

**A PARP gátlás sejtvédő hatásának szerepe,
Akt aktiváció és a mitokondriális védelem
oxidatív stresszben**

Ph.D. értekezés tézisei

Tapodi Antal

**Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar
Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet**

2007

**A PARP gátlás sejtvédő hatásának szerepe,
Akt aktiváció és a mitokondriális védelem
oxidatív stresszben**

Ph.D. értekezés tézisei

Tapodi Antal

Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar

Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet

Ph.D. Programvezető: Prof. Sümegei Balázs, D.Sc.

2007

Rövidítések jegyzéke

PARP	poly(ADP-ribose) polymerase
C1 and N3	mammalian expression vector construct
FCS	fetal calf serum
GFP	green fluorescent protein
GSK.....	glycogen synthase kinase
JC-1	5,5,6,6-tetrachloro-1,1,3,3-tetraethylbenzimidazolylcar- bocyanine iodide
MEM.....	minimum Eagle's medium
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide
PAR.....	poly(ADP-ribose)
PARP-DBD.....	N-terminal DNA binding domain of PARP
PI3-kinase	phosphatidylinositol 3-kinase
siRNA	small interfering RNA
MPT	Mitochondrial Permeability Transition
ROS.....	Reactive Oxygen Species
AIF.....	Apoptosis Inducing Factor
PTPC.....	Permeability Transition Pore Complex
VDAC	Voltage Dependent Anion Channel
ANT	Adenine Nucleotide Translocase
IM.....	Inner Membrane
OM.....	Outer Membrane
$\Delta\Psi$	Mitochondrial Membrane Potential
CsA	cyclosporine A
Rh123.....	Rhodamine 123
DRh123	Dihydrorhodamine 123
Resorufin.....	N-acetyl-8-dodecyl-3,7-dihydroxyphenoxazine
PI.....	Propidium Iodide
SCAV.....	1-hydroxy-2,2,5,5-tetramethyl-2,5-dihydro-1 <i>H</i> -pyrrol-3- ylmethyl

Bevezetés

A reaktív oxigén gyökök (ROS) által okozott károsodások fontos szerepet játszanak számos betegség patogenézisében. Különböző forrásokból származhatnak a szabadgyökök, pl. a xantin oxidáz rendszerből, a mitokondriális respirációs lánc tökéletlen működése következtében, az arahidonsav anyagcsere ciklooxigenáz útvonalából és a fagocitáló sejtek átmeneti respirációs aktivitásfokozódása következtében, amelyek aztán, számos egyéb károsodás mellett, egyes-láncú DNS töréseket okoznak. A poli(ADP-ribóz) polimeráz (PARP, EC 2.4.2.30) egy multifunkcionális nukleáris enzim, amelyet az egyes-láncú DNS törések aktiválnak, és amely NAD^+ -ot használva szubsztrátként különböző nukleáris fehérjéken, pl. hisztonokon és saját magán kovalensen kapcsolt, elágazó-láncú poli(ADP-ribóz) szálakat szintetizál. A PARP-1-nek szerepe van a kromatin "remodelling"-jében, a DNS hibajavításban, a genomikus stabilitás megőrzésében; és ezeket a szerepeket részben poliADP-riboziláló aktivitása révén éri el. Enyhe DNS károsodás esetén a PARP-1 szükséges a hibajavításhoz, de oxidatív stressz során, amikor a nagy mennyiségű DNS törés a PARP-1 túlzott aktivációját okozza, az enzim depletálhatja a NAD^+ -ot, illetve a NAD^+ reszintézisének nagy energia-igénye miatt az ATP-t is, ami sejthalált eredményez. A PARP inhibitorok védenek a miokardiális ischemia, neuronális ischemia, akut tüdőgyulladás, akut szепtikus sokk, zimogén-indukálta többszervi elégtelenség és a diabetikus pankreasz károsodás ellen mutatva, hogy milyen jelentős a túlzott PARP-1 aktiváció szerepe a sejthalál kiváltásában. A klasszikus elképzelés szerint a PARP inhibitorok a NAD^+ és ATP depléció megakadályozásával védnek az oxidatív stressz ellen, de néhány új adat a citoprotekció egy sokkal összetettebb mechanizmusát sugallja.

Kísérletesen bizonyított, hogy a PARP aktiváció hozzájárulhat a mitokondriális károsodások és a mitokondriális ROS termelés megnövekedéséhez, mutatva, hogy a PARP a magon kívüli folyamatokat is képes befolyásolni. Friss eredmények szerint létezik mitokondriális PARP, ami gátolható PARP-1 inhibitorokkal, ezért, fontos azt tisztázni, hogy a mitokondrium védelem a mitokondriális ADP-ribozilációs folyamatok gátlásának egyenes következménye, vagy a nukleáris PARP-1 befolyásol olyan, egyelőre nem tisztázott mechanizmusokat, amelyek a mitokondriális protekciót eredményezik.

Saját korábbi eredményeink szerint PARP inhibitorok az Akt foszforilációját, ezáltal aktivációját eredményezték lipopoliszahariddal kezelt egerek májában, tüdejében és lépében, ami annak lehetőségét veti fel, hogy a PARP inhibitorok védő hatása a PI3-kináz/Akt útvonalon keresztül mediálódik. Ezek a megfigyelések arra mutatnak, hogy a PARP inhibitorok védő hatása sokkal komplexebb lehet, mint a NAD^+ és ATP depléciónak megakadályozása, mivel az Akt kináz képes számos regulátoros fehérjére, így a GSK-3 β , a kaszpáz-9, a BAD, vagy a FKHR foszforilálására, amely folyamatok involválva vannak a mitokondriális membrán rendszerek stabilizálásában.

A sejtek lecsökkent energia töltése következtében rosszul működő pumpafunkciók eredményeként beáramló Ca^+ , a megemelkedett inorganikus foszfát, valamint a ROS külön-külön és együttesen is mitokondriális permeabilitás tranzícióhoz (mPT) vezetnek. Mind a fiziológiás, mind a patológiás sejthalál velejárója az mPT, mely természetesen több szintű reguláció alatt áll. Számos pro-apoptotikus másodlagos hírvivő felelős közvetlenül az mPT kialakulásáért; pl.: a már említett ROS és Ca^{2+} mellett lipid származékok is (ceramide és ganglioside GD3), valamint a stressz-kinázok. Mindent összevetve elmondhatjuk, hogy a pro-apoptotikus fehérjék kiváltják, az anti-apoptotikus fehérjék pedig gátolják az mPT kialakulását. A mitokondriumok belső membránja (inter membrán: IM) átjárhatatlan a metabolitok számára. Ennek köszönhetően alakulhat ki a légzési lánc komplexei által generált membránpotenciál különbség az IM két oldalán. Az mPT alatt végbemenő duzzadást a szabadon be és ki áramló metabolitok váltják ki, mely az u.n. "mega-pórus" (mPT-Pore) megnyitásán keresztül jön létre.

Korábbi eredményeink szerint az Amiodarone (2-butyl-3-benzofuranyl 4-[2-(diethylamino)-ethoxy]-3,5-diiodophenyl-ketone hydrochloride), amely egy III. kategóriájú antiarritmiás ágens, és a klinikai gyakorlatban számos szívritmuszavar kezelésében használnak, bizonyítottan jótékony hatással rendelkezik a postischemiás szívekre, mivel javítja a mitokondriumok energia metabolizmusát, és mPT gátló hatással is rendelkezik. Az Amiodarone kis koncentrációban gátolja, nagy koncentrációban viszont indukálja a mitokondriális duzzadást, valamint a mitokondriális membránpotenciál összeomlását okozza. Megvizsgáltuk az Amiodarone patkány szívre gyakorolt hatásait. Langendoff-perfúzió során, ^{31}P -NMR spektroszkópiával. Eredményeink szerint az Amiodarone, a mitokondriális energia metabolizmusra pozitív,

protektív hatású ischemia és reperfüzió alatt. A szívsejtekre és egyéb extrakardiális sejtekre gyakorolt hatásukat cardiomyocytá ill. májsejt sejt kultúrákon vizsgáltuk. Eredményeink alapján kijelenthetjük, hogy az Amiodarone alacsony koncentrációban a mitokondriumokra gyakorolt pozitív hatásai (mPT gátlás, ROS képződés gátlás, mitokondriális fehérjekiáramlás gátlás) miatt jótékony hatású a postischemiás szívekre. Feltételezéseink szerint az Amiodarone pozitív tulajdonságaiért a szerkezetében egy amincsoporton található etyl csoport lehet a felelős, mivel metabolitja a Desethylamiodarone, nem mutat cardioprotektív és mitokondriumvédő hatásokat.

Mivel az Amiodarone előnyös tulajdonságai miatt nélkülözhetetlen az orvostudomány számára, a közelmúltban jelentős erőt fektettek különféle Amiodarone analógok kifejlesztésébe. Az Amiodarone molekula szerkezetének megváltoztatásával próbált számos csoport olyan molekulákat keresni, melyek mutatják az Amiodarone mind a mitokondriumokra, mind a szívre gyakorolt pozitív hatásait, miközben elkerülhetővé válnak a negatív mellékhatások.

Prof. Hideg Kálmán és munkatársai által szintetizált és számunkra rendelkezésre bocsátott új Amiodarone analógok lehetőséget jelentettek számunkra, hogy tulajdonságaikat megvizsgálva találjunk egy olyan új Amiodarone analóg molekulát, mely megfeleljen a fenti kívánalmaknak.

Tíznel több új analóg molekula hatásait vizsgáltuk a mitokondriális permeabilitás tranzicióra, és Langendorff perfundált szívekre. Ezen vizsgálataink eredményeként jutottunk el a HO-3538 nevű molekulához, mely a leeffektívebb Amiodarone-analóg molekulának tűnik.

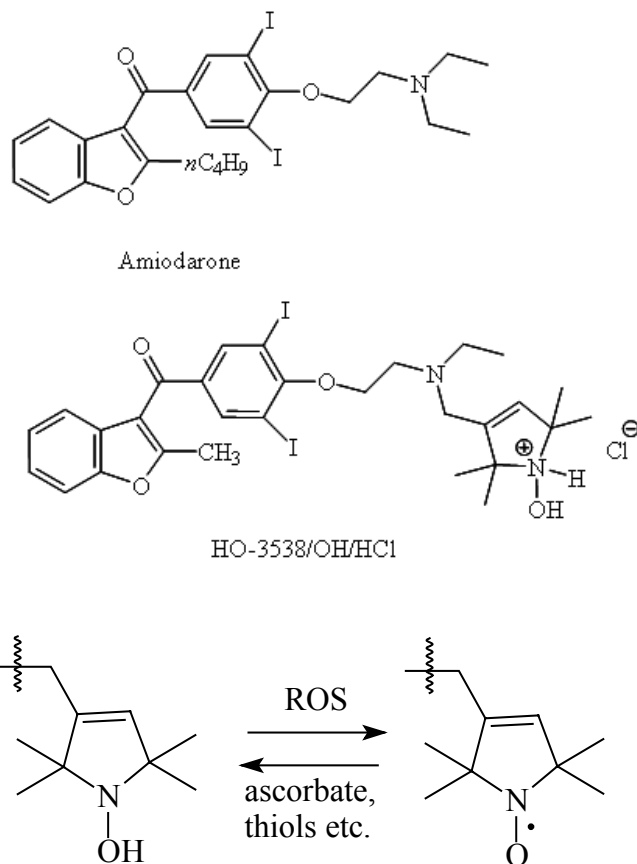


Fig. 1. The chemical structures of amidarone HO-3538 and SCAV

Az amidarone kémiai szerkezete (2-butyl-3-benzofuranyl 4-[2-(diethylamino)-ethoxy]-3,5-diiodophenyl-ketone hydrochloride), HO-3538 (2-Methyl-3-(3,5-diiodo-4-{2-[N-ethyl,N-(1-hydroxy-2,2,5,5-tetramethyl-2,5-dihydro-1H-pyrrol-3-ylmethyl)ethyl]}oxybenzoyl)benzofurane 2HCl salt). A HO-3538 1-hydroxy-2,2,5,5-tetramethyl-2,5-dihydro-1H-pyrrol-3-ylmethyl komponense (SCAV), mely gyökfogó tulajdonsággal rendelkezik.

A HO-3538 szerkezetileg egy oldalláncban tér el az Amiodarone molekulától (Fig.1.). Az Amiodarone Etyl oldalláncát helyettesítették egy 1-hydroxy-2,2,5,5-tetramethyl-2,5-dihydro-1H-pyrrol-3-ylmethyl oldallánccal, mely önmagában is gyökfogó tulajdonságokkal rendelkezik. Összehasonlítottuk a HO3538 és az Amiodarone mitokondriumokra (mPT, fehérjekiáramlás), szívekre és sejtekre gyakorolt hatásait.

Célkitűzések.

1. Számos tudományos munka bizonyítja, hogy a különböző PARP gátlók jótékony hatással bírnak a sejtek túlélésére oxidatív stresszben. Valóban a PARP-1 aktiválódásának közvetlen mérséklődéséhez köthető ez a citoprotekció, vagy inkább más, ADP-ribózilált fehérjék aktivációjának csökkenésével áll összefüggésben?
2. Széles körben elfogadott tény, hogy a PARP gátlás citiprotektív hatásai oxidatív stresszben a NAD^+ és közvetve az ATP szintjének a megőrzésén alapszik. Egyedül a sejtek energetikájának a megőrzése felelős ezért a jótékony hatásért, vagy más mechanizmusok is részt vehetnek ebben?
3. Korábbi munkáink során megállapítottuk, hogy az amiodarone az mPT-re bifázisos hatást gyakorol. Alacsony koncentrációban megvédi a mitokondriumokat a duzzadástól, míg nagyobb koncentrációnál CsA független úton mPT-t idéz elő. Feltételezhető, hogy elő tudunk állítani olyan amiodarone származékot, amely nem rendelkezik mPT indukáló hatással, amellet, hogy a mitokondriumra gyakorolt jótékony hatásait megőrzi?
4. Számos amiodarone származékot vizsgáltunk meg, míg kiválasztottunk egy olyan új amiodarone analógot (HO-3538), melynek egyik ethyl- oldalláncát egy SOD-mimetikus csoportra cseréltük. Milyen előnyös hatásai vannak az mPT gátlásnak és a szabadgyök fogó képesség kombinációjának oxidatív stresszben vagy ischemia-reperfúzió körülményei között?

Módszerek

A PARP DNS-kötő doménjének transzdomináns expressziója

A PARP N-terminális DNS-kötő doménjének kódoló régióját (PARPN214, 1-214 aminosavak [34]) PCR technikával kiterjesztettük és "in-frame" beillesztettük pEGFP-C1/N3 vektorokba (Clontech, Palo Alto, CA) Hind III és EcoRI restriktációs enzimek (Fermentase, Vilnius, Lithuania) segítségével. Annak érdekében, hogy a zöld fluoreszcens fehérjét (GFP) tartalmazó PARP-N214 a magba juthasson, az erősítéshez nukleáris lokalizációs szignált kódoló PCR primert alkalmaztunk. A tisztított rekombináns pPARPGFP-C1/N3 vektorokat transziensen transzfektáltuk WRL-68 humán máj sejtvonalba Lipofectamine2000 (Invitrogen, Frederick, MD) segítségével. Hatásos transzdomináns expresszió érdekében egy második transzfekciót is végeztünk 48 órával később és a sejteket 40 órával ezt követően használtuk fel a kísérletekhez.

A PARP-1 szupressziója kis interferáló RNS (siRNS) technikával

WRL-68 sejteket transziensen transzfektáltunk a gyártó (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) által a PARP-1 szupressziójára tervezett siRNS-sel Lipofectamin2000 segítségével. A PARP hatásos elnyomása érdekében még két transzfekciót végeztünk 48 órás időközökkel és a sejteket 40 órával ezt követően használtuk fel a kísérletekhez.

Sejthalál mérése

A sejteket 96-lyukú tálcákon tartottuk, a kiindulási sejtszám 10^4 sejt/lyuk volt. Az oxidatív stressz kiváltásához a sejteket 3 órán át H_2O_2 tartalmú médiumban tartottuk inhibitorok jelenlétében és távollétében, majd a médiumot lecseréltük 0.5% 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT^+) tartalmú médiumra. További 3 órás inkubáció után Anthos Labtech 2010 ELISA leolvasóval 550nm hullámhosszon megmértük a képződött kék formazán festék mennyiségét, amely arányos volt az élő sejtek számával. Minden kísérletet 3-szor ismételtünk kísérletenként 4 párhuzamost használva.

Western blot analízis

A sejteket az előzőekhez hasonlóan kezeltük, majd proteáz- és foszfatázgátlót tartalmazó pufferben homogenizáltuk. Zsebenként 35 μ g fehérjét vittünk fel 12%-os poliakrilamid géltre, és blotolást követően a nitrocellulóz membránt 5% zsírintes tejben 1:1000 arányban hígított primér antitest oldatban inkubáltuk 4°C-on egy éjszakán át. A második

antitest tormagyökér peroxidáz-konjugált anti-nyúl IgG volt, a vizualizálást SuperSignal West Pico chemiluminescent substrate (Pierce Chemical, Rockford, IL) használatával végeztük. Minden kísérletet 4-szer ismételtünk.

Fluoreszcens mikroszkópia

A vad típusú, vagy transzfektált WRL-68 sejteket poli-L-lizinnel borított (2.5-5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) üveg fedőlemezekre tenyésztettük. A kezelések után a lemezeket mostuk, a sejteket JC-1 membránpotenciál függő festékkel (Molecular Probes, Eugene, OR) feltöltöttük 10 percre, majd ColorView CCD kamerával és alySISR software-rel felszerelt Olympus BX61 fluoreszcens mikroszkóppal fényképeket készítettünk 60x objektív alatt. A GFP fluoreszcenciához 450-490nm excitációs és >520nm emissziós (zöld) filtereket használtunk. JC-1 fluoreszcenciához ugyanarról a látómezőről 546nm bandpass excitációs és >590nm emissziós (piros), majd zöld filterrel készült kép.

Állatok

A Wistar patkányokat a budapesti Charles River Hungary Breeding Kft-től vásároltuk

Mitokondriális permeabilitás tranzíció mérés

Az mPT jelenséget a mitokondriális duzzadás során fellépő abszorbancia csökkenés (540nm-en) regisztrálásával követtük nyomon Perkin-Elmer fluoriméter segítségével. 1mg/ml fehérje koncentrációjú mitokondrium oldatot inkubáltunk standard mPT-pufferben. A mitokondriális permeabilitás tranzíciót Ca^{2+} -mal, Amiodaronnal vagy HO-3538-cal indukáltuk. Az E_{450} -es abszorbancia csökkenést 20 percre detektáltuk.

Mitokondriális membránpotenciál mérés

A mitokondriumokat Rh123 tartalmú mPT pufferben 1 órán át előkezeltük. A mitokondriumok membránpotenciál csökkenését az mPT indukciót követő, kiáramló Rh123 fluoreszcens festék detektálásával követtük nyomon (ex./em.: 495nm/535nm). A mérés 4 percre tartott.

Antioxidáns hatás mérése sejteken

A sejteket 96-lyukú tálcákon tartottuk, a kiindulási sejtszám 10^4 sejt/lyuk volt. Az oxidatív stressz kiváltásához a sejteket 1,5 órán át H_2O_2 tartalmú médiumban tartottuk, majd a médiumot lecseréltük HO-3538 vagy különböző antioxidáns anyagokat tartalmazó médiumra. További 1/2 órás inkubáció után $1\mu\text{M}$ carboxy- H_2DCFDA -t adtunk a médiumhoz, majd 1 órán át tovább inkubáltuk. A generálódott ROS sztöchiometrikus

arányban oxidálta a carboxy-H₂DCFDA fluoreszcens festéket, amit fluoreszcens ELISA leolvasóval ex: 485nm / em:555nm hullámhosszon mértük. Minden kísérletet 3-szor ismételtünk kísérletenként 4 párhuzamost használva.

Langendorff szívperfúzió

A kísérleti patkányokat 200 mg/ttkg ketamin intraperitoneális beadásával altattuk el, és 100 IU i.p. Na-heparinnal heparinizáltuk. A szíveket a Langendorff módszer szerint az aortán keresztül retrográd perfundáltuk 70 Hgmm-es állandó nyomással 37°C-on. A perfúziós folyadék módosított, foszfátmentes Krebs-Henseleit puffer volt, amely 118 mM NaCl-t, 5 mM KCl-t, 1,25 mM CaCl₂-t, 1,2 mM MgSO₄-t, 25 mM NaHCO₃-t, 11 mM glükózt és 0,6 mM oktánsavat tartalmazott, és pH-ját 7,4-re állítottuk. A 15 perces kimosási fázist követően a szíveket 10 percig normoxiás körülmények között perfundáltuk, majd az aorta beáramlási csövének az elzárásával 30 perces globális ischaemiát hoztunk létre, amit 15, 45 illetve 90 perces reperfúziós fázis követett.

NMR spektroszkópia

A ³¹P spektrumokat Varian UNITY^{INOVA} 400 WB készülékkel detektáltuk. A perfundált szívek ³¹P méréseit (161,9 MHz) 37°C-on Z•SPEC 20 mm-es „broadband” mintavételi fejjel végeztük (Nalorac Co., Martinez, California, USA) a felvétel alatt GARP-1 proton lecsatolást alkalmazva. A mező homogenitását a proton jel ($w_{1/2} = 10\text{--}15$ Hz) követésével állítottuk be. A spektrumokat 3 percenként gyűjtöttük, minden FID (free induction decay) jelben 120 tranziens összegyűjtésével.

Eredmények

1. Számos tudományos munka bizonyítja, hogy a különböző PARP gátlók jótékony hatással bírnak a sejtek túlélésére oxidatív stresszben. Bebizonyítottuk, hogy mindhárom módszer, a farmakológiai gátlás, a PARP fehérje mennyiségének elnyomása siRNS technikával, illetve a kompetitív, de nem farmakológiai gátlás, a PARP-DBD transzdomináns expressziója megvédte a sejteket az oxidatív károsodásokkal szemben. Mind a siRNS, mind a PARP-DBD konstrukció a PARP-1 szekvenciája alapján készült, így kísérleteink nyomán egyértelművé vált, hogy a nukleáris PARP aktivációja, és nem egyéb ADP-ribosilációs folyamatok felelősek az oxidatív stressz kiváltotta sejthalál mediálásában.
2. Sikerült cáfolnunk azt a klasszikus elképzelést, hogy a PARP gátlás citoprotektív hatása kizárólag a sejtek NAD⁺ illetve ebből kifolyólag az ATP szintének megőrzésén alapszik oxidatív stresszben. Az Akt aktivációjának gátlása -specifikus inhibitorokkal szignifikánsan csökkentette a PARP gátlás jótékony hatásait oxidatív stresszben. Így a PARP gátlás indukálta Akt aktiváció is egyértelműen felelőssé tehető a citoprotektív hatásokért az oxidatív károsodásokkal szemben. Bebizonyítottuk, hogy a PARP gátlás jótékony hatásai oxidatív stresszben két különböző útvonalon mediálódnak: a sejtek energetikájának megőrzésén, valamint az Akt/PI3K mint ismert túlélési jelátviteli útvonal aktiválásán keresztül.
3. Számos amiodarone származékot szintetizáltunk és megvizsgáltunk az mPT-e gyakorolt hatásaikat, míg kiválasztottunk egy olyan új amiodarone analógot (HO-3538), melynek egyik ethyl- oldalláncát 1-hydroxy-2,2,5,5-tetramethyl-2,5-dihydro-1H-pyrrol-3-ylmethyl csoportra cseréltük, mely SOD-mimetikus aktivitást hordoz. A HO-3538 alacsonyabb koncentrációban tökéletesen gátolta a Ca²⁺ indukálta mitokondriális duzzadást, míg nagyobb koncentrációban nem okozott mitokondriális permeabilitás tranzíciót.
4. A HO-3538 bár kisebb szabadgyök fogó aktivitással rendelkezik, mint más antioxidáns vegyületek, vagy éppen saját SOD-mimetikus szubsztituens oldallánca önmagában, mégis sokkal hatékonyabbnak bizonyult az

amiodaronnal szemben-vagy egyéb vizsgált vegyületeknél- mind ischemia-reperfúzió során, mind oxidatív stresszben. A protektív hatás –minden kétséget kizáróan- az mPT gátló tulajdonság SOD-mimetikus aktivitással való kombinálásának köszönhető. A HO-3538 egy új típusú gyökfogó tulajdonságokkal rendelkező mPT inhibitor molekula, amely alapjául szolgálhat új cardioprotektív és az Amiodaronéhoz hasonló hatású gyógyszerek kifejlesztéséhez.

Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Sümegi Balázs professzor Úrnak és Ifj. Gallyas Ferenc docens Úrnak a támogatásukért és irányításukért.

Köszönöm Dr. Várbíró Gábor adjunktus Úrnak, valamint közvetlen munkatársaimnak: Dr. Bognár Zitának és Dr. Hantó Katalinnak; kollégáimnak, barátaimnak az együttműködést és segítségüket.

Köszönöm a PTE ÁOK Biokémiai és Orvosi kémiai Intézet asszisztenseinek, technikusainak; Pásztor Istvánnénak, Halász Helenának, Girán Lászlónak és Horváth Bertalannak a segítségüket és tanácsaikat, melyek jelentősen megkönnyítették munkámat. Végül, de nem utolsó sorban köszönöm családomnak, feleségemnek, gyerekeimnek, szüleimnek a biztatást és szeretetet, mellyel mellettem állnak.

Cytoprotective Role of PARP inhibition, Akt Activation and Mitochondrial Protection in Oxidative Stress

Ph.D. thesis

Antal Tapodi

Institute of Biochemistry and Medical Chemistry

Faculty of Medicine

University of Pécs

Ph.D. Program leader: Prof. Balazs Sümegi, DSc.

Project leader: Ferenc Gallyas Jr., Ph.D.

2007

Introduction:

Under several pathological conditions, reactive oxygen species-induced damages play important roles in pathogenesis. High levels of reactive oxygen species are generated from a variety of sources such as the xanthine oxidase system, the leakage of electrons from the mitochondrial respiratory chain, the cyclooxygenase pathway of arachidonic acid metabolism, and the respiratory burst of phagocyte cells, and they can cause DNA damage-generating singlestranded DNA breaks. Poly(ADP-ribose)polymerase (PARP-1,2 EC 2.4.2.30) is a multifunctional nuclear enzyme that is activated by DNA strand breaks and catalyzes the covalent coupling of branched chains of ADP-ribose units to various nuclear proteins such as histone proteins and PARP-1 itself. PARP-1 is involved in chromatin remodelling, DNA repair, replication, transcription, and the maintenance of genomic stability by, in part, poly(ADP-ribosyl)ation. With moderate amounts of DNA damage, PARP-1 is thought to participate in the DNA repair process. However, oxidative stress, which induces a large amount of DNA damage, can cause excessive activation of PARP-1, leading to depletion of its substrate NAD^+ ; and in an effort to resynthesize NAD^+ , ATP is also depleted, resulting in cell death as a consequence of energy loss. PARP inhibitors show pronounced protection against myocardial ischemia, neuronal ischemia, acute lung inflammation, acute septic shock, zymogen-induced multiple organ failure, and diabetic pancreatic damage, providing evidence for the role of excessive PARP-1 activation in cell death. It is believed that by preventing excessive NAD^+ and ATP utilization, PARP inhibitors protect cells against oxidative damage, but some recent data suggest a more complex mechanism for the cytoprotection.

Amiodarone (2-butyl-3-benzofuranyl 4-[2-(diethylamino)-ethoxy]-3,5-diiodophenyl-ketone hydrochloride) is a class III antiarrhythmic agent used in the clinical practice for the treatment of various arrhythmias. We found that it presented a protective effect on the postischemic heart by enhancing the recovery of high-energy phosphate metabolites and inhibiting mPT at low concentrations. However, when administrated at higher concentrations, it induced mitochondrial swelling, the collapse of the mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi$) and apoptosis.

Desethylamiodarone, the major metabolite of amiodarone, also has antiarrhythmic activity, significantly increasing the action potential duration (class III antiarrhythmic effect) and decreasing the maximum rate of depolarization (class I antiarrhythmic effect) at clinically relevant concentrations. Desethylamiodarone rapidly accumulates in the lung after amiodarone treatment, sometimes in higher concentrations than amiodarone itself raising the possibility that this metabolite contributed to the effects of amiodarone. However, we found it to be more toxic than amiodarone in pulmonary cell types, suggesting that desethylamiodarone may play an important role in the development of the amiodarone treatment-induced pulmonary fibrosis.

The cardioprotective effect of amiodarone is due, at least in part, to the inhibition of mitochondrial permeability transition (mPT) at lower concentrations. However, when administered in higher concentrations, it induced mitochondrial swelling as well as the collapse of the mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi$). Desethylamiodarone, the major metabolite of amiodarone —reported by some authors to be the major cause of the amiodarone administration induced toxicity— does not inhibit mPT at any concentration, and induce swelling and the collapse of the membrane potential at higher concentrations. The difference between the effect of amiodarone and desethylamiodarone is due to the absence of an ethyl side chain from the amino group of desethylamiodarone. This led us to the conclusion that the structural modification of amiodarone can improve its inhibitory effect on mPT as well as its beneficial effect in ischemia-reperfusion injuries. Considering its advantages, a lot of effort has been made in the past decade to improve pharmacokinetic properties of amiodarone, mainly by chemical alterations of the original molecule such as synthesis of monoiodo derivatives, introduction of carboxymethoxy side chain instead of tertiary amine or substitute the original n-butyl group for an isobutyl ester.

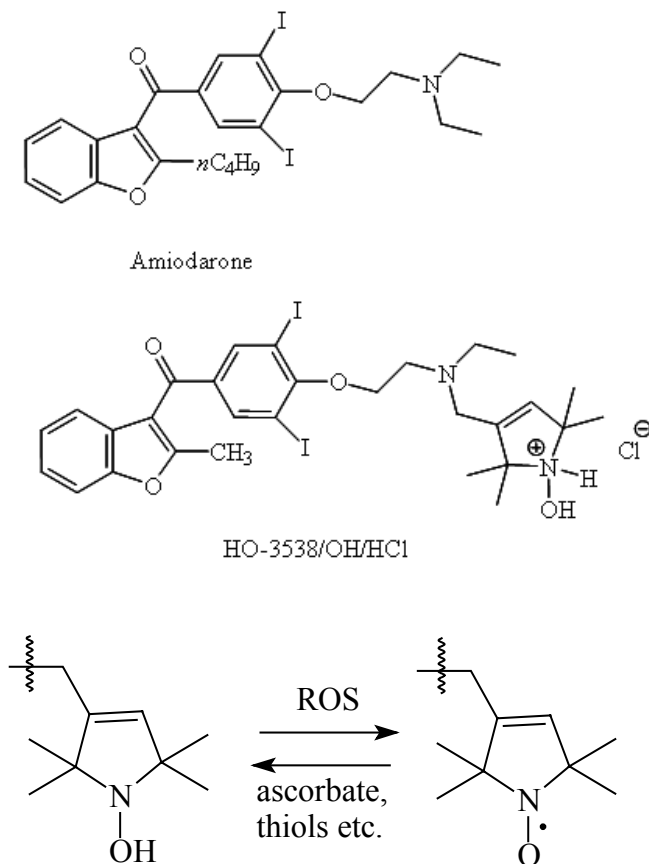


Fig. 1. The chemical structures of amiodarone HO-3538 and SCAV

The chemical structures of amiodarone (2-butyl-3-benzofuranyl 4-[2-(diethylamino)-ethoxy]-3,5-diiodophenyl-ketone hydrochloride), HO-3538 (2-Methyl-3-(3,5-diiodo-4-{2-[N-ethyl,N-(1-hydroxy-2,2,5,5-tetramethyl-2,5-dihydro-1H-pyrrol-3-ylmethyl) ethyl]}oxybenzoyl)benzofurane 2HCl salt). The 1-hydroxy-2,2,5,5-tetramethyl-2,5-dihydro-1H-pyrrol-3-ylmethyl component (SCAV) of HO-3538 possesses ROS scavenging activity. The oxidized form can be reduced by thiols, ascorbate, GSSH, etc.

Prof. Hideg and his co-workers provided numerous paramagnetic and diamagnetic amiodarone derivatives synthesized by them for screening their effect on the mitochondrial permeability transition. In this study, we analyzed the effect of HO-3538 (Fig.1), the most effective novel amiodarone analogue, in which an ethyl side chain is substituted with 1-hydroxy-2,2,5,5-tetramethyl-2,5-dihydro-1H-pyrrol-3-ylmethyl (SCAV) that has been described to possess free-radical scavenging activity on the permeability transition *in vitro* and in cultured cells as well as on ischemia-reperfusion in Landendorff-perfused rat hearts. This amiodarone analogue can form the basis of developing novel amiodarone

analogues that have the same or enhanced efficiency as amiodarone but with fewer side effects.

Objectives.

1. Several studies have shown that different PARP inhibitors improve the survival of cells in oxidative stress. Is this cytoprotection achieved via direct attenuation of PARP-1 activation or decrease of the activity of other ADP-ribosylating enzymes?
2. It is widely accepted fact that the cytoprotective effects of PARP inhibition in oxidative stress are based on the prevention of NAD^+ and ATP depletion. Is this protection mediated only through the preservation of the energetics of cells alone or there might be present other mechanisms as well?
3. Our previous works demonstrated that amiodarone has a biphasic effect on mPT; it protected the mitochondria from mPT at low concentration although it induces a CsA independent mitochondrial swelling at higher concentration. Can appropriate substitution of amiodarone suppress the mPT inducing effects of the drug while maintaining its protective effects on mitochondria?
4. After screening of many amiodarone derivatives we selected a novel amiodarone analogue (HO-3538), in which an ethyl side chain was substituted with a SOD-mimetic one. What are the beneficial effects of the combination of mPT inhibition and free-radical scavenging in ischemia-reperfusion and oxidative stress?

Materials and Methods.

Materials

PI3-kinase inhibitors LY 294002 and wortmannin, PARP-1 inhibitor PJ-34, protease inhibitor mixture, and all of the chemicals for cell cultures were purchased from Sigma. Fluorescent dyes JC-1, fluorescein-conjugated annexin V, and propidium iodide were from Molecular Probes. The following antibodies were used: anti-phospho- Akt (Ser473) and anti-phospho-GSK3_β (Cell Signaling Technology, Beverly, MA); anti-PAR and anti-PARP (Alexis Biotechnology, London, U.K.); anti-actin, anti-mouse IgG, and anti-rabbit IgG (Sigma). Cyclosporin A was from Biomol Research Laboratories, Inc. (Plymouth Meeting, PA, USA); rhodamine 123 (Rh123) and carboxy-H₂DCFDA were from Molecular Probes (Eugene, OR, USA), anti-cytochrome c monoclonal antibody was from Pharmingen (San Diego, CA, USA), anti-apoptosis-inducing factor (AIF) polyclonal antibody was from Oncogene (San Diego, CA, USA), HO-3538 (2-methyl-3-(3,5-diiodo-4-{2-[Nethyl, N-(1-hydroxy-2,2,5,5-tetramethyl-2,5-dihydro-1H-pyrrol-3-yl)methyl]ethyl}oxybenzoyl)benzofurane · 2HCl salt) was produced as described previously [27] all other compounds were from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) unless otherwise stated.

Cell Culture

WRL-68 human liver cells, H9C2 mouse cardiomyoblast, Jurkat cells were from the American Type Culture Collection (Wesel, Germany). The cells were maintained as monolayer adherent culture in minimum Eagle's medium, Dulbecco's modified Eagle's medium containing 1% antibiotic-antimycotic solution and 10% fetal calf serum (MEM/FCS) in a humid 5% CO₂ atmosphere at 37 °C. Jurkat cells were maintained in RPMI.

Transdominant Expression of the DNA-binding Domain of PARP

The coding region of the N-terminal DNA-binding domain of PARP (PARP-N214, amino acid residues 1–214 (34)) was amplified by PCR and cloned in-frame into pEGFP-C1/N3 vectors (Clontech) after cutting with HindIII and EcoRI restriction enzymes (Fermentase, Vilnius, Lithuania). For enabling active nuclear transport of the green fluorescent protein (GFP)-tagged PARP-N214, the nuclear localization signal was added

to the N terminus of the PARP-N214 sequence using PCR primers coding for the nuclear localization signal sequence. The recombinant pPARPGFP-C1/N3 vectors were purified by a plasmid purification kit (Qiagen, Valencia, CA) and utilized for transient transfection of WRL-68 cells using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. For an effective transdominant expression of PARP-DBD, the transfection step was repeated 48 h after the first transfection, and the experiments on the cells were performed 40 h after the second transfection. *Suppression of PARP-1 Expression by siRNA Technique*—WRL-68 cells were transiently transfected with siRNA designed for PARP suppression by the manufacturer (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) in Opti-MEM I Reduced Serum Medium (Invitrogen) using Lipofectamine 2000. For an effective suppression of PARP, the transfection step was repeated twice with a 48-h interval between the transfections, and the experiments on the cells were performed 40 h after the third transfection.

Cell Viability Assay

The cells were seeded into 96-well plates at a starting density of 104 cell/well and cultured overnight before H₂O₂ and different inhibitors modulating the effect of the H₂O₂ were added to the medium at a concentration and composition indicated in the figure legends. After 3 h of treatment, the medium was removed, and fresh MEM/FCS containing 0.5% of the water-soluble yellow mitochondrial dye MTT was added. Incubation was continued for an additional 3 h, and the MTT reaction was terminated by adding HCl to the medium at a final concentration of 10 mM. The amount of water-insoluble blue formazan dye formed from MTT was proportional to the number of live cells and was determined with an Anthos Labtech 2010 enzyme-linked immunosorbent assay reader at 550 nm wavelength after dissolving the blue formazan precipitate in 10% SDS. All experiments were run in at least four parallels and repeated three times.

Western Blot Analysis

The cells were seeded and treated as for the cell viability assay. After 1 h of treatment, the cells were harvested in a chilled lysis buffer of 0,5 mM sodium metavanadate, 1 mM EDTA, and protease inhibitor mixture in phosphate-buffered saline. The proteins were

precipitated by trichloroacetic acid, washed three times with $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ acetone, and subjected to SDS-PAGE. Proteins (30 $\mu\text{g}/\text{lane}$) were separated on 12% gels and then transferred to nitrocellulose membranes. The membranes were blocked in 5% low fat milk for 1 h at room temperature, then exposed to the primary antibodies at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ overnight at a dilution of 1:1,000 in blocking solution. Appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies were used for 2 h at room temperature and a 1:5,000 dilution. Peroxidase labeling was visualized with enhanced chemiluminescence (ECL) using an ECL Western blotting detection system (Amersham Biosciences). The developed films were scanned, and the pixel volumes of the bands were determined using NIH Image J software. All experiments were repeated four times.

Fluorescent Microscopy

Wild type or transfected WRL-68 cells were seeded to poly-L-lysine-coated (2.5–5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) glass coverslips and cultured at least overnight before the experiment. After subjecting the cells to the appropriate treatment (indicated in the figure legends), the coverslips were rinsed twice in phosphate-buffered saline then placed upside down on the top of a small chamber formed by a microscope slide and a press-to-seal silicone isolator filled with phosphate-buffered saline containing 4.5 g/liter glucose and 20 mM HEPES pH 7.4. Cells were imaged with an Olympus BX61 fluorescent microscope equipped with a ColorView CCD camera and analySISR software using a 60 \times objective and epifluorescent illumination. For GFP fluorescence, 450–490 nm excitation and ~ 520 nm emission (green) filters were used. For JC-1 fluorescence, the cells were loaded with the dye for 10 min, then the same microscopic field was imaged first with 546 nm bandpass excitation and ~ 590 nm emission (red), then with green filters. Under these conditions we did not observe considerable bleed-through between the red and green images.

Animals

Wistar rats were purchased from Charles River Hungary Breeding Ltd. (Budapest, Hungary). The animals were kept under standardized conditions; tap water and rat chow were provided ad libitum. Animals were treated in compliance with approved institutional animal care guidelines.

Mitochondrial permeability transition

The mPT was monitored by following the accompanying large amplitude swelling via the decrease in absorbance at 540 nm [31] measured at room temperature by a Perkin–Elmer fluorimeter (London, UK) in reflectance mode. Briefly, mitochondria at the concentration of 1 mg protein/ml were preincubated in the assay buffer (70 mM sucrose, 214 mM mannitol, 20 mM N-2-hydroxyethyl piperazine-N'-2-ethanesulfonic acid, 5 mM glutamate, 0.5 mM malate, 0.5 mM phosphate) containing the studied substances for 60 s. Mitochondrial permeability transition was induced by the addition of 60 μ M Ca²⁺ or amiodarone, or HO-3538 at the indicated concentration. Decrease in E540 was detected for 20 min. The results are illustrated by representative original registration curves from at least five independent experiments, each repeated three times using mitochondria prepared from the same liver or pool of rat hearts.

Mitochondrial membrane potential

The membrane potential was monitored by fluorescence of Rh123, released from the mitochondria after the induction of permeability transition at room temperature by using a Perkin–Elmer fluorimeter at an excitation wavelength of 495 and an emission wavelength of 535 nm. Briefly, mitochondria at the concentration of 1 mg protein/ml were preincubated in the assay buffer (70 mM sucrose, 214 mM mannitol, 20 mM N-2-hydroxyethyl piperazine-N'-2-ethanesulfonic acid, 5 mM glutamate, 0.5 mM malate, 0.5 mM phosphate) containing 1 μ M Rh123 and the studied substances for 60 s. Alteration of the mitochondrial membrane potential was induced by the addition of HO-3538 at the indicated concentration. Changes in fluorescence intensity were detected for 4 min. The results are illustrated by representative original registration curves from five 837 Z. Bogner et al. / Free Radical Biology & Medicine 41 (2006) 835–848 independent experiments, each repeated three times using mitochondria prepared from the same liver or pool of rat hearts.

Determination of cytochrome c level by high-pressure liquid chromatography (HPLC)

The analysis of cyt-c was performed on a nonporous 33 \times 4.6-mm KOVASIL-MS C18 column (Zeochem AG, Uetikon, Switzerland). Separations were carried out on a Dionex

HPLC system consisting of a Dionex P 580 lowpressure gradient pump and a Dionex UVD 340S diode array detector (chromatograms were detected at 393 nm). The samples were injected by a Rheodyne 8125 injector equipped with a 20- μ l loop. Instrument control and data acquisition were carried out using Chromeleon data management software. The measurements were accomplished using gradient elution. Eluent A consisted of 10:90 acetonitrile:water + 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid and eluent B consisted of 90:10 acetonitrile: water + 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid. The applied gradient program was the following: 0 to 7 min, from 0% B to 70% B; 7 to 12 min, from 70% B to 100% B; 12 to 12.5 min, from 100% B to 0% B; 12.5 to 14.5 min, 0% B. The flow rate was 1 cm³ · min⁻¹. The column reequilibration was involved in the gradient program. Data acquisition was performed from at least three independent experiments.

Detection of antioxidant effect in cells

H9C2 cells were seeded into 96-well plates at a starting density of 2×10^4 cells/well and cultured overnight. The next day, the cells were exposed for 90 min to 1 mM H₂O₂ followed by two washings with phosphate-buffered physiological saline solution. The cells were then preincubated for 30 min in fresh medium containing HO-3538 or different antioxidants at the concentration of 10 μ M, and 1 μ M carboxy-H₂DCFDA was added to the medium for a further 1 h incubation. Fluorescence of carboxy-DCFDA oxidized stoichiometrically by the ROS was measured by using a fluorescence ELISA reader (BMG Laboratories, Offenbach, Germany) at excitation and emission wavelengths of 485 and 555 nm, respectively. All experiments were run at least four in parallel and repeated three times.

Heart perfusion

Hearts were perfused via the aorta as described before [12] in the absence or presence of different concentrations of HO-3538. After being washed (nonrecirculating period of 15 min), hearts were perfused under normoxic conditions for 10 min; the flow was subsequently discontinued for 30 min by inflating a balloon (ischemia), which was followed by 15 min of reperfusion. HO-3538 at the indicated concentrations was added at the beginning of the normoxic perfusion phase. Levels of high-energy phosphate

intermediates were monitored in the magnet of a ^{31}P NMR spectroscopy during the entire perfusion.

NMR spectroscopy

NMR spectra were recorded with a Varian UNITYINOVA 400 WB instrument. ^{31}P measurements (161.90 MHz) of perfused hearts were run at 37°C in a Z d SPEC 20-mm broadband probe (Nalorac Co., Martinez, CA, USA), applying WALTZ proton decoupling ($\gamma\text{B}2 = 1.6 \text{ kHz}$) during the acquisition only. Field homogeneity was adjusted by following the ^1H signal ($w1/2 = 10\text{--}15 \text{ Hz}$). Spectra were collected with a time resolution of 3 min by accumulating 120 transients in each free induction decay. Flip-angle pulses of 45° were used after a 1.25-s recycle delay, and transients were acquired over a 10-kHz spectral width in 0.25 s, and the acquired data points (5000) were zero-filled to 16,384. Under the above conditions, relative concentrations of the species are proportional to the corresponding peak areas, because interpulse delays exceeded four to five times the T_1 values of the metabolites that were analyzed in the ^{31}P experiments. Data were acquired from five independent experiments for each concentration of HO-3538.

Statistical analysis

Data are presented as means \pm SEM. For multiple comparisons of groups ANOVA was used. Statistical difference between groups was established by paired or unpaired Student's t test, with Bonferroni correction.

Conclusions

1. Several studies demonstrated that the different pharmacological PARP inhibitors have got beneficial effects in oxidative stress. We provided evidence that suppression of PARP-1 activation by small molecular weight inhibitor, by siRNA method, or by the transdominant expression of PARP-DBD protected cells from oxidative stress. Since the sequence of the siRNA and the PARP-DBD were based on the sequence of the nuclear PARP-1, the same cytoprotection by the pharmacological and non-pharmacological inhibition has proven that inhibition of the single-stranded DNA break-induced PARP-1 activation was responsible for the protective effect in oxidative stress rather than some side effect of the pharmacological inhibitor.
2. We provided evidence for undermining the classical view that cytoprotection by PARP inhibitors relies exclusively on the preservation of NAD^+ and consequently the ATP stores in oxidative stress. Inhibition of Akt activation by specific inhibitors in a significant extent counteracted the cytoprotective effect of PARP inhibitor, indicating that the PARP inhibition-induced Akt activation was very significantly responsible for the cytoprotective property of PARP inhibitors. We established that the benefit of PARP inhibition is mediated through two different processes in oxidative stress: the preservation of energetics of cells and activation of PI3K/Akt as a well-known survival signaltransduction pathway.
3. We synthesized numerous paramagnetic and diamagnetic amiodarone derivatives and screened their effects on the mitochondrial permeability transition. We found an amiodarone analogue HO-3538 in which an ethyl side chain is substituted with 1-hydroxy-2,2,5,5-tetramethyl-2,5-dihydro-1H-pyrrol-3-ylmethyl, which has been described to possess SOD-mimetic activity. HO-3538 completely inhibited the Ca^{2+} -induced swelling at low concentration furthermore did not induce mPT at higher concentration.
4. HO-3538, although had a less pronounced free-radical scavenging activity than its SOD-mimetic side chain, and some antioxidants, due to its mPT inhibitory activity combined to its SOD-mimetic activity, was much more effective protective effect in ischemia-reperfusion as well as in oxidative stress than any

other compounds tested including amiodarone. This proved that combined mPT inhibitory and free-radical properties within the same molecule might represent a useful approach in the therapy of oxidative damage related diseases.

List of Publications

Publications supporting the dissertation:

Antal Tapodi, Balazs Debreceni, Katalin Hanto, Zita Bogнар, Istvan Wittmann, Ferenc Gallyas, Jr., Gabor Varbiro, and Balazs Sumegi: Pivotal role of Akt activation in mitochondrial protection and cell survival by poly(ADP-ribose)polymerase-1 inhibition in oxidative stress. *J Biol Chem.* 2005 Oct 21;280(42):35767-75.

Zita Bogнар , Tamas Kalai , Anita Palfi , Katalin Hanto , Balazs Bogнар , Laszlo Mark , Zoltan Szabo , *Antal Tapodi* , Balazs Radnai, Zsolt Sarszegi , Arpad Szanto, Ferenc Gallyas Jr. , Kalman Hideg , Balazs Sumegi, Gabor Varbiro a: A novel SOD-mimetic permeability transition inhibitor agent protects ischemic heart by inhibiting both apoptotic and necrotic cell death. *Free Radic Biol Med.* 2006 Sep 1;41(5):835-48.

Other publications:

Varbiro G., Toth A., *Tapodi A.*, Veres B., Gallyas F., Sumegi B.: The concentration dependent mitochondrial effect of amiodarone. *Biochem. Pharmacol.* (2003) 65(7):1115-28.

Gabor Varbiro, Ambrus Toth, *Antal Tapodi*, Zita Bogнар, Balazs Veres, Balazs Sumegi, and Ferenc Gallyas, Jr.: Protective effect of amiodarone but not N-desethylamiodarone on postischemic hearts through the inhibition of mitochondrial permeability transition *J Pharmacol Exp Ther.* 2003 Nov;307(2):615-25.

Abstracts, posters and presentations supporting the dissertation:

Varbiro, G., Veres, B., Gallyas, F., Tapodi, A., Sumegi, B.: A taxol közvetlen hatása a mitokondriális permeability transitionra és a szabadgyökképződésre. Sümeg, XXXI. Membrán-Transzport Konferencia, 2001. Május 22-25.

Tapodi, A., Veres, B., Varbiro, G., Gallyas, F., Sumegi, B.: Az amiodarone mitokondriális hatásai. Sümeg, XXXI. Membrán-Transzport Konferencia, 2001. Május 22-25.

Jakus P., *Tapodi A., Varbiro G.:* Amiodarone indukálta génexpressziós változások analízise DNS-chip technikával. Pécs, A Pécsi Akadémiai Bizottság Sejtbiológiai Munkabizottságának Doktorandusz Szimpóziuma, 2002. december 11.

Tapodi A., Veres B., Varbiro G., ifj. Gallyas F., Sumegi B.: Az amiodaron bifázisos mitokondriális hatásai. Siófok, X. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, 2002. Március 27-29.

Gallyas F., Varbiro G., Veres B., *Tapodi A., Sumegi B.:* A Taxol közvetlen módon gyakorol hatást egyes mitokondriális funkciókra. Debrecen, IX. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, 2001. Január 21-24

Other abstracts, posters and presentations

Varbiro G., *Tapodi A.*, Veres B., Gallyas F. Jr., Sumegi B.: The induction of COX-2 expression through an NFkB dependent pathway in liver cells by amiodarone. (Abstract)

Z. Gastroenterologie 5: (2002)

Varbiro, G., *Tapodi, A.*, Veres, B., Gallyas, F., Sumegi, B.: The induction of COX-2 expression through an NFkB dependent pathway in liver cells by amiodarone Balatonaliga, 44rd Annual Meeting of the Hungarian Society of Gastroenterology, 2002. June 4-8.

Veres B., *Tapodi A.*, Varbiro G., ifj. Gallyas F., Sumegi B.: PARP-gátlók hatása az LPS indukálta szepszisre. Sümeg, XXXII. Membrán-Transzport Konferencia, 2002. Május 21-24.

Tapodi A., Veres B., Varbiro G., ifj. Gallyas F., Sumegi B.: PARP-gátlók hatása oxidatív stresszben. Sümeg, XXXII. Membrán-Transzport Konferencia, 2002. Május 21-24.

Veres B., Varbiro G., *Tapodi A.*, ifj. Gallyas F., Sumegi B.: PARP-gátlók hatása a szeptikus sokkra. Siófok, X. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, 2002. Március 27-29.

Ifj. Gallyas F., Jun-Ichi Satoh, *Tapodi A.*, Varbiro G., Veres B.: Neurotranszmitter szintézis immortalizált sejtvonalakban. Siófok, X. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, 2002. Március 27-29.

Acknowledgement

I would like to thank prof. Dr. Balazs Sümegi the support, and guidance I received.

I would like to thank dr. Ferenc Gallyas Jr., associate professor the cooperation, assistance and advices.

I would like to thank dr. Gabor Varbiro, dr. Zita Bognar and dr. Katalin Hanto, colleagues and friends cooperation and completeing my work.

I would also like thank the technical help I recieved fom Isvanné Pásztor, Helena Halász, László Girán and Bertalan Horváth.

And last but not least I would like to thank my family the support and encouragment for completing my work.