

A farmakológiai PARP gátlás nukleáris és extranukleáris
hatásainak *in vitro* vizsgálata különböző tumorsejtes
modellekben, különös tekintettel a mitokondriális struktúra és
funkció változásaira

Doktori (PhD) értekezés tézisei

Dr. Cseh Anna Mária

Interdiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola

Doktori iskola vezetője: Prof. Dr. Sümegi Balázs

Programvezető: Prof. Dr. Sümegi Balázs

Témavezetők: Prof. Dr. Sümegi Balázs, Dr. Fábíán Zsolt

Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar



Università degli Studi di Padova



Pécs, 2019.

1. Bevezetés

1.1. A Poli(ADP-ribóz) polimeráz (PARP) enzim és működéséhez kapcsolt nukleáris és extranukleáris folyamatok

A PARP-1 enzim egy 116 kDa nagyságú fehérje, a PARP enzim család legismertebb tagja [1]. Aktivációja során DNS-kötő doménjén keresztül a PARP-1 felismeri cél-molekuláit majd 50-200 ADP-ribóz egységet köt azokhoz [2] [1]. Ezt a folyamatot poli(ADP-riboz)ilációnak nevezzük.

Számos repair molekula rendelkezik PAR-kötő motívummal, beleértve a bázis excíziós repair (BER), a nukleotid excíziós repair (NER) és a non-homologous end joining repair (NHEJ) fehérjéit, mely alapján elmondható, hogy a PARP-1-nek a repair folyamatok koordinátoraként alapvető szerepe van a dezoxiribonukleinsav (DNS) károsodások kijavításában [3] [4] [5] [4, 6]. Mindemellett, mind *in vitro*, mind *in vivo* kísérletek arra világítottak rá, hogy a poli(ADP-riboz)iláció a DNS repairen kívül számos, repair-független fiziológiás és patofiziológiás folyamatban elengedhetetlen szerepet játszik [3] [7]. Ezek kapcsán mára már világossá vált, hogy transzkripciós faktorok PARilációjával a PARP-1 többek között befolyásolja gyulladásozó fehérjék, mitokondriális elektron transzport lánc elemek és mitokondriális transzkripciós faktorok működését [8], ezen felül a PARP-1 szerepére világítottak rá olyan fontos jelátviteli folyamatokban, mint az AKT/PKB jelátvitel és a MAPK (mitogen-activated protein kinase, mitogén-aktivált protein kináz) kaszkád [9] [10] [11] [12].

1.1. A PARP gátlás terápiás jelentősége

A PARP gátlás számos tumorban, DNS károsító ágens adásával együtt kromoszóma instabilitáshoz, sejtciklus megálláshoz és apoptózis indukcióhoz vezet [13-15]. Mindemellett, a fent említett extranukleáris folyamatokban leírt szerepével összhangban, a PARP gátlás védő hatását bizonyították többek között agyi iszkémiás folyamatokban, *Diabetes mellitusban*, miokardiális iszkémia-reperfúziós, vagy szeptikus shock modellben [16-18] [19]. Fontos és

érdekes kísérletes eredmény a PARP gátlás mitokondriális mechanizmusokra gyakorolt hatása, mely kapcsán előzetes kutatások során, intézetünkben is kimutattuk, hogy a PARP gátlók védik a mitokondriális membrán potenciál stabilitást oxidatív stresszben, számos jelátviteli útvonal aktiválásával [10, 20, 21]. A PARP inhibitorokkal kapcsolatban számos *in vivo* tumor terápiás vizsgálat vezetett biztató eredményhez, míg más klinikai eredmények ellentmondásosnak bizonyultak. Így például míg egy fázis I-es tanulmányban BRCA mutációval bíró petefészek- és prosztata karcinómában szenvedő betegekben az olaparib PARP gátló kezelés szignifikáns tumorelles hatását írták le, egy másik tanulmány nem mutatott szinergizmust az olaparib és dakarbazin között melanómában szenvedő betegeknél [22, 23]. Ehhez hasonlóan ellentmondásos eredményekhez vezetett az a fázis II vizsgálat ahol az olaparib hatásosnak bizonyult petefészek karcinómában szenvedő betegeknél de hatástalannak találták emlőkarcinómában, függetlenül attól, hogy az adott tumor típusban jelen volt-e BRCA mutáció vagy sem [24].

A felfedezés, hogy a PARP-1 a repair irányításán túl számos jelátviteli folyamatot befolyásol, és a repairtól függetlenül kötődik a kromatinhoz és poszttranszlációs modifikációs hatást gyakorolva a hisztonokra számos gén transzkripció indukciójához vezet, addig ismeretlen, PARP-1 mediálta funkciók új dimenzióját nyitotta meg és egyben magyarázatul szolgálhatott az egyes tanulmányokban megfigyelt terápiás sikertelenségekre.

2. Célkitűzések, kísérletes munkánk alapja

DNS repairben betöltött szerepe alapján a PARP-1 fontos onkológiai target terápiás célpont lehet, azonban a DNS repairen kívül számos, repair-független folyamatban is szerepet játszik. Ebből kiindulva logikusnak tűnik, hogy a PARP gátlók klinikai használata során nem számíthatunk egységes, sejt típustól vagy szervezettől független válaszra. Kísérletes munkánkban különböző sejtes tumor modelleken figyeltük meg a PARP gátlás hatását a MAPK kaszkádra, az AKT jelátvitelre és egyéb extranukleáris folyamatokra. Ezt követően

megvizsgáltuk a PARP gátlás sejt toxikus, illetve a mitokondriális struktúrára és funkcióra kifejtett hatását. Munkánkkal célul tűztük ki:

- A HO3089 és PJ34 PARP gátlók hatásának vizsgálatát a tumor sejtek kolónia formációs képességére önmagukban és kiegészítve citosztatikus kezeléssel vagy irradiációval.
- A PARP gátlás hatásának vizsgálatát különböző jelátviteli mechanizmusokra, köztük MAP kinázokra, illetve pro-és antiapoptotikus faktorokra.
- A PARP gátlás hatásának vizsgálatát a mitokondriális struktúrára és funkcióra önmagában és kemoterápiás szerekkel kombinálva.

3. Anyagok és módszerek

3.1. Sejtvonalak és sejtkultúra feltételek, reagensek

Kísérletes modellként egér B16F10 melanóma, humán A549 tüdő tumor, humán U251 glioblasztóma és az egér 4T1 emlő adenokarcinóma (American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) sejtvonalakat használtunk. Kísérleteink során a PARP gátló PJ34-t 10 μM , a temozolomide-t 25 μM , a ciszplatin-t 25 μM , a PARP gátló HO3089-t 10 μM , PD98059 MAPKK inhibitor 4 μM , SB203580 p38 inhibitor 1.2 μM , LY294002 PI3K (phosphatidylinositol 3-kinases) inhibitor 10 μM és JNK II inhibitor 1 μM koncentrációkban alkalmaztuk. A felhasznált anyagokat a Sigma-Aldrich (S.r.l., Milan, Italy) cégtől rendeltük, a HO3089 PARP inhibitor kivételével, mely Professzor Hideg Kálmán nagyvonalú ajándéka volt, a PD98059, SB203580, LY294002 és JNK II inhibitorok kivételével melyeket a Calbiochem cégtől rendeltük (Darmstadt, Germany) és a pPARPGFPC1/N3 konstrukt kivételével, mely Dr. Debreceni Balázs munkájának eredménye. A dsRED plazmid mitokondriális target szekvenciát tartalmaz az 5' végén, mely által lehetővé teszi a mitokondriális struktúra változás monitorozását. A pPARPGFPC1/N3 konstrukt a PARP-DBD modul transzdomináns expressziója által PARilációra képtelen domináns negatív PARP enzimként hat, mely a PARP

gátló lókuszkokhoz kötődik [25] [20]. A telekobalt külső besugárzást külső irradiációs géppel (Teratron 780C, 1.25 MeV) végeztük 2.0 vagy 4.0 Gray sugár erősséggel.

3.2. MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) Assay

A sejtek mitokondriális NADPH reduktáz aktivitás változásának vizsgálatára MTT tesztet alkalmaztunk. Ennek során a sejteket 96 lyukú lemezekben ültettük ki 2.5×10^4 sejt/számban és egy éjszakán át tenyésztettük a kezelések megkezdése előtt. A kezeléseket követően a médiumot lecseréltük 0.5% MTT tetrazolium szubsztrátot tartalmazó friss médiumra és 3 órán keresztül inkubáltuk. A vízben oldhatatlan formazan-ibolya precipitátumot 100 μ l 20% nátrium dodecil szulfát oldatban oldottuk fel és az optikai denzitásokat Infinite 200 Pro plate readerrel olvastuk le (Tecan Italia S.r.l., Milan, Italy) 570 nm hullámhosszon.

3.3. Kolónia formáció vizsgálat

A sejtek kolónia formációs képességének meghatározása végett a B16F10, U251 és 4T1 sejteket 6-lyukú lemezekben szélesztettük 300 sejt/lyuk denzitásban, majd a jelölt kezeléseket követően 7 napig inkubáltuk. Ezt követően a kolóniákat Coomassie blue (Bio-Rad Laboratories S.r.l., Milan, Italy) festékkel festettük, a lemezeket beszkeneltük majd a kolóniákat ImageJ software segítségével számoltuk meg.

3.4. Sejthalál analízis

A kezelések sejthalált indukáló hatásának vizsgálatára Flow citometriás vizsgálatot végeztünk Annexin-V (apoptotikus sejtek) és Propidium jodid (nekrotikus sejtek) jelölést követően. A B16F10 sejteket 6-lyukú lemezekben szélesztettük, majd a kezeléseket követően a mintákat FITC-el jelölt Annexin-V és Propidium-jodid (eBioscience, Life Technologies, Milan, Italy) festékekkel jelöltük a gyártó leírásának megfelelően. A sejthalált flow citométerrel vizsgáltuk FACS Calibur flow citométer (Becton Dickinson Italia S.r.l., Milan, Italy) segítségével, az adatokat CellQuest Pro software segítségével értékeltük.

3.5. Comet Assay

A kezelésekre létrejövő DNS fragmentáció vizsgálatára Comet assay-t alkalmaztunk. A B16F10 sejteket 6-lyukú lemezekben szélesztettük, a kísérleteket követően a sejteket összegyűjtöttük, centrifugáltuk, alacsony olvadáspontú PBS-ben oldott agarózzal kevertük össze majd a szuszpenziót az előkezelt üveglemezekre pipettáztunk és az üveglemezeket elektroforetizáltuk. Az üveglemezeket Hoechst 33342-el festettük, és Nikon Eclipse Ti-U fluoreszcens mikroszkópban Spot RT3 kamerával 60x objektív alatt vizsgáltuk. Comet attribútumokat ImageJ 1.43f software segítségével elemeztük.

3.6. Magfragmentációs vizsgálat

Az apoptózis folyamatának vizsgálatára kvantifikáltuk az apoptotikus nukleuszok jelenlétét. A B16F10 sejteket 96 lyukú lemezen szélesztettük majd a kezeléseket követően Hoechst 33342-el festettük. A sejtmagokat Nikon Eclipse Ti-U fluoreszcens mikroszkóp Spot RT3 kamerájával, 4× és 20× objektívekkel vizsgáltuk. A kondenzált, illetve fragmentált apoptotikus morfológiájú sejtmagokat ImageJ software segítségével (NIH) kvantifikáltuk.

3.7. Mitokondriális morfológia analízis

Az egyes kezelések hatására létrejövő mitokondriális morfológia változások meghatározására a B16F10 sejteket pDsRed2-Mito és/vagy pPARPGFPC1/N3 plazmidokkal transzfektáltuk majd a mitokondriumok morfológiáját konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk (IMIC Andromeda system, Fondis Electronic) 60× objektívvel. A mitokondrium hosszúságokat legalább sejtenként 10 mitokondrium manuális megméréssel határoztuk meg, ImageJ software (NIH) segítségével. Minden mintában legalább 20 sejtet analizáltunk.

3.8. Tetramethyl-rhodamine methyl ester (TMRM) time-laps fluoreszcens képalkotás

Az egyes kezelések hatására létrejövő mitokondriális membrán potenciál változások meghatározására a TMRM time-laps fluoreszcens vizsgálatot alkalmaztuk. A kezeléseket

előzetes irodalmi adatokból kiindulva végeztük [26]. A sejteket 10 nM TMRM (Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)-ben oldva, kiegészítve 10 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic sav (HEPES) és 1 μ M P-glikoprotein inhibitor ciklosporin H kezeléssel, 5% CO₂ tartalmú 37 °C-os inkubátorban 30 percen át inkubáltuk. A TMRM fluoreszcencia szekvenciális felvételeket 60 másodpercenként vettük fel, IMIC Andromeda rendszer használatával, 30 percen keresztül. A légzési lánc működésének vizsgálatára a sejteket 5 perccel a mérés megkezdését követően 2 μ M oligomicinnel kezeltük. Depolarizációs kontrollként a sejteket 25 perc után 2.5 μ M karbonilcianid p-trifluoro-metoxifenil hidrazon (FCCP) oldattal kezeltük. Az egyes mitokondriális hálózati régiók TMRM fluoreszcencia kiértékelése ImageJ program (NIH) segítségével történt.

3.9. Immunoblot analízis

Az egyes kezelések hatására létrejövő fehérje expressziós változásokat Western blottal vizsgáltuk. A B16F10 sejteket 1% proteáz inhibitor koktél és 10% Phos-stop foszfatáz inhibitor keverékkel kiegészített (Roche, Sigma-Aldrich S.r.l., Milan, Italy) hideg RIPA lízis pufferben gyűjtöttük össze, majd a fehérjéket (20 μ g/zseb) 3%–8% Tris-acetát vagy 4%–12% Bis-Tris (NuPAGE, Life Technologies, Milan, Italy) poliakrilamid géleken (Life Technologies, Milan, Italy) szeparáltuk és PVDF membránra (Merck, Sigma-Aldrich S.r.l., Milan, Italy) blottoltuk, amelyet előzetesen tris-buffered saline (TBST)-t tartalmazó 0.1 % Tween-20-ben oldott 5% marha szérum albumin (BSA) oldatban szobahőmérsékleten blokkoltunk 1 órán át. Az elsődleges OPA1 (Becton Dickinson Italia S.r.l., Milan, Italy, 1:1000), β -Aktin (Sigma-Aldrich S.r.l. Milan, Italy 1:10 000) és PAR (Santa Cruz Biotechnology, 1:500) antitesteket TBST-t tartalmazó 5% BSA oldatban oldottuk. A membránokat a torna-peroxidázhoz kötött nyúl, egér vagy patkányban termeltetett másodlagos antitestekkel (Bio-Rad Laboratories S.r.l., Milan, Italy) 1:3000 arányban TBST-t tartalmazó 5%-os tejben hígítva szobahőmérsékleten inkubáltuk 1 órán keresztül. A peroxidáz jelölést

enhanced chemiluminescence substrate” (Life Technologies, Pierce, Milan, Italy) segítségével hívtuk elő Image Quant mini Luminescent Image Analyzer 4000 (GE Healthcare Italia S.r.l., Milan, Italy) előhívó gépben. Az U251 és 4T1-es sejteken végzett kezelések esetében 24 órás inkubációs időt követően a sejteket hideg lízis pufferben (0.5 mM nátrium metavanadát, 1 mM etiléndiamintetraacetát [EDTA], proteáz inhibitor koktél, foszfát pufferes sóoldatban, pH: 7.4) gyűjtöttük össze. Teflon/üveg homogenizátorral homogenizáltuk majd centrifugáltuk a sejtszuszpenziót, és Laemli oldattal 1mg/ml fehérje koncentrációjú oldattá egyenlítettük ki. A fehérjéket (50 µg/zseb) 12% nátrium dodecil szulfát poliakrilamid gél elektroforézisre (SDS PAGE) alkalmas gélen választottuk szét és nitrocellulóz membránra vittük át. A membránokat előzetesen 5% alacsony zsírtartalmú tejben blokkoltuk 1 órán át szobahőmérsékleten, majd Akt-1, foszfospecifikus Akt-1 Ser473, Bax, BCL-2, foszfospecifikus Erk1/2 Tr202/Tyr204, foszfospecifikus p38 MAPK Tr180/Tyr182 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), PARP-1, PAR (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany), foszfospecifikus SAPK/JNK Tr183/ Tyr185 (RandD Systems, Abingdon, UK), foszfospecifikus p53 Ser15 (PromoKine, Heidelberg, Germany), caspase-3, foszfospecifikus Raf1 Ser338, p21 (Termo Scientific, Runcorn, UK) és β-Aktin (Sigma Aldrich Co, Budapest, Hungary) antitestekben inkubáltuk 4 °C-on egy éjszakán át, 1:1000 dilúcióban 5% marha szérum albumin, 1 trisz(hidroximetil) aminometán pufferes sóoldat és 0.1% Tween20 oldatában. A megfelelő tormagyökér peroxidázhoz kapcsolt nyúlban (1:3000, Bio-Rad, Budapest, Hungary), egerben (1:5000, Sigma Aldrich Co, Budapest, Hungary) és patkányban (1:5000, Enzo Life Sciences, Lörrach, Germany) termeltetett másodlagos antitestekben a membránokat 1 órán keresztül inkubáltuk szobahőmérsékleten. A peroxidáz jelölést enhanced chemiluminescence (ECL)- el vizsgáltuk ECL Western blot detektációs rendszer (GE Healthcare, Freiburg, Germany) alkalmazásával. A beolvasás után a pixel denzitásokat ImageJ (NIH) programmal elemeztük.

Az egyes fehérje jelölések pixel denzitásait az adott membránon alkalmazott loading kontrollhoz normalizáltuk és a megfelelő kontroll százalékos arányában fejeztük ki.

3.10. Statisztikai analízis

Az adatokat egy-utas ANOVA-val analizáltuk Tukey *post hoc* teszttel (alfa = 0,05; $n \geq 3$). A szignifikáns különbségeket * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ módon jelöltük. Az U251 és 4T1 sejtvonalakon történt kezelések esetében kétfaktoros variancia analízist és páratlan mintás Student *t*-tesztet végeztünk a csoportok összehasonlításához. A 0.05 alatti *p* értékeket szignifikánsnak vettük. Az adatokat minimum 3 független kísérlet eredményéből nyertük.

4. Eredmények

4.1. A PARP gátlás és irradiáció hatása az A549 sejtek kolónia formációs kapacitására

A HO3089 PARP gátló jelentősen csökkentette az A549 sejtek kolónia képző kapacitását önmagában, és besugárzással kiegészítve is. A 2 és 4 Gray-jel történő besugárzás HO3089 kezelés nélkül vagy annak jelenlétében átlagosan 60.98%, 20.73%, 25.61% és 4.88%-ra csökkentette le a kolóniák arányát a kontroll csoporthoz képest.

4.2. A PARP gátlás és a besugárzás hatása a MAP kinázokra és a pro-és anti-apoptotikus faktorokra A549 humán tüdő adenokarcinóma sejtvonalon

A HO3089 PARP gátló A549 sejtekben kifejtett irradiációt érzékenyítő hatásának hátterében rejlő biokémiai folyamatok megértéséhez megvizsgáltuk a fehérje expressziós és aktivációs változásokat 24 órával a besugárzást követően. A pro-apoptotikus kaszpáz-3 fehérje hasított formájának emelkedését figyeltük meg minden kezelésben a kontroll csoporthoz képest. Az AKT foszforiláció megemelkedett a besugárzott sejtekben, a PARP gátló kezeléstől függetlenül. A PARP gátlás önmagában is p53 aktivációt okozott, mely még nyilvánvalóbb volt sugár kezeléssel kiegészítve, a sugárzás mértékének növelésével párhuzamosan. A caspase-3 hasítással összhangban, megnövekedett p21 foszforilációt figyeltünk meg a besugárzott

sejtekben, függetlenül a PARP gátló kezelés jelenlététől. A pro-apoptotikus szignalizációs jelátvivő BAX megemelkedett expresszióját figyeltük meg minden kezelésben. Másrészt az anti-apoptotikus BCL-2 szintje lecsökkent minden kezelésben, kivéve, ha a HO3089 kezelést önmagában alkalmaztuk. Az A549 sejtvonalban a Raf-1 foszforiláció, a kontroll csoporton kívül minden egyéb kezelés esetén detektálható volt. A HO3089 kezelés következményeként, csakúgy, mint a besugárzás hatására, ERK1/2 foszforilációt figyeltünk meg, összhangban a Raf-1-foszforilációval, amely az ERK1/2 „upstream” regulátora. A JNK/SAPK foszforiláció dóziszfüggő csökkenését figyeltük meg besugárzás esetén. Mindeközben a p38 MAPK foszforilációja is detektálható volt besugárzás hatására.

4.3. A PARP gátlás és sugárkezelés hatása a MAP kinázokra és a pro és antiapoptotikus faktorokra 4T1 egér emlő karcinóma sejtekben

A foszfo p53 szintet a HO3089 önmagában nem befolyásolta, azonban sugárkezelés hatására a foszforilációja megnőtt. Nem találtunk szignifikáns BCL-2 expressziós emelkedést a kizárólag HO3089-el kezelt sejtekben, ezzel szemben szignifikáns csökkenést figyeltünk meg besugárzást követően (32% és 54%-os frakció csökkenés a kontrollhoz képest). A HO3089 önmagában nem befolyásolta a BAX expressziót, azonban ez esetben is szignifikáns emelkedést figyeltünk meg besugárzást követően (átlagos 68%, 76%, 72%, és 75%-os emelkedés). Az ERK1/2 foszforilációban csak a HO3089-el előkezelt majd sugárzásnak kitett sejtek esetén figyeltünk meg változást (69% és 81-os átlagos változás). JNK foszforilációt detektáltunk mind PARP gátlás mind pedig sugárkezelés esetén (58% és 164% átlagos emelkedés a kontroll csoporthoz képest). A p-p38 szint szignifikáns emelkedését figyeltük meg mind a HO3089 és besugárzás alkalmazásakor külön-külön, az alkalmazott dózistól függetlenül (62% és 107%-os átlagos emelkedés).

4.4. A MAPK inhibitorok hatása a PARP inhibíció okozta sugárzás-érzékenység növekedésre A549, 4T1 és U251 sejtekben

Szelektív inhibitorok használatával vizsgáltuk meg az egyes MAPK fehérjék kölcsönhatását a HO3089-el mindhárom sejtvonalon. A HO3089 előkezelés ellentétes hatással volt a sejtproliferációra az A549 és 4T1 sejtvonalakon, ezzel szemben nem volt hatással az U251 sejtvonagra. A MAPK inhibitorral végzett kezelések közül, míg az ERK1/2 gátlás HO3089 előkezeléssel együtt szignifikánsan javította a sejtek klonogenitását az A549 és U251 esetén, ellenkezőleg hatott a 4T1 sejtekben. Mindeközben a p38 inhibitorral lényeges kolónia formációs készség növekedést értünk el a 4T1 sejtekben HO389 együttes alkalmazása esetén. Ez a hatás nem volt jellemző a másik két sejtvonagra. A JNK inhibitor szignifikánsan gátolta a PARP gátlás általa kiváltott kolónia formáció csökkenést vagy emelkedést A549 és 4T1 sejtekben, míg nem volt hatással az U251 sejtekre.

A PARP és MAPK inhibitorok közötti kapcsolat meghatározását követően, a MAP kináz inhibitorok és a besugárzás kölcsönhatását kívántuk megvizsgálni. A besugárzás használata 2 és 4 Gy esetén is szignifikánsan csökkentette a különböző sejtvonalakban a kolónia formációs kapacitást. Ez a hatás csökkent az ERK1/2 inhibitor használatakor, mely esetén szignifikáns kolónia formációs készség javulást mértünk az A549 és U251 sejtekben, a megfelelő, besugárzott de ERK1/2 inhibitorral nem kezelt csoportokhoz képest. A kolónia képződés szignifikáns növekedését tapasztaltuk ezekben a csoportokban JNK inhibitor alkalmazása esetén is a megfelelő besugárzott csoportokhoz képest, a 4T1 sejtekben ugyanakkor a besugárzott dózis mértékétől függően a klongenitás vagy nem változott vagy kissé csökkent. A p38 MAPK inhibitor megnövelte a 4T1 besugárzott sejtekben a kolóniák számát, míg a másik két sejt típusra nem volt hatással.

A besugárzást megelőző HO3089 kezelés szignifikánsan csökkentette a sejtek proliferációs készségét minden sejtvonalon. A kombinációs kezelés ERK1/2 gátlással kiegészítve

elősegítette a kolónia formációs készséget az A549 és U251 sejtekben. Szignifikáns kolónia formáció növekedést figyeltünk meg a JNK/SAPK gátlás esetén is, azonban ez a hatás még A549 sejtekben jelen volt alacsony dózisu besugárzás esetén is, az U251 és 4T1 sejtekben csak magasabb dózisok esetén volt tapasztalható. A 4T1 sejtek proliferációja jelentősen növekedett p38 MAPK inhibitor alkalmazása esetén; a kolóniák számának jelentős növekedését találtuk a 2Gy-jel besugárzott, HO3089-el előkezelt 4T1 sejtekben, azonban a magas dózisu besugárzás hatása még jelentősebb volt a p38 MAPK inhibitorral kezelt 4T1 sejtek esetén.

Az előző kísérletes munkáink során részletezett jelátviteli útvonalak kapcsolatot jelenthetnek a PARP gátlók nukleáris és extranukleáris hatásai között, lehetséges közvetítői lehetnek a PARP gátlók használata kapcsán megfigyelt mitokondriális változásoknak. A számos adat, mely a PARP-1 felfedezése óta bizonyította annak hatását a mitokondriális metabolizmusra, ill. az, hogy a PARP gátlás kapcsán olyan mitokondriális védő hatások figyelhetők meg, mint például a mitokondriális membrán potenciál megtartás, csökkent oxigén/glükóz fogyasztás vagy a csökkent ROS koncentráció, arra adott elméleti alapot, hogy a következőkben megfigyeljük a PARP gátlás mitokondriális struktúrára és funkcióra gyakorolt hatását [27]. A PARP inhibitorok citotoxicitást fokozó hatása ciszplatin és temozolomide együttes használatakor számtalan tumorsejtes modellből ismert [28, 29]. Kísérleteink során B16F10 egér melanóma sejteket ciszplatinnal vagy temozolomide-dal kezeltük önmagukban vagy PJ34-el kiegészítve, és megfigyeltük hatásukat a B16F10 sejtek kolónia formációs kapacitására és túlélésére.

4.5. PJ34 és ciszplatin vagy temozolomide kezelés hatása a B16F10 sejtek túlélésére és kolónia formációs készségére

A PJ34 és ciszplatin illetve PJ34 és temozolomide kombinációs kezelések, illetve ezen ágensek önmagukban mutatott sejttúlélést befolyásoló hatásának vizsgálatához a sejteket Annexin-V^{FITC} és propidium jodiddal jelöltük és Flow citométeres analízist végeztünk. Azt találtuk, hogy sem a citosztatikus ágensek sem pedig a PJ34 nem fejtett ki citotoxikus hatás az első 24 órában. 48

órás kezelést követően a PJ34 enyhe, de nem szignifikáns citotoxicitást okozott, ami tovább emelkedett 72 órás kezelés során. Hasonló eredmény volt megfigyelhető a ciszplatinnal kezelt sejtek esetén, ahol 72 órás kezelésnél szignifikáns sejt túlélés csökkenést tapasztaltunk. Ez a hatás még kiemelkedőbb volt a PJ34-ciszplatin kombinációval 48 és 72 órán át kezelt sejtek esetén. A ciszplatinnal szemben, a temozolomide nem mutatott citotoxikus hatást a B16F10 sejtekben. Az apoptotikus (Annexin V pozitív) és nekrotikus (propídium jodid pozitív) sejtek arányának vizsgálata során azt találtuk, hogy 48 órás kezelés hatására a PJ34 és ciszplatin kombinációs kezelés szignifikáns emelkedést okozott az Annexin V-pozitív sejtek arányában. 72 órával a kezelés megkezdése után a temozolomide kivételével minden kezelés szignifikánsan megnövelte az apoptózis mértékét: kombinációban kifejezettebben, mint önálló kezeléseknél. Nem figyeltünk meg szignifikáns változást a nekrosis mértékében.

A PJ34, ciszplatin és temozolomide kezeléseknél citosztatikus hatásának vizsgálatához kolónia formációs vizsgálatot végeztünk. Azt tapasztaltuk, hogy mind a PJ34 mind pedig a ciszplatin lecsökkentette a B16F10 sejtek kolónia formációs kapacitását nem úgy, mint a temozolomide, mely nem volt rá hatással.

4.6. A PJ34 és ciszplatin vagy temozolomide kombinációs kezeléseknél a sejthalálra és a nukleáris fragmentációra B16F10 melanóma sejtekben

A PJ34 és ciszplatin illetve PJ34 és temozolomide kombinációs kezeléseknél, illetve ezen ágensek sejthalál indukáló hatásának hátterében álló mechanizmusok vizsgálatához a sejteket 4 és 24 órás kezelésnek tettük ki majd Comet assay-t végeztünk. Eredményeink szerint minden kezelés DNS fragmentációt okozott. A temozolomide-dal kezelt sejtek hasonló mértékben mutattak DNS károsodást, mint a PJ34 esetében, azonban a leghatásosabb kezelést a ciszplatin esetén figyeltük meg. A PJ34-gyel és ciszplatinnal vagy temozolomide-dal kezelt B16F10 sejtekben további DNS törés növekedést észleltünk, amely kifejezettebb volt a PJ34-temozolomide kombinációs kezelés esetén.

A következőkben kvantifikáltuk a ciszplatinnal vagy temozolomide-dal önmagukban vagy PJ34-gyel kiegészített kezelésnek alávetett sejtek apoptotikus sejtmagjainak számát. Azt találtuk, hogy a ciszplatin megnövelte az apoptotikus morfológiájú sejtmagok számát a B16F10 sejtekben. Meglepő módon, a PJ34 nem befolyásolta ezt a hatást az első 24 órában. A PJ34 és temozolomide kombinációs kezelés jelentősebb apoptotikus nukleáris morfológia változáshoz vezetett mint a temozolomide önmagában. 48 órás kezelést követően a PARP gátlás megnövelte az apoptotikus morfológiájú sejtek számát, ami még kifejezettebb volt ciszplatinnal együtt alkalmazva.

Összefoglalva elmondhatjuk, hogy a flow citometriás és nukleáris morfológiával kapcsolatos kísérleteink során a ciszplatin és a temozolomide különböző mértékű citotoxikus hatást váltott ki a B16F10 sejtekben. Míg a ciszplatin jelentős korai apoptotikus választ indukált, a temozolomide hatása fokozatosan jött létre. A PJ34-en keresztül kifejtett PARP-1 gátlás növelte mind a ciszplatin mind pedig a temozolomide citotoxikus hatását, melyet apoptotikus változásokra jellemző Annexin V kötődés és apoptotikus nukleáris morfológia kísért.

4.7. A PJ34 és ciszplatin vagy temozolomide kezelés hatása a mitokondriális fragmentációra B16F10 sejtvonalon

A B16F10 sejtekkel mitochondria-directed red fluorescent proteint (B16F10^{mtRFP}) expresszáltattunk, ciszplatinnal, temozolomide-dal önmagukban vagy PJ34 kezeléssel kiegészítve kezeltük őket és megvizsgáltuk a mitokondriális hálózat integritását.

A ciszplatin és a temozolomide egyaránt már rövid, 4 órás kezelésnél is mitokondriális fragmentációt okoztak. A PJ34 lecsökkentette a ciszplatin és temozolomide mitokondriális állományra kifejtett hatását, megőrizve az összefüggő fuzionált állományt. Ez a mitokondriális hatás, a kezeléseket követően legalább 48 órán át megfigyelhető volt. Annak érdekében, hogy meggyőződjünk arról, hogy a PJ34 kezelést követő hatások a PARilációs aktivitás gátlásának köszönhetőek-e, a B16F10^{mtRFP} sejteket a PARP-1 enzim N-terminális DNA-kötő doménjét

expresszáló GFP-jelölt plazmiddal transzfektáltuk (PARP^{DN}). A ciszplatin vagy temozolomide-dal kezelt sejtekben a PARP^{DN} ellensúlyozta a citosztatikus szerek mitokondriális struktúra roncsoló hatását, alátámasztva a feltételezést, hogy a PJ34 mitokondriális hatásait az endogén poli(ADP)riboziláció lecsökkentésével fejtí ki.

4.8. A PJ34 és ciszplatin vagy temozolomide kezelések hatása az OPA1 rövid versus hosszú izoformák arányára B16F10 sejtekben

A PJ34 mitokondriális morfológiára kifejtett védő hatások hatásmechanizmusának vizsgálatára kvantifikáltuk a mitokondriális dinamika egyik fő regulátorának, a Dynamin-like 120 kDa mitochondrial protein OPA1-nek rövid és hosszú izoformáit (S-OPA1, L-OPA1). A kezelések első 24 órájában sem az OPA1 rövid, sem pedig hosszú izoformáinak expressziójában nem mértünk változást. Ezzel szemben S-OPA1 frakció növekedést tapasztaltunk a PJ34-gyel és ciszplatinnal 48 órán át kezelt sejtek esetén. Mivel az S-OPA1 akkumulációt nem kísérte mitokondriális fragmentáció, a ciszplatin, temozolomide és PJ34-indukálta mitokondriális morfológia változások nagy valószínűséggel nem az OPA1 fehérje által közvetítődnek.

4.9. A PJ34 és ciszplatin vagy temozolomide kezelések hatása a mitokondriális membrán potenciálra (ψ_m)

A mitokondriális struktúra és funkció kapcsolatának vizsgálatára a következőkben megvizsgáltuk a mitokondriális membrán potenciál változást a ciszplatinnal, temozolomide-dal és PJ34-gyel kezelt B16F10 sejtekben. A mitokondriális légzési lánc épségének vizsgálatára a sejteket előzetesen az ATP szintetáz inhibitor oligomicinnel kezeltük.

Úgy találtuk, hogy sem a ciszplatin, sem a temozolomide, sem pedig a PJ34 nem befolyásolta önmagában a ψ_m -t. Érdekes módon, nem tapasztaltunk mitokondriális membrán potenciál összeesést azokban a sejtekben sem, ahol a PJ34 és ciszplatin vagy temozolomide kombinációs kezeléseket alkalmaztuk. Ehelyett, egy enyhe, de statisztikailag nem szignifikáns membrán hiperpolarizációt figyeltünk meg. Ennél még különösebb, hogy ez a trend temozolomide

jelenlétében még kifejezettebb volt, mint ciszplatin esetén. A mitokondriális membrán hiperpolarizációs folyamatok PARiláció függésének vizsgálatára megismételtük kísérleteinket a domináns negatív PARP-1 mutánssal (PARP^{DN}) transzfektált B16F10 sejteken. A ciszplatinnal vagy temozolomide-dal kezelt PARP^{DN}-t expresszáló B16F10 sejtekben kifejezetten megemelkedett membrán potenciál volt mérhető. Ez az eredmény arra enged következtetni, hogy a PJ34 és citosztatikus ágensekkel való kezeléseknél kitett B16F10 sejtekben észlelt citotoxikus hatások nem a membrán potenciál összeesésnek tudhatók be.

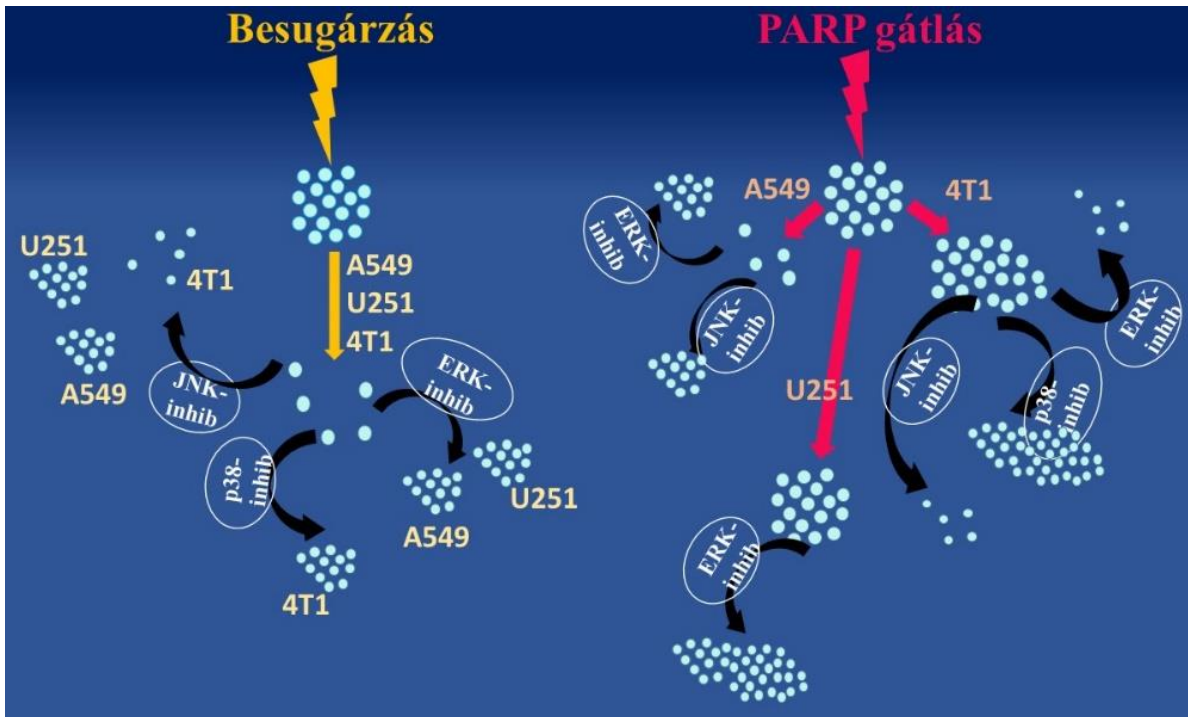
Kiegészítésképpen megvizsgáltuk az esetleges összefüggést a PJ34 mediálta citotoxikus hatásfokozás és a mitokondriális NAPH redukáló rendszer között, MTT assay segítségével, PJ34-gyel és ciszplatinnal vagy temozolomide-dal kezelt sejtekben. A mitokondriális membrán potenciál változással kapcsolatos megfigyeléseinkkel összhangban, nem találtunk változást a mitokondriális NADPH reduktáz aktivitásban a PJ34 PARP inhibitor jelenléte esetén.

5. Megbeszélés és következtetések

Az irodalomból jól ismert a PI3K-PTEN-Akt-mTOR, a Ras-Raf-MEK-Erk1/2 vagy a JNK/SAPK és p38 MAPK útvonalak aktivációjának jelentősége olyan biológiai folyamatokban mint az apoptózis, mitózis vagy a sejt differenciáció [30]. Ezen szignalizációs útvonalak aktivációjának és jelentőségének tesztelésére a PARP gátlást követő folyamatokban egyrészt megfigyeltük a részt vevő fehérjék aktivációs változását PARP gátlásra, illetve irradiációs kezelésre, másrészt megvizsgáltuk a sejtek klonogenitásának változását különböző MAPK inhibitorok alkalmazása során.

Az A549 sejtvonalban HO3089 és irradiációs kezelésre csökkent kolónia formációs kapacitást ellensúlyozta az, ha ugyanezeket a kezeléseket ERK gátlóval egészítettük ki. A 4T1 sejtekben a HO3089 kezelés kiegészítése ERK gátlóval csökkentette a kolónia formációs készséget, míg U251 sejtekben elősegítette azt. Nőtt az U251 és A549 sejtek kolónia formációs kapacitása amennyiben az irradiációval történő kezelést JNK inhibitorral egészítettük ki, míg a 4T1 sejtek

klonogenitása kevésbé csökkent JNK gátlásra. Amennyiben az A549 és 4T1 sejtek HO3089-el történő kezelését JNK inhibitorral egészítettük ki, megnövekedett a kolónia formációs készség az A549, míg lecsökkent a 4T1 sejtekben. A p38 MAPK inhibíció megnövelte a 4T1 sejtek klonogenitását mind HO3089 kezelést, mind irradiációt követően, míg az U251 vagy az A549 sejtekre nem volt hatással (1. ábra).



1. ábra. A besugárzás és PARP-gátlás hatása a humán A549 tüdő adenokarcinóma, humán U251 glioblastóma és az egér 4T1 emlő adenokarcinóma sejtek kolónia formációs készségére különböző MAPK inhibitorokkal történt kiegészítő kezelés jelenlétében vagy anélkül.

Besugárzás hatására mindhárom sejtvonalon egységesen csökkent a kolónia formációs kapacitás. Ezt kiegészítve JNK inhibitorral, 4T1 sejtekben 4Gy hatására tovább csökkent, míg U251 és A549 sejtekben visszaállt a kolónia formációs kapacitás. A besugárzást p38 inhibitorral kiegészítve megnőtt kolónia formációs kapacitást figyeltünk meg a 4T1 sejtekben, ERK inhibitor hatására pedig megnövekedett kolónia formációs kapacitást figyeltünk meg az A549 és U251 sejtekben.

A PARP gátlás hatására lecsökkent a kolónia formációs kapacitás az A549 sejtekben, nem mutatott szignifikáns változást U251 és megnőtt a 4T1 sejtek esetén. Ezt kiegészítve ERK inhibitorral megnőtt a kolónia formációs kapacitás az A549 és U251, míg lecsökkent a 4T1 sejtek esetén. JNK inhibitor hatására megnövekedett klonogenitást figyeltünk meg az A549 sejteken, míg lecsökkent klonogenitást tapasztaltunk a 4T1 sejtekben az önmagában történt HO3089 kezeléshez képest. p38 inhibitor hatására 4T1 sejtekben megnőtt kolónia formációs készséget tapasztaltunk az önmagában történt HO3089 kezeléshez képest.

Más irodalmi adatokkal összhangban mi is a sejtek kolónia formációs készségének extrém csökkenését találtuk - sejtípustól függetlenül- amennyiben a sugárkezelésnek kitett sejteket előzetesen HO3089-el kezeltük [31] [32].

Összesítve elmondható, hogy az A549 sejtekben a HO3089 és az irradiáció önmagukban is aktiválták az ERK1/2 útvonalat, és együttvéve az ERK inhibícióra mutatott klonogenitás növekedéssel, a Raf-1-ERK1/2 útvonalak aktivációjának így valószínűleg jelentős szerepe lehet az A549 sejtvonalon megfigyelt kolónia formációs készség csökkenésben. 4T1 sejtekben a HO3089 kezelésre megnőtt a JNK és p38 aktiváció és a p38 gátlásra megnőtt ezen sejtek klonogenitása, amiből arra következtethetünk, hogy ebben a sejtvonalban a p38 MAPK útvonalnak lehet lényeges kolonogenitást gátló szerepe.

A p53 fehérje többek között a mitokondrium külső membrán permeabilizálásáért, különböző proapoptotikus faktorok felszabadításáért felel, ezáltal a DNS károsodásokat követő intrinzik apoptotikus útvonal során általánosan megfigyelt jelenség a p53 aktivációja [33]. Ebből logikusan következik, hogy a tumorellenes szerek (beleértve az irradiációt) sikeressége és apoptózis indukáló készsége, nagyban függ attól, hogy a sejtek vad típusú p53-al rendelkeznek-e vagy sem [34] [33] [35]. A PARP gátlás elősegíti a p53 sejtmagból történő exportját, mely hozzájárul a sejthalál aktivációjához [36]. A pro- és antiapoptotikus folyamatok vizsgálata során A549 sejteken megnövekedett p53 foszforilációt találtunk, mely gyakori következménye a besugárzásnak és a PARP gátlásnak, ezen felül konstans BAX expresszió volt megfigyelhető, míg a BCL-2 expresszió csökkent amennyiben ezeket a sejteket PARP gátlóval kezeltük és irradiációnak is kitettük.

Az irradiációt követő, MAPK-kapcsolt szignalizációs mechanizmusok nagyban hozzájárulhatnak a pozitív terápiás eredmény kimeneteléhez, ezáltal gátlószerek alkalmazása fordított eredménnyel járhat és csökkentheti az antitumor hatást, ahogy azt több irodalmi adat is alátámasztotta [37] [38] [39] [40] [41] [42]. A MAPK inhibitorokkal és PARP gátlókkal végzett kezelésekre adott sejttípusonként eltérő válaszok, nemcsak arra hívják fel a figyelmet, hogy a sejt és szövettípusok figyelembe vétele nélkülözhetetlen egy-egy terápiás terv kidolgozása során, hanem megerősítik azokat az irodalmi adatokat is, melyek a PARP gátlás

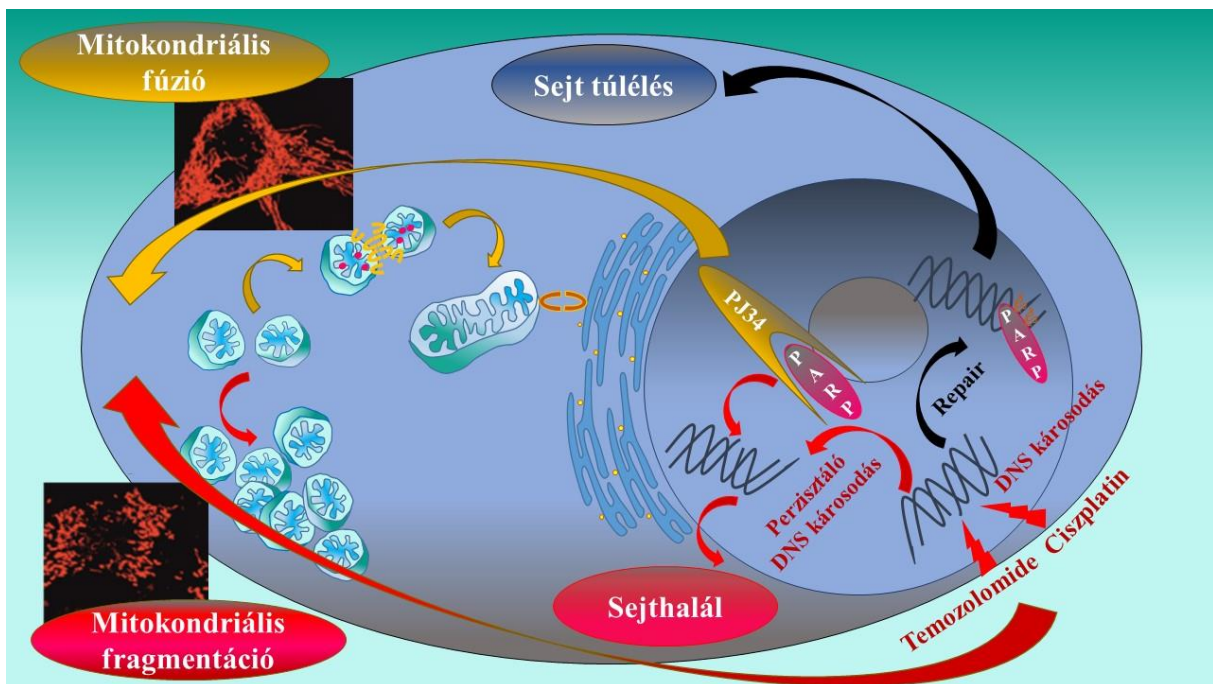
extranukleáris hatásainak fontosságára, ezek szükségszerű figyelembe vételére hívják fel a figyelmet, terápiás alkalmazás esetén.

A poli(ADP-ribozi)láció és a ciszplatin hatásának kapcsolata már évtizedekkel ezelőtt felmerült, a PARP-1 DNS-károsodás kijavításában játszott repair szerepére alapozva [43]. Jelen munkánkban két, a melanóma terápiában gyakran használt tumorterápiás szer, a ciszplatin és temozolomide hatását vizsgáltuk meg a PJ34 inhibitor jelenlétében, *in vitro* B16F10 egér melanóma sejtes modellben. Nagy különbséget találtunk a ciszplatin és temozolomide toxicitásban a B16F10 sejteken: míg a ciszplatin okozta citotoxicitás csak 72 óra után vált szignifikánssá, a temozolomide nem mutatott szignifikáns sejtpusztulást a B16F10 sejtekben. A PJ34 megnövelte mindkét szer citotoxikus hatását. Hasonló potencírozó hatást figyeltünk meg a PJ34 inhibitor alkalmazásakor a nukleáris fragmentáció, apoptózis vizsgálat és kolónia formációs vizsgálatok esetén.

Mivel a ciszplatinnal kezelt sejtekben crista vesztés és külső membrán szétesés figyelhető meg, a ciszplatinnal végzett kísérletes adatok citotoxicitásának háttérében alternatív effektorokat, mint például mitokondriális targeteket vetettek fel [44] [45]. A ciszplatinnal kezelt B16F10 sejtek mitokondriális morfológia analízise során mi is szétterjedt és robusztus mitokondriális hálózat szétesést találtunk, mely időben megelőzte a citotoxikus hatás kezdetét. Érdekes, hogy hasonló hatást találtunk a temozolomide-dal kezelt sejtekben is, annak ellenére, hogy ezt nem követte citotoxikus hatás a megfigyelt időintervallumban. A PJ34 megvédte a mitokondriális hálózat integritását a ciszplatin és temozolomide okozta fissionál szemben.

A mitokondriális dinamika egyik fő regulátora az OPA1, egy dinamin-szerű GTP-áz, mely a hosszú és rövid izoformáinak megtartásával biztosítja a mitokondriális állomány fiziológiás fúzióját [46] [47]. A PJ34 és citosztatikus szereknek kitett B16F10 sejtekben 48 órás kezelést követően az OPA1 hosszú és rövid izoformák arányának megbomlását találtuk. Habár ez az időpont egybeesik a citotoxikus hatások megnyilvánulásával, az ezt megelőző időpontokban

nem figyeltünk meg mitokondriális morfológiai változást. Ez az adat arra enged következtetni, hogy amennyiben az OPA1 hozzájárul a PJ34 okozta ciszplatin és temozolomide citotoxicitást növelő hatáshoz, azt nem a mitokondriális morfológiát meghatározó funkcióján keresztül teszi. A jelenlegi, széles körben elfogadott álláspont szerint, a mitokondriális fragmentáció jobbra stresszválaszt jelez a sejt részéről, míg a fúzió általában a sejt kiegyensúlyozott anyagcsere állapotára utal. Érdekes módon, kísérleteink során habár a PJ34 képes volt gátolni a mitokondriális fúziót, nem védte meg az apoptotikus folyamatoktól. Ebből a PJ34-nek a B16F10 sejtek túlélésében és a mitokondriális morfológia változásában betöltött egymástól független szerepeire következtethetünk.



2. ábra. A PARP gátlás hatása a B16F10 sejtekben. A temozolomide és ciszplatin okozta DNS károsodást a repair folyamatok kijavítják, melyek ezáltal elősegítik a sejt túlélését. A tumor kezelés sikerességét elősegítendő, a PJ34 meggátolja a repairt, ezáltal perzisztáló DNS károsodáshoz, végül sejthalálhoz vezet. Mindkét citosztatikus szer hatására mitokondriális fragmentációt figyeltünk meg, melyet a PJ34 kezelés ellensúlyozott, megtartva a mitokondriális állomány fuzionáltságát. *Az ábra a szerző műve mely a szövegben hivatkozott irodalmi adatok és a kísérletes eredményeink alapján készült.*

Összefoglalva, adataink azt sugallják, hogy a PARP gátlás ciszplatinnal és temozolomide-dal alkalmazott domináns, hosszú távú hatása a DNS károsodás, valószínűleg a repair gátlásával (2. ábra). Ez a feltételezés összhangban van előzetes irodalmi adatokkal, melyek szerint a PARP

gátlás végső hatását az összefüggő, adott sejten belüli molekuláris folyamatok összessége határozza meg [48]. A PARP gátlás még ugyanazon sejtes modellen belül is tapasztalt ellentétes hatásai azonban felhívják a figyelmet a PARP gátlók használatának gondos mérlegelésére a humán megbetegedésekben is.

6. Eredmények összefoglalása és egységes értelmezése

- **Átfogó vizsgálatot végeztünk három sejtvonalon különböző fehérje expressziós illetve foszforilációs változások és a sejtek klonogenitás változásának elemzésével, 3 MAPK inhibitor, PARP inhibitor és irradiációs kezelés alkalmazását követően.** A különböző kezelésekre adott eltérő klonogenitás készség az egyes sejtvonalakon alaposabb vizsgálatot kíván, azonban magyarázatul szolgálhat a tumor terápiás kezelése során megfigyelt eltérő kezelési eredményekre. Összesítve adatainkat elmondható, hogy kimutattuk, hogy az egyes MAPK inhibitorok a legtöbb kezelés esetében ellensúlyozták az irradiáció és PARP gátlás okozta klonogenitás csökkenést, amely az egyénre és tumor típusra szabott tumor-terápia fontosságára hívja fel a figyelmet.
- **Először mutattuk ki, hogy a PARP gátlás véd a ciszplatin vagy temozolomide okozta mitokondrium fragmentációval szemben, és felerősítette a mitokondriális légzést.** Ennek a megfigyelésnek nem elhanyagolható szerepe lehet egyes esetekben a PARP gátló kezelésekkel szemben megfigyelt terápiás ellenállással szemben.
- **Elsőként készítettünk átfogó vizsgálatot arról, hogy a PARP gátlás ugyanazon modellen belül párhuzamos sejtvédő és toxikus hatásokat indít el.** Vizsgálataink során a PARP gátlás mitokondriális struktúra és funkció védelmét jelző hatásait találtuk a ciszplatin és temozolomide-dal szemben rövid távú kezelése során. Ezzel párhuzamosan a PARP gátlás fokozta a felhasznált citotoxikus ágensek okozta sejthalál mértékét és csökkentette a sejtek kolónia formációs kapacitását. Ezeknek az egymással párhuzamosan

zajló de ellentétes folyamatoknak a megfigyelése is magyarázatul szolgálhat a tumor terápiában megfigyelt PARP gátlókra adott változatos, sokszor ellentétes válaszokra.

Irodalmi hivatkozások jegyzéke

1. Chambon, P., J.D. Weill, and P. Mandel, *Nicotinamide mononucleotide activation of new DNA-dependent polyadenylic acid synthesizing nuclear enzyme*. Biochem Biophys Res Commun, 1963. **11**: p. 39-43.
2. Menissier-de Murcia, J., et al., *Zinc-binding domain of poly(ADP-ribose)polymerase participates in the recognition of single strand breaks on DNA*. J Mol Biol, 1989. **210**(1): p. 229-33.
3. Durkacz, B.W., et al., *(ADP-ribose)_n participates in DNA excision repair*. Nature, 1980. **283**(5747): p. 593-6.
4. Pleschke, J.M., et al., *Poly(ADP-ribose) binds to specific domains in DNA damage checkpoint proteins*. J Biol Chem, 2000. **275**(52): p. 40974-80.
5. Pines, A., et al., *PARP1 promotes nucleotide excision repair through DDB2 stabilization and recruitment of ALC1*. J Cell Biol, 2012. **199**(2): p. 235-49.
6. Ruscetti, T., et al., *Stimulation of the DNA-dependent Protein Kinase by Poly(ADP-Ribose) Polymerase*. Journal of Biological Chemistry, 1998. **273**(23): p. 14461-14467.
7. Jungmichel, S., et al., *Proteome-wide Identification of Poly(ADP-Ribosyl)ation Targets in Different Genotoxic Stress Responses*. Molecular Cell, 2013. **52**(2): p. 272-285.
8. Lapucci, A., et al., *Poly(ADP-ribose) polymerase-1 is a nuclear epigenetic regulator of mitochondrial DNA repair and transcription*. Mol Pharmacol, 2011. **79**(6): p. 932-40.
9. Hagan, M.P., A. Yacoub, and P. Dent, *Radiation-induced PARP activation is enhanced through EGFR-ERK signaling*. Journal of cellular biochemistry, 2007. **101**(6): p. 1384-1393.
10. Racz, B., et al., *Regulation of MKP-1 expression and MAPK activation by PARP-1 in oxidative stress: a new mechanism for the cytoplasmic effect of PARP-1 activation*. Free Radic Biol Med, 2010. **49**(12): p. 1978-88.
11. Szanto, A., et al., *PARP-1 inhibition-induced activation of PI-3-kinase-Akt pathway promotes resistance to taxol*. Biochem Pharmacol, 2009. **77**(8): p. 1348-57.
12. Robaszekiewicz, A., et al., *The role of p38 signaling and poly(ADP-ribosyl)ation-induced metabolic collapse in the osteogenic differentiation-coupled cell death pathway*. Free Radical Biology and Medicine, 2014. **76**: p. 69-79.
13. Bryant, H.E., et al., *Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase*. Nature, 2005. **434**(7035): p. 913-917.
14. Farmer, H., et al., *Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy*. Nature, 2005. **434**(7035): p. 917-921.
15. Thomas, H.D., et al., *Preclinical selection of a novel poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor for clinical trial*. Mol Cancer Ther, 2007. **6**(3): p. 945-56.
16. Masutani, M., et al., *Poly(ADP-ribose) polymerase gene disruption conferred mice resistant to streptozotocin-induced diabetes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(5): p. 2301-4.
17. Eliasson, M.J., et al., *Poly(ADP-ribose) polymerase gene disruption renders mice resistant to cerebral ischemia*. Nat Med, 1997. **3**(10): p. 1089-95.
18. Zingarelli, B., A.L. Salzman, and C. Szabo, *Genetic disruption of poly (ADP-ribose) synthetase inhibits the expression of P-selectin and intercellular adhesion molecule-1 in myocardial ischemia/reperfusion injury*. Circ Res, 1998. **83**(1): p. 85-94.

19. Veres, B., et al., *Decrease of the inflammatory response and induction of the Akt/protein kinase B pathway by poly-(ADP-ribose) polymerase 1 inhibitor in endotoxin-induced septic shock*. *Biochem Pharmacol*, 2003. **65**(8): p. 1373-82.
20. Tapodi, A., et al., *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. **280**(42): p. 35767-75.
21. Hocsak, E., et al., *PARP inhibition protects mitochondria and reduces ROS production via PARP-1-ATF4-MKP-1-MAPK retrograde pathway*. *Free Radic Biol Med*, 2017. **108**: p. 770-784.
22. Fong, P.C., et al., *Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers*. *N Engl J Med*, 2009. **361**(2): p. 123-34.
23. Khan, O.A., et al., *A phase I study of the safety and tolerability of olaparib (AZD2281, KU0059436) and dacarbazine in patients with advanced solid tumours*. *Br J Cancer*, 2011. **104**(5): p. 750-5.
24. Gelmon, K.A., et al., *Olaparib in patients with recurrent high-grade serous or poorly differentiated ovarian carcinoma or triple-negative breast cancer: a phase 2, multicentre, open-label, non-randomised study*. *Lancet Oncol*, 2011. **12**(9): p. 852-61.
25. Cipolat, S., et al., *OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(45): p. 15927-32.
26. Frezza, C., et al., *OPA1 controls apoptotic cristae remodeling independently from mitochondrial fusion*. *Cell*, 2006. **126**(1): p. 177-89.
27. Ye, X.Q., et al., *Mitochondrial and energy metabolism-related properties as novel indicators of lung cancer stem cells*. *Int J Cancer*, 2011. **129**(4): p. 820-31.
28. Donawho, C.K., et al., *ABT-888, an Orally Active Poly(ADP-Ribose) Polymerase Inhibitor that Potentiates DNA-Damaging Agents in Preclinical Tumor Models*. *Clinical Cancer Research*, 2007. **13**(9): p. 2728-2737.
29. Calabrese, C.R., et al., *Anticancer chemosensitization and radiosensitization by the novel poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor AG14361*. *J Natl Cancer Inst*, 2004. **96**(1): p. 56-67.
30. Zhang, W. and H.T. Liu, *MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells*. *Cell Research*, 2002. **12**(1): p. 9-18.
31. Senra, J.M., et al., *Inhibition of PARP-1 by olaparib (AZD2281) increases the radiosensitivity of a lung tumor xenograft*. *Mol Cancer Ther*, 2011. **10**(10): p. 1949-58.
32. Wang, L., et al., *MK-4827, a PARP-1/2 inhibitor, strongly enhances response of human lung and breast cancer xenografts to radiation*. *Invest New Drugs*, 2012. **30**(6): p. 2113-20.
33. Brown, J.M. and L.D. Attardi, *The role of apoptosis in cancer development and treatment response*. *Nat Rev Cancer*, 2005. **5**(3): p. 231-7.
34. Erster, S. and U.M. Moll, *Stress-induced p53 runs a direct mitochondrial death program: its role in physiologic and pathophysiologic stress responses in vivo*. *Cell Cycle*, 2004. **3**(12): p. 1492-5.
35. Galluzzi, L., et al., *Targeting p53 to mitochondria for cancer therapy*. *Cell Cycle*, 2008. **7**(13): p. 1949-55.
36. Abd Elmageed, Z.Y., et al., *The poly(ADP-ribose) polymerases (PARPs): new roles in intracellular transport*. *Cell Signal*, 2012. **24**(1): p. 1-8.
37. Daniel, R.A., et al., *Central nervous system penetration and enhancement of temozolomide activity in childhood medulloblastoma models by poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor AG-014699*. *Br J Cancer*, 2010. **103**(10): p. 1588-96.

38. Dedes, K.J., et al., *PTEN deficiency in endometrioid endometrial adenocarcinomas predicts sensitivity to PARP inhibitors*. *Sci Transl Med*, 2010. **2**(53): p. 53ra75.
39. Issaeva, N., et al., *6-thioguanine selectively kills BRCA2-defective tumors and overcomes PARP inhibitor resistance*. *Cancer Res*, 2010. **70**(15): p. 6268-76.
40. Konstantinopoulos, P.A., et al., *Gene expression profile of BRCAness that correlates with responsiveness to chemotherapy and with outcome in patients with epithelial ovarian cancer*. *J Clin Oncol*, 2010. **28**(22): p. 3555-61.
41. Toshimitsu, H., et al., *Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase enhances the effect of chemotherapy in an animal model of regional therapy for the treatment of advanced extremity malignant melanoma*. *Ann Surg Oncol*, 2010. **17**(8): p. 2247-54.
42. Drew, Y., et al., *Therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor AG014699 in human cancers with mutated or methylated BRCA1 or BRCA2*. *J Natl Cancer Inst*, 2011. **103**(4): p. 334-46.
43. Burkle, A., et al., *Increased poly(ADP-ribosylation) in intact cells by cisplatin treatment*. *Carcinogenesis*, 1993. **14**(4): p. 559-61.
44. Cullen, K.J., et al., *Mitochondria as a critical target of the chemotherapeutic agent cisplatin in head and neck cancer*. *J Bioenerg Biomembr*, 2007. **39**(1): p. 43-50.
45. Rosen, M., M. Figliomeni, and H. Simpkins, *The interaction of platinum antitumour drugs with mouse liver mitochondria*. *Int J Exp Pathol*, 1992. **73**(1): p. 61-74.
46. Song, Z., et al., *OPA1 processing controls mitochondrial fusion and is regulated by mRNA splicing, membrane potential, and Yme1L*. *J Cell Biol*, 2007. **178**(5): p. 749-55.
47. Del Dotto, V., et al., *OPA1 Isoforms in the Hierarchical Organization of Mitochondrial Functions*. *Cell Reports*, 2017. **19**(12): p. 2557-2571.
48. Sukhanova, M.V., et al., *Single molecule detection of PARP1 and PARP2 interaction with DNA strand breaks and their poly(ADP-ribosylation) using high-resolution AFM imaging*. *Nucleic Acids Research*, 2016. **44**(6): p. e60.

Az értekezés alapját szolgáló publikációk listája

1. PARP inhibitor PJ34 protects mitochondria and induces DNA-damage mediated apoptosis in combination with cisplatin or temozolomide in B16F10 melanoma cells

Anna Maria Cseh^{1,2}, Zsolt Fabian³, Ruben Quintana-Cabrera^{4,5,6}, Aliz Szabo¹, Krisztian Eros^{1,7,8}, Maria Eugenia Soriano^{2,9}, Ferenc Gallyas^{1,7,8}, Luca Scorrano^{2,9} & Balazs Sumegi^{1,7,8}

¹Department of Biochemistry and Medical Chemistry, University of Pecs Medical School, Pecs, Hungary; ²Department of Biology, University of Padova, Padova, Italy; ³Department of Medical Chemistry, Molecular Biology and Pathobiochemistry, Faculty of Medicine, Semmelweis University, Budapest, Hungary; ⁴University of Salamanca, CSIC, Institute of Functional Biology and Genomics, Salamanca, Spain; ⁵Institute of Biomedical Research of Salamanca, University Hospital of Salamanca, University of Salamanca, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Salamanca, Spain; ⁶CIBERFES, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain; ⁷Nuclear-Mitochondrial Interactions Research Group, Hungarian Academy of Sciences, Budapest, Hungary; ⁸Szentagotthai Research Centre, University of Pecs, Pecs, Hungary; ⁹Venetian Institute of Molecular Medicine, via Orus 2, 35129 Padova, Italy; Department of Biology, University of Padova, Via U. Bassi 58B, 35121 Padova, Italy.

Tudományos cikk: *Frontiers in Physiology* 2017, Impact Factor: 3.394

2. PARP inhibitor attenuated colony formation can be restored by MAP kinase inhibitors in different irradiated cancer cell lines

Hocsak E¹, Cseh A, Szabo A, Bellyei S, Pozsgai E, Kalai T, Hideg K, Sumegi B, Boronkai A.

¹*Department of Biochemistry and Medical Chemistry, Medical School, University of Pécs, Hungary.*

Tudományos cikk: *International journal of radiation biology* 2014, Impact Factor: 1.687

Publikációk, absztraktok listája

1. PARP inhibition protects mitochondria and reduces ROS production via PARP-1-ATF4-MKP-1-MAPK retrograde pathway

Hocsak E¹, Szabo V², Kalman N², Antus C², Cseh A², Sumegi K², Eros K², Hegedus Z³, Gallyas F Jr⁴, Sumegi B⁴, Racz B²

¹*Departments of Biochemistry and Medical Chemistry, University of Pécs, Medical School, Pécs, Hungary; Nuclear-Mitochondrial Interactions Research Group, Hungarian Academy of Sciences, Budapest, Hungary. Electronic address: eniko.hocsak@aok.pte.hu;* ²*Departments of Biochemistry and Medical Chemistry, University of Pécs, Medical School, Pécs, Hungary;* ³*Departments of Biochemistry and Medical Chemistry, University of Pécs, Medical School, Pécs, Hungary; Institute of Biophysics, Biological Research Centre, Hungarian Academy of Sciences, Szeged, Hungary;* ⁴*Departments of Biochemistry and Medical Chemistry, University of Pécs, Medical School, Pécs, Hungary; Nuclear-Mitochondrial Interactions Research Group, Hungarian Academy of Sciences, Budapest, Hungary; Szentagotthai Research Center, Pécs, Hungary.*

Tudományos cikk: *Free Radical Biology & Medicine* 2015/2016, Impact Factor: 5.784

2. Poly(adenosine diphosphate-ribose) polymerase as therapeutic target: lessons learned from its inhibitors

Anna Mária Cseh^{1,2}, Zsolt Fábíán³, Balázs Sümegi¹, Luca Scorrano²

¹*Department of Biochemistry and Medical Chemistry, University of Pécs Medical School, Pécs, Hungary;* ²*Department of Biology, University of Padova, Italy;* ³*Conway Institute, University College Dublin, Belfield, Dublin, Ireland.*

Tudományos cikk: *Oncotarget* 2015/2016, Impact Factor: 5.008

3. PJ34 PARP inhibitor reverses the cisplatin and temozolomide induced early mitochondrial changes in B16F10 melanoma cells

Anna Mária Cseh^{1,2}, József Orbán¹, Rubén Quintana-Cabrera², Stephanie Herkenne², Zsolt Fábíán³, Balázs Sümegi¹ and Luca Scorrano²

¹*Department of Biochemistry and Medical Chemistry, University of Pécs, Medical School, Pécs, Hungary;* ²*Department of Biology, University of Padua, Padua, Italy;* ³*Conway Institute, University College Dublin, Belfield, Dublin 4, Ireland*

Poszter: *European Bioenergetics Conference (EBEC)*, Riva Del Garda 2016. július 2-7.

4. Quercetin increases the efficacy of glioblastoma treatment compared to standard chemoradiotherapy by the suppression of PI-3-kinase-Akt pathway

Pozsgai E1, Bellyei S, Cseh A, Boronkai A, Racz B, Szabo A, Sumegi B, Hocsak E.

¹ *Department of Biochemistry and Medical Chemistry, University of Pécs, Pécs, Hungary.*

Tudományos cikk: *Nutrition and Cancer 2013*, Impact Factor: 2.47

Köszönetnyilvánítás

Köszönöm Témavezetőimnek, Prof. Dr. Sümegi Balázsnak és Dr. Fábíán Zsoltnak a PhD munkám során nyújtott mind szakmai mind pedig emberi támogatásukat, és sajnálattal veszem tudomásul, hogy mindezért, személyesen már csak Egyikőjüknek mondhatok köszönetet.

Külön köszönöm Prof. Gallyas Ferencnek nagyvonalú szakmai tanácsait és Prof. Luca Scorrano-nak, hogy lehetővé tette, hogy munkacsoportjában dolgozhassak.

Köszönöm mind Prof. Dr. Sümegi Balázsnak mind Prof. Dr. Gallyas Ferencnek, hogy támogatták, hogy a PhD munkám jó részét Olaszországban, a padovai egyetem mitokondriális munkacsoportjában végezhessem, mely tapasztalat nélkülözhetetlen volt dolgozatom elkészítéséhez.

Köszönöm azoknak a magyar és külföldi kollégáimnak, külön kiemelve Dr. Rubén Quintana-Cabrera-t és Dr. Stephanie Herkenne-ét, akik szakmai tanácsai lehetővé tették, hogy kísérleteimet és azok eredményeit a kutatási témám szempontjából jelenleg legmegfelelőbb módszerekkel végezhessem el és értékelhessem. Köszönöm Dr. Hocsák Enikőnek, egykori tudományos diákköri témavezetőmnek, illetve Pásztor Irmának és Halász Helénának, hogy megtanították az alapvető sejtbioológiai módszereket, és köszönöm Dr. Szabó Alízna és Dr. Orbán Józsefnek, a mikroszkópos munkával kapcsolatos tanításukat. Köszönöm Dr. Boronkai Árpádnak, Girán Lászlónak és Monostori Attilának, a munkám során felmerült technikai kérdésekben nyújtott készséges segítségüket.

Köszönöm Szüleimnek, Testvéremnek és Családjának, és hálás vagyok Nekik, amiért támogatnak, és szeretetükkel távolról is bátorítanak.

Köszönöm Arielnek a belém vetett bizalmát, türelmét és mérhetetlen támogatását. Nélküle ez a dolgozat nem készült volna el.

Hálás vagyok Barátaimnak, és köszönöm Nekik, hogy mellettem állnak.