztok 3AB kezelése a kollagenáz expresszió csökkenéséhez vezet (Ehrlich és mtsai, 1995). Azonban magas cukorkoncentrációval stimulált endotelsejteken, ahol szintén kimutatható NF κ B aktiváció, a PARP gátlása nem vezet az NF κ B aktiváció gátlásához (Soriano és mtsai, 2001). Más modellekben *in vivo* vizsgálatok során PARP gátlás hatására egyes citokinek mennyisége csökkenést mutat (Soriano és mtsai, 2002).

A PARP által regulált gének feltérképezésében a DNS chip technika alkalmazása egyre nagyobb szerepet kap. Ezzel a technikával vizsgálva fibroblasztok génexpressziós mintázatát 91 PARP gátlás hatására expressziós változást mutató gént azonosítottak (Simbulan-Rosenthal és mtsai, 2000). Immunostimulált glia sejtek génexpressziós mintázatát hasonló módszerrel vizsgálva Ha és mtsai (2002) azt találták, hogy immunstimulus után több, gyulladásban szerepet játszó gén expressziója csökkent stimulálás után a PARP^{-/-} sejtekben a vad típushoz képest.

Fontos megemlítenünk, hogy a hiszonokon lévő PAR-nak szerepe lehet a kromatinszerkezet fellazításában és ezáltal a génexpresszió elősegítésében (Althaus és mtsai, 1994) is.

c) A PARP szerepe a sejthalál során

A sejtelhalásának két típusát különböztetjük meg: alapvetően morfológiai jellemzők alapján beszélünk apoptózisról, illetve onkózisról (onkózis megnevezéssel illetjük az eredetileg nekrozisnak nevezett folyamatot, mert a nekrozis fogalmán a post mortem sejthalált értik.). A két sejthalálforma nem egymástól élesen elkülönülő folyamat, sokkal inkább arról van szó, hogy egy skála két szélsőértékét képviselik.

A PARP aktivációt a DNS károsító szerek citotoxikus hatásával először Berger és munkatársai (1983, 1986) hozták összefüggésbe. Eszerint a PARP aktiváció hatására a sejt NAD⁺ készlete a PAR szintézis miatt lecsökken. A NAD⁺ képződés ATP igényes, így a foszforibozil transzferáz és a mononukleotid adenilil transzferáz által katalizált reakciók során elfogy a sejt ATP készlete. Az ATP hiánya gátolja az ATP igényes folyamatokat, mint a glikolízis kezdeti lépései, a NAD⁺ hiánya pedig a mitokondriális elektrontranszportláncot állítja le, ami a mitokondriális membránpotenciál összeomlásához vezet. Ilyen körülmények között a mitokondriális F1/F0 ATPáz enzim

ATPáz-ként kezd működni, ami az ATP mennyiség és a sejtbeli energia további csökkenéséhez vezet (Virág és mtsai, 1998a, Ha és Snyder, 1999).

Az apoptózist jellemzi a kompakt sejtmorfológia, a kromatin kondenzációja, a sejtmembrán épségnek megőrzése, illetve az apoptotikus sejtek gyors eltávolítása fagocitózissal. Apoptózis indukálható bizonyos ligandokkal (Fas ligand, TNF, TRAIL), a DNS károsításával (alkiláló szerek, ionizáló sugárzás, oxidatív stressz), illetve a mitokondriumra ható szerekkel. Az apoptózis során aktiválódó jellemző fehérjék a kaspáz enzimrendszer (cysteinyl-aspartate-specific proteases), illetve bizonyos mitokondriális apoptotikus faktorok (pl. citokróm c, apoptózis indukáló faktor – AIF, SMAC-DIABLO).

Az apoptózis korai lépései során a PARP-1-et a kaspáz-7 vagy 3 elhasítja, egy 89 kDa (p89) és egy 24 kDa (p24) fragmentre (Tewari és mtsai, 1995, Germain és mtsai, 1999). A PARP-1-hez hasonlóan a PARP-2 is elhasítódik apoptózisban, azonban a hasítását a kaspáz-8 végzi (Benchoua és mtsai, 2002). Mindkét esetben a hasítás úgy zajlik le, hogy a katalitikus és a DNS kötő domén elválik egymástól, ami az enzim inaktiválódásához vezet. A PARP-1-ből létrejövő fragmentek közül a p89 gátolja a PARP homoasszociációját, a p24 pedig a PARP DNS kötését (Kim és mtsai, 2000a, b, D'Amours és mtsai, 2001).

A fentiekből kitűnik, hogy a PARP aktivitás és aktiválódás erőteljesen gátlódik az apoptózis kezdeti szakaszában. E gátlás jelentősége az lehet, hogy kivédi a PARP aktivációt az apoptózis későbbi szakaszában lejátszódó DNS fragmentáció során, így megőrzi a sejtek NAD^+ és energiakészletét (Herceg és Wang, 1999) az energiaigényes további apoptotikus folyamatok számára.

A PARP szerepe az apoptózisban nem tisztázott, gátlása az apoptózis során egyaránt gátolta (Tanaka és mtsai, 1995, Richardson és mtsai, 1999), vagy fokozta (Tentori és mtsai, 1999), vagy nem befolyásolta (Watson és mtsai, 1995) a folyamatot.

A PARP szerepe a PARP-1 génhányos egerek megjelenése után vált molekuláris szinten vizsgálhatóvá. A $\text{PARP}^{-/-}$ egerekből származó sejtek (hepatociták, timociták, primer neuronok) érzékenysége hasonló volt Fas liganddal, $\text{TNF}\alpha$ -val, etopoziddal, dexametazonnal kiváltott apoptózisban, mint a $\text{PARP}^{+/+}$ sejteké (Leist és mtsai, 1997a,

Wang ZQ és mtsai, 1997, Virág és mtsai, 1998b). A PARP^{-/-} egerek embrionális és posztnatális fejlődése is zavartalan, ami szintén arra utal, hogy az apoptózis zavartalan lefolyású (Wang és mtsai, 1995).

Dawson és munkacsoportja azonban a szabad gyökök, alkiláló szerek, illetve NMDA által kiváltott apoptózisban bizonyította a PARP szerepét az AIF faktor mitokondriumból a sejtmagba való transzlokációjában (Yu és mtsai, 2002).

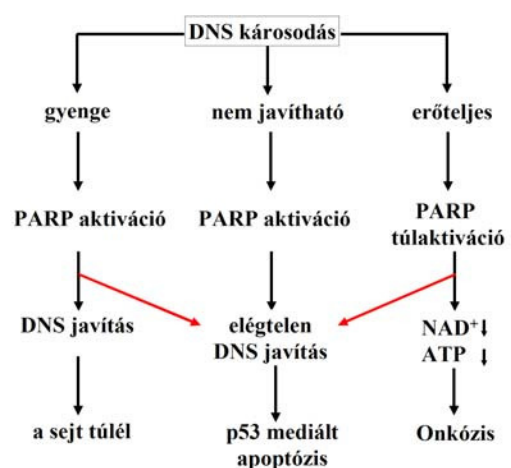
Összességében megállapítható, hogy az apoptózis legtöbb formájához a PARP nem szükséges, azonban hasítása nélkülözhetetlen az apoptózis zavartalan végrehajtódásához.

Az onkózisa - az apoptózissal ellentétben - a sejtterfogot növekedése, a plazmamembrán integritásának megszűnése a sejtterfogot növekedése és a sejtartalom kiszabadulása jellemző. Ez utóbbi „szivárgás” gyulladást serkentő hatású.

Oxidánsokkal, illetve alkilálószerekkel kiváltott enyhe stimulus apoptotikus jellegű, míg a koncentráció emelésével egyre inkább onkotikus jelekkel rendelkező sejthalált vált ki (Bonfoco és mtsai, 1995, Nicotera és mtsai, 1999). Az így beindított sejthalál jellegének meghatározásában (apoptotikus vagy onkotikus) mind az ATP, mind a NAD⁺ mennyisége meghatározó jelentőségű (Coppola és mtsai, 1995, Corwley és mtsai, 2000, Klaidman és mtsai, 1996, Leist és mtsai, 1997b, 1999, Lelli és mtsai, 1998).

A fentiek alapján a PARP aktiválódása az ATP/NAD⁺ szint csökkentése miatt gátolja az energiaigényes apoptózis beindulását és az onkózis felé tereli a sejtet. Ezen a területen az első tanulmányok a PARP farmakológiai gátlószereinek a felhasználásával készültek (Szabó és Dawson, 1998, Watson és mtsai, 1995) és igazolták a fenti elméletet, vagyis a PARP gátlása gátolta az onkózist. PARP^{-/-} egereken is hasonló eredmények születtek (Eliasson és mtsai, 1997).

PARP gátlását vagy genetikai ablációját az apoptózis, az onkózis, illetve a DNS repair szempontjából a 2. ábrán foglaltuk össze. A



2. ábra A PARP szerepe az apoptózisban és az onkózisban.

Magyarázat a szövegben.

Virág és Szabó (2002) nyomán.

DNS károsodás, illetve a PARP aktivitás mértékétől függ a sejt sorsa a genotoxikus stressz után. Gyenge DNS károsodás után a PARP aktiváció a hibajavító rendszerek aktiválásán keresztül a sejt túléléséhez járul hozzá (bal oldali folyamatsor). Ha a repair rendszerek nem tudnak megbirkózni a hibák mennyiségével, a sejt elindítja az apoptózis programját és elpusztul (középső folyamatsor). Azonban az erőteljes, túlzott mértékű DNS károsodás a sejtek NAD^+ és ATP tartalmának elhasználásával lehetetlenné teszi az apoptózis végbemenetelét, így onkotikus sejthalált vált ki (jobb oldali folyamatsor). A PARP gátlása mind a jobb, mind a bal ágról a középsőre tereli a sejtek sorsát (piros nyilak), vagyis a sejtek apoptózisát okozza. Az apoptotikus és az onkotikus sejthalál közül az előbbi a szervezet számára kevésbé megterhelő, ezért önmagában egy ilyen váltás terápiás előnyt jelenthet.

3. Oxidatív stressz patológiai szerepe

A. A peroxinitrit és a nitroxil kórélettani hatásai

A peroxinitrit *in vivo* fiziológiai hatásairól elég részletes ismeretekkel rendelkezünk. Peroxinitrit termelődését kimutatták szeptikus peritonitisben (Soriano és mtsai, 2002), hemorrágiás sokkban (Liaudet és mtsai, 2000a), diabetesben (Soriano és mtsai, 2001a, Szabó és mtsai, 2001b), mesenterikus ischaemiában (Liaudet és mtsai, 2000b), artritiszben, kolitiszben (Mabley és mtsai, 2002) és asztmában (Andreadis és mtsai, 2003). Általánosságban a peroxinitrit túlzott termelődése az ischaemia-reperfúziós károsodásra, a sokkra, illetve a gyulladásos folyamatokra jellemző. Habár a peroxinitritnek elsősorban biokémiai hatásai vannak, emellett ki kell emelnünk, hogy a peroxinitrit DNS törések létrehozásán keresztül PARP aktivációhoz vezet.

In vivo vizsgálatok a nitroxillal kapcsolatban elsősorban a keringési rendszerre gyakorolt hatására koncentráltak, azonban olyan adatok, melyek közvetlen kóroki szerepét bizonyítanák, nem állnak rendelkezésre.

Szíven pozitív inotrop és lusitrop hatása van a nitroxil kezelésnek, ami nem áll kapcsolatban a béta adrenerg jelátvitellel (Paolucci és mtsai, 2003). Ischaemia-reperfúziós károsodás esetén a kontraktilitás és a sejtpusztulás mértékét csökkentette az NO^- kezelés (Pagliaro és mtsai, 2003). Vannak azonban olyan megfigyelések is, melyek

szerint ischaemia-reperfúziós károsodás esetén az NO⁻ kezelés ront a szívfunkciókon (Ma és mtsai, 1999), illetve növeli a neutrofil infiltrációt (Takahira és mtsai, 2001).

Az NO⁻ képes a szolubilis guanil cikláshoz kapcsolódni, és az NO-hoz hasonlóan aktiválni azt, ami a rezisztenciaerek dilatációjához vezet (Irvine és mtsai, 2003, Wanstall és mtsai, 2001).

B. Oxidatív stressz által kiváltott patológiás enzimaktiváció: PARP és mátrix metalloproteináz aktiváció

Az oxidatív stressz által okozott változások közé tartozik egyes enzimek aktiválódása, mint a PARP és a mátrix metalloproteinázok (MMP). Mindkét enzimescsoport aktiválódása kapcsolódhat kórfolyamatokhoz.

A patofiziológias PARP aktiváció *in vivo* iniciátoráról keveset tudunk, csak az *in vitro* kísérletes eredményekből feltételezzük, hogy szabad gyökök, elsősorban hidroxil gyökök és peroxinitrit játszanak központi szerepet aktiválódásában. Alátámasztja ezt az elméletet, hogy PARP aktiváció esetében emelkedett nitrotirozin festődés mutatható ki, ami a nitrozatív stressz indikátora (Soriano és mtsai, 2002, Liaudet és mtsai, 2000a, Szabó és mtsai, 2002, Soriano és mtsai, 2001a, Liaudet és mtsai, 2000b, Mabley és mtsai, 2002). A PARP aktiváció kimutatására az enzimreakció termékének, a PAR-nak a kimutatása (pl. immunhiszokémiai módszerrel) a legalkalmasabb.

Az előző fejezetben peroxinitrit termeléssel jellemzett kórfolyamatokhoz, (peritonitis, hemorrágiás sokk, diabetes, mesenterikus ischaemia, kolitisz) PARP aktiváció társul. Ezen kívül többek között a miokardiális infarktus, a szívtranszplanktáció (Endres és mtsai, 1998, Faro és mtsai, 2002, Fiorillo és mtsai, 2002, Szabó és mtsai, 2002), a szeptikus sokk (Goldfarb és mtsai, 2002, Jagtap és mtsai, 2002, Soriano és mtsai, 2002, Watts és mtsai, 2001), illetve az adult respiratorikus diszstressz szindróma (Liaudet és mtsai, 2002) kapcsán is mutattak ki PARP aktivációt.

Az *in vivo* képződő szabad gyökök DNS töréseket hoznak létre, amelyek a PARP aktivációján át egyrészt onkózt váltanak ki, másrészt azonban aktiválják az NFκB -t, és azon keresztül különböző gyulladásos citokinek termelését indítják el. Ezek a citokinek aktivált leukocitákat vonzanak a sérülés helye felé, és így felerősítik az oxidatív stresszt.

Az elhalt sejtekből kiszabaduló anyagok szintén gyulladáskeltő hatásúak, ami egy újabb pozitív visszacsatolás az előbbi körbe.

Számos tanulmány igazolja, hogy a PARP mind farmakológiai, mind molekuláris biológiai gátlása javítja több betegségmodell klinikai és laboratóriumi paramétereit (citokin termelés, túlélés, szervfunkciók, stb.). Feltételezhető, hogy a PARP gátlása esetén a PARP túlzott aktivációja miatt bekövetkező onkózis fordítható apoptózisba (Virág és Szabó, 2002).

Egy másik – számunkra fontos – szabad gyökök által aktiválható enzimescsoport az mátrix metalloproteinázok (MMP-k) családja. Az MMP-k szerteágazó funkcióval rendelkező cink endopeptidázok. Bár különböző folyamatokban játszhatnak szerepet, elsődleges szerepük az extracelluláris mátrix lebontása. Fiziológias funkciójuk az extracelluláris mátrix újraépülésének biztosítása többek között az embrionális fejlődés, a blasztocisza beágyazódása, szervek morfogenezise, az idegek növekedése, ovuláció, az endometrium ciklikus átrendeződése, a hajfollikulus ciklusa, csontátépülés, angiogenezis során. Az MMP-k patofiziológias aktivációja emellett szerepet játszik artritiszben, kardiovaszkuláris betegségekben, a vér-agy gát funkciózavaraiban, periodontális betegségekben, bőrrulcerációkban, gyomorfekélyben, a kornea ulcerációjában, májfibrózisban, emfizémában, tüdőfibrózisban is (Nagase és Woessner, 1999).

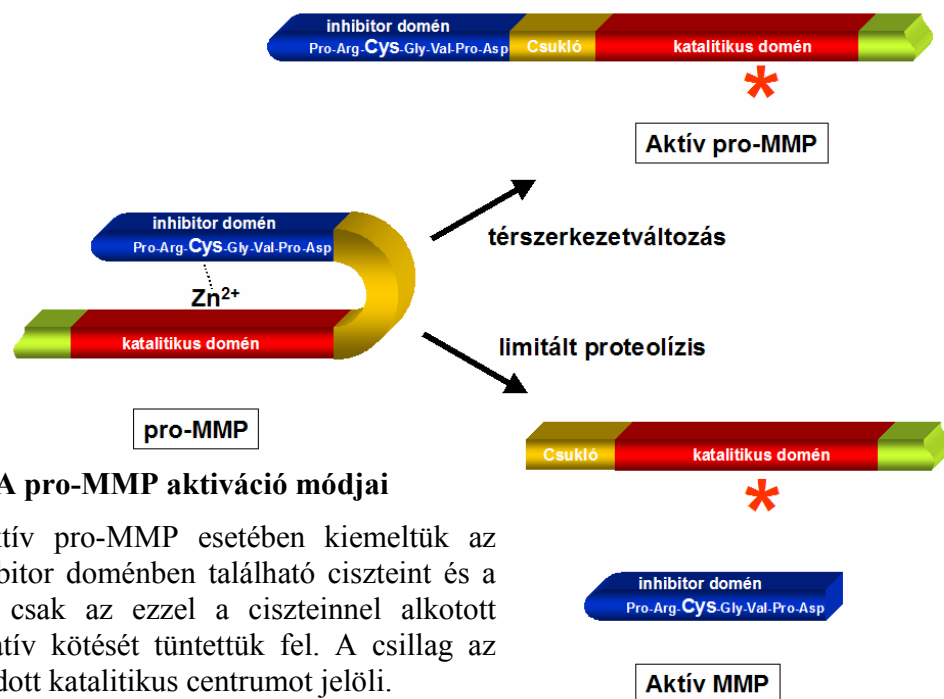
Az MMP-k inaktív proenzimek formájában szintetizálódnak. Az inaktivitásért a fehérje N-terminálisán található propeptid (autoinhibitorikus) doménben lévő konzervált aminosavszekvencia cisztein oldallánca felelős. Ez a cisztein a katalízisben eszenciális cink ionhoz kapcsolódik koordinatív kötéssel, és ezzel a cink iont katalitikusan inaktívvá teszi. Aktívvá az enzim akkor válik, amikor ez a kapcsolat felszakad.

Az MMP aktivációnak két útját ismerjük. A történetileg először megismert út a véralvadáshoz vagy a komplement aktivációhoz hasonló proteolitikus aktiváció volt. Ebben az esetben az autoinhibitor domént valamilyen proteáz lehasítja. Azonban a véralvadáshoz vagy a komplement aktivációhoz hasonló rigid, konszekutív aktivációs rendszert nem találunk az MMP-k esetében. Akár nem az MMP-k közé sorolt proteináz is lehet aktiváló hatású (pl. a pro-MMP2-t aktiválhatja az MT1-MMP, de az urokináz-típusú

plazminogén aktivátor is). Proteolitikus aktiváció során változik az adott MMP molekulatömege, a kb. 8-12 kDa méretű inhibitor domén lehasadása után.

A proteolitikus aktiváció mellett a térszerkezetváltozás okozta aktivációs útvonalat is leírták. Ebben az esetben a zimogénben valamilyen térszerkezetváltozás vezet a kritikus koordinációs kötés felszakadásához. Ilyen hatás lehet erős detergenssek, merkurivegyületek (pl. az általános MMP aktivátor APMA), vagy reaktív oxigén intermedierek (ROI), illetve peroxinitrit megjelenése (Grant és mtsai, 1992, Okamoto és mtsai, 2001, Springman és mtsai, 1990, Wang és mtsai, 2002, van Wart és Birkedal-Hansen, 1990). Az ilyen jellegű aktiváció mechanizmusára Springman és mtsai (1990) a „cink-switch” megnevezést használja.

A két aktivációs mód közötti különbséget a 3. ábra szemlélteti.



3. ábra A pro-MMP aktiváció módjai

Az inaktív pro-MMP esetében kiemeltük az autoinhibitor doménben található ciszteint és a cinknek csak az ezzel a ciszteinnel alkotott koordinatív kötését tüntettük fel. A csillag az aktiválódott katalitikus centrumot jelöli.

Peroxinitrit esetében Okamoto és mtsai (2001) *in vitro* vizsgálatokra támaszkodva alkotott elméletet az MMP aktiváció mechanizmusára. Paradox módon a folyamat kezdő lépéséhez antioxidáns hatású redukált glutation (GSH) szükséges. A peroxinitrit a GSH ciszteinjének szulfhidril csoportjával reakcióba lép és valószínűleg GSNO₂-t képez, ami oxidálja a ciszteint leválasztva az esszenciális cinkionról az MMP-k aktivációjához vezet.

Wang és mtsai (2002) ezen elméletet bizonyítandó, peroxinitrittel perfundáltak izolált szívet és MMP aktivációt tapasztaltak, melyek közül a leghatározottabb az MMP2 volt.

Az MMP-k a transzkripció szintjén is szabályozottak, expressziójuk fontos aktivátorai közé tartoznak a citokinek (Siwik és mtsai, 2000).

MMP aktivációt több esetben is leírták már szívben és érrendszeri patológiás állapotokban, például szívelégtelenségben (Mann és Spinale, 1998, Spinale, 2002), egyes kardiomiopátiákban (Thomas és mtsai, 1998), ischaemia-reperfúziós károsodásban (Cheung és mtsai, 2000). A szívelégtelenség kialakulásában nagy jelentőséggel bír az extracelluláris mátrix lebontásának és felépítésének egyensúlyának megbomlása. A szívben az extracelluláris mátrix, illetve az azt felépítő kollagén kiemelten fontos mechanikai szerepet játszik. Sérülése esetén a kardiomiociták „megcsúsznak” (cardiomyocyte slippage), ami ventrikuláris dilatációhoz, fokozatos kontraktilis diszfunkcióhoz és a szívfunkciók általános gyengüléséhez vezet (Mann és Spinale, 1998, Thomas és mtsai, 1998, Cheung és mtsai, 2002, Spinale, 2002).

C. A doxorubicin által okozott kardiomiopátia és a reaktív nitrogén intermedierek

A doxorubicin egy széles spektrumú, antraciklin alapú, különböző szolid tumorok, limfómák, illetve leukémiák kezelésére használt citosztatikum (Blum és mtsai, 1974, Young és mtsai, 1981). A doxorubicin citosztatikus hatásmechanizmusában a legfontosabb a szer DNS két szála közé történő interkalálódása és ezen keresztül a DNS replikáció gátlása (Smith és Bell, 1990). Azonban a doxorubicin klinikai gyakorlatban történő felhasználásának gátja súlyos kardiotoxikus mellékhatása (Singal és mtsai, 1987, Singal és Iliskovic, 1998). Humán kumulatív dózisa, mely felett elfogadhatatlanul magassá válik a kardiotoxikus esetek aránya 550 mg/m^2 (Siveski-Iliskovic és mtsai, 1995).

A kardiotoxicitás oka a doxorubicin mediált szabadgyök termelés (Davies és Doroshov, 1986, Doroshov és Davies, 1986). Az antracénszármazékok képesek kinon-szemikinin átalakulásra. A redukción a mitokondriális elektrontranszportlánc I. komplexében feltételezhetően a NADH dehidrogenáz katalizálja (Davies és Doroshov, 1986). A képződött szemikinin instabil vegyület és az elektronját könnyen továbbadja.

Kardiomiociták mitokondriumait doxorubicinnel kezelve kimutatható volt a szuperoxid anion, a hidrogén peroxid és a hidroxil gyök termelődése (Doroshov és Davies, 1986). A szívben állandóan termelődik kis mennyiségű NO (Benyó és mtsai, 1991), ami a szuperoxid gyökkel reagálva peroxinitrit képződéséhez vezet. A doxorubicin kardiotoxikus hatása gyökfogó vegyületekkel csökkenthető (Siveski-Iliskovic és mtsai, 1995).

A doxorubicin génexpressziós átrendeződést is okoz. Csökkenti a réz-cink szuperoxid diszmutáz expresszióját (Li és Singal, 2000), illetve több nem szív eredetű sejtvonalonban leírták NF κ B aktiváló hatását (Andriollo 2003, Lavon 2003).

A doxorubicin kezelés a szívizomsejtek energiaháztartását megzavarja, és károsítja a szívizomsejtek DNS állományát (Li és Singal, 2000).

IV. Célkitűzés

Munkánk során az alábbi két témakör köré csoportosítottuk kérdéseinket.

Az Angeli sóból felszabaduló nitroxil citotoxicitásának vizsgálata.

1. Aktiválja-e a Angeli só a DNS törés - PARP aktiváció útvonalat?
2. Hasonlít-e a Angeli só által kiváltott citotoxicitás a más oxidánsokkal (hidrogén peroxid, peroxinitrit) kiváltott sejthalálhoz?
3. Képződik-e peroxinitrit Angeli só kezelés során?

A doxorubicin által okozott kardiomiopátiában a szabad gyökök és a PARP szerepének vizsgálata

1. A doxorubicin által okozott kardiomiopátiában aktiválódik-e a DNS törés - PARP aktiváció útvonal, és ez vezet-e sejtpusztuláshoz?
2. Van-e mátrix metalloproteináz aktiváció a doxorubicin indukálta kardiomiopátiában a szívben?

V. Anyagok és módszerek

1. Anyagok

Az Angeli só ($\text{Na}_2\text{N}_2\text{O}_3$, AS) nitroxil donor vegyületet a Cayman Chemical Co.-tól (Ann Harbour, MI, USA) vásároltuk, a propidium jodidot (PI), a hidroetidint (HE) és a 3,3'-dihexiloxakarbocianin jodidot (Dio) pedig a Molecular Probes-től (Eugene, OR, USA). Minden más vegyszert a Sigma-Aldrich-től (St. Louis, MO, USA) szereztünk be, amennyiben másként nem jelezzük. A PARP specifikus gátlására a fenantridion-alapú PJ34-et használtuk (Inotek Pharmaceuticals, Beverly, MA, USA). A szabad gyökök *in vivo* befogására az új ferroporfirin alapú szert, az FP15-öt használtuk (Inotek Pharmaceuticals, Beverly, MA, USA).

2. Állatok

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

A. *Timocita preparálás és kezelés*

A timociták preparálását a már leírtak szerint végeztük (Virág és mtsai, 1998a). Hat-nyolc hetes hím C57BL6 egerek (Charles-River, Wilmington, MA, USA) tímuszát használtuk kísérleteinkben. Az állatokat széndioxid belélegeztetéssel túlaltattuk, majd a mellkas megnyitása után kivágtuk a tímuszt. A tímuszt dróthálón préseltük át, így nyertünk önálló sejtekből álló timocita preparátumot. A sejteket RPMI-1640 médiumban (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) tartottuk, melyet 10% főtális borjúsavóval egészítettünk ki. A sejteket 37 °C-on 5% CO_2 atmoszférában tartottuk. Az AS-t PBS-ben (pH 11) oldottuk fel és a teljes térfogat 10%-ban adtuk a rendszerhez. Az AS hozzáadása nem változtatta meg jelentősen a médium pH-ját. A kontroll mintákhoz olyan AS mintát

adtunk, amelyet egy héten át szobahőmérsékleten pH 7,0 PBS-ben inkubáltunk. Kísérleteinkben a lebomlott AS nem befolyásolta az általunk mért paramétereket.

B. Akut doxorubicin kezelés

Hím Balb/c egereket (25-30 g) egyszeri dózisban doxorubicinnel (DOX) kezeltünk (25 mg/kg i.p.). Az állatokat két nappal a kezelés megkezdése után használtuk az alább részletezett vizsgálatokra. A PJ34 (PARP inhibitor) kezelés egy órával a DOX beadása előtt kezdődött (20 mg/kg i.p.) és folytatódott a biokémiai kísérletek megkezdéséig (3X10 mg/kg/nap). Az FP15 kezelés (1 mg/kg/nap p.o., ivóvízbe keverve) két órával a DOX beinjektálása előtt kezdődött. A biokémiai mérésekhez a szívet és a szérumot használtuk.

A szívfunkciók vizsgálatát, illetve az állatok követését kollegám, dr. Pachter Pál végezte.

3. Módszerek

A. Egyszálú DNS törések kimutatása

A DNS töréseket comet assay-vel mutattuk ki a Trevigen (Gaithersburg, MD, USA) comet assay kitjének segítségével. Az eljárás a károsodott DNS azon tulajdonságán alapszik, hogy könnyebben hurkolódik ki és mozdul el elektromos erőterben, mint az ép DNS. Ha a sejteket agarózba ágyazzuk, lizáljuk, majd elektromos erőterbe helyezzük, a károsodott DNS-ű sejtek DNS-e üstökösszerűen elnyúlik (innen az eljárás neve), míg az ép DNS a sejt eredeti helyén marad.

A timocitákat AS-sel kezeltük 20 percen át 37 °C-on. Majd jéghideg PBS-ben mostuk és PBS-ben szuszpendáltuk a sejteket úgy, hogy 10⁵ sejt/ml oldatot kapjunk. A sejtszuszenziókat alacsony olvadáspontú agarózba kevertük (42 °C-on) 1:10 arányban. Ebből a szuszpenzióból 75 µl-t CometSlides tárgylemezre szélesztettünk. A gél megszilárdulása után (4 °C, 20 perc) a tárgylemezeket lízis pufferbe helyeztük (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA pH 10, 10 mM TRIS, 1% nátrium lauril szarkozinát, 1% Triton X-100) egy órára. A mintákat a denaturáló pufferbe (0,6 g NaOH pH>13, 250 µl 200 mM EDTA 50 ml desztillált vízben) helyeztük a lízis után újabb egy órára

szobahőmérsékleten sötétben. A tárgylemezeket ezután futtatókádba helyeztük, és alkalikus elektroforézis pufferben (12 g NaOH, 2 ml 500mM EDTA pH 8, 1 liter desztillált vízben) ekvilibráltuk (lúgos közegben történő ekvibrálás során egyszálú törések növelik a DNS kihurkolódását, semleges pH-n pedig a kettős szálú DNS törések növelik a mobilitást), majd elektromos erőteret kapcsoltunk a kádra (30 perc, 300 mA). A tárgylemezeken a DNS-t ezüsfestéssel tettük láthatóvá és Zeiss Axiolab mikroszkóppal vizsgáltuk. A kísérelt eredményét reprezentatív képek segítségével mutatjuk be.

B. Radioaktív PARP aktivitásmérés

A sejtlyázatok PARP aktivitását a klasszikus módszerrel határoztuk meg, amely a $^3\text{H-NAD}^+$ TCA-val kicsapható fehérjefrakcióba való beépülésének a meghatározásán alapszik (Virág és mtsai, 1998a).

A timocitákat 30 percen át kezeltük elő PARP inhibitorral. Ezt követően AS-t adtunk a rendszerhez, amivel 20 percen át inkubáltuk a sejteket. A médiumot 0,5 ml aktivitásmérő pufferre cseréltük (56 mM HEPES, pH 7,5, 28 mM KCl, 28 mM NaCl, 2 mM MgCl_2 , 0,01% digitonin, 0,125 μM NAD^+ és 0,5 $\mu\text{Ci/ml}$ $^3\text{H-NAD}^+$), majd 30 percen át 37 °C-on inkubáltuk a timocitákat. A sejtfehérjéket 200 μl jéghideg 50%-os TCA-val kicsaptuk és 4 órán át 4°C-on inkubáltuk. A csapadékot kétszer 500 μl 5% TCA-val mostuk, majd 250 μl 2% SDS/0,1 N NaOH oldatban szolubilizáltuk 37°C-on egy éjszakán át. A csövek tartalmát 6,5 ml Scintisafe Plus szcintillációs folyadékhoz adtuk (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA) és a radioaktivitást folyadékszcintillációs számlálóval mértük meg (Wallac, Gaithersburg, MD, USA).

C. Immunodotblot alapú poli(ADP-ribóz)meghatározás

A PARP aktiváció eredményeként a sejtfehérjék egy része poli-ADP-ribozilálódik, amely kimutatható specifikus antitest segítségével (Affar és mtsai, 1998). A timocitákat előinkubáltuk 3AB-dal (2 mM) vagy médiummal 30 percig. A sejteket 30 percen át kezeltük AS-val, majd centrifugáltuk és lizáltuk RIPA pufferben, melyet NaOH-dal és EDTA-val egészítettünk ki (Tris 50 mM, NP-40 1%, Na-deoxycholate 0,25%, NaCl 150 mM, PMSF 1 mM, aprotinin, leupeptin, pepstatin 1 $\mu\text{g/ml}$ each, Na_3VO_4 1 mM, NaF 1

mM, NaOH 0,4 M, EDTA 10 mM). A mintákból fehérjekoncentrációt mértünk (BCA protein assay kit, Pierce, Rockford, IL, USA), majd 20 µg fehérjét vittünk fel Hybond N+ membránra (Amersham Pharmacia, Little Chalfont, England) dot-blot technikával. A blotot 0,4 M NaOH oldatban mostuk 20 percig, majd átmostuk PBST-ben. A membránt tejpor 5%-os PBST oldatával blokkoltuk egy órán át. A poli(ADP-ribóz)-t anti-poli(ADP-ribóz) elleni antitesttel mutattuk ki (1:400, Alexis, Lausen, Switzerland). A membránt PBST-vel háromszor mostuk, majd peroxidázzal jelzett második antitesttel inkubáltuk (Boehringer-Mannheim). Újabb háromszori PBST és egyszeri PBS mosás után az immunkomplex által szolgáltatott jelet ECL-lel (Pierce) detektáltuk.

D. Citotoxicitás meghatározása

Az AS kezelés által kiváltott sejtpusztulást propidium jodid (PI) felvétellel határoztuk meg (Virág és mtsai, 1998a). A sejteket először PARP inhibitorral kezeltük 30 percen át, melyet AS kezelés követett 4 órán át. A timocitákat ezután 2,5 µg/ml PI oldattal festettük 15 percen át, majd PBS mosás után és áramlási citometriával analizáltuk a mintákat. A citotoxicitást a következő képlet segítségével számítottuk: $100 \cdot (T-C)/(100-C)$, ahol a T a PI pozitív sejtek százalékat jelenti a mintákban, míg a C a kontroll mintában a normális sejtek arányát.

E. Annexin-FITC - propidium jodid kettős jelölés

Az Annexin-FITC - propidium jodid kettős jelölést a Virág és mtsai (1998a) alapján végeztük el. Három órával az AS kezelés után a sejteket PBS-ben mostuk és 10^5 sejtet 5 µl Annexin V-FITC-cel és 5 µg/ml PI-dal Annexin kötő pufferben (10 mM Hepes, pH 7,4, 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl₂) festettük szobahőmérsékleten. A mintákhoz 15 perc elteltével 400 µl Annexin kötő puffert adtunk, majd a mintákat azonnal áramlási citometriával elemeztük.

F. A mitokondriális membrán depolarizációjának és a szuperoxid termelés kimutatása

A mitokondriális membránpotenciál változását áramlási citometriával vizsgáltuk 3,3'-dihexiloxakarbocianin jodid (Dio) festett sejtekben (Virág és mtsai, 1999). A

festéshez használt festék kationos lipofil karakterű, melyet a mitokondriumba transzportál a negatív mitokondriális membránpotenciál, és az így a mitokondriális mátrixban dúsul fel. Ezért csökkenő mitokondriális membránpotenciál a sejt csökkenő fluoreszcenciáját eredményezi.

A mitokondriális szuperoxid termelést szintén áramlási citometriával határoztuk meg hidroetidium (HE) felhasználásával. Ez a fluoreszcens festék szenzitív szuperoxid jelenlétére, a szuperoxid gyök a hidroetidiumot erősen fluoreszkáló etidiummá alakítja.

A timocitákat azonos módon kezeltük, mint a citotoxicitási mérések esetében, azonban a sejteket 40 nM Dio-val és 1 μ M HE-nel festettük 15 percen át, majd PBS-sel mostuk őket, és FACS-Calibur citométeren analizáltuk a mintákat.

G. Kaszpáz-3 aktivitás mérése

A kaszpáz-3 aktivitást a Virág és mtsai (1998b) által leírt módon végeztük el az alábbi módosításokkal. Hat órával az AS kezelés megkezdése után timocitákat a lízis pufferben lizáltuk (10 mM HEPES, 0,1% w/v CHAPS, 5 mM ditiotritol, 2 mM EDTA, 10 μ g/ml aprotinin, 20 μ g/ml leupeptin, 10 μ g/ml pepstatin A, 1 mM PMSF, pH 7,25). A lizátumokhoz reakciópuffert adtunk (100 mM HEPES, 10% w/v sucrose, 5 mM dithiothreitol, 0,1% w/v CHAPS, pH 7,25), amely 300 μ M-os végkoncentrációban tartalmazta a tetrapeptid pNA konjugátum szubsztrátot (DEVD-pNA), mellyel 1 órán át inkubáltuk. A pNA abszorbanciáját spektrofotometriásan mértük és pNA standard görbéhez viszonyítottuk.

H. A DNS fragmentáció kimutatása (DNS létra képződése)

A DNS létra képződésének kimutatására a timocitákat az előbbieken leírtak szerint kezeltük hat órán át.

Az internukleoszomális DNS fragmentációt agaróz gélelektroforézissel mutattuk ki. Két százalékos agaróz gélre öntöttünk, majd a gél megszilárdulása után a felső feletti részt levágtuk. Az üres részbe 1% agaróz gélre öntöttünk, mely 2% SDS-t és 64 μ g/ml proteinase K-t tartalmazott. 2×10^6 sejtet 20 μ l mintapufferben (5% v/v glicerol, 10 mM Tris, pH 8,0, 0,05% brómfenol kék, 5 mg/ml RNáz A) vittünk fel a gélre. Az

elektroforézist 60 V feszültség mellett 13 órán át végeztük, majd a gélt 2 µg/ml etidium bromiddal festettük meg, és a felesleges festéket desztillált vízzel mostuk ki.

I. Nitrotirozin kimutatása Western blot segítségével

A sejteket 30 percen át különböző koncentrációjú AS-val és peroxinitrittel kezeltük, majd RIPA pufferben lizáltuk. 15 µg fehérjét SDS-PAGE segítségével elválasztottunk és nitrocellulóz membránra transzferáltunk. A fehérjékben lévő nitrotirozint nyúl anti-nitrotirozin antitesttel mutattuk ki (2 µg/ml) (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY). A monoklonális egér anti-nyúl második antitest hozzáadása után a reakciót ECL technikával hívtuk elő.

J. Szérum laktát dehidrogenáz és kreatin kináz aktivitásának meghatározása

Két nappal a DOX kezelés után az egerek vena cava inferiorából vért vettünk a. A vért hagytuk megalvadni, és a szérumot használtuk az enzimaktivitások meghatározásához. A laktát dehidrogenáz és kreatin kináz aktivitást kolorimetriás aktivitásmérő kitékkel mértük (Sigma Diagnostics, St. Louis, MO, USA). Az LDH és CK aktivitásokat U/L dimenzióban fejeztük ki.

K. Metalloproteináz zimográfia

Két nappal a DOX kezelés megkezdése után az egerek szívét fiziológiás sóoldattal perfundáltuk, majd kimetszettük. Az így nyert szövetmintát TNC pufferben homogenizáltuk (50 mM Tris, 0,15 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, 0,05% Brij 35, 0,02% NaN₃, pH 7,4) (Koyama és mtsai. 2000), majd a törmeléket centrifugálással eltávolítottuk. A fehérjekoncentrációt Bradford módszerével határoztuk meg. A homogenizátumokat ezután 2X SDS mintapufferrel kevertük össze (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), és szobahőmérsékleten inkubáltuk 15 percen át. Az így elkészített mintákból 7,5 µg fehérjét zselatin vagy kazein zimográfias gélekre (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) vittünk fel (125 V, 90 min). A géleket a futtatás után renaturáló pufferben renaturáltuk (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 30 percig állandó rázatás alatt, majd az aktív proteinázok előhívását 37 °C-on végeztük éjszakán át előhívó pufferben (Invitrogen). Az

emésztetlen szubsztrátot Brilliant Blue festékkel festettük meg (0,1% Coomassie Brilliant Blue, 45,5% metanol, 9% ecetsav). Bizonyítandó, hogy az emésztés után megjelenő sávok Ca^{2+} függő proteázoknak felelnek meg, replikátum géleket Ca^{2+} mentes pufferben (20 mM EDTA) hívtunk elő.

4. Statisztikai analízis

Minden kísérletet három alkalommal végeztünk el különböző napon. A szignifikancia meghatározására a Student t tesztet alkalmaztuk, és a $p < 0,05$ értékeket tekintettük szignifikánsnak.

VI. Eredmények

1. A nitroxil által kiváltott timocita sejthalál vizsgálata

A. DNS törés és PARP aktiváció

Az irodalomban leírtak alapján az AS képes egyszálú DNS törések létrehozására (Ohshima és mtsai, 1998, 1999). Az egyszálú DNS törések kialakulása a PARP aktiváció első lépése. A PARP ezeket az egyszálú DNS töréseket érzékeli, és kötődik hozzájuk DNS kötő doménjének segítségével. A PARP DNS-hez kötődése az enzim aktiválódásához vezet.

A timociták genomi DNS-ének törését comet assay segítségével mutattuk ki. Az alkalikus lízis során a genomi DNS kihurkolódik, és a kihurkolódás mértéke arányos a DNS károsodásának a mértékével. Az elektroforézis során pedig a lazább, jobban kihurkolódott DNS nagyobb távolságra képes elmozdulni, mint a kompakt DNS, vagyis összességében a DNS elmozdulásának távolsága arányos a DNS károsodásának mértékével.

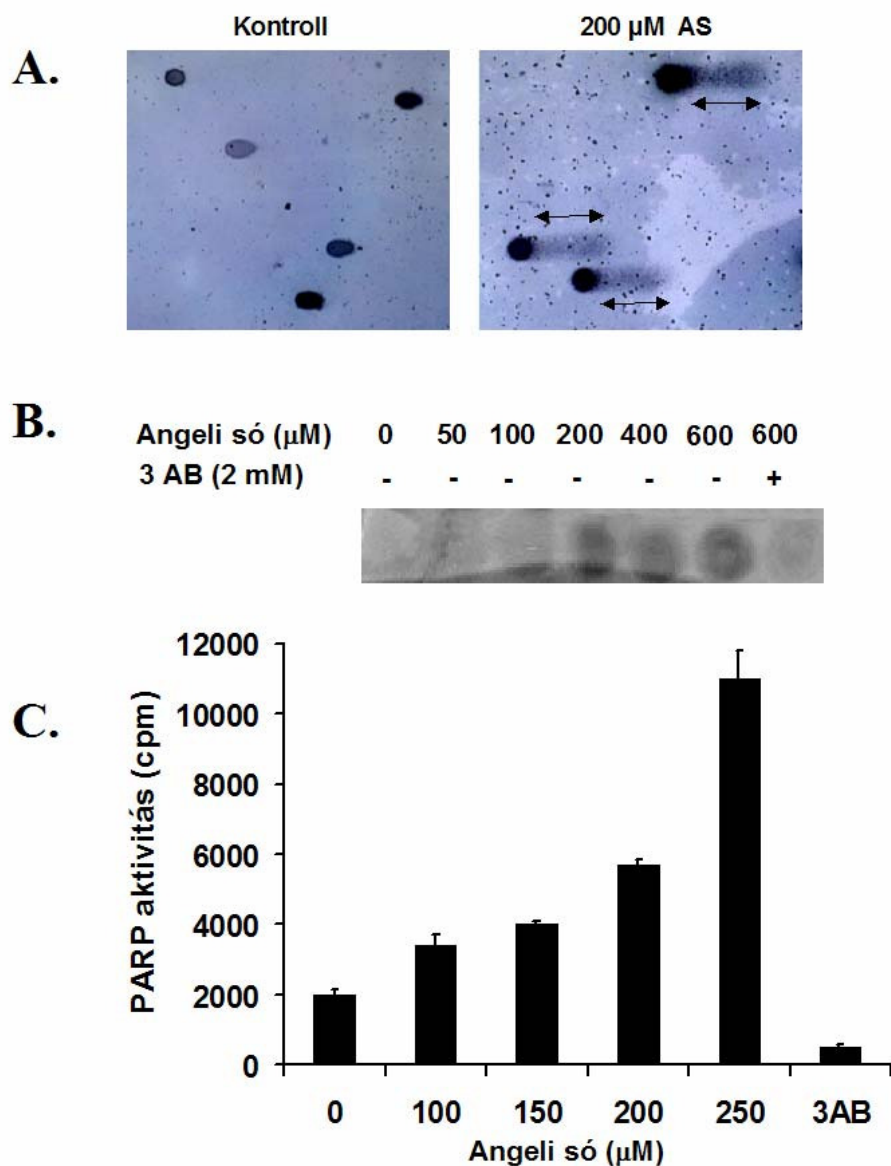
A kontroll timociták esetében nem tapasztaltunk DNS törést, nem történt DNS elmozdulás. AS kezelés (200 μ M) hatására a sejtekben a genomi DNS-ben egyszálú törések jelentek meg (4. ábra).

Az AS kezelés során kialakuló egyszálú DNS törések meglétének bizonyítása után vizsgáltuk, hogy ezek a törések aktiválják-e a PARP-ot. A PARP aktivációt digitoninnal permeabilizált sejteken a hagyományos radioaktív NAD⁺ beépülésének mérésével, illetve a képződött PAR specifikus antitesttel történő kimutatásával vizsgáltuk sejtlizátumokon.

A permeabilizált timocitákban AS kezelés hatására megnövekedett a TCA-val kicsapható triciált fehérjék mennyisége, ami a PARP aktivitás megemelkedésére utal. Az aktivitás specifitását 3AB előkezeléssel igazoltuk, amely a kontroll érték alá csökkentette a mért jelet (4. ábra, A panel).

A specifikus antitesttel történő kimutatáshoz a sejteket NaOH-ot tartalmazó RIPA pufferben lizáltuk, majd dot blot-ot készítettünk, nylon membrán felhasználásával. Az

aspecifikus kötőhelyek tejporos blokkolása után a polimereket specifikus antitesttel mutattuk ki. A triciált NAD^+ beépülését mérő radioaktív módszerhez hasonló eredményre jutottunk (4. ábra C panel). A PARP aktiváció jelentős emelkedését tapasztaljuk 200 μM AS kezelés hatására, a folt denzitása pedig az AS koncentráció növelésével arányosan növekedett. A PARP inhibitor 3AB előkezelés szintén a kontroll értéken tartotta a PARP aktivitást ebben az esetben is (4. ábra B és C panel).



4. ábra A DNS törés – PARP aktiváció útvonal aktiválódása Angeli só kezelés során.

A panel. A timocitákat 200 μ M AS-sel kezeltük 20 percen át. A sejteket agaróz gélbe ágyasztuk, majd lizáltuk. A DNS kihurkolódását alkalikus pH-n végzett elektroforézissel idéztük elő. Az Angeli só kezelés egyszálú DNS töréseket okozott. B és C panel. A timocitákat 30 percen át előkezeltük 2 mM 3AB-vel, majd 30 percen át különböző koncentrációjú AS-sel inkubáltuk. A sejteket digitoninnal permeabilizáltuk és a PARP aktivitást jelzett szusztrát (biotinilált NAD⁺-ot a B panelen, vagy triciált NAD⁺-ot a C panelen) beépülésének követésével határoztuk meg. A mért aktivitás specificitását 3AB kezeléssel igazoltuk.

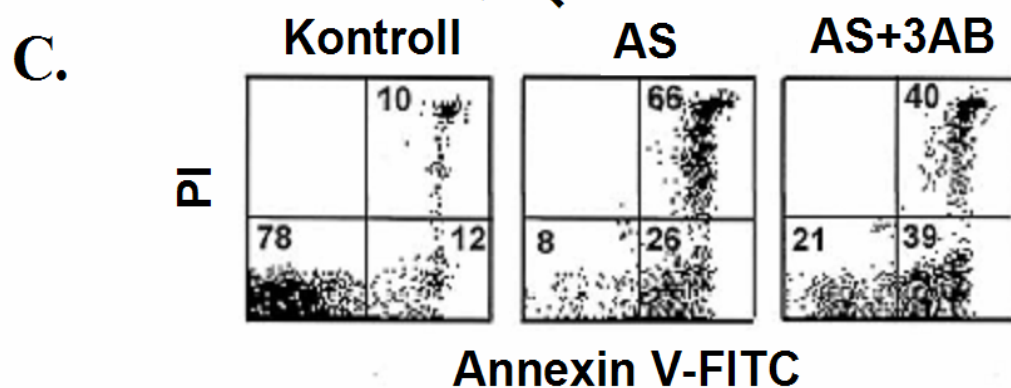
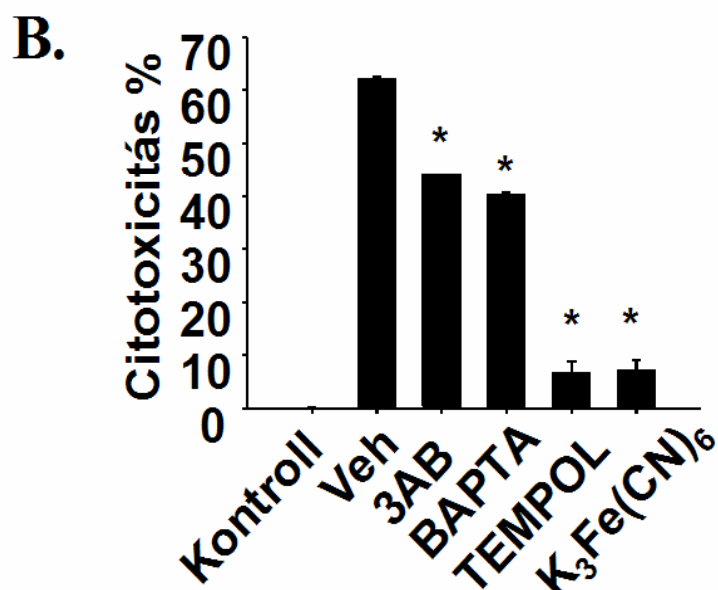
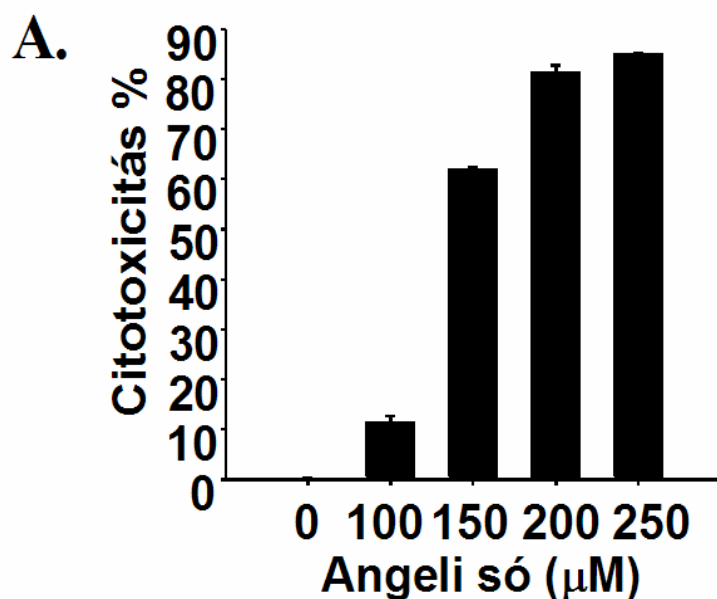
B. A nitroxil által kiváltott citotoxicitás és mitokondriális változások vizsgálata

A PARP aktivációja oxidánsokkal (hidrogén peroxid, peroxinitrit) több sejtvonalon, illetve timocitákon onkotikus sejthalálhoz vezetett. A PARP gátlásával a nekrosis apoptózisba fordítható (Virág és Szabó, 2002). A nekrosis során a mitokondrium membránpotenciálja összeomlik, ennek következtében a respirációs lánc tagjai elektronjaikat elsősorban az oxigénnek leadva szabad gyököket hoznak létre. Ez a folyamat a szekunder szuperoxid termelés.

Az AS kezelés a timociták koncentrációfüggő nekrosisához vezetett (5. ábra). A $K_3Fe(CN)_6$ és TEMPOL gyökfogókkal történő előkezelés megvédte a timocitákat az AS által indukált sejtpusztulástól (5. ábra), amiből arra következtethetünk, hogy a felszabaduló nitroxil hatására lépett fel citotoxicitás. Az intracelluláris kalcium megkötése a sejtmembránpermeabilis BAPTA kalcium kelátor vegyülettel szignifikáns védő hatást mutatott hasonlóan a PARP inhibitor 3AB-hez (5. ábra).

A citotoxicitás jellemzésére Annexin-FITC és PI kettős festést is végeztünk. A PI pozitív sejtek a permeabilizálódó sejthártyájú, pusztuló sejteket jelentik, az Annexin pedig az apoptózis során a sejtmembrán külső oldalára kerülő foszfatidil-szerinhez kötődik az apoptotikus sejteket jelölve meg. Ilyen módon a FITC - PI kettős festéssel az AS-sel kezelt sejtek három populációt képeznek: a FITC és PI negatív normál, a PI pozitív onkotikus (vagy késői apoptotikus), illetve a FITC pozitív és PI negatív apoptotikus sejtek populációját. Azonban három órás AS kezelés után valószínűtlen késői onkotikus sejtek jelenléte, ezért a dupla pozitív sejtek valószínűleg az nekrotikus sejteket jelenítik meg. A timocitákat 150 μ M AS-val kezelve a onkotikus (66%) és apoptotikus (26%) sejtek aránya megnő a kontroll mintában mérthez képest. 3AB előkezelés csökkenti az onkotikus sejtek arányát (40%) megnövelve az apoptotikus (39%) és a normál sejtek arányát (21%) (5. ábra C panel).

Kísérleteinkben a timociták AS kezelése (150 μ M) után a mitokondriális membránpotenciál lecsökkent (alacsonyabb Dio fluoreszcencia), illetve ezzel párhuzamosan megnövekedett a szekunder szuperoxid produkció (emelkedett HE fluoreszcencia) (6. ábra D panel). A PARP gátlása 3AB-val szignifikánsan csökkentette az AS indukálta mitokondriális elváltozásokat (6. ábra).

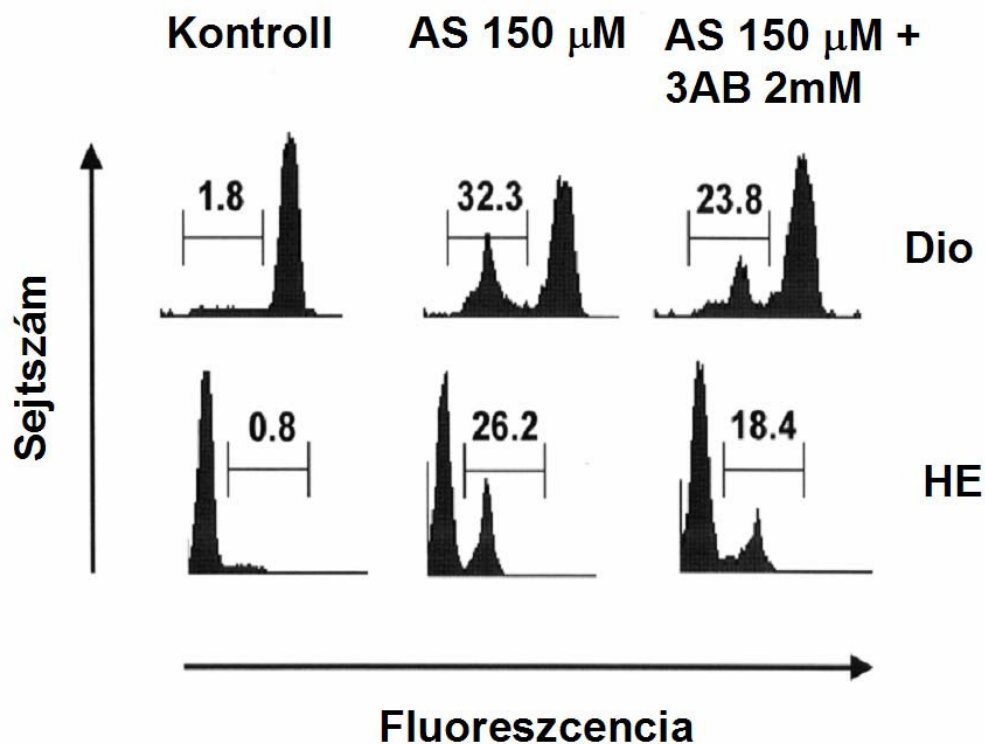


5. ábra Az AS indukálta citotoxicitás jellemzése.

A panel. Az AS kezelés során fellépő citotoxicitást PI felvétellel vizsgáltuk. A sejteket különböző koncentrációban AS-sel kezeltük, majd 4 órával később PI festést végeztünk. Az AS kezelés koncentrációfüggő sejtpusztuláshoz vezetett.

B panel. A timocitákat 30 perces előkezelést kaptak az egyes anyagokkal (3AB – 2mM, BAPTA – 5 μM, 1 mM TEMPOL, 1mM K₃Fe(CN)₆), majd 4 órán át AS-sel indukáltuk őket, amit PI festés követett. A sejtpusztulás szabadgyökfogókkal, kalcium kelátorral és PARP gátlószerrel gátolható volt. * p<0.05 a kontrollhoz képest.

C panel. A timocitákat fél órán át előkezeltük 2mM 3AB-vel, majd 3 órán át kezeltük 150 μM AS-sel. A sejteket Annexin-FITC – PI kettős festéssel vizsgáltuk. A bemutatott eredmény egy reprezentatív mérés eredményét mutatja.



6. ábra Az AS kezelés által okozott mitokondriális elváltozások.

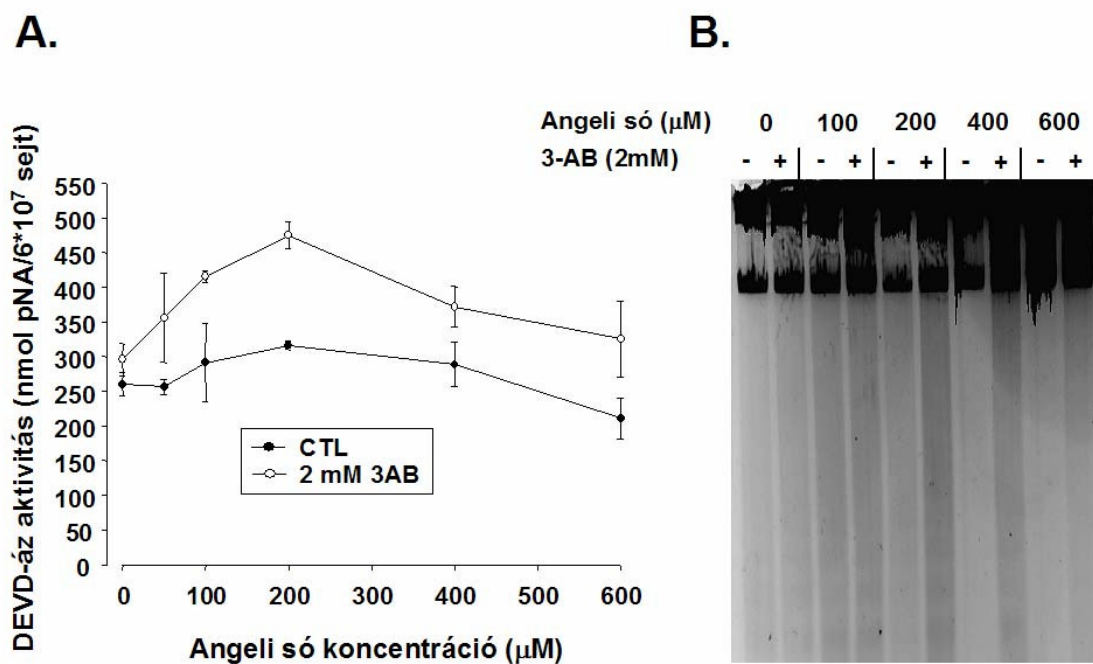
Az AS által kiváltott sejthalált a peroxinitrittel kiváltott sejthalálhoz hasonló mitokondriális változások jellemzik. A timocitákat fél órán át előkezeltük 2 mM 3AB-vel, majd 4 órán át inkubáltuk 150 μ M AS jelenlétében. A mitokondriális elváltozásokat ezután HE és Dio festéssel vizsgáltuk. A mitokondriális membránpotenciál összeomlása, illetve a szekunder szuperoxidtermelés csökkenthető volt, de nem volt megakadályozható PARP gátlással. A bemutatott eredmény egy reprezentatív mérés eredményét mutatja.

C. Nitroxil által kiváltott timocita sejthalál vizsgálata

A DNS törés, illetve ezen keresztül a PARP aktiváció energetikai katasztrófa révén a sejtek nekrozisát okozzák. Az irodalmi adatok szerint ilyen esetekben a PARP gátlása a sejtek nekrozisát apoptózisba tereli. Az apoptózis jellemző biokémiai markerei közül a kaszpáz-3 aktivációját és a DNS létra képződését vizsgáltuk. A kaszpáz-3 aktivációja nitroxil hatására enyhe emelkedést, majd egy plató fázis után csökkenést mutatott. A PARP inhibitor 3AB mellett a kaszpáz-3 aktivitás hamarabb kezdett emelkedni, és jóval magasabb értéket ért el, mint az inhibitor nélküli mintáknál. (7. ábra, A panel)

A DNS fragmentációja szintén az apoptózisra jellemző folyamat, mely könnyen vizsgálható, a genomi DNS agaróz gélen történő elválasztásával. Amennyiben minden vályúba ugyanannyi DNS-t viszünk fel, akkor az egyes oszlopokban az elektroforézis során létrejövő létra denzitása jellemezni fogja a mintában lévő apoptotikus-, illetve onkotikus sejtek arányát. Minél sötétebb egy adott oszlop, annál nagyobb az apoptotikus sejtek aránya.

AS kezelés hatására (100 μ M) megemelkedett az apoptotikus sejtek aránya mind a 3AB kezelt, mind a kezeletlen sejtekben (ez összhangban áll a kaszpáz mérés eredményével). Az AS koncentráció további emelésével a létra intenzitása csökken a kontroll sejtek esetében, azonban a 3AB kezelt sejtek létráinak intenzitása emelkedik, csökkenést csak 600 μ M AS-nál láthatunk. (7. ábra, B panel)



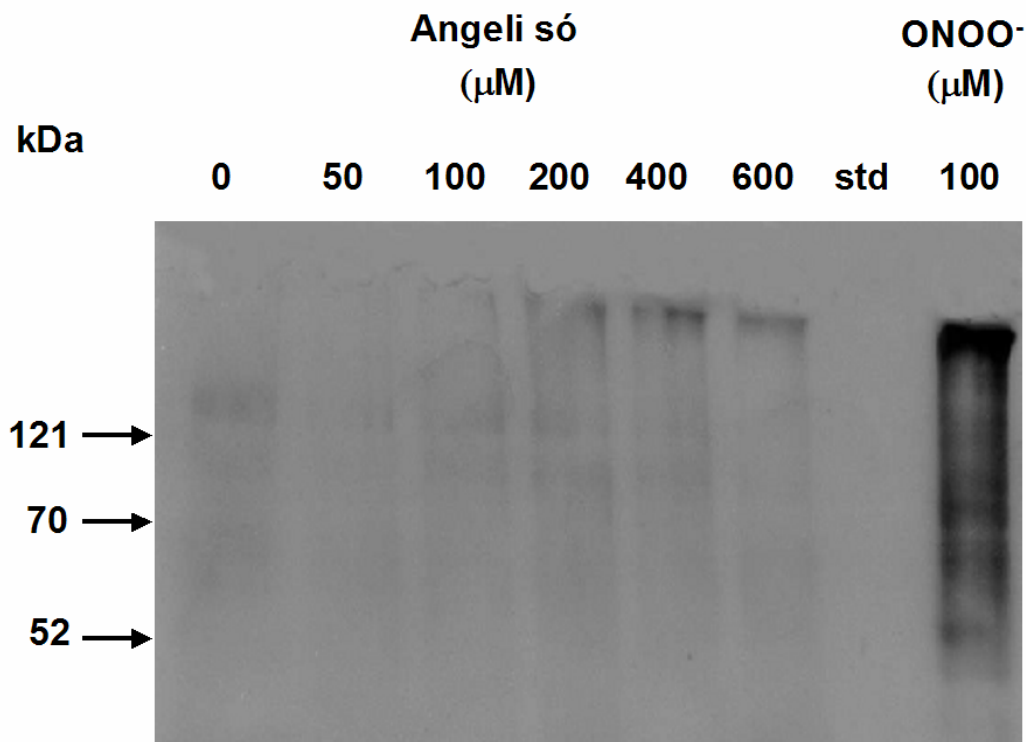
7. ábra. Angeli só kezelt timociták sejthalálának jellemzői

A panel. A timocitákat 30 percen át előkezeltük 2mM 3AB-val, majd 6 órán át inkubáltuk AS-sel. A sejteket lizáltuk, a kaszpáz-3 aktivitást a DEVD-pNA szubsztrátból felszabaduló pNA fotometriás mérésével határoztuk meg.

B panel. A timocitákat ugyanolyan módon kezeltük, mint a kaszpáz-3 aktivitás meghatározásához. A 6 órás inkubáció után 2×10^6 sejtet vittünk fel 2% agaróz gélre. A 13 órás elektroforézis során (60 V) a mintákon SDS-t és proteináz K-t futtattunk keresztül. A gélét etidium bromiddal festettük meg.

D. Tirozin nitrálódás vizsgálata

Hogy kizárjuk annak a lehetőségét, hogy a nitroxil által kiváltott citotoxicitás során valójában a nitroxilból képződő peroxinitrit által indukált sejthalált látjuk, Western blotot készítettünk AS kezelt timocitákból nitrotirozin ellenes antitest felhasználásával. Kísérleti rendszerünkben nem találtunk jelentős fehérjenitrálódást, míg pozitív kontrollunk – peroxinitrittel kezelt timociták – erőteljes jelet adott (8. ábra). A nitrálódás hiánya arra utal, hogy peroxinitrit nem képződött a kísérletek során, így valószínű, hogy az eredmények tisztán az NO- biológiai hatásait tükrözik.



8. ábra Nitrotirozin képződés hiánya AS-sel kezelt timocitákban.

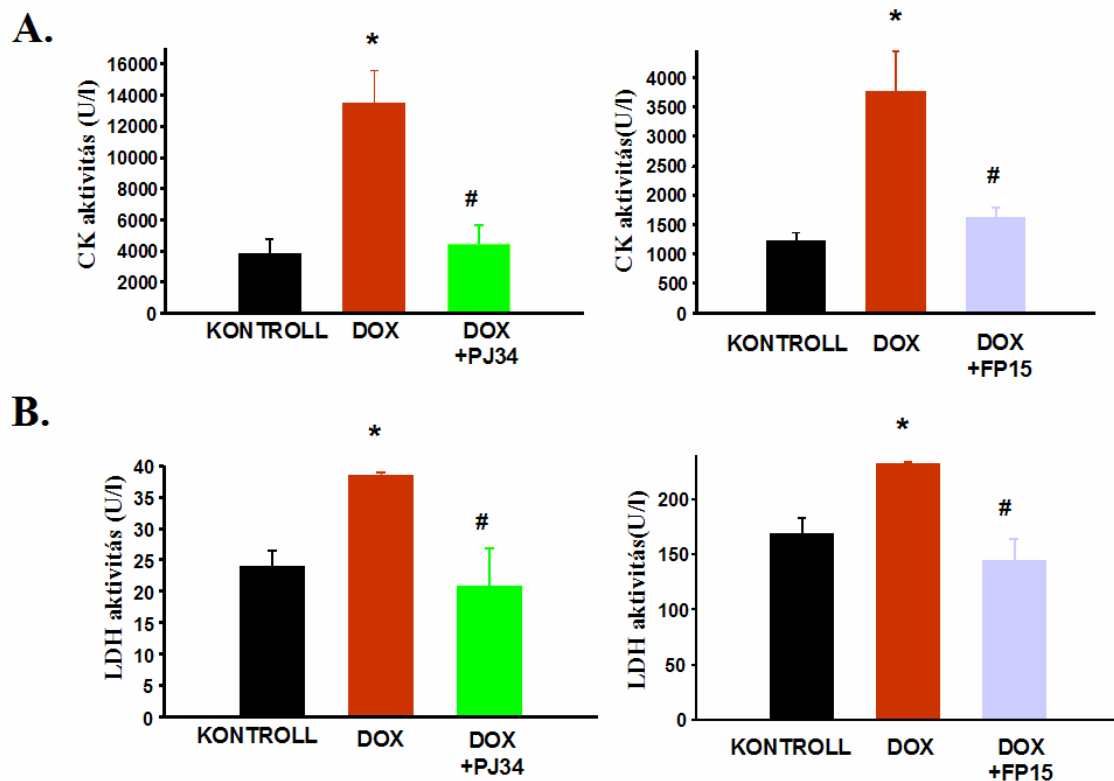
A timocitákat 1 órán át AS-val, vagy peroxinitrittel kezeltük, RIPA pufferben lizáltuk. A lizátumokból 15 μ g-ot 10% akrilamid gélen elválasztottunk, majd nitrocellulóz membránra blotoltuk. Anti-nitrotirozin antitesttel vizsgáltuk a fehérjék nitrálódását. Az AS-sel kezelt mintákban nem tapasztaltunk jelentős nitrotirozin képződést ellentétben a pozitív kontroll peroxinitrit kezelt sejtekkel.

2. A PARP és szabad gyökök szerepe a doxorubicin által okozott kardiomiopátiában

A. Szabad gyökök és a PARP szerepe kardiomiociták doxorubicin által kiváltott elhalásában

A szívizomsejtek pusztulása *in vivo* jól jellemezhető bizonyos szérumbiológiai markerenzimek (CK és LDH) aktivitásváltozásának követésével. A CK a szívizomsejtek pusztulásának korai markere, míg az LDH szérumszintje hosszabb idő után éri el maximumát.

Két napos doxorubicin kezelés mind a CK, mind az LDH szérumszintjét megemelte (9. ábra). Ezek az enzimaktivitás értékek jelentős szívizomsejtkárosodást jeleznek doxorubicin kezelés hatására. Mind az FP15, mind a PJ34 előkezelés meggátolta mind a CK, mind az LDH szint emelkedését. Vagyis a DOX kezelés során fellépő sejtelhalás patomechanizmusában mind szabad gyökök, mind a PARP aktiváció szerepet játszhat.



9. ábra CK és LDH aktivitás doxorubicinnal kezelt egerek szérumban.

A DOX kezelés a szérumban CK és LDH aktivitását szignifikánsan megemelte, a kardiomiociták jelentős mértékben károsodtak. Mind az FP15, mind a PJ34 a kontroll szinten tartotta mindkét markerenzim aktivitását.

A. panel – A CK aktivitás változása PJ34 és FP15 kezelés hatására;

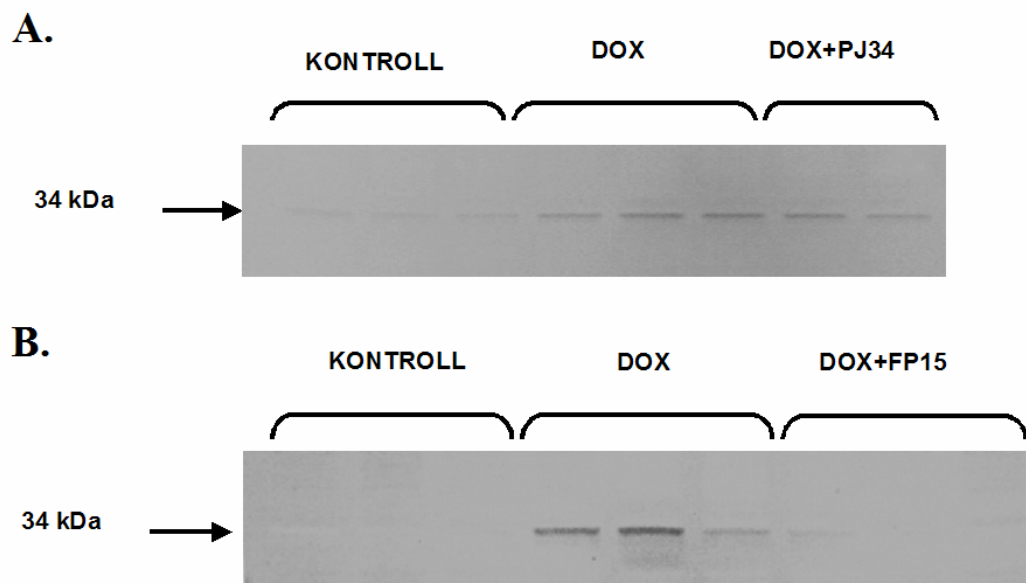
B. panel – LDH aktivitás változása PJ34 és FP15 kezelés hatására; # $p < 0.05$ a kontrollhoz képest; * $p < 0.05$ a DOX kezeltéhez képest.

B. Metalloproteináz aktiváció vizsgálata doxorubicin kardiomiopátiában

Az aktív metalloproteinázokat zimográfiával azonosítottuk. A módszer kiválóan alkalmas többféle eredetű mintából (sejtkultúra felülszó, szerv, vagy szövetminták) az aktív proteázok azonosítására, felvilágosítást ad aktivitásuk mértékéről, illetve molekulatömegükről. A gélekbe többféle szubsztrát építhető be (zselatin, kazein, kollagén), s ilyen módon az adott enzimek szubsztrátspecifitása is megállapítható.

A kontroll szívekben nem, vagy alig láttunk MMP aktivitást. A DOX kezelés hatására mindkét kísérlet során megjelent egy 34 kDa molekulatömegű zselatináz enzim. A sávok denzitometráásával megbecsültük az enzim aktivitásának változását, mely mintegy négyszeres aktivitásváltozást mutatott a DOX kezelt mintákban a kontrollhoz képest. Az FP15 kezelés meggátolta az MMP aktivitás megemelkedését ebben a modellben. A PARP aktivitás gátlása azonban nem vezetett az MMP aktivitás növekedés gátlásához. (10. ábra)

Kazeináz aktivitást nem tudtunk kimutatni a mintákban. A zselatináz aktivitás Ca^{2+} függését replikátum gélek Ca^{2+} mentes előhívó pufferben történő előhívással igazoltuk.



9. ábra Az MMP aktivitás változása akut doxorubicin modellben

Az MMP aktivitás változását zimográfiával követtük. Az egerek szívét TNC pufferben homogenizáltuk, majd 7,5 µg fehérjét zimográfiás gélen elválasztottunk. A gélekből az SDS-t eltávolítottuk, és Brij 35-re cseréltük (renaturálás). A géleket egy éjszakára kalcium tartalmú előhívó pufferbe helyeztük, az emésztetlen szubsztrátot Coomassie Brilliant Blue festékkel festettük meg. DOX kezelés hatására mindkét esetben (A és B panel, DOX) szignifikáns MMP aktivitásnövekedést tapasztaltunk a kontrollhoz képest. PJ34 előkezelés nem gátolta meg (A panel, DOX+PJ34), azonban FP15 előkezelés meggátolta az MMP aktivitás megemelkedését (B panel, DOX+FP15).

VII. Diszkusszió

1. A nitroxil citotoxicitásának vizsgálata

Az NO egyelektronos redukciójával keletkező nitroxil előállítására használt Angeli só (AS) koncentrációfüggő módon citotoxikusnak bizonyult az általunk alkalmazott timocita modellben, hasonlóan a más sejtvonalon leírtakhoz (Chazotte-Aubert és mtsai, 1999, Vaananen és mtsai, 2003, Wink és mtsai, 1998). Az irodalmi citotoxicitási adatok millimólos nagyságrendűek, azonban az általunk timocitákon mért citotoxicitási értékeket a mikromólos tartományban tapasztaltuk. Az eltérés oka valószínűleg a timociták oxidatív hatásokkal szembeni eltérő érzékenységéből adódik. Hasonló nagyságrendű különbségek mutatkoztak a peroxinitrittel, illetve hidrogén peroxiddal indukált citotoxicitás esetében timociták és más sejtvonalak (pl. fibroblasztok) között (Virág és mtsai, 1998a,b, Szabó és mtsai, 1998b). Ennek a jelenségnek a közvetlen oka egyelőre nem ismert. Feltételezhető, hogy a sejtek oxidatív stressz elleni védelme (antioxidánsok, peroxidázok és diszmutázok mennyisége) eltér az egyes sejtípusok között. Meg kell jegyezzük, hogy az éretlen T-sejtek (a timociták legnagyobb része) az apoptózis beindulásának határmezsgyéjén mozog a timuszban zajló szelekció során, vagyis bennük a sejthalál mechanizmusokat eleve könnyebb beindítani, mint más differenciált, vagy transzformált sejtípusok esetében.

Az oxidatív stresszel kiváltott sejthalál útvonalak közül mi a DNS törés - PARP aktiváció - onkózis útvonalat vizsgáltuk. Az útvonal első lépése a DNS szálak törése. Az alkalikus comet-assay-vel az irodalmi adatokhoz hasonlóan sikerült a DNS egyszálú törését igazolni (Ohshima és mtsai, 1998, 1999). Szintén sikerült kimutatnunk PARP aktivációt (dot-blot és ^3H -NAD beépülés) AS stimuláció után, aminek szerepe van az AS citotoxicitás kialakításában, mert az AS által kiváltott citotoxicitás 3AB-vel gátolható volt. A PARP mediálta citotoxicitás kialakulásában szerepet játszik az intracelluláris kalcium koncentráció megváltozása is, amit kimutattak peroxinitrit-indukálta sejthalálban timocitákon és keratinocitákon is (Virág és mtsai, 1999, Bakondi és mtsai, 2003a). A sejtporémbilis kalcium kelátor BAPTA-AM az AS kezelés esetében is szignifikáns védő hatást mutatott citotoxicitással szemben.

Az oxidatív stressz hatására fellépő károsodások egy része az intracelluláris kalcium homeosztázis felborulására vezethető vissza. Feltételezhető, hogy a károsodások kialakulásában elsődlegesen a kalcium-hírvivő rendszer módosulása játszik szerepet (Goldhaber, 1996, Goldhaber és Weiss, 1992). A megnövekedett kalciumszint okozhatja a specifikus proteázok aktiválódását, a citoszkeletális hálózat összeomlását, mitokondriális zavarokat, és a DNS károsodását (Nicotera, 1992). A megnövekedett kalciumszint a kromatinszerkezet fellazulásához vezet, így hozzáférhetőbbé teszi azt a proteázok (Nicotera és mtsai, 1994) és ennek következtében endonukleázok számára is (Villapontenau és mtsai, 1986). Az intrakromoszomális DNS hasításban szerepet játszó nukleázok szintén kalcium és magnézium függőek. Ki kell emelnünk, hogy a PARP aktiváció kezdődhet az intracelluláris kalciumkoncentráció megemelkedésével (Homburg és mtsai, 2000), bár ennek az útvonalnak nem valószínű, hogy szerepe lenne a timociták sejthalálában.

A PARP gátlás bár szignifikáns, de nem nagyfokú védelmet biztosított a nitroxil citotoxikus hatásával szemben (Virág és mtsai, 1998a,b). Azaz feltételezhetően a DNS törés - PARP aktiváció – onkózis útvonal csak egy mechanizmus a nitroxil által indukált citotoxikus útvonalak közül (pl. kaspázok és átmeneti fémion tartalmú komplexek inaktivációja).

Felvetődik a kérdés, hogy maga a nitroxil felelős-e a tapasztalt citotoxicitásért, vagy esetleg más, az NO^- -ből, vagy az NO^- segítségével képződő szabad gyök indítja-e el. Lehetséges, hogy a nitroxilból – hasonlóan az NO -hoz – peroxinitrit képződhet. Miranda és munkatársai (2001) eredményei szerint az Angeli só lebomlása során nem képez peroxinitritet. Espey és mtsai (2002) szerint a nitroxil hatásmechanizmusában humán sejteken nem vesz részt a peroxinitrit. Ezzel szemben Kirsch és de Groot (2002) eredményei szerint a nitroxil képes molekuláris oxigénnel peroxinitritet és hidroxil gyököket képezni. Hidroxil gyök képződésének a lehetőségét Ohshima és munkatársai is felvetették (1998, 1999). A peroxinitrit termelődésének lehetőségét kísérleti rendszerünkben a timocita fehérjék tirozil oldalláncainak nitrálódásának kimutatásával vizsgáltuk Western bloton. Eredményeink szerint a nitroxil gyök nem nitrálja a sejtfehérjéket, vagyis nem valószínű a peroxinitrit termelődés.

A nitrálás hiányában valószínűsíthetünk más biokémiai folyamatot, mint például a fehérjék ciszteineinek nitrozilálása, illetve oxidatív módosítása (Perrin és Koppenol, 2000, Viner és mtsai, 1999, Kuhn és mtsai, 1999, Kuhn és Geddes, 1999, Stepien és mtsai, 2000). A nitroxil PARP-től független citotoxicitásában szerepet játszhat tiol iránti reaktivitása (Bartberger és mtsai, 2001, Kim és mtsai, 1999, Shoeman és mtsai, 2000), illetve affinitása átmeneti fémek felé (Miranda és mtsai, 2003). Mindkét esetben a sejtbeli enzimek aktivitását változtathatja meg a nitroxil kezelés és ezen keresztül vezethet a sejt elpusztulásához.

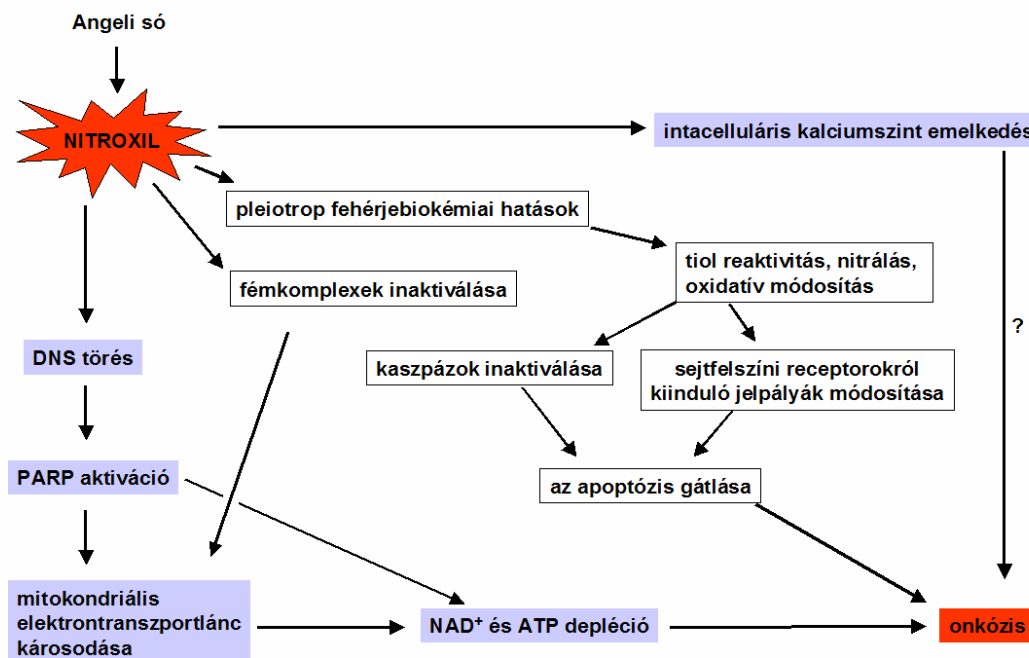
A nitroxil által indukált sejthalál a timocitákon hasonló jellegzetességeket mutatott más oxidánsokkal indukált sejthalálhoz: a mitokondriális membránpotenciál csökkenését okozta, illetve a szekunder szuperoxid termelés emelkedéséhez vezetett (Virág és mtsai, 1998a,b). Virág és munkatársai (1998a,b) a membránpotenciál csökkenését az ATP-NAD⁺ mennyiség csökkenésével, illetve az ezzel párhuzamosan kialakuló szekunder szuperoxidképződést pedig az elektrontranszportlánc szétkapcsolódásával magyarázzák. Ezek a folyamatok megelőzhetőek voltak a PARP gátlásával (Virág és mtsai, 1998a, 1999).

A nitroxil kezelés során megjelent mitokondriális eltérések csak részben voltak kiküszöbölhetőek PARP gátlással. Ez felveti, hogy más mechanizmusok is szerepet játszanak a mitokondriumban zajló folyamatokban. Az NO-hoz hasonló biológiai tulajdonságokkal rendelkező nitroxil képes lehet a mitokondrium fémtartalmú enzimeit, mint például a citokrómokat, vas-kén fehérjéket, illetve az elektrontranszportlánc további fehérjéit módosítani. Ez hasonlóan a mitokondriális membránpotenciál csökkenéséhez, illetve a légzési transzportlánc szétkapcsolásán keresztül szekunder szuperoxid termeléshez vezet.

Az Angeli só kezelés apoptózishoz vezetett (DNS-fragmentáció, kaszpáz-3 aktiváció), ami a koncentráció emelkedésével onkózisba váltott. Az apoptózis - onkózis kapcsoló működése hasonló volt az eddig az irodalomban leírtakhoz, azonban kevésbé volt kifejezett váltás. A két sejthalálforma közötti váltás oka egyrészt valószínűleg a már leírt ATP-NAD⁺ mennyiség csökkenésével, illetve ezen folyamat gátlásával magyarázható. Másrészt lehetséges az AS kezelés az apoptózisban résztvevő fehérjék (pl.

kaspázok) aktivitását megváltoztatta, nitrálással, vagy oxidatív módosítással. A nitroxil indukálta kaspáz-3 aktiváció nem igazán jellegetes összehasonlítva például a peroxinitrittel, vagy hidrogén peroxiddal kiváltott kaspáz-3 aktivációval. A 3AB-vel kezelt sejtek kaspáz-3 aktivitása más esetekben jóval magasabbra emelkedett, mint az általunk mért esetében. A másik szokatlan jelenség a kaspáz-3 aktivációval kapcsolatban, hogy a kontroll és a 3AB-vel kezelt sejtek aktivitása egyszerre esik, holott a 3AB-vel kezelt sejtekben olyan nitroxil koncentrációknál is magasabb aktivitást várnánk, ahol a kontroll sejtekben már nem találnánk mérhető kaspáz-3 aktivitást. A kaspázok nitroxil általi kémiai inaktivációja magyarázhatja a különbségeket a kaspáz-3 aktivációban. A nitroxil NO-hoz való hasonlósága miatt képes lehet az NO-hoz hasonló módon a kaspázok inaktivációra (Mannick és mtsai, 1999). Hasonló módon a nitroxil kezelés megváltoztathatja a sejteken kívülről érkező jelátviteli utakat (pl. a Fas ligand jelpálya módosítása), ami a proapoptotikus szignálok csökkent hatékonyságához vezethet (Mannick és mtsai, 1997, Liu és Stamler, 1999).

A nitroxil kiváltotta sejthalál lehetséges molekuláris mechanizmusait a 11. ábrán foglaltuk össze.



11. ábra A nitroxil kiváltotta sejthalál molekuláris mechanizmusainak összefoglalása

A nitroxil citotoxicitásában többféle mechanizmus játszhat szerepet. Szürke alapon az általunk vizsgált jelenségeket jelöltük. Eredményeink PARP-tól független mechanizmusok jelenlétét és dominanciáját valószínűsítik.

Eredményeink alapján esetleg magyarázható a kettősség, amit az irodalomban a nitroxil hatásáról találhatunk a keringési rendszer ischaemia - reperfüziós károsodásával kapcsolatban. Egyes megfigyelések szerint a nitroxil kezelés javít a szívfunkciókon (Paolucci és mtsai, 2003, Pagliaro és mtsai, 2003), azonban mások szerint inkább ront (Ma és mtsai, 1999), illetve növeli a neutrofil infiltrációt (Takahira és mtsai, 2001). Az ellentmondás feloldására lehetőség, hogy más irodalmi adatok (Irvine és mtsai, 2003, Wanstall és mtsai, 2001) a nitroxil képes az NO értágító hatását kiváltani, vagyis alacsony koncentrációban az ischaemiás esemény alatt értágító hatású, majd a koncentrációját emelve citotoxikussá válik, amely citotoxicitásában a PARP aktivációnak is lehet szerepe.

2. A doxorubicin által okozott kardiomiopátia vizsgálata

A doxorubicin kardiotoxikus hatásával kapcsolatos kutatások felvetették az RNI-k lehetséges szerepét (Siveski-Iliskovic és mtsai, 1995). Eredményeink szerint nitrotirozin festődés tapasztalható a doxorubicinnel kezelt, és kardiomiopátiában szenvedő egerek szívében, ami feltételezhetően peroxinitrit képződését jelzi. A peroxinitrit képződéséhez szükséges NO termelődésének forrása lehet az eNOS és az iNOS. NOS inhibitor szisztémás alkalmazásával csökkenthető a doxorubicin kardiotoxicitása (Mostafa és mtsai, 1999). Az eNOS állandóan jelen van a vaszkuláris rendszerben (Benyó és mtsai, 1991). Az iNOS szerepére utal, hogy az iNOS^{-/-} egerek védettek a doxorubicin hatásaival szemben. Az iNOS expresszióját, több citokin mellett az NFκB transzkripciós faktor szabályozza (Wang és Mardsen, 1995, Brattsand és Linden, 1996). Nem szívizom sejtekben ismert a doxorubicin NFκB aktiváló hatása (Wang és mtsai, 2002). Feltételezhető, hogy ez a folyamat lezajlik szívizomsejtekben is, ami az iNOS fokozott expressziójához vezethet.

A doxorubicin kémiai szerkezetéből adódóan képes kinon-szemikinon átalakulásra a szívizomsejtek mitokondriumában. Ebben a redox ciklusban a szemikinon forma képes elektront átadni a környezetében lévő anyagoknak ROI-kat hozva létre (Doroshov és Davies, 1986). A doxorubicin redox ciklusa közben keletkező ROI-k közül a legfontosabb a szuperoxid, a hidrogén peroxid és a hidroxil gyök termelődése. A szuperoxid gyök a NOS által szintetizált NO-val képes peroxinitritet képezni. A peroxinitrit lebontását katalizáló FP15 kezelés megakadályozta a nitrotirozin képződését, vagyis *in vivo* hatékonyan bontotta a képződő peroxinitritet. Fontos kiemelnünk, hogy mind a ROI-k, mind a peroxinitrit képes az NFκB aktiválására (Bowie és O'Neill, 2000).

Az egerek kamrai szívfunkciói (pulzusszám, artériás középnyomás, kamrai végdiasztolés és kamrai végszisztolés nyomás, nyomásváltozás a kamraszisztolés és -diasztolés közben) a kezelés ötödik napjára jelentősen romlottak. A szívfunkciók romlásának megakadályozására a PARP inhibitor PJ34-et és FP15-öt használtuk. Mindkét anyag a DOX által okozott szívfunkciókárosodás ellen hatott, azonban míg az FP15 teljes védelmet nyújtott a DOX ellen, addig a PJ34 szignifikáns, azonban korántsem teljes mértékű védelmet biztosított.

A kardiomiociták sejthalálát vizsgálva mindkét vegyület ugyanolyan hatásfokkal védte ki az LDH és a CK szérumbeli aktivitásának onkotikus sejthalálra jellemző emelkedését. Ebből feltételezhető, hogy a szívizomsejtek a szabadgyök képződés – DNS törés – PARP aktiváció – ATP és NAD⁺ deplécio – onkózis útvonalon pusztulnak el (Pacher és mtsai, 2002). Okkal feltételezhető, hogy hasonlóan a más sejtes modellekben leírtakhoz (Virág és mtsai, 1998a,b, Szabó és mtsai, 1998b) a PARP gátlása - ebben az esetben is - az onkotikus sejteket apoptotózisba terelte. A PARP indukcióban részt vevő szabad gyökök közé kell sorolnunk a peroxinitritet és a hidroxil gyököt. A szívfunkciók nem teljes javulásának oka lehet PARP gátlás esetében, hogy a szívizomsejtek mindenképpen elpusztulnak a szabad gyök túltermelés hatására, azonban a PARP gátlása mellett erre a szervezet számára kevésbé megterhelő módon, apoptózissal kerül sor.

Eredményeink egy új útvonalat tártak fel a doxorubicin indukálta kardiomiopátia patomechanizmusában. Kimutattuk egy 34 kDa MMP aktiválódását doxorubicin kezelés hatására. Az aktivációban szerepet játszik a szabad gyökök megjelenése, de eredményeink szerint a PARP szerepe nem valószínű az általunk leírt aktiváció során.

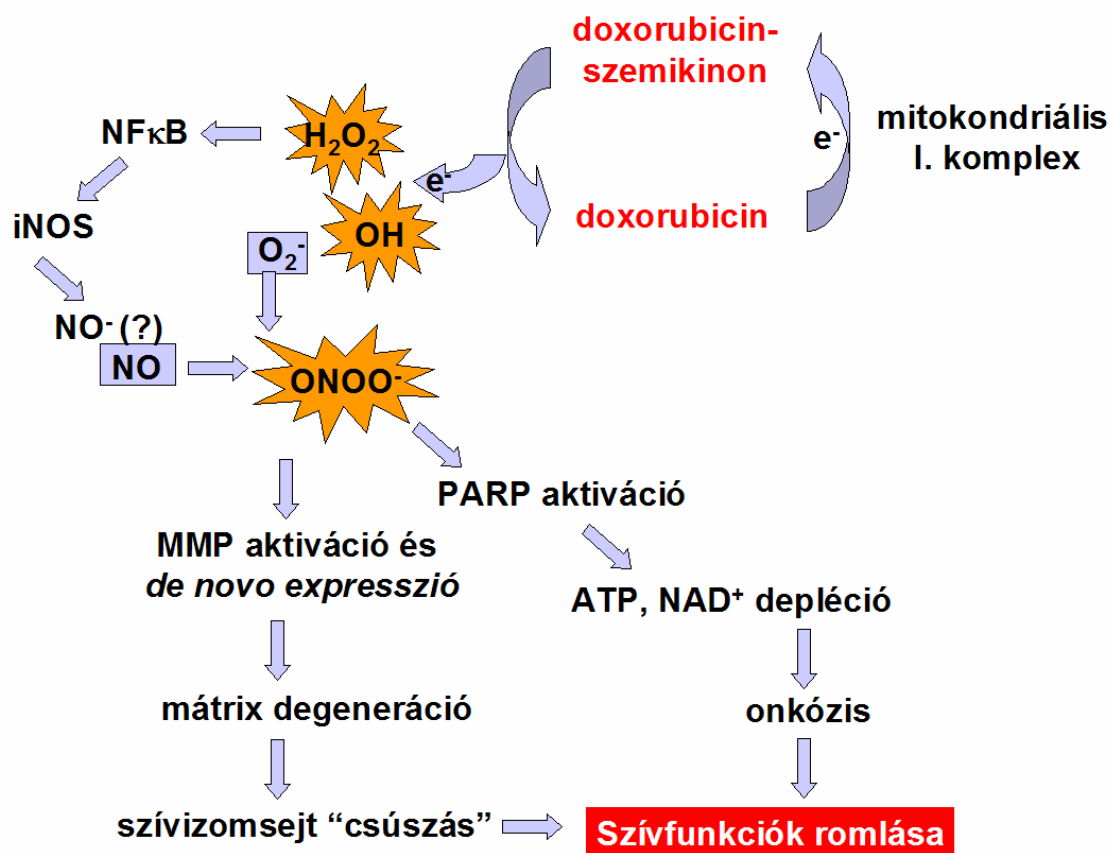
Az MMP aktivitás megjelenése a szívben önmagában nem meglepő. Megjelenésüket több, a szívet érintő kórfolyamatban, mint például szívelégtelenségben (Mann és Spinale, 1998, Spinale, 2002), illetve ischaemia - reperfúziós károsodás során (Cheung és mtsai, 2000) leírták már.

Érdekes és lényeges kérdés, hogy a megjelenő MMP aktivitás *de novo* expresszió, vagy oxidáns aktiváció eredménye-e. Az oxidáns aktiváció lehetőségét támasztja alá az emelkedett ROI és RNI szint. Újabb vizsgálataink (Bai és mtsai, 2003) során tovább vizsgáltuk a doxorubicin-indukálta MMP aktiváció mechanizmusát szívben. Western blottal igazoltuk, hogy a fent említett MMP mellett az MMP2 is jelen van és aktiválódik doxorubicin kezelés hatására. Aktivációja során az MMP2 mennyisége az idővel arányosan növekszik, azonban az aktiváció során nem változik a fehérje molekulatömege. Ennek alapján úgy gondoljuk, hogy valamilyen okból egyes MMP-k expressziója indukálódik, majd a zimogén aktivációja oxidáns aktiválással történik a doxorubicin indukálta kardiomiopátiában. Más csoportoknak is sikerült aktiválódó MMP-k kimutatása

peroxinitrittel perfundált szívből (Wang és mtsai, 2002). Az általunk kimutatott 34 kDa MMP-t máshol még nem írták le.

Az MMP expresszió induktoráról csak feltételezéseink lehetnek. Nincs olyan irodalmi adat, ami az NF κ B szerepét felvetné az MMP-k transzkripciójával kapcsolatban. Azonban a doxorubicin kezelés az NF κ B aktiválásával megváltoztathatja olyan citokinek expresszióját, amelyek indukálhatják az MMP-k expresszióját (Siwik és mtsai, 2000).

Feltételezzük, hogy az aktiválódó MMP-k a szív extracelluláris mátrixának degenerációjával hozzájárulnak ahhoz, hogy a szívműködés munkája rosszabb határfokkal adódik át a szívműködés csúszása miatt. Ezáltal hozzájárulnak a doxorubicin által okozott kontraktilis diszfunkció kialakulásához. A doxorubicin által okozott kardiomiopátia hatásmechanizmusának a fenti eredmények fényében az 12. ábrán foglaltam össze.



11. ábra A doxorubicin-indukálta kardiomiopátia hatásmechanizmusa

A doxorubicin kezelés kardiomiopátiás mellékhatásának középpontjában a különböző reaktív intermedierek (H_2O_2 , OH , $ONOO^-$) kialakulása áll. Ezek a gyökök részben a doxorubicin mitokondriális félredukciós ciklusa során keletkeznek, részben valószínűleg az iNOS $NF\kappa B$ függő expresszióján át a termelődő NO és szuperoxid gyök reakciójából. Az oxidánsok egyrészt aktiválják a DNS törés – PARP aktiváció – onkózis útvonalat, másrészt MMP aktivációt és expressziót indítanak be. Ez utóbbi eseménysorról feltételezzük, hogy az extracelluláris mátrix degenerációjában, illetve ebből következően a szívizomsejtek csúszásában kulminál és erősíti a szívelégtelenséget.

A doxorubicin kardiotoxikus hatásának csökkentésére a klinikumban a dexrazoxane-t használják, ami hazánkban Cardioxane néven van forgalomban. A hazai klinikai gyakorlatban harminc év alatti betegek esetében tekintik indikáltnak alkalmazását. Hasonló módon csökkenthető a kardiotoxikus mellékhatás a doxorubicin adagolásának helyes beállításával is, többszöri alacsonyabb dózisban adva kevesebb számú nagyobb dózis helyett. Az FP15-szerű vegyületek klinikai alkalmazása ezzel együtt perspektivikus lehet fiatal egyéneknél. Ugyanis a fiatal betegek túlélése a kezelés után megközelíti a 30-40 évet, így érdemes komoly erőfeszítéseket tenni a kardiotoxikus hatás csökkentésére, amivel a beteg életminősége jelentősen javulhat.

Az MMP aktiváció kórélettani jelentőségének megismeréséhez további vizsgálatokra van szükség. Azonban, ha bizonyítható a kóroki összefüggés az MMP aktiváció és a doxorubicin kardiotoxikus mellékhatása között, akkor új terápiás célpontot jelenthet a kardiotoxicitás megelőzésében. MMP gátlók alkalmazása a szolid tumorok doxorubicin terápiájában nemcsak a kardiotoxicitást csökkentheti, hanem egyúttal adjuváns hatásként a tumorok metasztázis képző képességét is visszafoghatja (Nagase és Woessner, 1999).

VIII. Konklúziók

1. Az Angeli só kezelés egyszálú DNS töréseken keresztül PARP aktivációhoz vezet timocitákban.
2. Az Angeli só kezelés a mitokondriális membránpotenciál összeomlásához, illetve szekunder szuperoxid termeléshez vezetett.
3. Az Angeli só kezelés során nem képződik nitro tirozin, ami a peroxinitrit képződés hiányára utal.
4. Eredményeink alapján, bár az Angeli só indukálta sejthalálban szerepet játszik a DNS törés - PARP aktiváció – NAD^+ és ATP deplécio – onkózis útvonal, nem olyan domináns a hatása, mint más ROI-k, vagy RNI-k esetében.
5. Doxorubicin indukálta kardiomiopátiában kimutattuk a peroxinitrit és a PARP aktiváció szerepét a szívizomsejtek onkotikus sejtpusztulásában.
6. Doxorubicin indukálta kardiomiopátiában egy 34 kDa MMP aktivációját mutattunk ki.
7. A 34 kDa MMP aktiváció szabad gyök indukált, és feltételezhető, hogy a 34 kDa MMP aktivációja térszerkezetének megváltozásával áll összefüggésben.

IX. Irodalomjegyzék

Affar EB, Duriez PJ, Shah RG, Sallmann FR, Bourassa S, Kupper JH, Burkle A, Poirier GG (1998) Immunodot blot method for the detection of poly(ADP-ribose) synthesized in vitro and in vivo. *Anal Biochem* **259**(2):280-283.

Althaus FR, Hofferer L, Kleczkowska HE, Malanga M, Naegeli H, Panzeter PL, Realini CA (1994) Histone shuttling by poly-ADP-ribosylation. *Mol Cell Biochem* **138**:53-59.

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

Ame JC, Rolli V, Schreiber V, Niedergang C, Apiou F, Decker P, Muller S, Hoger T, Menissier-de Murcia J, de Murcia G (1999) PARP-2, A novel mammalian DNA damage-dependent poly(ADP-ribose) polymerase. *J Biol Chem*. **274**(25):17860-17868.

Andreadis AA, Hazen SL, Comhair SA, Erzurum SC (2003) Oxidative and nitrosative events in asthma. *Free Radic Biol Med*. **35**(3):213-225.

Andriollo M, Favier A, Guiraud P (2003) Adriamycin activates NF-kappaB in human lung carcinoma cells by IkappaBalpha degradation. *Arch Biochem Biophys*. **413**(1):75-82.

Ariumi Y, Masutani M, Copeland TD, 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.

Arnelle DR and Stamler JS (1995) NO⁺, NO, and NO⁻ donation by S-nitrosothiols: implications for regulation of physiological functions by S-nitrosylation and acceleration of disulfide formation. *Arch. Biochem. Biophys*. **318**:279-285.

Bai P, Mabley JG, Liaudet L, Virág L, Szabó C, Pacher P (2003) Matrix metalloproteinase activation is an early event in doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Oncol. Rep.* (in press).

Bahtia M, Kirkland JB, Meckling-Gill KA (1995) Modulation of poly(ADP-ribose) polymerase during neutrophilic and monocytic differentiation of promyelocytic (NB4) and myelocytic (HL-60) leukaemic cells. *Biochem J*. **308**:131-137.

Bakondi E, Bai P, Szabó E, Hunyadi J, Gergely P, Szabo C, Virag L (2002) 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.

Bakondi E, Gonczi M, Szabo E, Bai P, Pacher P, Gergely P, Kovacs L, Hunyadi J, Szabo C, Csernoch L, Virag L (2003a) Role of Intracellular Calcium Mobilization and Cell-

Density-Dependent Signaling in Oxidative-Stress-Induced Cytotoxicity in HaCaT Keratinocytes. *J Invest Dermatol.* **121(1)**:88-95.

Bakondi E, Bai P, Erdélyi K, Szabo E, Gergely P, Hunyadi J, Szabo C, Virag L (2003b) Cytoprotective effect of gallotannin in oxidatively stressed HaCaT keratinocytes: the role of poly(ADP-ribose) metabolism. *Experimental Dermatology* (in press)

Bartberger MD, Fukuto JM, Houk KN (2001) On the acidity and reactivity of HNO in aqueous solution and biological systems. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **98(5)**:2194-2198.

Bauer PI, Farkas G, Buday L, Mikala G, Meszaros G, Kun E, Farago A (1992) Inhibition of DNA binding by the phosphorylation of poly(ADP-ribose) polymerase protein catalysed by protein kinase C. *Biochem Biophys Res Commun* **187**:730-736.

Bauer PI, Farkas G, Mihalik R, Kopper L, Kun E, Farago A (1994) Phosphorylation of poly(ADP-ribose) polymerase protein in periharial lymphocytes stimulated with phytohemagglutinin. *Biochem Biophys Res Commun* **1223**:234-239.

Beckman JS and Koppenol WH (1996) Nitric oxide, superoxide and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* **271(5 Pt 1)**:C1424-1437.

Benchoua A, Couriaud C, Guegan C, Tartier L, Couvert P, Friocourt G, Chelly J, Menissier-de Murcia J, Onteniente B (2002) Active caspase-8 translocates into the nucleus of apoptotic cells to inactivate poly(ADP-ribose) polymerase-2. *J Biol Chem.* **277(37)**:34217-34222.

Benyo Z, Kiss G, Szabo C, Csaki C, Kovach AG (1991). Importance of basal nitric oxide synthesis in regulation of myocardial blood flow. *Cardiovasc Res.* **25(8)**:700-703.

Berger NA, Sims JL, Catino DM, Berger SJ (1983) Poly(ADP-ribose) polymerase mediates suicide response to massive DNA damage: studies in normal and DNA-repair defective cells. *Princess Takamatsu Symp.* **13**:219-226.

Berger SJ, Sudar DC, Berger NA (1986) Metabolic consequences of DNA damage: DNA damage induces alterations in glucose metabolism by activation of poly(ADP-ribose) polymerase. *Biochem Biophys Res Commun.* **134**:227-232.

Bergeron MJ, Leclerc S, Laniel MA, Poirier GG, Guerin SL (1997) Transcriptional regulation of the rat poly(ADP-ribose) polymerase gene by Sp1. *Eur J Biochem.* **250**:342-353.

Berlett BS, Levine RL, Stadtman ER (1998) Carbon dioxide stimulates peroxynitrite-mediated nitration of tyrosine residues and inhibits oxidation of methionine residues of glutamine synthetase: both modifications mimic effects of adenylation. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**:2784-2789.

- Blum RH Carter SK (1974) Adriamycin: a new anticancer drug with significant clinical activity. *Ann Intern Med* **180**:249–259.
- Bonofoco E, Kranic D, Ankarcrona M, Nicotera P, Liton SA (1995) Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, pectively, 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.
- Bowie A and O'Neill LA (2000) Oxidative stress and nuclear factor-kappaB activation: a reassessment of the evidence in the light of recent discoveries. *Biochem Pharmacol*. **59(1)**:13-23.
- Boulikas T (1990) Poly(ADP-ribosylated) histones in chromatin prelication. *J Biol Chem*. **265**:14638-14647.
- Brattsand R and Linden M (1996) Cytokine modulation by glucocorticoids: mechanisms and actions in cellular studies. *Aliment Pharmacol Ther*. **2**:81-90; discussion 91-92.
- Brochu G, Duchaine C, Thibeault L, Lagueux J, Shah GM, Poirier GG (1994) Mode of action of poly(ADP-ribose) glycohydrolase. *Biochim Biophys Acta*. **1219(2)**:342-350.
- Burkle A (2001) Physiology and pathophysiology of poly(ADP-ribosyl)ation. *Bioessays* **23**:795-806.
- Burney S, Caulfield JL, Niles JC, Wishnok JS, Tannenbaum SR (1999) The chemistry of DNA damage from nitric oxide and peroxynitrite. *Mutat Res*. **424(1-2)**:37-49.
- Butler AJ and Ordahl P (1999) Poly(ADP-Ribose) Polymerase Binds with Transcription Enhancer Factor 1 to MCAT1 Elements To Regulate Muscle-Specific Transcription. *Molecular and cellular biology* **19(1)**:296-306.
- Buyukafsar K, Nelli S, Martin W (2001) Formation of nitric oxide from nitroxyl anion: role of quinones and ferricytochrome c. *Br J Pharmacol*. **132(1)**:165-172.
- Cadet J, Berger M, Douki T, Morin B, Raoul S, Ravanat JL, Spinelli S. (1997) Effects of UV and visible radiation on DNA-final base damage. *Biol Chem*. **378(11)**:1275-1286.
- Chang WJ and Alvarez-Gonzalez R. (2001) The sequence-specific DNA binding of NF-kappa B is reversibly regulated by the automodification reaction of poly (ADP-ribose) polymerase. *J Biol Chem*. **276(50)**:47664-47670.
- Cervellera MN and Sala A (2000) Poly(ADP-ribose) polymerase is a B-MYB coactivator. *J Biol Chem*. **275**:10692-10696.

Chazotte-Aubert L, Oikawa S, Gilibert I, Bianchini F, Kawanishi S, Ohshima H (1999) Cytotoxicity and site-specific DNA damage induced by nitroxyl anion (NO(-)) in the presence of hydrogen peroxide. Implications for various pathophysiological conditions. *J. Biol. Chem.* **274**:20909–20915.

Cheung PY, Sawicki G, Wozniak M, Wang W, Radomski MW, Schulz R (2000) Matrix metalloproteinase-2 contributes to ischemia-reperfusion injury in the heart. *Circulation* **101**:1833–1839.

Cherney BW, Midura RJ, Caplan AI (1985) Poly(ADP-ribose) synthetase and chick limb mesenchymal cell differentiation. *Dev Biol.* **112**(1):115-125.

Chi NW and Lodish HF (2000) Tankyrase is a Golgi-associated mitogen-activated protein kinase substrate that interactss with IRAP in GLUT4 vesicles. *J Biol Chem.* **275**:38437-38444.

Cook NM, Shinyashiki M, Jackson MI, Leal FA, Fukuto JM (2003) Nitroxyl-mediated disruption of thiol proteins: inhibition of the yeast transcription factor Ace1. *Arch Biochem Biophys.* **410**(1):89-95.

Coppola S, Nosseri C, Maresca V, Ghibelli L (1995) Different basal NAD levels determine opposite effects of poly(ADP-ribose)polymerase inhibitors on H₂O₂-induced apoptosis. *Exp Cell Res.* **221**:462-469.

Crow JP and Beckman JS (1995) Reactions between nitric oxide, superoxide and peroxynitrite: footprints of peroxynitrite in vivo. *Adv Pharmacol* **34**:17-43.

Crow JP, Ischiropulos H (1996) Detection and quantitation of nitrotyrosine residues in proteins: in vivo marker of peroxynitrite. *Methods Enzymology* **269**:185-194.

Crowley CL, Payne CM, Bernstein H, Bernstein C, Roe D (2000) The NAD⁺ precursors, nicotinic acid and nicotinamide protect cells against apoptosis induced by multiple stress inducer, deoxycholate. *Cell Death Differ.* **7**:314-326.

D'Amours S, Sallmann FR, Dixit VM, Poirier GG (2001) Gain-of-function of poly(ADP-ribose) polymerase-1 upon cleavage by apoptotic proteases: implication for apoptosis. *J Cell Sci.* **114**:3771-3778.

Dantzer F, Nasheuer HP, Vonesch JL, de Murcia G, Ménissier-de Murcia J (1998) Functional association of poly(ADP-ribose) polymerase with DNA polymerase α -primase complex: a link between DNA strand break detection and DNA replication. *Nucleic Acids Research* **26**(8):1891–1898.

Dantzer F, de la Rubia G, Ménissier-de Murcia J, Hostomsky Z, de Murcia G, Scribeur V (2000) Base excision repair is impaired in mammalian cells lacking poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Biochemistry*. **39**:7559-7569.

Davidovoch L, Vodenchiarov M, Affar EB, Poirier GG (2001) Importance of poly(ADP-ribose) glycohydrolase in the control of poly(ADP-ribose) metabolism. *Exp Cell Res*. **268**(1):7-13.

Davies KJA and Doroshow JH (1986) Redox Cycling of Anthracyclines by Cardiac Mitochondria I. *J. Biol. Chem*. **261**:3060-3067.

Doroshow JH and Davies KJA (1986) Redox Cycling of Anthracyclines by Cardiac Mitochondria II. *J Biol Chem*. **261**:3068-3074.

Doucet-Chabeaud G, Godon C, Brutescio C, de Murcia G, Kazmaier M (2001) Ionising radiation induces the expression of PARP-1 and PARP-2 genes in Arabidopsis. *Mol Genet Genomics*. **265**(6):954-963.

Durkacz BW, Lunec J, Grindley H, Griffin S, Horner O, Simm A (1992) Murine melanoma cell differentiation and melanogenesis induced by poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Exp Cell Res*. **202**(2):287-291.

Ehrlich W, Huser H, Kroger H (1995) Inhibition of the induction of collagenase by Interleukin-1 beta in cultured rabbit synovial fibroblasts after treatment with the poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor 3-aminobenzamide. *Rheumatol Int* **15**:171-172.

Eiserich JP, Cross CE, Jones AD, Halliwell B, van der Vliet (1996) Formation of nitrating and chlorinating species by reaction of nitrite with hypochlorous acid. A novel mechanism for nitric oxide-mediated protein modification. *J Biol Chem*. **271**:19199-19208.

Eiserich JP, Hristova M, Cross CE et al (1998) Formation of nitric oxide-derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils. *Nature* **391**:393-397.

Eliasson MJ, Sampei K, Mandir AS, Hurn PD, Traystman RJ, Bao J, Piper A, Wang, ZQ, Dawson TM, Snyder SH, Dawson VL (1997) poly(ADP-ribose) polymerase gene disruption renders mice resistant to cerebral ischaemia. *Nat Med*. **3**:1089-1095.

Endres M, Scott G, Namura S, Salzman AL, Huang PL, Moskowitz MA, Szabó C (1998) Role of peroxynitrite and neuronal nitric oxide synthase in the activation of poly(ADP-ribose) synthase in a murine model of cerebral ischaemia-reperfusion. *Neurosci Lett*. **248**:41-44.

Espey MG, Miranda KM, Thomas DD, Wink DA (2002) Ingress and reactive chemistry of nitroxyl-derived species within human cells. *Free Radic Biol Med*. **33**(6):827-834.

Exley R, Gordon J, Clemens MJ (1987) Induction of B-cell differentiation antigens in interferon- or phorbol ester-treated Daudi cells is impaired by inhibitors of ADP-ribosyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **84(18)**:6467-6470.

Faro R, Toyoda Y, McCully J, Jagtap P, Szabó E, VirágL, Bianchi C, Levitsky S, Szabó C (2002) Protective effect on regional myocardial function and infarct size induced by PJ34: a novel poly(ADP-ribose) synthase inhibitor. *Ann Thorac Surg*. **73**:575-581.

Fiorillo C, Pace S, Poziani V, Nediani C, Perna AM, Liguori P, Checci C, Nassi N, Donzelli GP, Formigli L, Nassi P (2002) Poly(ADP-ribose) polymerase activation and cell injury in course of rat heterotopic transplantation. *Free Radic Res*. **36**:79-87.

Francis GE, Gray DA, Berney JJ, Wing MA, Guimaraes JE, Hoffbrand AV (1983) Role of ADP-ribosyl transferase in differentiation of human granulocyte-macrophage progenitors to the macrophage lineage. *Blood*. **62(5)**:1055-1062.

Gagne JP, Shah RG, Poirier GG (2001) Analysis of ADP-ribose polymer sizes in intact cells. *Mol Cell Biochem*. **224(1-2)**:183-185.

Germain M, Affar EB, D'Amours D, Dixit VM, Salvesen GS, Poirier GG (1999) Cleavage of automodified poly(ADP-ribose) polymerase during apoptosis. Evidence for involvement of caspase-7. *J Biol Chem*. **274**:28379-28384.

Griffiths HR, Mistry P, Herbert KE, Lunec J (1998) Molecular and cellular effects of ultraviolet light-induced genotoxicity. *Crit Rev Clin Lab Sci*. **35(3)**:189-237.

Go YM, Patel RP, Maland MC, Park H, Beckman JS, Darley-Usmar VM, Jo H (1999) Evidence for peroxynitrite as a signaling molecule in flow-dependent activation of c-Jun NH(2)-terminal kinase. *Am J Physiol*. **277(4 Pt 2)**:H1647-H1653.

Goldfarb RH, Marton A, Szabó É, Virág L, Glock D, McCarthy R, Parillo JE, Szabó C (2002) Protective effect of a novel, potent inhibitor of poly(ADP-ribose) synthase in a porcine model of severe bacterial sepsis. *Crit Care Med*. **30**:974-980.

Goldhaber JJ (1996) Free radicals enhance Na⁺/Ca²⁺ exchange in ventricular myocytes. *Am J Physiol*. **271(3 Pt 2)**:H823-833.

Goldhaber JJ, Weiss JN (1992) Oxygen free radicals and cardiac reperfusion abnormalities. *Hypertension*. **20(1)**:118-127.

Gow AJ and Stamler JS (1998) Reactions between nitric oxide and hemoglobin under physiological conditions. *Nature* **391**:169-173.

Gradwohl G, Mazen A, de Murcia G (1987) Poly(ADP-ribose) polymerase forms loops with DNA. *Biochem Biophys Res Commun.* **148(3)**:913-919.

Grant GA, Goldberg GI, Wilhelm SM, He C, Eisen AZ (1992) Activation of extracellular matrix metalloproteases by proteases and organomercurials. *Matrix Suppl.* **1**:217-223.

Growes JT (1999) Peroxynitrite: reactive, invasive and enigmatic. *Curr Opin Chem Biol* **3**:226-235.

Guittet O, Ducastel B, Salem JS, Henry Y, Rubin H, Lemaire G, Lepoivre M (1998) Differential sensitivity of the tyrosyl radical of mouse ribonucleotide reductase to nitric oxide and peroxynitrite. *J Biol Chem.* **273(34)**:22136-22144.

Gunther MR, Hsi LC, Curtis JF, Gierse JK, Marnett LJ, Eling TE, Mason RP (1997) Nitric oxide trapping of the tyrosyl radical of prostaglandin H synthase-2 leads to tyrosine iminoxyl radical and nitrotyrosine formation. *J Biol Chem.* **272(27)**:17086-17090.

Ha HC and Snyder SH (1999) Poly(ADP-ribose) polymerase is a mediator of necrotic cell death by ATP depletion. *Proc Natl Acad Sci USA.* **96**:13978-13982.

Ha HC, Hester LD, Snyder SH. (2002) Poly(ADP-ribose) polymerase-1 dependence of stress-induced transcription factors and associated gene expression in glia. *Proc Natl Acad Sci USA.* **99(5)**:3270-3275.

Hassa PO, Covic M, Hasan S, Imhof R, Hottiger MO (2001) The enzymatic and DNA binding activity of PARP-1 are not required for NF-kappa B coactivator function. *J Biol Chem* **276(49)**:45588-45597.

Hautschildt S, Scheipers P, Bessler WG (1991) Inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase suppress lipopolysaccharide-induced nitrite formation in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun.* **179**:865-871.

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

Hobbs AJ, Fukuto JM, Ignarro LJ (1994) Formation of free nitric oxide from L-arginine by nitric oxide synthase: direct enhancement of generation by superoxide dismutase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:10992-10996.

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

Irvine JC, Favaloro JL, Kemp-Harper BK. (2003) NO- activates soluble guanylate cyclase and Kv channels to vasodilate resistance arteries. *Hypertension* **41**(6):1301-1307.

Ischiropoulos H, Zhu L, Chen J, Tsai M, Martin JC, Smith CD, Beckman JS (1992) Peroxynitrite-mediated tyrosine nitration catalyzed by superoxide dismutase. *Arch Biochem Biophys* **298**:431-437.

Jagtap P, Soriano FG, Virág L, Liaudet L, Mabley J, Szabó É, Hasko G, Marton A, Lorigados CB, Gallyas F, Sumegi B, Huang H, Hoyt DG, Southan GJ, Szabó C (2002) Novel phenatridinone inhibitors of poly(ADP-ribose) synthase: potent cytoprotective and anti-shock agents. *Crit Care Med.* **30**:1071-1082.

Johansson M. (1999) A human poly(ADP-ribose) polymerase gene family (ADPRTL): cDNA cloning of two novel poly(ADP-ribose) polymerase homologues. *Genomics.* **57**(3):442-445.

Jonsson GG, Menard L, Jacobson EL, Poirier GG, Jacobson MK (1988) Effect of hyperthermia on poly(adenosine diphosphate-ribose) glycohydrolase. *Cancer Res.* **48**:4240-4243.

Kalidman LK, Mukherjee SK, Hutchin TP, Adams JD (1996) Nicotinamide as a precursor for NAD⁺ prevents apoptosis in the mouse brain induced by tertiary-buthylhydroperoxide. *Neurosci Lett.* **206**:5-8.

Kaminker PG, Kim SH, Taylor RD, Zebajadin Y, Funk WD, Morin GB, Yaswen P, Campisi J (2001) TANK2, a new TRF-1 associated poly(ADP-ribose) polymerase, causes rapid induction of cell death upon overexpression. *J Biol Chem.* **276**:35891-35899.

Kanai M, Uchida M, Hanai S, Uematsu N, Uchida K, Miwa M (2000) Poly(ADP-ribose) polymerase localizes to the centrosomes and chromosomes. *Biochem Biophys Res Commun.* **278**(2):385-389.

Kannan P, Yu Y, Wankhade S, Tainsky MA (1999) Poly(ADP-ribose) polymerase is a coactivator for AP-2-mediated transcriptional activation. *Nucleic Acid Research* **27**(3):866-874.

Kawaichi M, Ueda K, Hayashi O (1981) Multiple auto poly(ADP-ribosylation) of rat liver poly(ADP-ribose) synthase. Mode of modification and properties of automodified synthase. *J Biol Chem.* **256**:9483-9489.

Kickhoefer VA, Siva AC, Kedersha NL, Inman EM, Ruland C, Streuli M, Rome LH (1999) The 193-kD vault protein, vPARP, is a novel poly(ADP-ribose) polymerase. *J Cell Biol.* **146**(5):917-928.

Kim WK, Choi YB, Rayudu PV, Das P, Asaad W, Arnelle DR, Stamler JS, Lipton SA (1999) Attenuation of NMDA receptor activity and neurotoxicity by nitroxyl anion, NO⁻. *Neuron*. **24**(2):461-469.

Kim JW, Kim K, Kang K, Joe CO (2000a) Inhibition of homodimerization of poly(ADP-ribose) polymerase by its C-terminal cleavage products produced during apoptosis. *J Biol Chem*. **275**:8121-8125.

Kim JW, Won J, Sohn S, Joe CO (2000b) DNA-binding activity of the N-terminal cleavage product of poly(ADP-ribose) polymerase is required for UV mediated apoptosis. *J Cell Sci*. **113**:955-961.

Kirsch M and de Groot H (2002) Formation of peroxynitrite from reaction of nitroxyl anion with molecular oxygen. *J Biol Chem*. **277**(16):13379-13388.

Klotz LO, Schieke SM, Sies H, Holbrook NJ (2000) Peroxynitrite activates the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway in human skin primary fibroblasts. *Biochem J*. **352 Pt 1**:219-225.

Knowles RG and Moncada S (1994) Nitric oxide synthases in mammals. *Biochemical Journal* **298**:249-258.

Koyama H, Iwata H, Kuwabara Y, Iwase H, Kobayashi S, Fujii Y (2000) Gelatinolytic activity of matrix metalloproteinase-2 and -9 in oesophageal carcinoma; a study using in situ zymography. *Eur J Cancer* **36**(16):2164-2170.

Kuhn DM, Aretha CW, Geddes TJ (1999) Peroxynitrite inactivation of tyrosine hydroxylase: mediation by sulfhydryl oxidation, not tyrosine nitration. *J Neurosci*. **19**:10289-10294.

Kuhn DM and Geddes TJ (1999) Peroxynitrite inactivates tryptophan hydroxylase via sulfhydryl oxidation. Coincident nitration of enzyme tyrosyl residues has minimal impact on catalytic activity. *J Biol Chem* **274**:29726-29732.

Kumari SR, Mendoza-Alvarez H, Alvarez-Gonzales (1998) Functional interactions of p53 with poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) during apoptosis following DNA damage: covalent poly(ADP-ribosylation) of p53 by exogenous PARP and noncovalent binding of p53 to the M_r 85,000 proteolytic fragment. *Cancer Res*. **58**:5075-5078.

Lavon I, Pikarsky E, Gutkovich E, Goldberg I, Bar J, Oren M, Ben-Neriah Y (2003) Nuclear factor-kappaB protects the liver against genotoxic stress and functions independently of p53. *Cancer Res*. **63**(1):25-30.

Lavrik OI, Prasad R, Sobol RW, Horton JK, Ackerman EJ, Wilson SH (2001) Photoaffinity labeling of mouse fibroblast enzymes by a base excision repair

intermediate. Evidence for the role of poly(ADP-ribose) polymerase-1 in DNA repair. *J Biol Chem.* **276(27)**:25541–25548.

Leist M, Single B, Kunstle G, Volbracht C, Hentze H, Nicotera P (1997a) Apoptosis in the absence of poly(ADP-ribose) polymerase. *Biochem Biophys Res Commun.* **233**:518-522.

Leist M, Single B, Castoldi AF, Kuhnle S, Nicotera P (1997b) Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J Exp Med.* **185**:1481-1486.

Leist M, Single B, Naumann H, Fava E, Simon B, Kuhnle S, Nicotera (1999) Inhibition of mitochondrial ATP generation by nitric oxide switches apoptosis to necrosis. *Exp Cell Res.* **249**:396-403.

Lelli JJJ, Becks LL, Dabrowska MI, Hinshaw DB (1998) ATP converts necrosis to apoptosis in oxidant-injured endothelial cells. *Free Radic Biol Med* **25**:694-702.

Li T and Singal PK (2000) Adriamycin-Induced Early Changes in Myocardial Antioxidant Enzymes and Their Modulation by Probucol. *Circulation.* **102**:2105-2110.

Liaudet L, Soriano FG, Szabo E, Virag L, Mabley JG, Salzman AL, Szabo C (2000a) Protection against hemorrhagic shock in mice genetically deficient in poly(ADP-ribose)polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA.* **97(18)**:10203-10208.

Liaudet L, Szabo A, Soriano FG, Zingarelli B, Szabo C, Salzman AL (2000b) Poly (ADP-ribose) synthetase mediates intestinal mucosal barrier dysfunction after mesenteric ischemia. *Shock.* **14(2)**:134-141.

Liaudet L, Pacher P, Mabley JG, Virag L, Soriano FG, Hasko G, Szabo C (2002) Activation of poly(ADP-Ribose) polymerase-1 is a central mechanism of lipopolysaccharide-induced acute lung inflammation. *Am J Respir Crit Care Med.* **165(3)**:372-377.

Lindahl T, Satoh MS, Poirier GG, Klungland A (1995) Post-translational modification of poly(ADP-ribose) polymerase induced by DNS strand breaks. *TIBS* **20**:405-411.

Liochev SI and Fridovich I (2002) Nitroxyl (NO⁻): a substrate for superoxide dismutase. *Arch Biochem Biophys.* **402(2)**:166-171.

Liu L, Stamler JS (1999) NO: an inhibitor of cell death. *Cell Death Differ.* **6(10)**:937-942.

Lowenstein CJ, Dinerman JL, Snyder SH (1994) Nitric oxide: a physiologic messenger. *Ann Intern Med.* **120(3)**:227-237.

Lyons RJ, Deane R, Lynch DK, Ye ZS, Sanderson GM, Eyre HJ, Sutherland GR, Daly RJ (2001) Identification of a novel human tankyrase through its interaction with the adaptor protein Grb14. *J Biol Chem.* **276**:17172-17180.

Ma Q, Baldwin KT, Renzelli AJ, McDaniel A, Dong L. (2001) TCDD-inducible poly(ADP-ribose) polymerase: a novel response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Biochem Biophys Res Commun.* **289**(2):499-506.

Ma XL, Gao F, Liu GL, Lopez BL, Christopher TA, Fukuto JM, Wink DA, Feelisch M. (1999) Opposite effects of nitric oxide and nitroxyl on postischemic myocardial injury. *Proc Natl Acad Sci USA.* **96**(25):14617-14622.

Mabley JG, Liaudet L, Pacher P, Southan GJ, Salzman AL, Szabo C (2002) Part II: Beneficial Effects of the Peroxynitrite Decomposition Catalyst FP15 in Murine Models of Arthritis and Colitis. *Mol Med.* **8**(10):581-590.

MacMillan-Crow LA, Crow JP, Thompson JA (1998) Peroxynitrite-mediated inactivation of manganese superoxide dismutase involves nitration and oxidation of critical tyrosine residues. *Biochemistry* **37**:1613-1622.

Mallozzi C, di Stasi AM, Minetti M (1999) Activation of src tyrosine kinases by peroxynitrite. *FEBS Lett.* **456**:201-206.

Mann DL and Spinale FG (1998) Activation of matrix metalloproteinases in the failing human heart: breaking the tie that binds. *Circulation* **98**:1699–1702.

Mannick JB, Maxiao XQ, Stamler JS (1997) Nitric oxide inhibits Fas-induced apoptosis. *J Biol Chem.* **272**(39):24125-24128.

Mannick JB, Hausladen A, Liu L, Hess DT, Zeng M, Miao QX, Kane LS, Gow AJ, Stamler JS (1999) Fas-induced caspase denitrosylation. *Science* **284**(5414):651-654.

Masson M, Niedergang C, Schreiber V, Muller S, Ménissier-de Murcia J, De Murcia G (1998) XRCC1 is specifically associated with poly(ADP-ribose) polymerase and negatively regulates its activity following DNA damage. *Molecular and cellular biology* **18**(6):3563–3571.

Masutani M, Nozaki T, Nishiyama E, Shimokawa T, Tachi Y, Suzuki H, Nakagama H, Wakabayashi K, Sugimura T (1999) Function of poly(ADP-ribose) polymerase in response to DNA damage: gene-disruption study in mice. *Mol Cell Biochem.* **193**:149–152.

Masutani M, Nozaki T, Watanabe M, Ochiya T, Hasegawa F, Nakagama H, Suzuki H, Sugimura T (2001) Involvement of poly(ADP-ribose) polymerase in trophoblastic cell differentiation during tumorigenesis. *Mutat Res.* **477(1-2)**:111-117.

di Meglio S, Denegri M, Vallefucio S, Tramontano F, Scovassi AI, Quesada P. (2003) Poly(ADPR) polymerase-1 and poly(ADPR) glycohydrolase level and distribution in differentiating rat germinal cells. *Mol Cell Biochem.* **248(1-2)**:85-91.

Ménissier-de Murcia J, Ricoul M, Tartier L, Niedergang C, Huber A, Dantzer F, Schreiber V, Ame JC, Dierich A, LeMeur M, Sabatier L, Chambon P, de Murcia G (2003) Functional interaction between PARP-1 and PARP-2 in chromosome stability and embryonic development in mouse. *EMBO J.* **22(9)**:2255-2263.

Ménissier-de Murcia J, Niedergang C, Trucco C, Ricoul M, Dutrillaux B, Mark M, Oliver FJ, 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.

Miranda KM, Espey MG, Yamada K, Krishna M, Ludwick N, Kim S, Jourdeheuil D, Grisham MB, Feelisch M, Fukuto JM, Wink DA (2001) Unique oxidative mechanisms for the reactive nitrogen oxide species, nitroxyl anion. *J Biol Chem.* **276(3)**:1720-1727.

Miranda KM, Nims RW, Thomas DD, Espey MG, Citrin D, Bartberger MD, Paolocci N, Fukuto JM, Feelisch M, Wink DA (2003) Comparison of the reactivity of nitric oxide and nitroxyl with heme proteins. A chemical discussion of the differential biological effects of these redox related products of NOS. *J Inorg Biochem.* **93(1-2)**:52-60.

Miranda KM, Espey MG, Yamada K, Krishna M, Ludwick N, Kim S, Jourdeheuil D, Grisham MB, Feelisch M, Fukuto JM, Wink DA (2001) Unique oxidative mechanisms for the reactive nitrogen oxide species, nitroxyl anion. *J Biol Chem.* **276(3)**:1720-1727.

Moncada S, Palmer RM, Higgs EA (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev.* **43(2)**:109-142.

Morioka K, Tanaka K, Nokuo T, Ishizawa M, Ono T (1979) Erythroid differentiation and poly(ADP-ribose) synthesis in Friend leukemia cells. *Gann.* **70(1)**:37-46.

Mostafa AM, Nagi MN, Al Rikabi AC, Al-Shabanah OA, El-Kashef HA (1990) Protective effect of aminoguanidine against cardiovascular toxicity of chronic doxorubicin treatment in rats. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol.* **106(3)**:193-202.

de Murcia G and Ménissier-de Murcia J (1994) Poly(ADP-ribose) polymerase: a molecular nick sensor. *TIBS* **19**:172-176.

de Murcia G, Sreber V, Moliente M, Saulier B, Poch O, Masson M, Niedergang C, Ménissier-de Murcia J (1994) Structure and function of poly(ADP-ribose) polymerase. *Mol Cell Biochem.* **138**:15-24.

de Murcia G, Huletsky A, Lamarre D, Gaudreau A, Pouyet J, Daune M, Poirier GG (1986) Modulation of chromatin superstructure induced by poly(ADP-ribose) synthesis and degradation. *J Biol Chem.* **261**(15):7011-7017.

Nagale A (1995) Poly(ADP-ribosyl)ation as a fail-safe, transcription-independent, suicide mechanism in acutely DNA-damaged cells: a hypothesis. *Radiat Environ Biophys* **34**:251-254.

Nagase H, Woessner Jr. JF (1999) Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem.* **274**:21491–21494.

Nathan C (1992) Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB Journal* **6**:3051-3064.

Naughton P, Foresti R, Bains SK, Hoque M, Green CJ, Motterlini R (2002) Induction of heme oxygenase 1 by nitrosative stress. A role for nitroxyl anion. *J Biol Chem.* **277**(43):40666-40674.

Nelli S, Hillen M, Buyukafsar K, Martin W (2000) Oxidation of nitroxyl anion to nitric oxide by copper ions. *Br J Pharmacol.* **131**(2):356-362.

Nicotera P, Lesit M, Ferrando-May E (1999) Apoptosis and necrosis: different execution of the same death. *Biochem Soc Symp.* **66**:69-73.

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.

Nicotera P, Bellomo G, Orrenius S (1992) Calcium-mediated mechanisms in chemically induced cell death. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **32**:449-470.

Nie J, Sakamoto S, Song D, Qu Z, Ota K, Taniguchi T (1998) Interaction of Oct-1 and automodification domain of poly(ADP-ribose) synthetase. *FEBS Lett.* **424**(1-2):27-32.

Nishio A, Nakanishi S, Doull J, Uyeki EM (1983) Enhanced chondrocytic differentiation in chick limb bud cell cultures by inhibitors of poly(ADP-ribose) synthetase. *Biochem Biophys Res Commun.* **111**(2):750-759.

Oei SL, Griesenbeck J, Schweiger M, Babich V, Kropotov A, Tomilin N. (1997) Interaction of the transcription factor YY1 with human poly(ADP-ribosyl) transferase. *Biochem Biophys Res Commun.* **240**(1):108-111.

Oei SL and Ziegler M (2000) ATP for DNA ligation step in base excision repair is generated from poly(ADP-ribose). *J Biol Chem.* **275(30)**:23234-23239.

Ohshima H, Gilibert I, Bianchini F (1999) Induction of DNA strand breakage and base oxidation by nitroxyl anion through hydroxyl radical production. *Free Radic Biol Med.* **26(9-10)**:1305-1313.

Ohshima H, Yoshie Y, Auriol S, Gilibert I (1998) Antioxidant and pro-oxidant actions of flavonoids: effects on DNA damage induced by nitric oxide, peroxynitrite, and nitroxyl anion. *Free Radic. Biol. Med.* **25**:1057–1065.

Oka J, Ueda K, Hayaishi O, Komura H, Nakanishi K (1984) ADP-ribosyl protein lyase. Purification, properties and identification of the product. *J Biol Chem.* **259**:986-995.

Okamoto T, Akaike T, Sawa T, Miyamoto Y, van der Vliet A, Maeda H (2001) Activation of matrix metalloproteinases by peroxynitrite-induced protein S-glutathiolation via disulfide S-oxide formation. *J Biol Chem.* **276**:29596–29602.

Oliver FJ, de Murcia MJ, Nacci C, Decker P, Andriantsitohaina R, Muller S, de La Rubia G, Stoclet JC, de Murcia G (1999) Resistance to endotoxic shock as a consequence of defective NF-kappaB activation in poly(ADP-ribose) polymerase-1 deficient mice. *EMBO J.* **18**:4446-4454.

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(5)**:1006-1016.

Pagliaro P, Mancardi D, Rastaldo R, Penna C, Gattullo D, Miranda KM, Feelisch M, Wink DA, Kass DA, Paolocci N (2003) Nitroxyl affords thiol-sensitive myocardial protective effects akin to early preconditioning. *Free Radic Biol Med.* **34(1)**:33-43.

Palomba L, Sestili P, Guidarelli A, Sciorati C, Clementi E, Fiorani M, Cantoni O (2000) Products of the phospholipase A(2) pathway mediate the dihydorhodamine fluorescence response evoked by endogenous and exogenous peroxynitrite in PC12 cells. *Free Radic Biol Med.* **29(8)**:783-789.

Paolocci N, Katori T, Champion HC, St John ME, Miranda KM, Fukuto JM, Wink DA, Kass DA (2003) Positive inotropic and lusitropic effects of HNO/NO⁻ in failing hearts: independence from beta-adrenergic signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* **100(9)**:5537-5555.

Park SD, Kim CG, Kim MG (1983) Inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase enhance DNA strand breaks, excision repair, and sister chromatid exchanges induced by alkylating agents. *Environ Mutagen.* **5(4)**:515-525.

Pellat-Deceunynck C, Wietyerbin J, Drapier JC (1994) Nicotinamide inhibits nitric oxide synthase mRNA induction in activated macrophages. *Biochem J.* **297**:53-58.

Perrin D and Koppenol, WH (2000) The quantitative oxidation of methionine to methionine sulfoxide by peroxynitrite. *Arch Biochem Biophys* **377**:266-272.

Quesada P, Atorino L, Cardone A, Ciarcia G, Farina B. (1996) Poly(ADP-ribose)ylation system in rat germinal cells at different stages of differentiation. *Exp Cell Res.* **226**(1):183-190.

Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA (1991) Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J Biol Chem.* **266**:4244-4250.

Richardson DS, Allen PD, Kelsey SM, Newland AC (1999) Effects of PARP inhibition on drug Fas-induced apoptosis in leukaemic cells. *Adv Exp Med Biol.* **457**:267-279.

le Rhun Y, Kirkland JB, Shah GM (1998) Cellular responses to DNA damage in the absence of Poly(ADP-ribose) polymerase. *Biochem Biophys Res Commun.* **245**(1):1-10.

Ruf A, de Murcia G, Schulz GE (1998) Inhibitor and NAD⁺ binding to poly(ADP-ribose) polymerase as derived from crystal structures and homology modeling. *Biochemistry.* **37**(11):3893-3900.

Rusche KM, Spiering MM, Marletta MA (1998) Reactions catalyzed by tetrahydrobiopterin-free nitric oxide synthase. *Biochemistry* **37**:15503–15512.

Sallmann FR, Vodenicharov MD, Wang ZQ, Poirier GG (2000) Characterization of sPARP-1. An alternative product of PARP-1 gene with poly(ADP-ribose) polymerase activity independent of DNA strand breaks. *J Biol Chem.* **275**(20):15504-15511.

Sampson JB, Ye Y, Rosen H, Beckman JS (1998) Myeloperoxidase and horseradish peroxidase catalyze tyrosine nitration in proteins from nitrite and hydrogen peroxide. *Arch Biochem Biophys.* **356**:207-213.

Sastry SS and Kun E (1990) The interaction of adenosine diphosphoribosyl transferase (ADPRT) with a cruciform DNA. *Biochem Biophys Res Commun.* **167**(2):842-847.

Saxena A, Saffery R, Wong LH, Kalitsis P, Choo KH (2002) Centromere proteins Cenpa, Cenpb, and Bub3 interact with poly(ADP-ribose) polymerase-1 protein and are poly(ADP-ribosyl)ated. *J Biol Chem.* **277**(30):26921-26926.

Schieke SM, Briviba K, Klotz LO, Sies H (1999) Activation pattern of mitogen-activated protein kinases elicited by peroxynitrite:attenuation by selenite supplementation. *FEBS Lett.* **448**:301-303.

Schmidt HH, Hofmann H, Schindler U, Shutenko ZS, Cunningham DD, Feelisch M (1996) No •NO from NO synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**:14492–14497.

Schreiber V, Ame JC, Dolle P, Schultz I, Rinaldi B, Fraulob V, Menissier-de Murcia J, de Murcia G (2002) Poly(ADP-ribose) polymerase-2 (PARP-2) is required for efficient base excision DNA repair in association with PARP-1 and XRCC1. *J Biol Chem.* **277**(25):23028-23036.

Schreiber V, Hunting D, Trucco C, Gowans B, Grunwald D, de Murcia G, Ménissier-de Murcia J (1995) A dominant-negative mutant of human poly(ADP-ribose) polymerase affects cell recovery, apoptosis and sister chromatid exchange following DNA damage. *Proc Natl Acad Sci USA.* **92**:4753-4757.

Sharp C, Warren A, Oshima T, Williams L, Li JH, Alexander JS (2001) Poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors prevent the upregulation of ICAM-1 and E-selectin in response to Th1 cytokine stimulation. *Inflammation.* **25**:157-163.

Sharpe MA, Cooper CE (1998) Reactions of nitric oxide with mitochondrial cytochrome c: a novel mechanism for the formation of nitroxyl anion and peroxynitrite. *Biochem. J.* **332**:9–19.

Shieh WM, Ame JC, Wilson, MV, Wang ZQ, Koh DW, Jacobson MK, Jacobson EL (1998) Poly (ADP-ribose) polymerase null mouse cells can synthesize ADP-ribose polymers. *J Biol Chem.* **273**:30069-30072.

Shoeman DW, Shirota FN, DeMaster EG, Nagasawa HT (2000) Reaction of nitroxyl, an aldehyde dehydrogenase inhibitor, with N-acetyl-L-cysteine. *Alcohol.* **20**(1):55-59.

Simbulan-Rosenthal CM, Rosenthal DS, Hilz Z, Hickey R, Malkas L, Applegern N, Wu Y, Bers G, Smulson ME (1996) The expression of poly(ADP-ribose) polymerase during differentiation-linked DNA replication reveals that it is a component of the multiprotein DNA replication complex. *Biochemistry.* **35**:11622-11633.

Simbulan-Rosenthal CM, Ly DH, Rosenthal DS, Konopka G, Luo R, Wang ZQ, Schultz PG, Smulson ME (2000) misregulation of gene expression in primary fibroblasts lacking poly(ADP-ribose) polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA.* **97**:11274-11279.

Singal PK, Deally CM, Weinberg LE (1987) Subcellular effects of adriamycin in the heart: a concise review. *J Mol Cell Cardiol* **19**:817–828.

Singal PK and Iliskovic N (1998) Doxorubicin-induced cardiomyopathy. *N Engl J Med* **339**:900–905.

Siveski-Iliskovic N, Hill M, Chow DA, Singal PK (1995) Probucol Protects Against Adriamycin Cardiomyopathy Without Interfering With Its Antitumor Effect. *Circulation*. **91**:10-15.

Siwik DA, Chang DL, Colucci WS (2000) Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha decrease collagen synthesis and increase matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts in vitro. *Circ Res*. **86**(12):1259-1265.

Smith PJ and Bell SM (1990). A DNA topoisomerase II-independent route for novobiocin-mediated resistance to DNA binding agents. *Cancer Chemother Pharmacol*. **26**(4):257-262.

Smith S and de Lange T (2000) Tankyrase promotes telomere elongation in human cells. *Curr Biol* **10**:1299-1302.

Smith GCM and Jackson SP (1999) The DNA-dependent protein kinase. *Genes Dev*. **13**: 916–934.

Smith S, Giriat I, Scmitt A, de Lange T (1998) Tankyrase, a poly(ADP-ribose) polymerase at human telomeres. *Science* **282**:1484-1487.

Soldatenkov VA and Smulson M (2000) Poly(ADP-ribose) Polymerase in DNA Damage-Response Pathway: Implications for Radiation Oncology. *Int. J. Cancer (Radiat. Oncol. Invest)* **90**:59–67.

Soriano GF, Virag L, Jagtap P, Szabo E, Mabley JG, Liaudet L, Marton A, Hoyt DG, Murthy KG, Salzman AL, Southan GJ, Szabo C (2001a) Diabetic endothelial dysfunction: the role of poly(ADP-ribose) polymerase activation. *Nature Medicine* **7**(1):108-113.

Soriano FG, Pacher P, Mabley J, Liaudet L, Szabo C (2001b) Rapid reversal of the diabetic endothelial dysfunction by pharmacological inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase. *Circ Res*. **89**(8):684-691.

Soriano FG, Liaudet L, Szabo E, Virag L, Mabley JG, Pacher P, Szabo C (2002) Resistance to acute septic peritonitis in poly(ADP-ribose) polymerase-1-deficient mice. *Shock*. **17**(4):286-292.

Spinale FG (2002) Matrix metalloproteinases: regulation and dysregulation in the failing heart. *Circ Res* **90**:520–530.

Springman EB, Angleton EL, Birkedal-Hansen H, van Wart HE (1990) Multiple modes of activation of latent human fibroblast collagenase: evidence for the role of a Cys73 active-site zinc complex in latency and a "cysteine switch" mechanism for activation. *Proc Natl Acad Sci USA*. **87**(1):364-8.

Stepien K, Zajdel A, Wilczok A et al (2000) Dopamine-melanin protects against tyrosine nitration, tryptophan oxidation and Ca^{2+} -ATPase inactivation induced by peroxynitrite. *Biochim Biophys Acta* **1532**:189-195.

Sugiura M, Fram R, Munroe D, Kufe D (1984) DNA strand scission and ADP-ribosyltransferase activity during murine erythroleukemia cell differentiation. *Dev Biol.* **104**(2):484-488.

Szabó C (1998) Potential role of the peroxynitrite-poly(ADP-ribose) synthase pathway in a rat model of haemorrhagic shock. *Shock* **9**:341-344.

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

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

Szabó C (ed) (2000) Cell death: the role of PARP. CRC Press, Boca Raton, FL.

Szabo C, Mabley JG, Moeller SM, Shímanovich R, Pacher P, Virag L, Soriano FG, Van Duzer JH, Williams W, Salzman AL, Groves JT (2002) Part I: Pathogenetic Role of Peroxynitrite in the Development of Diabetes and Diabetic Vascular Complications: Studies With FP15, A Novel Potent Peroxynitrite Decomposition Catalyst. *Mol Med.* **8**(10):571-580.

Takahira R, Yonemura K, Fujise Y, Hishida A (2001) Dexamethasone attenuates neutrophil infiltration in the rat kidney in ischemia/reperfusion injury: the possible role of nitroxyl. *Free Radic Biol Med.* **31**(6):809-815.

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, Yagi T, Johnson GS (1985) Endogenous ADP ribosylation of high mobility group proteins 1 and 2 and histone H1 following in intact cells. *Arch Biochem Biophys* **237**:38-42.

Tentori L, Turriziani M, Franco D, Serafino A, Levati L, Roy R, Bonmassar E, Graziani G (1999) Treatment with temozolomide and poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors induces early apoptosis and increases base excision repair gene transcripts in leukaemic cells resistant to triazene compounds. *Leukemia* **13**:901-909.

Terada M, Fujiki H, Marks PA, Sugimura T (1979) Induction of erythroid differentiation of murine erythroleukemia cells by nicotinamide and related compounds. *Proc Natl Acad Sci USA*. **76**(12):6411-6414.

Tewari M, Quan LT, O'Rourke K, Desnoyers S, Zeng Z, Beidler DR, Poirier GG, Salvesen GS, Dixit VM (1995) Yama/CPP32 beta, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase. *Cell* **81**:801-809.

Thomas CV, Coker ML, Zellner JL, Handy JR, Crumbley AJ 3rd, Spinale FG (1998) Increased matrix metalloproteinase activity and selective upregulation in LV myocardium from patients with end-stage dilated cardiomyopathy. *Circulation* **97**:1708-1715.

Tien M, Berlett BS, Levine RL, Chock PB, Stadtman ER (1999) Peroxynitrite-mediated modification of proteins at physiological carbon dioxide concentration: pH dependence of carbonyl formation, tyrosine nitration and methionine oxidation. *Proc Natl Acad Sci USA*. **96**:7809-7814.

Tramonato F, Malanga M, Farina B, Jones R, Quesada P (2000) Heat stress reduces poly(ADPR) polymerase expression in rat testis. *Mol Hum Reprod*. **6**:575-581.

Vaananen AJ, Moed M, Tuominen RK, Helkamaa TH, Wiksten M, Liesi P, Chiueh CC, Rauhala P (2003) Angeli's salt induces neurotoxicity in dopaminergic neurons in vivo and in vitro. *Free Radic Res*. **37**(4):381-389.

Villaponteau B, Pribil TM, Grant MH, Martinson HG (1986) Novobiocin induces the in vivo cleavage of active gene sequences in intact cells. *J Biol Chem* **261**:10359-10365.

Viner RI, Williams TD, Schoneich C (1999) Peroxynitrite modification of protein thiols: oxidation, nitrosylation, and S-glutathiolation of functionally important cysteine residue(s) in sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase. *Biochemistry* **38**:12408-12415.

Virag L, Scott G S, Cuzzocrea S, Marmer D, Salzman A L, Szabo C (1998a) Peroxynitrite-induced thymocyte apoptosis: the role of caspases and poly (ADP-ribose) synthetase (PARS) activation. *Immunology* **94**(3):345-355.

Virag L, Marmer D J, Szabo C (1998b) Crucial role of apopain in the peroxynitrite-induced apoptotic DNA fragmentation. *Free Radical Biology and Medicine* **25**(9):1075-1082.

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. *Molecular Pharmacology*. **56**(4):824-833.

Virag L and Szabo C (2001) Purines inhibit poly(ADP-ribose) polymerase activation and modulate oxidant-induced cell death. *FASEB J.* **15(1)**:99-107.

Virag L and Szabo C (2002) The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Pharmacol Rev* **54**:375–429.

Wang S, Kotamraju S, Konorev E, Kalivendi S, Joseph J, Kalyanaraman B (2002) Activation of nuclear factor-kappaB during doxorubicin-induced apoptosis in endothelial cells and myocytes is pro-apoptotic: the role of hydrogen peroxide. *Biochem J.* **367(Pt 3)**:729-740.

Wang W, Sawicki G, Schulz R (2002) Peroxynitrite-induced myocardial injury is mediated through matrix metalloproteinase-2. *Cardiovascular Research* **53**:165–174.

Wang Y and Marsden PA (1995) Nitric oxide synthases: gene structure and regulation. *Adv Pharmacol.* **34**:71-90.

Wang ZQ, Auer B, Singl L, Berghammer H, Haidacher D, Schweiger M, Wagner EF (1995) Mice lacking ADPRT and poly(ADP-ribosyl)ation develop normally, but are susceptible to skin disease. *Genes Dev.* **9**:509-520.

Wang ZQ, Singl L, Morrison C, Jantsch M, Los M, Schultze-Osthoff K, Wagner EF (1997) PARP is important for genomic stability but dispensable in apoptosis. *Genes Dev.* **11**:2347-2358.

Wanstall JC, Jeffery TK, Gambino A, Lovren F, Triggle CR (2001) Vascular smooth muscle relaxation mediated by nitric oxide donors: a comparison with acetylcholine, nitric oxide and nitroxyl ion. *Br J Pharmacol.* **134(3)**:463-472.

van Wart HE and Birkedal-Hansen H (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci.USA.* **87**:5578–5582.

Watts JA, Grattan RM, Whittlow BS, Kline JA (2001) Activation of poly(ADP-ribose) polymerase in severe hemorrhagic shock and resuscitation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* **281(2)**:G498-G506.

Watson AJ, Askew JN, Benson RS (1995) Poly(adenosine diphosphate ribose) polymerase inhibition prevents necrosis induced by H₂O₂ but not apoptosis. *Gastroenterology.* **109**:472-482.

Wink DA, Feelisch M, Fukuto J, Chistodoulou D, Jourdain D, Grisham MB, Vodovotz Y, Cook JA, Krishna M, DeGraff WG, Kim S, Gamson J, Mitchell JB (1998) The cytotoxicity of nitroxyl: possible implications for the pathophysiological role of NO. *Arch Biochem Biophys.* **351(1)**:66-74.

Ying W and Swanson RA (2000) The poly(ADP-ribose) glycohydrolase inhibitor gallotannin blocks oxidative astrocyte death. *Neuroreport*. **11(7)**:1385-1388.

Ying W, Sevigny MB, Chen Y, Swanson RA (2001) Poly(ADP-ribose) glycohydrolase mediates oxidative and excitotoxic neuronal death. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **98(21)**:12227-12232.

Young RC, Ozols RF, Myers CE (1981) The anthracycline antineoplastic drugs. *N Engl J Med* **305**:139–153.

Yu SW, Wang H, Poitras MF, Coombs C, Bowers WJ, Federoff HJ, Poirier GG, Dawson TM, Dawson VL (2002) Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 dependent cell death by apoptosis-inducing factor. *Science*. **297**:259-263.

Zhang H, Joseph J, Feix J, Hogg N, Kalyanaraman B (2001) Nitration and oxidation of a hydrophobic tyrosine probe by peroxynitrite in membranes: comparison with nitration and oxidation of tyrosine by peroxynitrite in aqueous solution. *Biochemistry* **40**:7675-7686.

Ziegler M and Oei SL (2001) A cellular survival switch: poly(ADP-ribosyl)ation stimulates DNA repair and silences transcription. *Bioessays*. **23(6)**:543-548.

Zingarelli B, Salzman AL, Szabó C (1998) Genetic disruption of poly(ADP-ribose) synthase inhibits the expression of P-selectin and intracellular adhesion molecule-1 in myocardial ischaemia/reperfusion injury. *Circ Res*. **83**:85-94.

X. Köszönetnyilvánítás

Hálás köszönetem szeretném kifejezni Dr. Virág László témavezetőmnek segítségért, amit Ph. D. ösztöndíjam ideje alatt és a disszertációm írásához nyújtott, illetve a lehetőséget arra, hogy többször is kiutazhassak az Amerikai Egyesült Államokba. Köszönöm értékes segítségét és támogatását pályázataimhoz.

Hasonlóan szeretném megköszönni Prof. Gergely Pálnak (Orvosi Vegytani Intézet) és Dr. Szabó Csabának (Inotek Pharmaceuticals) lehetőséget, hogy mindkét intézetben dolgozhattam, illetve támogatták pályázataimat.

Munkatársaimnak, Bakondi Edinának, Erdélyi Katalinnak és Hegedűs Csabának segítségüket és a laborban a jó hangulat kialakítását köszönöm. Dr. Pacher Pálnak a doxorubicin modellben nyújtott segítségét köszönöm. A diszkusszió fejezetben említett nitro tirozin immunfestés és a szívfunkció mérés az ő munkája volt és a saját eredményeim értelmezéséhez idéztem őket.

Közvetlen barátaimnak, akik közül kiemelném Dr. Tóth Attilát, Dr. Boczán Juditot, Csóka Balázst és Pechmann Ildikót, illetve barátnőmet Dr. Kiss Borbálát, megköszönöm, hogy mindig volt idejük rám. Szeretném megköszönni építő kritikájukat disszertációmmal kapcsolatban és segítségüket a szöveg gondozása során.

Szüleimnek, öcsémnek és nagymamámnak köszönöm, hogy a nyugodt munkához és élethez a háttérmet megteremtették és mindig mindenben támogattak.

XI. Összefoglalás

A nitrogén tartalmú reaktív intermedierek (RNI) biológiai hatásainak jellemzése napjaink szabad gyökökkel foglalkozó tudományának egyik fő célja. Az eddig legjobban megismert RNI a peroxinitrit (ONOO^-), mely a szuperoxid gyök és a nitrogén monoxid reakciójában keletkezik. Az ONOO^- képes a fehérjék oldalláncainak módosítására, illetve a DNS szálainak törésére. Fokozott termelődését kimutatták oxidatív stresszel járó megbetegedésekben. A DNS szálainak törése folytán a poli(ADP-ribóz) polimeráz (PARP) enzim aktiválódik, ami a repairen túlmenően a sejt energetikai rendszerének megzavarásával a sejt onkotikus halálához vezethet. A PARP gátlása az onkózist apoptózisba fordítja. Kísérleteink során vizsgáltuk egy RNI, a nitroxil, citotoxicitásának mechanizmusát. Kimutattuk, hogy timocita modellrendszerben a nitroxil egyszálú DNS törésekhez, illetve PARP aktivációhoz és mitokondriális zavarokhoz vezetett. A sejtek pusztulását csökkentette a PARP gátlása, ami együtt járt a sejthalál jegyeinek apoptotikus jellegűvé válásával (DNS fragmentáció, kaspáz-3 aktiváció, foszfatidil szerin expozíció). A nitroxil citotoxicitásában szerepet játszik a PARP aktiváció, azonban kísérleteink a PARP-tól független útvonalak dominanciáját mutatják.

Megvizsgáltuk az RNI-k és a PARP aktiváció lehetséges szerepét egy *in vivo* modellben, a doxorubicin kiváltotta kardiotoxicitásban is. Doxorubicin kezelés hatására emelkedett nitro tirozin festődés tapasztalható, ami peroxinitrit termelődésre utal. A doxorubicin kezelés a szívizomsejtek pusztulásához vezetett, amit szérum markerezimek (CK, LDH) szintjének vizsgálatával követtünk. Mind a PARP gátlás, mind az RNI-k lebontása FP15 szerű, ferroporfirin alapú vegyületek alkalmazásával megakadályozta a sejtpusztulást. A kardiotoxicitás lehetséges új útvonalként mátrix metalloproteináz (MMP) aktivációt találtunk a szívben doxorubicin kezelés hatására. A 34 kDa MMP aktivációját RNI-k okozták. Eredményeink újabb bizonyítékot szolgáltatnak az RNI - DNS törés - PARP aktiváció - onkózis útvonal kóroki szerepére. Munkánk felvetette az MMP-k, illetve a szabad gyökök MMP aktiváló képességének szerepét a doxorubicin-indukálta kardiomiopátiában.

XII. Summary

The characterisation of the biological effects of reactive nitrogen intermediates (RNIs) is an ever-growing area in the field of free radical research. The best characterised RNI is peroxynitrite (ONOO^-), formed in the reaction of superoxide and nitric-oxide. ONOO^- is capable of nitrating tyrosil residues of proteins, and of breaking the strands of DNA. Enhanced ONOO^- production have been detected under different oxidative stress associated pathological conditions. DNA strand breaks lead to the activation of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP), resulting in oncosis due to collapse of the cellular energetic system. PARP inhibition switches oncosis to apoptosis. In our experiments, the cytotoxicity of nitroxyl was investigated. Nitroxyl treatment in thymocytes leads to DNA single strand breaks and mitochondrial dysfunction. Cytotoxicity was attenuated by PARP inhibition, which was accompanied with the switching of the markers of cell death from oncotic to apoptotic (DNA fragmentation, caspase-3 activation, phosphatidyl-serine exposure). Nitroxyl-induced cytotoxicity was partially dependent on PARP activation, however our experiments suggest the dominance of PARP-independent pathways.

We have also investigated the possible role of RNIs and PARP inhibition in doxorubicin-induced cardiotoxicity. Doxorubicin treatment lead to increased nitrotyrosine staining, indicative of peroxynitrite formation. Doxorubicin treatment lead to cardiac muscle cell death, as indicated by increased levels of marker enzymes as CK and LDH. Both PARP inhibition by PJ34 and RNI decomposition by FP15 prevented cardiotoxicity. As a possible novel pathway of cardiotoxicity, we have described matrix metalloproteinase (MMP) activation in the heart after doxorubicine treatment. The induction of the newly described MMP was mediated by oxidants. Our results support the pathological significance of the RNI-DNA strand break-PARP activation-oncosis pathway in doxorubicin-induced cardiotoxicity. We also proposed the role of free radical activated MMPs in doxorubicin-induced cardiotoxicity.

XIII. Publikációs lista

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

Bai P, Bakondi E, Szabó E, Gergely P, Szabo C, Virag L (2001) Partial protection by poly(ADP-ribose)polymerase inhibitors from nitroxyl-induced cytotoxicity in thymocytes. *Free. Radical. Bio. Med.* **31(12)**:1616-1623.

IF.: 5.082

Pacher P, Liaudet L, **Bai P**, Virag L, Mabley JG, Hasko G, Szabo C (2002) The activation of poly(ADP-ribose) polymerase contributes to the development of doxorubicin-induced heart failure. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **300**:862-867.

IF.: 3.555

Pacher P, Liaudet L, **Bai P**, Mabley J, Kaminsky PM, Virag L, Deb A, Szabo E, Ungvari Z, Wolin MS, Szabo C (2003) A potent peroxynitrite decomposition catalyst, FP15, protects against the development of doxorubicin-induced cardiac dysfunction. *Circulation* **107**: 896-904.

IF.: 10.517

Egyéb közlemények

Bai P, Mabley JG, Liaudet L, Virág L, Szabó C, Pacher P: Matrix metalloproteinase activation is an early event in doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Oncol. Rep.* (in press)

IF.: 1.171

Bakondi E, **Bai P**, Erdélyi K, Szabo E, Gergely P, Hunyadi J, Szabo C, Virag L: Cytoprotective effect of gallotannin in oxidatively stressed HaCaT keratinocytes: the role of poly(ADP-ribose) metabolism. *Exp. Derm.* (in press)

IF.: 2.234

Bakondi E, Gönczi M, Szabó É, **Bai P**, Pacher P, Gergely P, Kovács L, Hunyadi J, Szabó C, Csernoch L, Virág L (2003) Role of intracellular calcium mobilization and cell density-dependent signaling in oxidative stress-induced cytotoxicity in HaCaT keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* **121(1)**:88-95.

IF.: 4.645

Virag L, Szabó E, Bakondi E, **Bai P**, Gergely P, Hunyadi J, Szabo C (2002): The nitric oxide – peroxynitrite - poly(ADP-ribose) polymerase pathway in the skin. *Exp. Derm.* **11(3)**:189-202.

IF.: 2.234

Bakondi E, **Bai P**, Szabó E, Hunyadi J, Gergely P, Szabo C, Virag L (2002) 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.

IF.: 2.718

Szabó E, Virag L, Bakondi E, Gyüre L, Haskó G, **Bai P**, Hunyadi J, Gergely P, Szabo C (2001) Peroxynitrite-induced poly(ADP-ribose) polymerase activation in keratinocytes: implications for contact hypersensitivity. *J. Invest. Dermatol.* **117(1)**:74-80.

IF.: 4.645

Bai, P., Erdélyi, K., Bakondi, E., Hegedus, C., Gergely, P., Szabo, C., Virag, L. Potential role of peroxynitrite in the DNA damage, poly(ADP-ribose) polymerase activation and cytotoxicity caused by the alkylating agent N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) in thymocytes. (közlésre benyújtva)

Mabley, J.G., Pacher, P., **Bai, P.**, Wallace, R., Goonesekera, S., Virag, L., Southan, G.J., Szabo, C. Suppression of intestinal polyposis in *Apc^{min/+}* mice by inhibition of inducible nitric oxide synthase, inhibition of poly (ADP-ribose) synthetase or neutralization of peroxynitrite. (közlésre benyújtva)

Idézhető absztraktok

Bai, P., Bakondi, E., Gergely, P., Szabo, C., Virág, L. (2002) Mechanism of nitroxyl (NO⁻/HNO)-induced cytotoxicity in thymocytes. *FASEB J.* **16(5)**, A1166-A1167.

Bakondi, E., **Bai, P.**, Bak, I., Szabó, E., Gergely, P., Szabó, C., Virág, L. (2002) Role of poly(ADP-ribose) polymerase in contact hypersensitivity. *FASEB J.* **16(4)**, A674-A675.

Virág, L., **Bai, P.**, Bak, I., Bakondi, E., Szabo, E., Liaudet, L., Gergely, P., Szabo, C. (2002) Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase attenuates leukocyte migration in an ovalbumin-induced asthma model in mice. *FASEB J.* **16(4)**, A674.

Pacher, P., Liaudet, L., **Bai, P.**, Virag, L., Mabley, J.G., Szabo, C. (2002) Activation of poly(ADP-ribose)-polymerase contributes to the development of doxorubicine-induced heart failure. *FASEB J.* **16(4)**, A570.

Pacher, P., Liaudet, L., **Bai, P.**, Virag, L., Mabley, J.G., Szabo, C. (2002) A potent peroxynitrite decomposition catalyst, FP15, protects against the doxorubicine-induced heart failure. *FASEB J.* **16(4)**, A177.

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

XIV. Függelék (közlemények másolatai)