

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

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

Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet



Università degli Studi di Padova



Pécs, 2019.

Tartalomjegyzék

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	7
1. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	11
1.1. A POLI(ADP-RIBÓZ) POLIMERÁZ (PARP) ENZIM.....	11
1.1.1. A PARP-1 működése és szerepe a repair folyamatokban.....	13
1.1.2. A PARP gátlás szerepe a tumor-terápiában	15
1.1.3. A PARP-1 sejthalál szabályozó szerepe	16
1.1.4. A PARP-1 mint gyulladáscsökkentő folyamatok szabályozója.....	18
1.2. A MITOKONDRIUM	18
1.2.1. A mitokondrium általános tulajdonságai	19
1.2.1.1. Eredete	19
1.2.1.2. Szerkezete	20
1.2.2. A mitokondriális struktúra dinamikus jellege, a mitokondriális dinamika	21
1.2.2.1. A mitokondriális fúzió és formáló proteinjei	22
1.2.2.2. A mitokondriális fisszió és formáló proteinjei: A Dynamin-related protein 1 (DRP1) és a humán Fis1 (hFis1)	23
1.2.2.3. A mitokondriális fúzió- fisszió jelentősége	24
1.2.3. A legfőbb mitokondriális funkciók.....	26
1.3. A PARP-1 SZEREPE KÜLÖNBÖZŐ EXTRANUKLEÁRIS FOLYAMATOKBAN, KÜLÖNÖS TEKINTETTEL A MITOKONDRIUMRA.....	28
2. CÉLKITŰZÉSEK, KÍSÉRLETES MUNKÁNK ALAPJA	37
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	39
3.1. REAGENSEK	39

3.2. SEJTVONALAK ÉS SEJTKULTÚRA FELTÉTELEK	40
3.3. MTT (3-(4,5-DIMETHYLTHIAZOL-2-YL)-2,5-DIPHENYLTETRAZOLIUM BROMIDE) ASSAY 40	
3.4. KOLÓNIA FORMÁCIÓ VIZSGÁLAT.....	41
3.5. SEJTHALÁL ANALÍZIS	41
3.6. COMET ASSAY	42
3.7. MAGFRAGMENTÁCIÓS VIZSGÁLAT	43
3.8. MITOKONDRIÁLIS MORFOLÓGIA ANALÍZIS	43
3.9. TETRAMETHYL-RHODAMINE METHYL ESTER (TMRM) TIME-LAPS FLUORESZCENS KÉPALKOTÁS.....	44
3.10. IMMUNOBLOT ANALÍZIS.....	44
3.11. STATISZTIKAI ANALÍZIS	46
4. KÍSÉRLETES MUNKÁINK, EREDMÉNYEK.....	47
4.1. A PARP GÁTLÁS ÉS IRRADIÁCIÓ HATÁSA AZ A549 SEJTEK KOLÓNIA FORMÁCIÓS KAPACITÁSÁRA	47
4.2. A PARP GÁTLÁS ÉS A BESUGÁRZÁS HATÁSA A MAP KINÁZOKRA ÉS A PRO-ÉS ANTI- APOPTOTIKUS FAKTOROKRA A549 HUMÁN TÚDŐ ADENOKARCINÓMA SEJTVONALON.....	48
4.3. A PARP GÁTLÁS ÉS SUGÁRKEZELÉS HATÁSA A MAP KINÁZOKRA ÉS A PRO ÉS ANTI- APOPTOTIKUS FAKTOROKRA 4T1 EGÉR EMLŐ KARCINÓMA SEJTEKBEN	51
4.4. A MAPK INHIBITOROK HATÁSA A PARP INHIBÍCIÓ OKOZTA SUGÁRZÁS-ÉRZÉKENYSÉG NÖVEKEDÉSRE A549, 4T1 ÉS U251 SEJTEKBEN	53
4.5. PJ34 ÉS CISZPLATIN VAGY TEMOZOLOMIDE KEZELÉS HATÁSA A B16F10 SEJTEK TÚLÉLÉSÉRE ÉS KOLÓNIA FORMÁCIÓS KÉSZSÉGÉRE	58

4.6. A PJ34 ÉS CISZPLATIN VAGY TEMOZOLOMIDE KOMBINÁCIÓS KEZELÉSEK HATÁSA A SEJTHALÁLRA ÉS A NUKLEÁRIS FRAGMENTÁCIÓRA B16F10 MELANÓMA SEJTEKBEN.....	61
4.7. A PJ34 ÉS CISZPLATIN VAGY TEMOZOLOMIDE KEZELÉS HATÁSA A MITOKONDRIÁLIS FRAGMENTÁCIÓRA B16F10 SEJTVONALON	63
4.8. A PJ34 ÉS CISZPLATIN VAGY TEMOZOLOMIDE KEZELÉSEK HATÁSA AZ OPA1 RÖVID VERSUS HOSSZÚ IZOFORMÁK ARÁNYÁRA B16F10 SEJTEKBEN	66
4.9. A PJ34 ÉS CISZPLATIN VAGY TEMOZOLOMIDE KEZELÉSEK HATÁSA A MITOKONDRIÁLIS MEMBRÁN POTENCIÁLRA (Ψ_M).....	69
5. MEGBESZÉLÉS ÉS KÖVETKEZTETÉTESEK	73
6. EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA ÉS EGYSÉGES ÉRTELMEZÉSE.....	83
IRODALMI HIVATKOZÁSOK JEGYZÉKE	85
AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁT SZOLGÁLÓ PUBLIKÁCIÓK LISTÁJA	101
PUBLIKÁCIÓK, ABSZTRAKTOK LISTÁJA	102
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	103

Rövidítések jegyzéke

AIF	apoptosis inducing factor, apoptózis indukáló faktor
ADP	adenosine diphosphate, adenzin difoszfát
AKT/PKB	protein kinase B
ALC1	amplified in liver cancer 1
AMP	adenosine monophosphate, adenzin monofoszfát
ANT	adenine nucleotide transferase, adenin nukleotid transzferáz
APE	N-glycosylase/DNA lyase
ATP	adenosine triphosphate, adenzin trifoszfát
BAD	BCL-2 agonist of cell death
BAK	BCL-2 antagonist/killer 1
BAX	BCL-2 associated x protein
BCL-2	B-cell lymphoma 2
BER	base excision repair, bázis excíziós repair
BH-3	BCL-2 homology-3
BID	BH3 interacting-domain death agonist
BIM	BCL-2-like protein 11
BRCA	breast cancer type 1 susceptibility protein
BSA	bovine serum albumin
CDK1	cyclin-dependent kinase, ciklin-dependens kináz
CJ	christa junction, crista junkció
COX 1-2	cyclooxygenase 1- 2
Cyt c	cytochrom-c, citokróom c
Da	dalton
DBM	DNA-binding module, DNS kötő domén
DDB2	DNA damage-binding protein 2
DDR	DNA damage response
DMSO	dimethyl sulfoxide, dimetil szulfoxid
DNS	desoxy ribonucleic acid, dezoxiribonukleinsav
DRP1	dynammin-related protein 1
DUSP-1	dual specificity protein phosphatase-1

EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
ER	endoplasmic reticulum, endoplazmatikus retikulum
ERK1/2	extracellular signal-regulated protein kinases 1 és 2
EXO1	MutS α -exonukleáz 1
FADH2	flavine adenine dinucleotide, flavin adenin dinukleotid
FCCP	carbonyl cyanide p-trifluoro-methoxyphenyl hydrazone
FH	fumarate hydratase, fumarát hidratáz
Fzo1p	fuzzy onions 1 protein
GTP-áz	guanosine triphosphatase, guanozin trifoszfátáz
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
hFis1	human Fis1
HIF	hypoxia-inducible factor, hipoxia indukáló faktor
HUWE1	E3 ubiquitin-protein ligase
IDH 1,2	isocitrate dehydrogenase 1,2, izocitrát dehidrogenáz 1, 2
JNK	c-Jun N-terminal kinase, c-Jun terminális kináz
L-OPA1	OPA-1 long isoform, OPA-1 hosszú izoforma
LPS	lipopolisacharide, lipopoliszacharid
MAPK	mitogen-activated protein kinase, mitogén-aktivált protein kináz
MCL-1	induced myeloid leukemia cell differentiation protein
MEM	minimum essential medium
MFN-1-2	mitofusin-1-2, mitofuzin 1-2
MGMT	O ⁶ -alklylguanine-DNA alkyltransferase , O ⁶ -alkilguanin DNS akiltransferáz
MIM	mitochondrial inner membrane, mitokondriális belső membrán
MITF 1	microphthalmia transcription factor 1
MKP-1	MAP kinase phosphatase, MAP kináz foszfátáz
MOM	mitochondrial outer membrane, mitokondriális külső membrán
MOMP	mitochondrial outer membrane permeabilisation, mitokondriális külső membrán permeabilizáció
MPTP	mitochondrial permeability transition pore, mitokondriális permeabilitási tranzíciós pórus
mtDNS	mitochondrial DNA, mitokondriális DNS

mtRFP	mitochondria-targeted red fluorescent protein
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
MYH1	adenine DNA glikosylase, adenin DNS glikoziláz
NAD ⁺ , NADH	nicotinamide adenine dinucleotide, nikotinamid adenin dinukleotid oxidált és redukált formája
ND2	NADH-ubiquinone oxidoreductase 2
NER	nucleotide excision repair, nukleotid excíziós repair
NHEJ	non-homologous end joining repair
OPA-1	optic atrophy protein 1
OXPHOS	oxidative phosphorylation, oxidatív foszforiláció
PADR1	cink-kötő motívummal bíró PARP-1 enzim domén
PARG	poly(ADP-ribose) glycohydrolase, poli (ADP-ribóz) glikohidroláz
PARL	presenilins-associated rhomboid-like protein
PARP	poly(ADP-ribose) polymerase, poli(ADP-ribóz) polimeráz
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
PGC-1alfa	peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha
PI	propidium iodide, propídium jodid
PINK1	PTEN-induced kinase 1
PI3K	phosphoinositide 3-kinase, foszfoinozitol 3-kináz
PRD	PARP regulatory domain, PARP regulációs domén
PTEN	phosphate and tensin homologue, foszfatáz és tenzin homológ
PTP	permeability transition pore
PUMA	p53 upregulated modulator of apoptosis
RIP	receptor-interacting protein
RIPA	radioimmunoprecipitation assay
ROS	reactive oxygen species, reaktív oxigén szabadgyökök
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
rRNS	riboszómális RNS
SAPK	stress-activated protein kinase
SDH	succinate dehydrogenase, szukcinát dehidrogenáz
SDS PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SIR2 α	sirtuin 2 alfa

SMAC/DIABLO	second mitochondria-derived activator of caspase/direct inhibitor of apoptosis-binding protein with low pI
SNP	single nucleotide polymorphism
S-OPA1	OPA-1 short isoforms, OPA-1 rövid izoforma
TBS	tris-buffered saline
TBST	tris-buffered saline és Tween 20 elegye
TFB1M, TFB2M	dimethyladenosine transferase 1, 2
TFR1	transferrin receptor 1
TIM	translocase of the inner membrane
TMRM	tetramethyl-rhodamine methyl ester
TNF α	tumor necrosis factor alpha, tumor nekrosis faktor alfa
TOM	translocase of the outer membrane
TRAF	tumor necrosis factor receptor-associated factor
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
tRNS	transzfer RNS
UNG1	uracyl-DNA glycosylase
VDAC	voltage-dependent anion channel
WGR	tryptophane-, glycine-, arginine PARP domain

1. Irodalmi áttekintés

1.1. A Poli(ADP-ribóz) polimeráz (PARP) enzim

Az alapanyagcsere és a környezeti hatások együttesen több, mint 20000 dezoxiribonukleinsav (DNS) károsodáshoz vezetnek nap mint nap, melyek kijavítódása alapvető fontosságú a transzkripció, proteom homeosztázis és a genom integritás megőrzéséhez [1]. Ez utóbbiért számos repair fehérje felel, melyek együttesen, a DNS sérülést követő összehangolt aktiválódását DNS károsodási válasznak (DNA damage response, DDR) nevezzük. Ezek egyik alappillére a poli(ADP-ribóz) polimeráz (PARP) enzim.

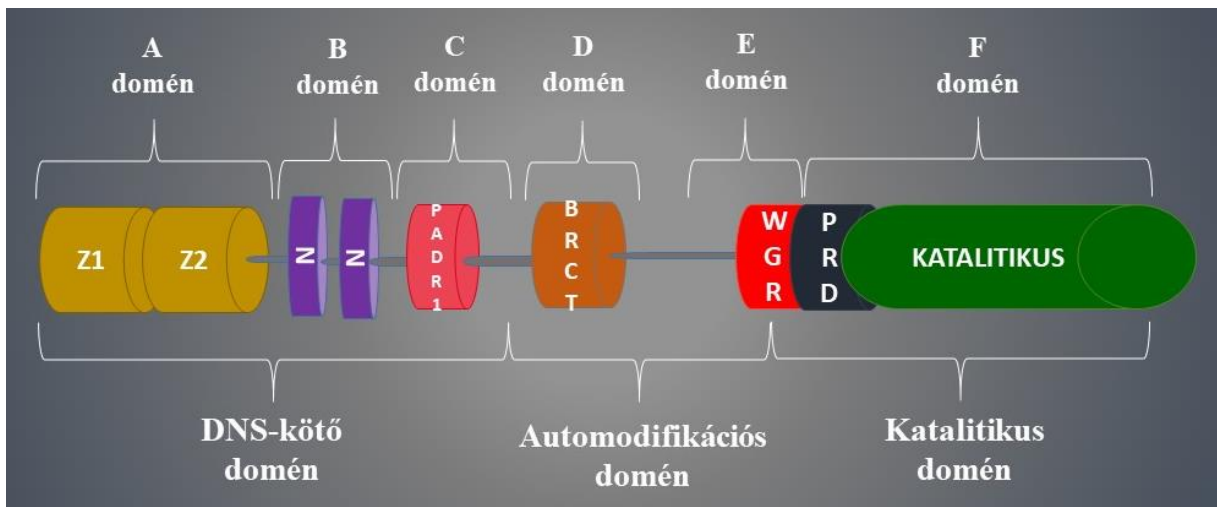
A PARP-ot először 1963-ban, mint nukleáris enzimet írták le, mely a poli(ADP-ribóz)iláció nagy részéért felel [2]. Jelenlegi tudásunk szerint 17 PARP polipeptid ismert, melyek közül a PARP-1 a legbőségebben expresszálandó izoforma [3] [4].

A 17 PARP polipeptid közül a PARP-4-en kívül mind rendelkezik egy konzervált, C-terminális katalitikus doménnel, N-terminális doménjük viszont nagy variabilitást mutat [5], ami az egyes PARP tagok eltérő fiziológiai szerepére utal és ez adja csoportosításuk alapját is [5]:

- DNS-függő PARP-ok: PARP-1, -2 és -3
- Tankirázok: PARP-5a és 5b
- CCCH-domént tartalmazó PARP-ok: PARP-7, -12 és -13
- Makro-doménnel bíró PARP-ok: PARP-9, -14 és -15
- Nem klasszifikált PARP-ok: PARP-4, -6, -8, -10, -11 és -16

A sejten belüli poli(ADP-riboz)iláció (PARiláció) jelentős részéért a DNS-dependens és tankiráz PARP-ok, illetve a nem klasszifikált PARP-ok csoportjába tartozó PARP-4 a felelős. A család többi tagja mono(ADP-riboz)ilációt végez. Ez alól kivételt jelent a PARP-10 mely képes PARilálni, és a PARP-9, illetve -13, melyek katalitikusan inaktívak [6, 7].

A PARP-1 egy 116 kDa nagyságú fehérje, amely a PARP család legismertebb tagja. A sejtmagban helyezkedik el, míg a család többi tagjának lokalizációja a sejtciklus során változhat. A PARP-2-vel és -3-mal együtt az emlős szövetekben mindenhol expresszálandó fehérje, egyúttal e három izoforma aktiválódása figyelhető meg a DNS-törések során is [8-10]. A PARP-1 hat doménnel rendelkezik (A-F), melyek különböző funkciókkal bírnak (1. ábra) [11].



1. ábra. A humán PARP-1 domén struktúrája. A jelölt struktúrák a következők: **KATALITIKUS**: C terminuson jelenlévő katalitikus domén. A katalitikus doménon belül az aktív rész egy 50 aminosavból álló blokkból épül fel, mely szigorúan konzervált a gerincesek között és erősen konzervált minden fajon belül.; **Z1 és Z2**: Cink ujj domének; **N**: Nukleáris lokalizációs szignál; **PADR1**: cink-kötő motívum; **BRCT**: breast cancer susceptibility gén asszociált C-terminális domén, más néven D domén; **WGR** - tryptophane-, glycine-, arginine domain: Nem specifikus funkciókkal bíró domén, mely számos PARP tagban jelen van, és a legkonzerváltabb centrális motívuma alapján kapta a nevét; **PRD** - PARP regulatory domain: PARP szabályozó domén mely 2 hélix-loop-hélix strukturális duplikátumot tartalmaz és tipikusan a C-terminális katalitikus doménnel asszociált. *Az ábra az Uniprot, RCSB és InterPro adatbázisokra épül.*

Az A domén a DNS-kötő domén (DNA-binding module, DBM) részét képezi és a cink-ujj motívumán keresztül a DNS törések felismeréséért felel. A B domén nukleáris lokalizációs szignálján keresztül felel a PARP-1 sejtmagba irányításáért, ezenkívül kaszpáz-3 hasítási helyként is szolgál [12]. Az A doménhez hasonlóan a C domén is cink-kötő motívummal (PADR1) rendelkezik, mely megkönnyíti a PARP-1 konformációs átalakulását a DNS kötődést követően és bár nem szükséges a DNS-kötéshez, hiányában sérül a PARP-1 katalitikus aktivitása. A C domén az A és B doménnel karöltve szükséges a PARP-1 N-terminális DNS

kötő moduljához [13]. A D domén auto-PARilációs helyként szolgál, ezáltal elősegíti a PARP-1 leválását a DNS-ről [14, 15]. A D domén a PARP-1 nukleáris partnereinek szolgál kötőhelyül [16]. Az E és F domének teszik ki a katalitikus domént, melynek feladata a nikotinamid adenin dinukleotid (NAD⁺) megkötése, és a PARiláció katalizálása [17] [18].

1.1.1. A PARP-1 működése és szerepe a repair folyamatokban

Az egyszálú DNS törések jelentik a PARP-1 elsődleges aktivációs stimulusát, azonban aktivációját figyelték meg DNS sérülés nélkül is, olyan, csupán csak a DNS konformációt megváltoztató stimulusokra és oxidatív ágensekre mint az etanol, lipopoliszacharid (LPS) terhelés, megnövekedett extracelluláris glükóz koncentráció vagy A-vitamin depléció [19-21] [22-28]. Jelen tudásunk szerint a PARP-1 felel a celluláris PARiláció nagy részéért, a PARP-2, körülbelül ennek csak 15%-t végzi [29].

Aktivációja során DNS-kötő doménjén keresztül a PARP-1 felismeri a sérült DNS struktúrát [9], majd a NAD⁺ hasításával — nikotinamidra és ADP-ribózra, — 50-200 ADP-ribóz (poli(ADP-ribóz), PAR) egységet kapcsol a cél-molekuláihoz [2, 15]. A PAR alegységek negatív töltésüknél fogva befolyásolják a befogadó molekulák struktúráját, funkcióját és lokalizációját. Például az elsőként szintetizált hosszú és elágazó PAR láncok egyik szerepe, hogy eltartsák a kromatin többi részét a sérült DNS lókusztól, ezáltal megakadályozzák egy esetleges véletlenszerű homológ rekombináció létrejöttét a sérült DNS lánc és a szomszédos kromatin között [30]. Ezen kezdetleges PAR láncok lebontását rövid láncokká a poli(ADP-ribóz) glikohidroláz (PARG) enzim végzi. Ezek a PAR egységek a PARP-1 leválását követően is megmaradnak, megakadályozva, hogy a PARP-1 visszakapcsolódjon a sérült DNS-hez és akadályozza a DNS repair folyamatát [31].

Számos repair molekula rendelkezik PAR-kötő motívummal [32] [33]. A nukleotid excíziós repairben (NER) a PARP-1 az UV-sugárzás okozta sérült szakasz felismeréséért és

eltávolításáért felelős DDB2 (DNA damage-binding protein 2) proteint PARilálja. A PARiláció elősegíti a kromatin újrendező ALC1 (amplified in liver cancer 1) fehérje és a többi NER protein sérült DNS szakaszhoz irányítását [34].

A PARP-1 szerepét a mismatch repair tagjaival, úgymint a replikációs protein A, replikációs faktor C és a proliferating cell nuclear antigen (PCNA) vagy a Mut α -exonukleáz 1 (EXO1) komplexszel is leírták. Így például megfigyelték, hogy a PARP-1 és a Mut α -aktivált EXO1 komplex kölcsönhatása megnöveli az 5' irányú excíziós aktivitást [35].

A PARP-1 kettős DNS sérülések kijavításában betöltött szerepére utal, hogy a non-homologous end joining repairben (NHEJ) részt vevő fehérjék PARilációja megnöveli azok kináz aktivitását, illetve a PARP-1 farmakológiai gátlása következtében sérült NHEJ-t figyeltek meg [33, 36].

A bázis excíziós repair (BER) a károsodott bázisok eltávolításáért és pótlásáért felel, folyamatában a PARP-nak, felfedezése óta alapvető jelentőséget tulajdonítottak. Érdekes, hogy később ezt ellentmondásos eredmények követték, rávilágítva arra, hogy bár a PARiláció elősegíti az XRCC1 molekula lokalizációját a sérült DNS részekhez - melynek fontos szerepe van a BER folyamatában részt vevő enzimek toborzásában - a BER intakt marad PARP-1 negatív sejtekben is [37] [38-40]. Ebből arra következtethetünk, hogy a PARP-1-XRCC1 kapcsolatnak a BER-től független jelentősége lehet a sejten belül [41], vagyis valószínűsíthetően a PARP-1 csak bizonyos károsodások esetén járul hozzá a BER-hez de nem nélkülözhetetlen a folyamathoz [42].

A repair enzimek aktivációját követően alapvető fontosságú, hogy a PARP-1 PARilációs aktivitása megszűnjön és leváljon a DNS-ről, átadva helyét a javító fehérjéknek. Ehhez alapvető fontosságú, a PARP-1 autoparilációja saját D doménjén, ami konformáció változáshoz vezet, ezáltal elengedi a sérült DNS szakaszt. Leválása után a PARP-1 ubikvitinálódik a PAR-dependens E3 ubikvitin ligáz RING-ujj protein 146 által, mely lehetővé teszi a PARP-1

proteozómális degradálódását [43], míg a PAR molekulák eltávolításáért a PARG és poli(ADP-ribóz) hidroláz 3 enzimek felelnek [44, 45].

A PARP-1 e folyamatokban játszott szerepének feltérképezése vezetett ahhoz a felismeréshez, hogy az enzim hiánya genom instabilitáshoz, ezáltal sejthalálhoz vezethet [46]. Egyben ez adta az elméleti alapot ahhoz az elképzeléshez, hogy a PARP-1 farmakológiai gátlószerei jelentőséggel bírhatnak a tumor terápiában.

1.1.2. A PARP gátlás szerepe a tumor-terápiában

A PARP gátlás olyan tumorokban, melyekben a repair folyamatok eleve sérültek, DNS károsító ágens adásával együtt kromoszóma instabilitáshoz, sejtciklus megálláshoz és apoptózis indukcióhoz vezet. Az első *in vitro* kísérletekben a PARP inhibitorok egyrészt sokkal potensebbnek bizonyultak breast cancer type 1 susceptibility protein (BRCA)-deficiens sejtes modellekben, másrészt kemoterapeutikus szerekkel, például alkiláló ágensekkel szinergisztikus hatást mutattak [47-49]. *In vivo* az AG14361 PARP inhibitor használata kombinációs kezelésben temozolomide-dal, irinotekánnal vagy irradiációval colon xenograft tumor modellben megnövelte a terápia hatásosságát [50] [51]. A szintén PARP-inhibitor veliparib (ABT-888) fokozta a temozolomide hatását állatkísérletes modellben [52], az olaparib pedig (AZD2281) szinergizmust mutatott ciszplatinnal és karboplatinnal BRCA1 deficiens emlő tumor modellben, megnövelve a túlélési rátát [53, 54].

Bár az említett *in vivo* vizsgálatok biztató eredményekről számoltak be, a klinikai eredmények ellentmondásosnak bizonyultak. Míg egy fázis I-es tanulmányban BRCA mutációval bíró petefészek és prosztata karcinómában szenvedő betegekben az olaparib kezelés szignifikáns tumorelles hatását írták le, egy másik tanulmány nem mutatott szinergizmust az olaparib és dakarbazin között melanómában szenvedő betegeknél [55, 56]. 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 [57].

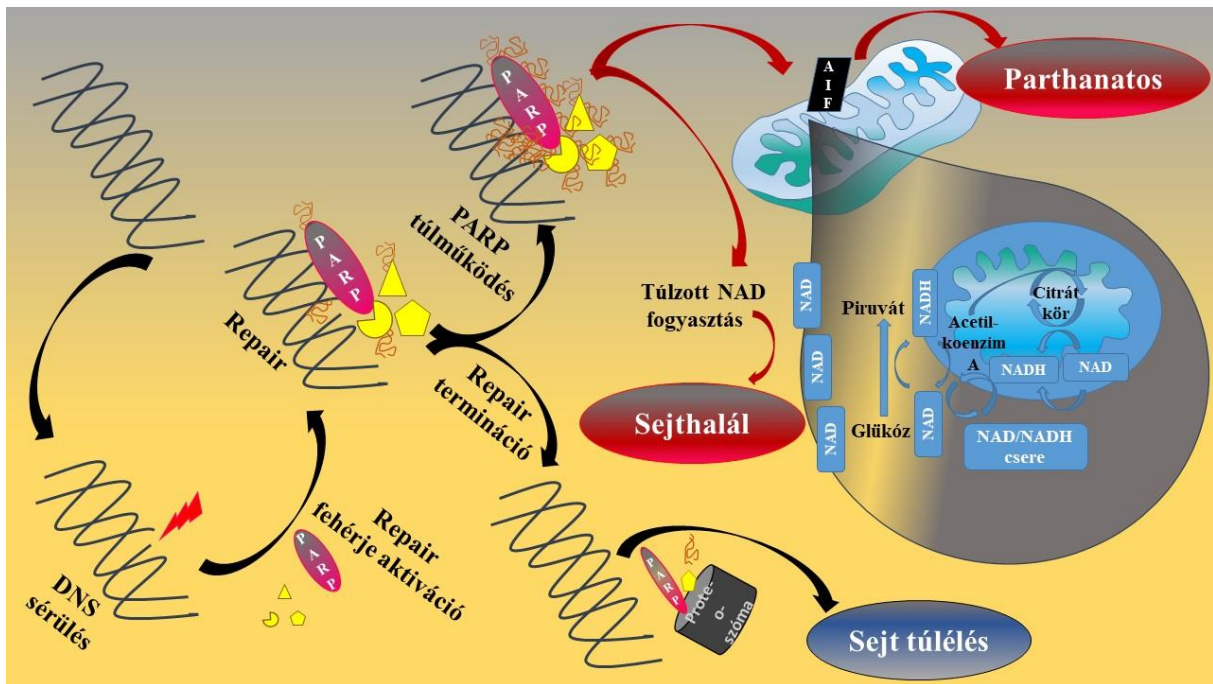
Nem meglepő, hogy az egymásnak ellentmondó eredmények után a PARP gátlókat a mai napig csak a BRCA mutációt hordozó ovárium tumorok kezelésére törzskönyvezték [58]. Ezek a vizsgálatok arra is felhívták a figyelmet, hogy a PARP-nak, a repairben játszott szerepén túl más funkciója is lehet a sejt fiziológiás és patofiziológiás folyamataiban. Ezt a feltételezést alátámasztja az a tanulmány, mely kapcsán *Drosophiliában* kimutatták, hogy transzkripciós faktorok PARilációjával a PARP-1 befolyásolja bizonyos fehérjék expresszióját, illetve a PARP-1 fizikailag kötődik a H3 és H4 hisztonokhoz, mely utóbbi fokozza a PARP-1 aktivitását. Mindebből arra következtethetünk, hogy a PARP-1, a repairben betöltött szerepén túl, valójában egy komplex epigenetikus szabályozó rendszer részét képezheti [59] [60].

1.1.3. A PARP-1 sejthalál szabályozó szerepe

A PARP-1 aktivitás a NAD^+ fogyasztáson keresztül megnövekedett adenzin trifoszfát (ATP) felhasználáshoz, és ennek következtében az energia egyensúly felborulásához, végül sejthalálhoz vezethet [61, 62]. A lecsökkent ATP készlet a megnövekedett adenzin monofoszfát (AMP) szint eredménye, mely a poli(ADP-ribóz) hidrolíziséből képződik. Ezt a mitokondriális adenin nukleotid transzlokátor (ANT) gátlása, és a mitokondriális adenzin-difoszfát (ADP) felvétel illetve ATP termelés csökkenése kíséri [63]. Az adenilát kináz útvonal, mely az ATP készletet újraszintetizálja ADP-ből, ezáltal szintén korlátozott, köszönhetően a PARP-1 up-regulációt követő csökkent ADP készletnek [64].

Sokáig elfogadott volt a feltételezés, hogy a PARP-1 aktivációt követő metabolikus katasztrófa és sejthalál kizárólag a megnövekedett NAD^+ felhasználásból ered. A sejtanyagcsere és a PARP-1 viszonyának összetettebb mivoltára világított azonban rá például az a tanulmány,

melyben kimutatták, hogy a PARP-1, PARilációval képes csökkenteni a Hexokináz II enzim aktivitását, amely szintén metabolikus kiegyensúlyozatlansághoz és sejthalálhoz vezet [65, 66]. Sőt, további fontos tudományos előrelépés volt az a felismerés, hogy a PARP-1 aktiváció egy jellegzetes, róla elnevezett sejthalál formát is indukálhat; ez a *parthanatos* (2. ábra).



2. ábra. A PARP-1 működése a DNS repairben és a sejthalálban. A PARP-1, aktivációját követően, elősegíti a különböző repair fehérjék toborzását a DNS sérüléshez. A repair befejeztével a PARP-1 és a repair fehérjék leválnak a DNS-ről, és degradálódnak. A nem kijavítható DNS sérülés konstitutív PARP-1 aktivációhoz, a sejt NAD-készletének kontrollálatlan felemésztéséhez, metabolikus katasztrófához, végül sejthalálhoz vezet. Mindemellert a PARP-1 aktivációja során PARilálja a mitokondriális AIF-et, mely ezt követően a sejtmagba transzlokálódik és elősegíti a kaspáz független, specifikusan a PARP-1 aktivációhoz köthető sejthalál típust, a *parthanatos*-t. Az ábrán jelölt rövidítések a következők: **PARP**: PARP-1; **AIF**: apoptózis indukáló faktor; **NAD**: nikotinamid adenin dinukleotid. Az ábra a szerző műve, mely a szövegben hivatkozott irodalmi adatok alapján készült.

Neve a poli(ADP-ribóz) és Thanatos (a görög mitológiából ismert halál isten neve) szavakból született. A *parthanatos* a PARP-1 aktiválódást követően sejtmembrán integritás veszteséssel, foszfatidilszerin externalizációval, mitokondrium membrán potenciál eséssel és kromatin kondenzációval jár. Egyik fő mediátora az apoptózis indukáló faktor (AIF), egy kaspáz-független mitokondriális halál effektor protein, mely 3 lehetséges PAR doménnel rendelkezik. Egészséges mitokondriumban oxido-reduktáz aktivitást mutat, és antiapoptotikus faktorként működik [67]. Az AIF nagy része a mitokondrium belső membránjához kötődik, körülbelül

csak 30% van jelen a külső membrán citoszól felőli oldalán [68, 69]. PARP-1 aktivációt követően, a PAR polimerek aktiválják a Calpain I-et mitokondriális Ca^{2+} diszreguláción keresztül, mely végül AIF szétdarabolódáshoz vezet. Ez kritikus lépés ahhoz, hogy az AIF a mitokondriumot elhagyva a sejtmagba transzlokálódjon, ahol a PARilált AIF, a kromatin kondenzáción és DNS fragmentáción keresztül, facilitálja a kaszpáz független *parthanatos*-t [69-73].

1.1.4. A PARP-1 mint gyulladási folyamatok szabályozója

A PARP inhibitorok citoprotektív hatása akut tüdőgyulladás és szepszis shock modellben a PARP-1 esetleges szerepére enged következtetni a gyulladási folyamatokban is [26, 74]. Valószínűleg a hiányzó PARP-1 koaktivációs funkciónak köszönhetően, a PARP-1^{-/-} egerek ellenállóbbnak bizonyultak vad típusú társaiknál LPS-indukálta endotoxikus shockban és elmaradt bennük az NF- κ B-szabályozta gyulladási gének indukciója [75-77].

A PARP gátlókkal nyert ígéretes kísérletes eredmények olyan krónikus betegségekben is felvetik felhasználhatóságuk lehetőségét, amelyekben a gyulladás fontos komponensnek tűnik. Így például *Diabetes mellitusban*, melynek kísérletes modelljében a PARP gátlás hatékonyan lecsökkenti a hiperglikémia indukálta NF- κ B aktivációt és az *in vivo* podocita depléciót, mely folyamatok közül utóbbi a diabéteszes glomerulopátia egyik fő hisztopatológiai jellemzője [78].

1.2. A mitokondrium

A mitokondrium felfedezése évtizedeken átnyúló kutatómunka eredménye volt. Először Albert von Kölliker írta le úgy, mint sejten belüli „granulomot” (1857), majd Richard Altman (1886) kutatásaiból mint „bioblastról” olvashatunk róla, végül Carl Benda nevezte mai nevén először e sejtorganellumot (1898). Neve a görög „*mitos*” (= cérna), és „*chondrion*” (= granulum,

részecske) összeolvadásából jött létre. A mitokondriumnak eleinte a sejtek „erőműveként” tulajdonítottak jelentőséget, ma azonban már tudjuk, hogy számos sejten belüli fiziológiai folyamathoz nélkülözhetetlen. Ezek közé tartozik a kalcium homeosztázis, az apoptózis szabályozás, a reaktív oxigén szabadgyök (ROS) produkció és a sejten belüli jelátvitel. Ezzel egy időben, számos betegség patogenezisében tárták fel jelentőségét a metabolikus kórképektől, különböző genetikai megbetegedéseken át a neurodegenerációig és a tumorok kialakulásáig.

1.2.1. A mitokondrium általános tulajdonságai

1.2.1.1. Eredete

Az endoszimbióta elmélet szerint a mitokondrium körülbelül 2500 millió évvel ezelőtt jött létre, két, addig egymástól függetlenül működő sejt összeolvadásából. Két, alapvetően különböző modellt érdemes kiemelni az endoszimbiózis létrejöttével kapcsolatban; az „archeozon elméletet” és a „szimbiogenezis elméletet”, melyek között az endoszimbiózisnak tulajdonított szerepben van különbség [79]. Az archeozon elmélet, mint evolúciós lépést mutatja be az endoszimbiózist, ahol a proto-mitokondriális endoszimbióta befogadója egy mitokondrium nélküli eukarióta, és az összeolvadás szerepe alapvetően az oxigén produkció. A szimbiogenezis elmélet ellenben azt állítja, hogy a szimbiózis egy légzésre képes, fakultatív anaerob eubaktérium (szimbion),- *α-Proteobacterium*,- és egy anaerob, hidrogén-függő-*ősbaktérium* (befogadószervezet) összeolvadásával jött létre, mely számos összetett folyamat során egy úgynevezett közös eukarióta őst kialakulásához vezetett [79]. Emellett a szimbiogenezis elmélet azt feltételezi, hogy e szimbiotikus összekapcsolódás evolúciós hajtóereje a hidrogén-függő ATP produkció, nem pedig az oxigén detoxifikáció volt [80] [81]. A mitokondriumok felépítésében ma is bizonyos prokarióta tulajdonságok ismerhetők fel:

kettős membránnal rendelkeznek, saját, cirkuláris DNS-ük van, és a replikációjuk nem kötött a sejtosztódáshoz. Ezek az eukarióta sejten belül is megmaradt prokarióta tulajdonságok egy valamikori evolúciós szempontból előnyös, ősi kapcsolat létrejöttének bizonyítékául szolgálnak.

1.2.1.2. *Szerkezete*

A mitokondrium egy intracelluláris, citoplazmatikus sejtalkotó elem, mely az endoplazmatikus retikulumhoz mind strukturálisan mind funkcionálisan szorosan kapcsolódik [82].

Mitokondriális külső membrán (mitochondrial outer membrane, MOM)

- A MOM számos protein-alapú pórust tartalmaz, melyek lehetővé teszik az 5000 Da-nál kisebb proteinek és ionok szabad áramlását [83]. A MOM fehérjéi részt vesznek a protein transzlokációban, pórus formálásban és találunk köztük elongációs faktorokat, hő-sokk fehérjéket, enzimeket és a fúziós-fissziós gépezet tagjait (lásd később) [84].

Mitokondriális belső membrán (mitochondrial inner membrane, MIM)

- A belső membrán tartalmazza az elektrontranszport lánc és az ATP szintézis tagjait [85] [84] [86]. A MIM két oldala közötti transzportot specifikus transzporterek végzik (adenozin difoszfát- és adenzin trifoszfát transzlokáz, illetve a foszfát transzport protein) [87]. A MIM felel a légzési lánc által létrejött elektrokémiai grádiens fenntartásáért így alapvető fontosságú az ATP szintézishez is [88].
- *A mitokondriális belső membrán részei:*
 - *Cristae struktúra:* A cristae-k a belső membrán begyűrődései, melyek a belső membránhoz tubuláris junkciókon keresztül kötődő, különálló kompartmenteket hoznak létre [89]. Ezek feladata az ion grádiens és a megfelelő citokróm c eloszlás biztosítása [90]. Ezen felül növelik a belső membrán kihasználható felületét az elektron transzport lánc fehérjéi számára és a respiratorikus szuperkomplexek stabilitásának biztosításával hozzájárulnak a mitokondriális légzés kivitelezéséhez [91].

- *Mitokondriális belső kötő membrán*
- *Mitokondriális permeabilitási tranzíciós pórus (mitochondrial permeability transition pore, MPTP):* Az MPTP, egy időnként létrejövő, az 1.5 kDa-nál kisebb molekulák számára hirtelen szabad átáramlást biztosító membránfolytonosság vesztes [92]. Tagjai a mai napig nem teljesen ismertek.

Intermembrán tér

- Az intermembrán tér a külső és belső membránok között helyezkedik el, fő szerepe proteinek, lipidek és ionok cseréjének lebonyolítása a mitokondriális mátrix és citoszól között [93].

Mátrix

- A mitokondriális mátrixot a MIM határolja, ezáltal a mátrix egyrészt elhatárolódik a citoszolikus anyagcsere folyamatoktól, például a glikolízis anyagcseretermékeitől és enzimeitől, másrészt izolált területet biztosít a citromsav ciklus lebonyolításához. A mátrixban találjuk a piruvát dehidrogenáz komplex, a citromsav ciklus, a zsírsav béta-oxidáció és az aminosav oxidáció enzimeit, illetve itt található a mitokondriális DNS, riboszómák és a piruvát oxidációhoz szükséges szolubilis enzimek [94].

Mitokondriális DNS (mtDNS)

- A humán mitokondriális DNS egy cirkuláris, zárt, kétszálú DNS, amely a teljes eukarióta genom kb. 1%-át teszi ki. 16 569 bázispárt, 37 gént tartalmaz, melyek 13mRNS-t, 2 riboszómális RNS-t (rRNS) és 22 transzfer RNS-t (tRNS) kódolnak, többek között az oxidatív foszforiláció rendszerének (OXPHOS) esszenciális alegységeit [95].

1.2.2. A mitokondriális struktúra dinamikus jellege, a mitokondriális dinamika

A mitokondriális struktúráról alkotott kezdetleges elképzelésekkel ellentétben, a modern képalkotó eljárások segítettek felderíteni, hogy a mitokondriumok összefüggő láncolatokba

rendeződnek, és a citoplazmatikus mikrotubulusokhoz kötődve folyamatosan mozognak, ezáltal morfológiájuk, sejten belüli elhelyezkedésük dinamikus viselkedést mutat [96]. A különálló mitokondriumok képesek kapcsolódni egymáshoz, összeolvastva membránjukat és kicserélni tartalmukat. Ezt a folyamatot „**fúzió**nak” nevezzük. Ezzel szemben a hálózat darabolódása apró leány-mitokondriumokká, a „**fisszió**” vagy **fragmentáció**” folyamata [97] [98]. A mitokondriális állomány ezen viselkedési formáját, vagyis, hogy folyamatosan változtatja alakját, méretét, számát és elhelyezkedését, mitokondriális dinamikának nevezzük (3. ábra). A mitokondriális dinamika pontos, precíz és gyors lebonyolítását úgynevezett „mitokondriális-shaping”, proteinek teszik lehetővé [99] [100].

Fiziológiás körülmények között a fúzió-fisszió folyamata összhangban, egymást kiegészítve, kiegyensúlyozottan zajlik, lehetővé téve a mitokondriumok és az mtDNS megfelelő intracelluláris eloszlását és öröklődését a leány-mitokondriumok között.

1.2.2.1. *A mitokondriális fúzió és formáló proteinjei*

Mitofuzin 1-2 (MFN-1-2)

A mitokondriális fúziót bonyolító fehérjék közül az 1997-ben *Drosophila melanogaster*-ben leírt, transzmembrán guanozin trifoszfátáz (GTP-áz) Fuzzy onions 1 protein (Fzo1p) vált elsőként ismertté [101]. Emlősökben két Fzo1p homológ, az MFN-1 és -2 felelős a MOM fúzió lebonyolításáért. Ezek is nagy transzmembrán GTP-ázok, melyek a MOM-ban helyezkednek el [102], pontos működésüket tekintve azonban jelentős különbségeket találunk. Míg a MFN-1 felel az egymás melletti mitokondriumok összekapcsolásáért és a fúzió során szorosan együtt működik az Optic atrophy protein 1 (OPA1)-el [103] [104] [105], a MFN-2 nemcsak a mitokondrium külső membránon hanem az endoplazmatikus retikulumban (ER) is megtalálható és feladata a mitokondrium rögzítése az ER-hoz [106].

Optic atrophy protein 1 (OPA1)

Az OPA1 egy nukleárisan kódolt, Dinamin-szerű, 120 kDa nagyságú, GTP-áz aktivitással rendelkező, a mitokondriumok belső membránjában elhelyezkedő fehérje, melynek alapvető szerepe van a MIM fúziójában. Keletkezése mind transzkripciós, mind poszt-transzkripciós szinten szabályozódik [107] [108]. Nyolc izoformája ismert, ezen felül az egyes izoformák további hasításáért az YME1L és OMA1 belső membrán peptidázok felelősek. Hosszú izoformái (long isoforms, L-OPA1) a belső membránhoz kapcsolódnak, míg rövid izoformái (short isoforms, S-OPA1) az intermembrán térben helyezkednek el, a mitokondrium külső membrán közelében [108]. Az egyes izoformák egyensúlya nélkülözhetetlen a megfelelő mitokondriális fúzió létrejöttében, a mitokondriális cristae junkciók integritásában [109, 110] és az apoptózis folyamatában kulcsszerepet játszó citokróm c kiáramlásban [109]. A stressz-aktiválta OMA1 általi excesszív OPA1 proteolízis azonban mitokondriális fragmentációt indukál és a cristae struktúrák szétesését okozhatja mely csökkent mitokondriális membrán potenciálhoz vezet [111] [112] [108]. A membránpotenciál csökkenés L-OPA1-S-OPA1 konverziót indukál, az S-OPA1 felgyülemelés pedig a mitokondriális fúzió gátlásához és mitokondriális fragmentációhoz, majd mitokondriális diszfunkcióhoz, csökkent ATP-termeléshez vezet, végül sejthalált, szöveti degenerálódást okoz [113] [108] [113] [108, 110].

1.2.2.2. *A mitokondriális fisszió és formáló proteinjei: A Dynamine-related protein 1 (DRP1) és a humán Fis1 (hFis1)*

A mitokondriális osztódásnak alapvető szerepe van abban, hogy a sejtosztódás során a mitokondriumok megfelelő arányban kerüljenek az utódsejtekbe de adaptációs szereppel is bír az extracelluláris stresszhatásokkal szemben [114]. Fő regulátorai a DRP1 és a hFis1 proteinek. A DRP1 egy citoplazmatikus fehérje, a dinamin szupercsalád tagja [115] [116]. A hFis1, az élesztő Fis1p megfelelője, egy MOM fehérje, amely a mitokondriális fisszió folyamatában a

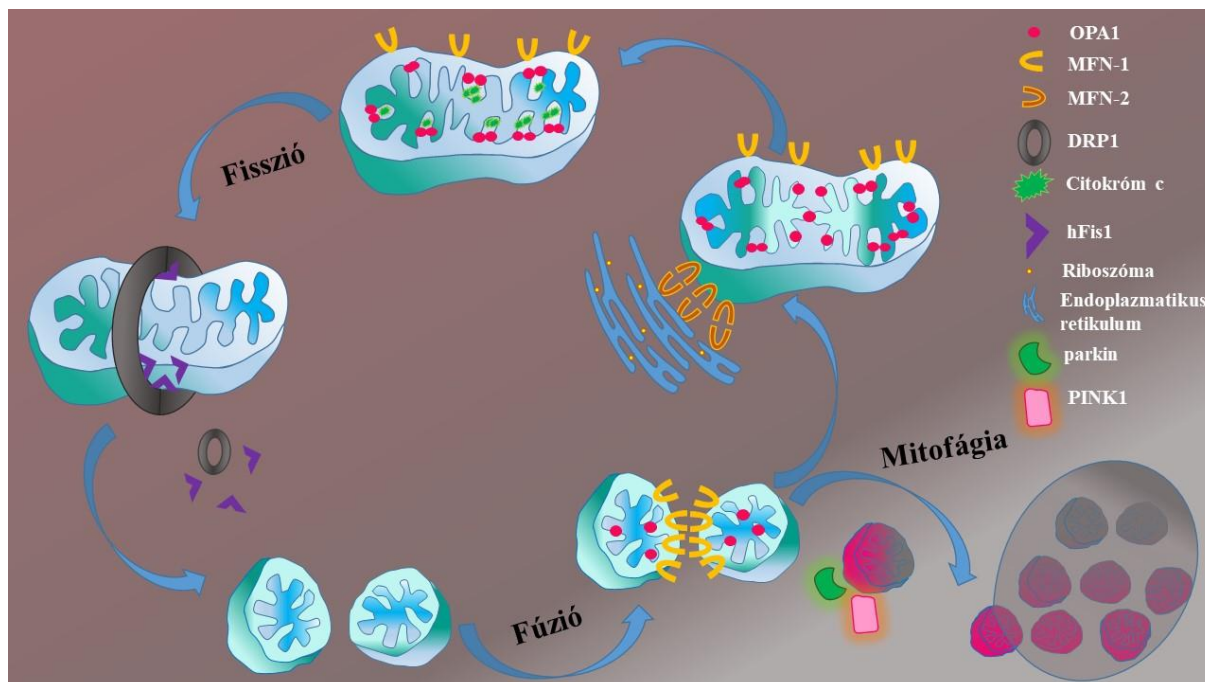
DRP1 mitokondriális toborzásáért felel [117]. A fisszió során a DRP1 a mitokondriumba transzlokálódik, ahol a hFis1-hez kapcsolódik [118] és a MOM-ban a fisszió pontjainál rendeződik el [119]. Multimerikus spirálokat alkot, melyek körülfogják a két leánymitokondrium közötti tubulusokat és GTP-dependens aktivitással elmetszik a mitokondrium membránt [120] [121] [115].

1.2.2.3. *A mitokondriális fúzió- fisszió jelentősége*

A mitokondriális alakformáló fehérjék, így a mitokondriális dinamika és a mitokondriális funkciók kapcsolatát számos tanulmány bizonyította. A mitokondriális bioenergetikai változások befolyásolják a mitokondriális hálózat megjelenését, másrészt, mind a fúzió mind pedig a fisszió gátlása ellehetetleníti a megfelelő mitokondriális működést, és csökkenti az ATP termelést [122]. Ezzel összhangban állnak azok a tanulmányok, melyek során a mitokondriális légzés csökkenését figyelték meg DRP1, hFis1, MFN-2 vagy OPA1 expresszió csökkentést (knockdown) követően [123] [124] illetve MFN-2 mutáció hatására [125] [126].

A mitokondriumok azon képességének, hogy a citoplazmán belüli elhelyezkedésüket és szerkezetüket változtatni képesek, adaptációs szerepe is van, elősegíti a sejt alkalmazkodását az aktuális, és esetenként a sejten belüli hely-függő energia szükséglethez [127] [128]. Másrészt, a folyamatos osztódás-egyesülés lehetővé teszi a mitokondriális tartalom kicserélődését két mitokondrium között [129, 130], illetve, elősegíti a károsodott vagy diszfunkcionális mitokondriumok kisselektálását. Ezt a folyamatot „mitokondriális minőség kontrollnak” nevezzük [124] [127]. A mitokondriumok rendkívül érzékenyek az oxidatív foszforiláció során létrejövő ROS okozta oxidatív károsodásra. A károsodott mitokondriális funkció citokróm c kiáramlást és kaszpáz aktivációt indukálhat mely végül sejthalálhoz vezet. A károsodott, illetve megöregedett mitokondriumok eliminációja tehát elengedhetetlen a mitokondriális háló energetikai egyensúlyához, ahogy az angol szakirodalom ötletesen kifejezi „a mitokondrium formában tartásához” (*to keep mitochondria in „good shape”*), ezáltal az

egész sejt fiziológiás működéséhez [131]. A belső membrán fúziója egy, a transzmembrán potenciáltól ($\Delta\psi_m$) függő folyamat. A károsodott mitokondriumok általában alacsony membránpotenciállal bírnak, így a fission követően nem tudnak újra fuzionálódni a mitokondriális hálóval, vagyis egyfajta természetes szelekció biztosítja a mitokondriális háló épségét [113] [132]. Az autofágia és a proteozóma mediálta proteolízis alapvető fontosságú folyamatok a károsodott fehérje és sejtrészecskék lebontásához [133]. Az autofágia részt vesz a mitokondriális szelekcióban is, ezáltal lehetővé teszi az eukarióta sejt számára, hogy szelektíven lebontsa a szükségtelenné vált mitokondriumokat, ezt a folyamatot mitofágiának nevezzük [134] (3. ábra). A mitofágia két fő irányító proteinje a foszfatáz és tenzin homológ (PTEN)-indukálta kináz 1 (PINK1) és E3 ubiquitin-protein ligáz parkin [135] [136]. A szerin/treonin kináz PINK1 felel a sérült mitokondriumok felismeréséért; mitokondriális célszekvenciával bír és mitokondriális importja szigorúan szabályozott folyamathoz kötött. Az egészséges mitokondriumok, mint előzőleg említettük, megtartják membrán potenciáljukat, mely lehetővé teszi, hogy a PINK1 a külső membrán transzlokáz (translocase of the outer membrane, TOM) komplexen keresztül a külső membránon áthaladjon és a belső membrán transzlokáz (translocase of the inner membrane, TIM) komplex segítségével a belső membránba épüljön. Ezzel a folyamattal párhuzamosan a Presenilins-associated rhomboid-like (PARL) protein a PINK1-et 64, 60 majd végül 52 kDa nagyságú peptidekké hasogatja. Ez teszi lehetővé, hogy a PINK1 ne halmozódhasson fel a külső membránban. Amennyiben a mitokondrium membrán potenciál lecsökken, a PINK1 a mitokondrium külső membránban akkumulálódik, az eredeti, teljes hosszúságú formájában. A külső membránban a PINK1 foszforilálja a Parkin-t (S65 ponton), mely a Parkin E3 ligáz funkciójának aktiválódásához, illetve mitokondriális felhalmozódásához vezet. A Parkin végül elősegíti a mitokondrium fúzióját lizoszómákkal [137] [138].



3. ábra. A mitokondriális fúzió-fisszió folyamata. A fúzió folyamata során első lépésben a különálló mitokondriális egységek külső membránja fuzionál a MFN-1 fehérje segítségével. Ezt követi a mitokondriális belső membrán fúziója melynek lebonyolításáért az OPA1 fehérje felel. A fisszió vagy fragmentáció folyamata során a DRP1 citoplazmatikus fehérje a mitokondriumba transzlokálódik, ahol a hFis1 fehérjéhez kapcsolódik és multimerikus spirálokat alkot. Ezek körül fogják a két leánymitokondrium közötti tubulusokat és GTP-dependens aktivitással elmetszik a mitokondrium membránt. A belső membrán fúziója egy, a transzmembrán potenciáltól ($\Delta\psi_m$) függő folyamat. Ebből következik, hogy a károsodott mitokondriumok, melyek alacsony membránpotenciállal bírnak, nem képesek újra fuzionálódni a mitokondriális hálóval. Az így kiszekelálódó károsodott mitokondriumok degradációjáért az autofágia egy speciális, a mitokondriumba lokalizálódó folyamata felel, melyet mitofágiának nevezünk. Ennek lebonyolításáért a PINK1 és Parkin fehérjék felelnek. Az ábrán jelölt rövidítések a következők: **OPA1**: Optic atrophy protein 1; **MFN-1** és **MFN-2**: Mitofuzin 1-2; **DRP1**: Dynamin-related protein 1; **hFIS1**: Human Fis1; **PINK1**: foszfatáz és tenzin homológ (PTEN)-indukálta kináz 1. Az ábra a szerző műve mely a szövegben hivatkozott irodalmi adatok alapján készült.

1.2.3. A legfőbb mitokondriális funkciók

Az energiatermelést, már első leírásuktól kezdve, a mitokondriumok elsődleges celluláris feladatának tulajdonították. A mitokondrium ad helyet a lipid szintézisnek, pirimidin szintézisnek és a citrát körnek, a sejtanyagcsere alapvető folyamatainak. Számos, olyan katabolikus biokémiai folyamat, mint a glikolízis, glutaminolízis és béta oxidáció, járulnak végső termékeikkel donorként a citromsav ciklushoz, mely során keletkeznek a fő elektron transzporterek, a NADH és FADH₂ [139]. Ezen koenzimek magasabb transzfer potenciállal

rendelkező elektronokat tartalmaznak, vagyis oxidációjuk nagy mennyiségű energia felszabadulásával jár. Ez valósul meg az oxidatív foszforiláció folyamata során.

A mitokondriumnak alapvető szerepe van a sejthalál lebonyolításában. Két fontos apoptotikus útvonalat ismerünk, az extrinzik és intrinzik utat. Az extrinzik út a külső plazma membránon elhelyezkedő „halál receptorokhoz” kötött, mint a TNF α (tumor necrosis factor α), TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) és Fas receptorok. A receptor-ligand kapcsolódás és az ezt követő downstream szignalizáció a végső útvonal iniciátor, kaszpáz 8 aktivációjához vezet. Az intrinzik apoptotikus jelátvitel aktivációját ezzel szemben olyan stimulusok váltják ki, mint a DNS károsodás vagy expozíció károsító anyagok, például kemoterápiás ágensek. Ezek mitokondriális külső membrán permeabilizációhoz (MOMP), majd fehérje kiáramláshoz vezetnek az intermembrán térből a citoszól felé. Az intrinzik útvonal proteinjei között találjuk a citokróm c (cyt c) és a Second mitochondria-derived activator of caspase/direct inhibitor of apoptosis-binding protein with low pI (SMAC/DIABLO)-t melyek a kaszpázok aktivációjáért felelősek [140]. Ez a folyamat a mitokondriális állomány szétesésével, fragmentációjával és a crista-k remodellingjével jár.

A mitokondrium részt vesz a citoszólikus kalcium szint szabályozásában, a kalcium jelátvitelben is. A mitokondriális kalcium kontroll az egyik legfontosabb adaptációs mechanizmus, mellyel a mitokondrium hozzájárul a sejt alkalmazkodásához az aktuális környezeti változásokhoz. Ebben mind a mitokondriális hálózat morfológiai változása mind pedig kapcsolata az endoplazmatikus retikulummal szerepet játszik [114].

A mitokondriumok a sejten belüli ROS képződés legfontosabb forrásai. A ROS fontos szerepet játszik számos fiziológiás és patológiás, elsősorban gyulladásozó folyamatokban, melyeknek mára már tudjuk, hogy alapvető jelentőségük van a cukorbetegség, neurodegeneráció, érlemezésedés vagy öregedés folyamataiban.

Mivel a sejt mitokondriális bioenergetikai állapota meghatározó jelentőséggel bír a sejt környezeti tényezőkhöz való adaptációs készségében, a mitokondriumot érintő genetikai mutációkkal, amelyek sikeresebb sejt túléléshez és rezisztenciához vezetnek, gyakran találkozunk a tumorok patogenezeise során.

1.3. A PARP-1 szerepe különböző extranukleáris folyamatokban, különös tekintettel a mitokondriumra

A PARP-1 hiperaktivációt excesszív NAD⁺ fogyasztás és citoszólikus NAD⁺ depléció követi. Ez kompromittálhatja a NAD⁺ függő anyagcsere útvonalak működését, ideértve a glikolízist és citromsav-ciklust, mely végül a légzési lánc alulműködéséhez és ROS felhalmozódáshoz vezet [141]. A ROS felhalmozódás egyrészt átmeneti mitokondriális permeabilitást és mitokondriális NAD⁺ vesztést indukál [142], másrészt közvetlenül hozzájárul DNS törések létrejöttéhez is [143]. Ezek alapján a PARP gátlás sejtvédő hatással bírhat a PARP-1 indukálta NAD⁺ fogyasztás gátlásával, megőrizve a mitokondriális bioenergetikát. Ez sokáig kielégítő magyarázatként szolgált a PARP gátlók használata során megfigyelt kedvező metabolikus hatásra számos iszkémia-reperfúziós modellben, ahol a védő hatás nem volt magyarázható a használt ágensek direkt antioxidáns tulajdonságával [144].

Izolált mitokondriumokon végzett vizsgálatok azonban további, a mitokondriumon belüli PARP-1 targetek jelenlétét sugallták, melyek esetlegesen a mitokondriális homeosztázis szabályozásában vehetnek részt [145]. Erre egy potenciális jelölt egy PJ34 PARP inhibitorral szeptikus egér modellen végzett kísérletből merült fel, amelyben LPS-el előkezelt egerekben PJ34 hatására AKT/PKB aktivációt írtak le. Ez alátámaszthatja annak lehetőségét, hogy a PARP gátlás védő mechanizmusai esetlegesen az AKT/PKB jelátviteli útvonalhoz köthetők [146]. Az AKT/PKB-mediálta biológiai válaszok pleiotropiát mutatnak de általánosságban elmondható, hogy ezek a folyamatok a sejt túlélését, proliferációját segítik elő, befolyásolva mindeközben

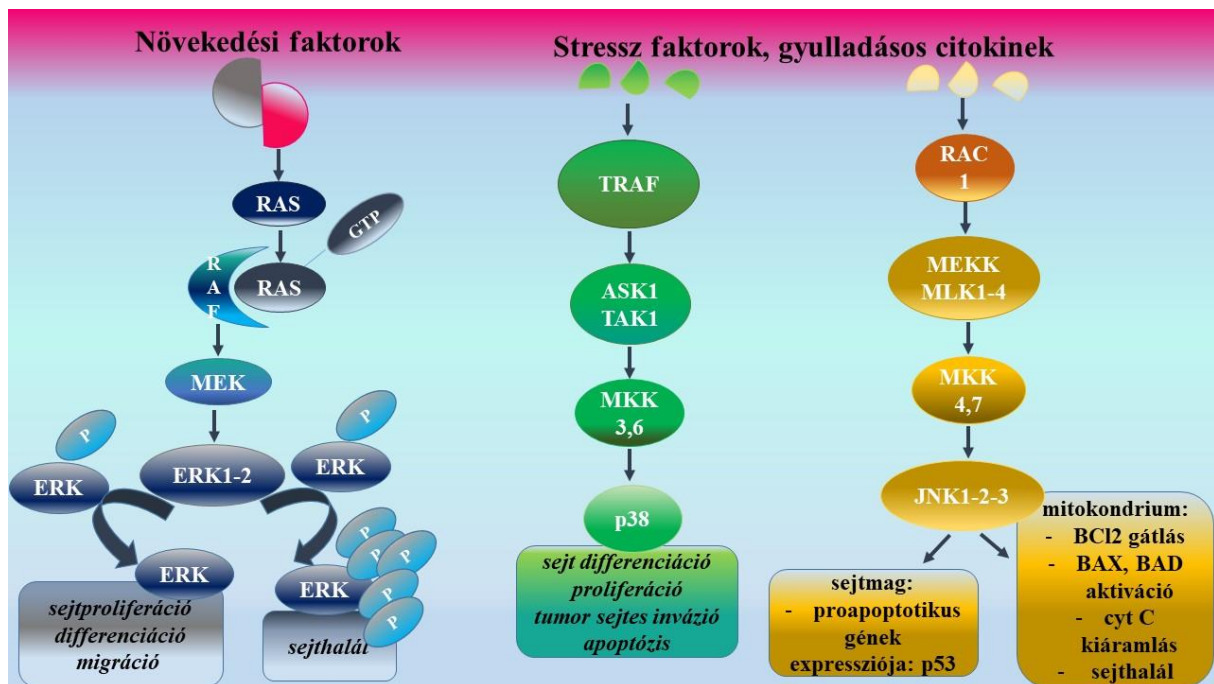
az intracelluláris transzportot vagy olyan komplex mechanizmusokat mint az angiogenezis [147, 148]. Hasonlóan citoplazmatikus társához, a mitokondriális AKT/PKB is a sejt túlélésre irányuló folyamatokat irányít, melyre példa, hogy szívműködésben az AKT/PKB aktivációja és mitokondriális transzlokációja segít fenntartani a szív bioenergetikáját azáltal, hogy fokozza a mitokondriális oxidatív foszforilációt, megőrzi a mitokondriális integritást és megelőzi a citokorom c felszabadulást, gátolva ezáltal az intrinzik apoptotikus jelátvitelt [149-151].

Egyes tanulmányok az AKT/PKB útvonal és a mitokondriális „shaping proteinek” kapcsolatára hívták fel a figyelmet. Ezekben kimutatták, hogy az AKT/PKB útvonal aktivációja mitokondriális fúziót indukál a Mitofuzin-1 foszforilációja által, mely megkésztet MPTP nyitáshoz vezet és megelőzi a sejthalált iszkémia-reperfúziót követően [152, 153], illetve kimutatták azt is, hogy az OPA1 az AKT/PKB útvonal downstream mediátoraként is funkcionál [154, 155]. Ezek a tanulmányok egyúttal azt is sejtetik, hogy a PARP-1 közvetlenül az AKT útvonalon keresztül is hatással lehet a mitokondriális struktúrára és funkcióra.

Az AKT/PKB útvonal a citosztatikum-rezisztenciában fontos szerepet játszik, például az ATP-binding cassette transzporterek (ABC)- szabályozásával. [156-159]. Előzetes kísérletes munkánkkal mi is kimutattuk azt, hogy a PARP gátlás indukálta taxol-rezisztencia hátterében nem az intracelluláris megnövekedett NAD^+ szint, hanem az AKT/PKB jelátvitel játszott szerepet [160].

A Ras-Raf-MEK-Extracellular signal-regulated protein kinases 1 és 2 (ERK1/2) kaszkádot kezdetben kizárólag, mint a sejt túlélés, differenciáció és tumor progresszió útvonalát definiálták. Mivel az ERK1/2 számos tumorban upregulálódik, target terápiai célpontként merült fel a sejthalál és proliferáció gátlásában. Friss tanulmányok a PARP-1 fontos szerepére világítottak rá az ERK jelátvitelben, kimutatva például, hogy az irradiációt követő PARP aktiváció ERK szignalizáció közvetítette folyamat [161]. Sőt úgy tűnik, hogy a PARP-1 képes direkt interakcióba lépni a foszforilált ERK2-vel, ami PARP-1 aktivációt okoz, mely további

például szolgál egy, a DNS sérüléstől független PARP-1 aktivációs mechanizmusra, illetve fontos adat arra vonatkozólag, hogy a PARP-1 az ERK útvonallal interakcióba lépve közvetlen szereppel bírhat a tumorigenezis során az angiogenezisben és metasztázis képződésben [162] [163]. Mára több tanulmány mutatta ki ennek ellenkezőjét is, vagyis, hogy az ERK a sejtípustól és stimulustól függően sejthalált indukálhat [164]. Bár az ennek hátterében álló pontos molekuláris mechanizmusok máig nem teljesen tisztázottak, érdekes, hogy egyes tanulmányok szerint az ERK aktiváció kinetikája és időtartama lehet a döntő, és míg az elhúzódó ERK aktivációt proapoptotikus [165], addig tranziens aktivációját sejtvédő mechanizmusok aktivációja követi [166] (4. ábra).



4. ábra. A MAPK jelátviteli útvonalak, és azok legfőbb funkciói a sejtben belül. A Ras-Raf-MEK- ERK1/2 kaszkádnak mind a sejt túlélés, differenciáció és tumor progresszió mind pedig a sejthalál folyamatában szerepe van. Valószínűsíthető, hogy míg az elhúzódó ERK aktiváció proapoptotikus, addig tranziens aktivációja sejtvédő mechanizmusokhoz köthető. A JNK és p38, más néven stressz aktivált kinázok hasonlóan az ERK-hez, pleiotróp szereppel bírnak a sejt túlélésben. Az ábrán jelölt rövidítések a következők: **RAS**: rat sarcoma; **RAF**: rapidly accelerated fibrosarcoma; **GTP**: guanosine triphosphate; **MEK**: MAPK/ERK kinase; **ERK**: extracellular signal-regulated kinase; **TRAF**: tumor necrosis factor receptor-associated factor; **ASK1**: apoptosis signal-regulating kinase 1; **TAK1**: TGF- β -activated kinase 1; **MKK**: MAPK kinase; **RAC**: RAS-related c3 botulinum toxin substrate; **MEKK**: MEK kinase; **MLK1-4**: Mixed-lineage kinase; **JNK1-2-3**: jun N-terminal protein kinase. Az ábra a szerző műve mely a [167, 168] művek és szövegben hivatkozott irodalmi adatok alapján készült.

A c-Jun N-terminal kinase (JNK) és p38 kinázok, más néven stressz aktiválta kinázok, környezeti hatásokra és genotoxikus stresszre adott aktivációjának fontos szerepe van a gyulladáshoz vezető folyamatokban, sejt differenciációban és proliferációban, azonban hasonlóan az ERK-hez, pleiotróp szereppel bírnak a sejt túlélésben, azáltal, hogy sejttípustól és a stimulustól függően képesek proliferációt vagy apoptózist indukálni [169] [170]. Tumorsejtekben gyakran a túlélésért és invázióért felelnek, [171] [172] [173] [174] [175] [170] ezzel egyetértésben számos JNK kináz inhibitor mutatott ígéretes eredményt tumor terápiai felhasználás során, például egér melanóma modellben vagy potenciózó hatást doxorubicinnel oszteosarkómában [176] [177]. Ezzel ellentétben, bizonyos sejtekben szerepük a sejtproliferáció gátlása, és egyelőre nem tisztázott mitől függ, hogy egy-egy sejtben tumorszuppresszorként vagy onkogénként viselkednek-e.

A PARP-1 lecsökkenti a MAP kináz foszfatáz (MAP kinase phosphatase, MKP-1) expressziót, és gátolja az AKT útvonalat, két, a JNK útvonalat aktiváló mechanizmust [178] [160], mely adat a PARP gátlók lehetséges felhasználhatóságát sugallja emelkedett JNK aktivitással bíró tumorokban. Ezt támasztja alá az a tanulmány, melyben a PARP-1 gátlás lecsökkentette a JNK és p38 aktivációt dual specific protein phosphatase-1 (DUSP-1) megnövekedett expressziója által, elősegítve így a sejttúlélést [178]. Az egymásnak ellentmondó eredményekre példa, hogy mindemellett, a JNK viszont foszforilálja a BCL-2 és BCL-X_L-t lecsökkentve sejttúlélést elősegítő aktivitásukat, ami citokróm c felszabaduláshoz és mitokondriális membrán potenciál eséshez vezet [179]. Ezen kívül direkt képes stimulálni az intrinzik apoptotikus útvonalat, foszforilálva a pro-apoptotikus BCL-2 család tagját a BAD-ot [180].

A p38 tumorszuppresszor szerepére következtethetünk abból, hogy a p38 aktivitás növekedése esetén, kisebb mértékű tumor transzformációt és differenciáltabb tumorsejtek képződését figyeltek meg például rhabdomyosarkómában vagy bél tumorokban [181] [182]. Ezzel ellentétben számos tanulmány számolt be arról, hogy bizonyos tumorsejt vonalakban de akár

hemopoetikus őssejtekben is a p38 pozitívan befolyásolja a sejtproliferációt [183] [184] [185] [170]. A p38 kulcsszerepének felismerése a pro-inflammatorikus proteinek produkciójában, számos kis molekulájú inhibitor kifejlesztéséhez vezetett, melyek közül több bizonyult hatásosnak gyulladásos betegségekre irányuló preklinikai tanulmányokban, viszont kevés jutott el a klinikai fázisig, elsősorban a mellékhatások miatt [186] [187] [170]. A p38 működése során szabályozni képes például a gyulladásos mediátor ciklooxygenáz 2 (COX2) indukcióját, ami hozzájárulhat a tumor progresszióhoz bizonyos bőr és emlő tumorokban és gliómákban [188] [189]. Így, a specifikusabb terápia érdekében, felvethető a p38 inhibitorok lehetséges alkalmazása a gyulladással összefüggő tumorok, mint például a bél vagy a máj daganatok esetén [190, 191]. Egyes vizsgálatok azt találták, hogy a PARP-1 aktiváció következményes p38 aktivációval jár, ami meghatározó a sejtek megfelelő differenciációjához és a sejthalál megfelelő lezajlásához is, ezzel összhangban a PARP-1 gátlás megelőzi a p38 aktivációt, ami sejttúléléshez vezethet [192]. A kombinációs kezelések esetén nem elhanyagolható azonban, hogy úgy tűnik, sok kemoterápiás ágens a p38 útvonal épségét kívánja meg a hatás kifejtéséhez [193]. Ez azt jelentheti, hogy a p38 gyógyszer-indukálta aktivációja szenzitizálhatná a tumorsejteket az apoptózisra.

A kanonikus jelátviteli útvonalak szabályozásán kívül a JNK és p38 MAP kinázok aktivációját kapcsolatba hozták a mitokondriális dinamikával és funkcióval is [194-196]. Erre példa az a tanulmány, melyben azt találták, hogy a JNK mediálta MFN2 foszforilálás elősegíti annak proteozómális degradációját az E3 ubiquitin ligáz HUWE1 által, mely így mitokondriális fragmentációhoz és sejthalálhoz vezet [197]. Ezzel összhangban a Transferrin Receptor 1 (TFR1)-JNK útvonal blokádjá csökkenti a HUWE1-mediálta MFN2 ubiquitinációt, megőrizve a fuzionált mitokondriális hálózatot és funkciót [198]. Ehhez hasonlóan a p38 farmakológiai gátlása mitokondriális fúziót okoz és elősegíti a mitokondriális funkciók megtartását [199]. Habár számos tanulmány feltételezte a JNK-p38 útvonal szerepét a mitokondriális morfológia

és funkció fenntartásában, a lehetséges PARP-1-JNK/p38 tengely proximális és disztális tagjai még tisztázásra várnak.

A felfedezés, hogy a PARP-1 a repair irányításán túl számos jelátviteli folyamatot befolyásol, részt vesz az epigenetikus regulációban, és a DDR-től 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. Ezekre példa, hogy a PARP-1 hozzájárul a magban kódolt citokróm c oxidáz *COX1*, *COX2* és komplex I szubunit *ND2*, mitokondriális elektron transzport lánc elemek transz aktiválásához, illetve a PARP-1 farmakológiai gátlása nukleárisan kódolt mtDNS repair elemek (*UNG1*, *MYH1*, *APE*) és mitokondriális transzkripció faktorok (*TFB1M* és *TFB2M*) elnyomásához vezet [200]. Ezzel az epigenetikus jelöléssel a PARP-1 szabályozza a mitokondriális integritást és funkciót, mely viszont kritikus a PARP-1 koenzim NAD⁺ produkcióhoz.

Ezen kívül, a PARilált proteom szisztematikus analizálása kapcsolatot mutatott ki a PARiláció és olyan alapvető sejtes folyamatok között, mint a DNS és RNS metabolizmus, a fent említett kanonikus jelátviteli útvonalak és a sejt ciklus szabályozás vagy apoptózis [201] (1 táblázat).

Az apoptózisban meghatározó szerepet játszik a p53 transzkripció faktor. Szabályozott génjei között találjuk a *PUMA* (p53 upregulated modulator of apoptosis) és *Noxa* pro-apoptotikus fehérjéket, a BCL-2 család tagjait, de számos tanulmány bizonyította azt, hogy mindemellett a p53 transzkripció független módon, mitokondriális útvonalakon keresztül okoz apoptózist a B-cell lymphoma 2 (BCL-2) fehérje család más tagjainak, az intrinzik apoptotikus útvonal kulcs szabályozóinak befolyásolásán keresztül [202] [203]. A BCL-2 fehérje család két csoportját különítjük el. Megkülönböztetjük egyrészt a pro-apoptotikus BAK, BAX és a BID, BIM, BAD, Noxa, PUMA BH3, másrészt az antiapoptotikus BCL-2, BCL-xl és MCL-1 fehérjéket. Ez utóbbiak a pro-apoptotikus BCL-2 család tagjaihoz kötődnek és gátolják ezek apoptotikus aktivitását, megakadályozva a citokróm c és más pro-apoptotikus faktorok mitokondriális

felszabadulását és a következményes apoptózist. A p53, mitokondriális transzlokációját követően, a BCL-2 család tagjaihoz kötődve befolyásolja azok működését. A BAK fehérjéhez kötődve elősegíti annak leválását az MCL-1 gátló fehérjéről. Ezt követően a BAK konformációs változáson megy keresztül, oligomerizálódik, ami lehetővé teszi a citokróm c felszabadulást a mitokondriumból [204]. A PARP-1 expresszió csökkenése pankreász karcinóma sejtekben csökkent pro-kaspáz-3 expressziót, növekedett kaspáz-3 aktivitást, csökkent BCL-2 fehérje expressziót és növekedett p53 expressziót okoz [205]. Hasonlóan, egér modellben azt találták, hogy a PARP gátló kezelés a p53 jelátviteli fehérje génjének upregulációja által csökkent sejtciklus progresszióhoz és apoptózis indukcióhoz vezethet neuronális őssejt/progenitor sejtekben, illetve ezzel összhangban a PARP gátlása növekedett p53 expresszióhoz vezet [206].

A p21 fehérje (másnéven WAF1, CAP20, Cip1, Sdi1) a ciklin kináz inhibitor a p27 és p57 fehérjékkel együtt a Cip/Kip család tagját képezi. Konzervált NH-terminális régiójukkal különböző ciklin/CDK komplexekhez kötődnek és azokat gátolják. A p21 alapvető fontosságú a DNS károsodást követő sejtnövekedés gátlásban, overexpressziója G1-G2 vagy S-fázis blokkot okoz [207]. Egyes vizsgálatok nélkülözhetetlen szerepet tulajdonítottak a p21-nek, a PARP gátlás során megfigyelt sejtosztódási megállásban [208].

Ezek a felsorolt, sokszor egymásnak ellentmondó tanulmányok rámutatnak arra, hogy a PARP-1 gátlás hatása valóban nagyban függhet az adott sejtípustól és a sejtes környezettől és magyarázatul szolgálhatnak arra, hogy a PARP-1 inhibíció terápiás hatása miért mutat ilyen nagy varianciát az egyes modellek között.

ID	Interaktor neve	Funkció	Interakció típusa	Interakció hatása	Refs
XRCC1	DNS repair protein XRCC1	BER	PARiláció	XRCC1 toborzás a DNS sérüléshez	[38]
UNG1	Uracil-DNS glikoziláz	BER	Transzkripciós reguláció	Nukleáris transzkripció aktiváció	[200]
COX 1	citokróm c oxidáz 1. alegység	Respirációs IV komplex alegység	Transzkripciós reguláció	Mitokondriális transzkripció aktiváció	[200]
COX 2	citokróm c oxidáz 2. alegység	Respirációs IV komplex alegység	Transzkripciós reguláció	Mitokondriális transzkripció aktiváció	[200]
ND2	NADH-ubiquinone oxidoreduktáz 2. lánc	Respirációs IV komplex alegység A mitokondriális légzési lánc tag NADH dehidrogenáz (Komplex I)-nek alegysége	Transzkripciós reguláció	Mitokondriális transzkripció aktiváció	[200]
c-FOS	Proto-onkogén c-Fos	Transzkripciós regulátor	PARiláció	?	[201]
c-JUN	Proto-onkogén c-Jun	Transzkripciós regulátor	PARiláció	Aktiváció	
NF-κB	Nukleáris faktor-kappa-B	Transzkripciós regulátor	Direkt interakció	Aktiváció	[75] [75, 76] [76] [209]
HIF1α	Hypoxia-indukálható faktor 1-alpha	Transzkripciós regulátor	Transzkripciós reguláció	<i>HIF1A</i> indukció	[75] [75, 76] [76] [209]
p53	Celluláris tumor antigen p53	Transzkripciós regulátor	PARiláció	Inhibíció	[210]
p21 ^{CIP1/WAF1}	Ciklin-dependens kináz inhibitor 1	Sejtciklus	PARiláció	?	[33]
AIF	Apoptózis indukáló faktor	Apoptózis	PARiláció	AIF transzlokáció a mitokondriumból	[73]
H3, H4	Hiszton-H3, -H4	Kromoszóma remodelling, transzkripció reguláció, DNS repair	Direkt interakció	PARP-1 aktiváció, kromatin remodelling	[60]

1. táblázat: A PARP-1 interaktom tagjai

2. Célkitűzések, kísérletes munkánk alapja

DNS repairben betöltött szerepe alapján a PARP-1 fontos onkológiai target terápia célpont lehet. Azonban mind *in vitro*, mind *in vivo* kísérletek arra világítottak rá, hogy a poli(ADP-ribozi)láció a DNS repairen kívül számos, repair-független fiziológias és patofiziológias folyamatban elengedhetetlen szerepet játszik [32] [29].

Ezek között említhetők azok a tanulmányok, melyekben a PARP gátlás védő hatását bizonyították agyi iszkémiás folyamatokban, *Diabetes mellitusban*, miokardiális iszkémia-reperfüziós, vagy szeptikus shock modellben [211-213] [146]. Fontos és érdekes kísérletes eredmény a PARP gátlás mitokondriális mechanizmusokra gyakorolt hatása, mely kapcsán előzetes kutatások során, intézetünkben mi is kimutattuk, hogy a PARP gátlók védik a mitokondriális membrán potenciál stabilitást oxidatív stresszben, számos jelátviteli útvonal aktiválásával [22, 178, 214]. Megemlítendő a PARP-1 láció jelentősége a sejtciklus során az S-fázis illetve M-G1 átmenet szabályozásában is, mely folyamatok az egészséges sejtekben betöltött jelentőségükön túl, tumor terápia felhasználás esetén szerepet játszhatnak a migrációban, és a metasztázis formálásban [144, 215] [216, 217].

Ezeknek a tanulmányoknak abból a szempontból is fontos jelentőségük van, hogy felhívták a figyelmet a PARP enzim család funkcióinak komplexitására, és arra, hogy a PARP gátlók klinikai használata során nem feltétlenül számíthatunk egységes sejtválaszra, szervezettől vagy akár felhasznált inhibitorától függetlenül. Sőt, a PARP-gátlók mediálta kemo-szenzitizáló hatás csak bizonyos kemoterápiás ágensekre és/vagy sejt típusokra igaz, tehát a végleges sejtválasz valószínűleg az adott modell genetikai háttérétől, fehérje expressziós mintázatától, a sejt belüli bonyolult jelátviteli útvonalak összességétől függhet.

A PARP gátlás extranukleáris jelátviteli folyamatokra gyakorolt hatásával kapcsolatban számtalan irodalmi adatot ismerünk. Kimutatták az AKT jelátvitelben, MAPK kaszkádban vagy gyulladásszerű folyamatokra kifejtett hatását.

Dolgozatomban két különálló munkánk eredményeit mutatom be. Első munkánkban különböző sejtes tumor modelleken figyeltük meg a PARP gátlás hatását a MAPK kaszkádra, az AKT jelátvitelre és egyéb extranukleáris folyamatokra. Következő kísérletes munkánk során pedig a PARP gátlás sejt toxikus hatásán kívül, annak kifejezetten mitokondriális hatásaira fókuszáltunk.

Célul tűztük ki:

- A HO3089 és PJ34 PARP gátlók hatásának vizsgálatát különböző tumor sejtes modellek 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. Reagensek

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 a JNK II inhibitorok kivételével, melyeket a Calbiochem cégtől rendeltük (Darmstadt, Germany) és a pPARPGFPC1/N3 konstrukt kivételével, mely Dr. Debreceni Balázs munkájának eredménye. Kísérleteink során a PARP gátló PJ34-t 10 μM , a temozolomide-t 25 μM , a ciszplatin-t 25 μM , HO3089-t 10 μM , PD98059-t 4 μM , SB203580-t 1.2 μM , LY294002-t 10 μM és a JNK Inhibitor II-t 1 μM koncentrációkban alkalmaztuk. A törzs oldatokat dimetil szulfoxiddal (DMSO) készítettük, a kezelési hígításokat az adott sejtvonalhoz alkalmazott médiumban végeztük különböző koncentrációk szerint. A mitochondrial targeted dsRED (mitochondria-targeted red fluorescent protein, mtRFP) és a pPARPGFPC1/N3 konstruktokat a [105] és [22] cikkekben leírtak szerint alkalmaztuk. A dsRED plazmid mitokondriális target szekvenciát tartalmaz az 5' végén, mely által lehetővé teszi a mitokondriális struktúra változás monitorozását. A fluoreszcens jelölés stabilitása és hogy ellenáll a PH változásoknak lehetővé teszi felhasználását hosszú távú kezelésekből és time-laps képalkotáshoz egyaránt. A pPARPGFPC1/N3 konstrukt a PARP –DBD modul transzdomináns expressziója által PARilációra képtelen domináns negatív PARP enzimként hat, mely a PARP gátló lókuszekhez kötődik.

A telekobalt külső besugárzást külső irradiációs géppel (Teratron 780C, 1.25 MeV) végeztük 2.0 vagy 4.0 Gray sugár erősséggel.

3.2. Sejtvonalak és sejtkultúra feltételek

Az egér B16F10 melanóma sejtvonalat az American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) cégtől rendeltük és Dulbecco's Modified Eagle Medium (Invitrogen, Life Technologies, Milan, Italy) médiumban tenyésztettük 10% (v/v) főtális marha szérum (Thermo Fisher, Life Technologies, Milan, Italy), 1% (v/v) penicillin/streptomycin és glutamine koktél (Invitrogen, Life Technologies, Milan, Italy) jelenlétében. A tranziens transzfekción átesett B16F10 sejteket a Transfectin Lipid Reagent (Bio-Rad Laboratories S.r.l., Milan, Italy) készítmény használatával állítottuk elő a gyártó leírásának megfelelően. 4-6 óra inkubációs idő után a médiumot eltávolítottuk, frissre cseréltük majd a kísérleteket 24 óra elteltével kezdtük meg.

A humán A549 tüdő adenokarcinóma, humán U251 glioblasztóma és az egér 4T1 emlő adenokarcinóma sejtvonalakat az American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) cégtől rendeltük. Az A549 sejteket Minimum Essential Médiumban (MEM), míg az U251 és 4T1 sejteket Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 médiumban (PAA Laboratories, Cölbe, Germany) tenyésztettük, mindkettőt kiegészítve 10% marha szérum albumin (BSA), 1% penicillin és streptomycin keverékkel (Gibco/Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

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

A sejtek mitokondriális NADPH reduktáz aktivitás változásának vizsgálatára MTT tesztet alkalmaztunk. 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 szubsztátot 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. Minden kísérletet legalább négy párhuzamos kezelésben végeztük és legalább háromszor megismételtük.

3.4. Kolónia formáció vizsgálat

A sejtek kolónia formációs képességének meghatározása végett az U251 és 4T1 sejteket 6-lyukú lemezekben szélesztettük 500 sejt/lyuk sejtszámban és egy éjszakán át inkubáltuk a kezelések megkezdése előtt, majd a HO3089 és MAPK inhibitorok kombinációival kezeltük 1 órán át a besugárzás előtt. Az egyes MAPK inhibitorok hatásosságát Western blot analízissel vizsgáltuk meg foszforiláció specifikus anti-ERK1/2 (extracellular signal regulated kinase), anti-p38 MAPK és anti- stress-activated protein kinase (SAPK) / JNK (stress activated protein kinase/Jun kinase) elsődleges antitestek (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) felhasználásával. 7 nap inkubáció után a sejteket átmostuk majd kristályibolya festéssel jelöltük és az ötvennél több sejtet tartalmazó kolóniákat megszámláltuk. A kolóniák számát a kontroll csoportban mért kolóniák arányában fejeztük ki.

A B16F10 sejteket 6-lyukú lemezekben szélesztettük 300 sejt/lyuk sejtszámban és egy éjszakán át inkubáltuk a kezelések megkezdése előtt majd 10 napig a kezeléseket követően. A kezelés leteltével a sejteket 1xPBS oldattal mostuk át majd 0.1% Coomassie blue (Bio-Rad Laboratories S.r.l., Milan, Italy) oldattal festettük 30% metanol és 10% ecetsav elegyében oldva. A lemezeket beszkeneltük és a kolóniákat ImageJ software segítségével számláltuk meg.

3.5. Sejthalál analízis

A kezelések sejthalált indukáló hatásának vizsgálatára Flow citometriás vizsgálatot végeztünk Annexin V (apoptotikus sejtek) és Propídium jodid (PI) (nekrotikus sejtek) jelölést követően.

A B16F10 sejteket 6-lyukú lemezeken szélesztettük 2×10^4 sejt/well denzitásban, majd 24 óráig inkubáltuk a kezelések megkezdése előtt. A mintákat FITC-el jelölt Annexin V és Propídium-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 és az adatokat CellQuest Pro softwarrel elemeztük.

3.6. Comet Assay

A kromozómális DNS hasítódása fragmentekké az apoptózis folyamatának szerves része. A kezelésekre létrejövő DNS fragmentáció vizsgálatára Comet assay-t alkalmaztunk.

A mikroszkópos üveglemezeket PBS-ben oldott, 1%-os normál olvadáspontú agarózzal vontuk be. A B16F10 sejteket 6-lyukú lemezeken szélesztettük 7×10^4 sejt/lyuk denzitásban. A kísérleteket követően a sejteket összegyűjtöttük, centrifugáltuk és 500 μ l, 1%-os, előmelegített alacsony olvadáspontú PBS-ben oldott agarózzal kevertük össze. 50 μ l szuszpenziót az előkezelt üveglemezekre pipettáztunk és 4°C-on 10 percig inkubáltuk. Az üveglemezeket lízis pufferben (2.5 M NaCl, 300 mM Tris, 200 mM NaOH, 3 mM Na₂EDTA, 1% Triton X-100) inkubáltuk 15 percig, majd elektroforetizáltuk 25 Voltos feszültséggel 300 mA áramerősséggel 4°C-on 30 percig. Ezt követően az üveglemezeket háromszor neutralizáltuk 5 percig Tris pufferben (0.58 M, pH 7.5) majd 70%-os etanolba áztattuk 5 percig, majd 0.25 μ g/ml Hoechst 33342-el festettük 10 percig, PBS-el kétszer átmostuk és Nikon Eclipse Ti-U fluoreszcens mikroszkópban Spot RT3 kamerával 60x objektív alatt vizsgáltuk. Legalább 25 sejtet választottunk ki véletlenszerűen a kiértékelésekhez. A Comet attribútumokat ImageJ software segítségével vizsgáltuk.

3.7. Magfragmentációs vizsgálat

Az apoptózis folyamatának vizsgálatára az egyik legmegbízhatóbb módszer az apoptotikus nukleuszok jelenlétének vizsgálata, és azok kvantifikálása.

A B16F10 sejteket 96 lyukú lemezen 2000 sejt/lyuk koncentrációban szélesztettük majd egy éjszakán át inkubáltuk a kezelések megkezdése előtt. A kezeléseket követően a sejteket 1xPBS-ben mostuk át és 0.5 µg/ml koncentrációjú Hoechst 33342-el festettük 10 percig. A sejtmagokat Nikon Eclipse Ti-U fluoreszcens mikroszkóp Spot RT3 kamerájával 4× és 20× objektív lencsékkel vizsgáltuk. A képeket 4× objektív lencsékkel rögzítettük. A kondenzált, illetve fragmentált apoptotikus morfológiájú sejtmagokat ImageJ software (NIH) segítségével kvantifikáltuk. Minden kezeléshez legalább 300 sejtmagot értékeltünk ki.

3.8. 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. A konfokális z-stack rekonstrukciókat IMIC Andromeda system (Fondis Electronic) segítségével rögzítettük, 60× olaj immerziós olaj alapú objektívvel (UPLAN 60× olaj objektív, 1.35NA, Olympus, Milan, Italy) 488 és 561 nm excitációjú hullámhosszon HC 525/39 és HC 615/20 (Semrock) emissziós filterekkel. A mitokondrium hosszúságokat legalább sejtenként 10 mitokondrium manuális megméréssel határoztuk meg, ImageJ software (NIH) segítségével. Minden mintában legalább 20 sejtet analizáltunk.

3.9. 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 [109]. 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 és monitoroztuk a sejtek piros fluoreszcencia kibocsátását, mely a mitokondriális transzmembrán potenciállal korrelált. 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-trifluorometoxifenil hidrazon (FCCP) oldattal kezeltük. Az egyes mitokondriális hálózati régiók TMRM fluoreszcencia kiértékelése ImageJ program (NIH) segítségével történt.

3.10. Immunoblot analízis

Az egyes kezelések hatására létrejövő fehérje expressziós változásokat Western blottal vizsgáltuk. Az egyes kezelési csoportokhoz tartozó B16F10 sejteket 1% proteáz inhibitor koktél és 10% Phos-stop foszfatáz inhibitor keverékkel kiegészített (Roche, Sigma-Aldrich S.r.l., Milan, Italy) hideg Radioimmunoprecipitation assay (RIPA) lízis pufferben gyűjtöttük össze. Jégen inkubáltuk 30 percen át és 10.000 g sebességgel centrifugáltuk 4 °C-on, 15 percig. A fehérje koncentrációkat Bradford reagenssel (Bio-Rad Laboratories S.r.l., Milan, Italy) határoztuk meg. 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 (TBS)-t tartalmazó 0.1 % Tween-20-ben oldott 5% 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 tris-buffered saline és Tween 20 (TBST) elegyét tartalmazó 5% BSA oldatban oldottuk. A membránokat a torma-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 történő sejtmembrán destrukciót követően lecentrifugáltuk, a homogenizátumot és a felülúszó fehérje koncentrációját bicinkonin sav reagenssel mértük meg és 1 mg/ml protein koncentrációra ekvalizáltuk Laemmler pufferben. A fehérjéket (50 μ g/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, foszfoszspecifikus Akt-1 Ser473, Bax, BCL-2, foszfoszspecifikus Erk1/2 Tr202/Tyr204, foszfoszspecifikus p38 MAPK Tr180/Tyr182 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), PARP-1, PAR (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany), foszfoszspecifikus SAPK/JNK Tr183/ Tyr185 (RandD Systems, Abingdon, UK), foszfoszspecifikus p53 Ser15 (PromoKine, Heidelberg, Germany),

caspase-3, foszfoszspecifikus 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 tormaökökér peroxidázhoz kapcsolt nyúlban (1:3000, Bio-Rad, Budapest, Hungary), egérben (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-el (ECL) vizualizáltuk 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.

3.11. 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 A549, 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.

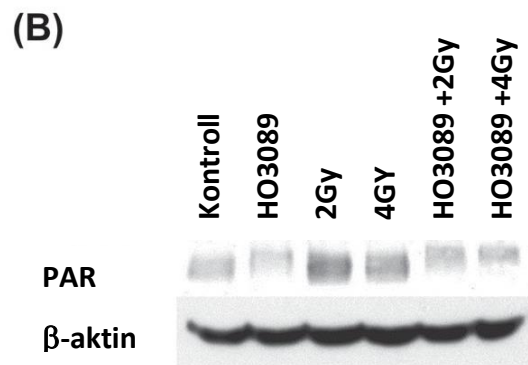
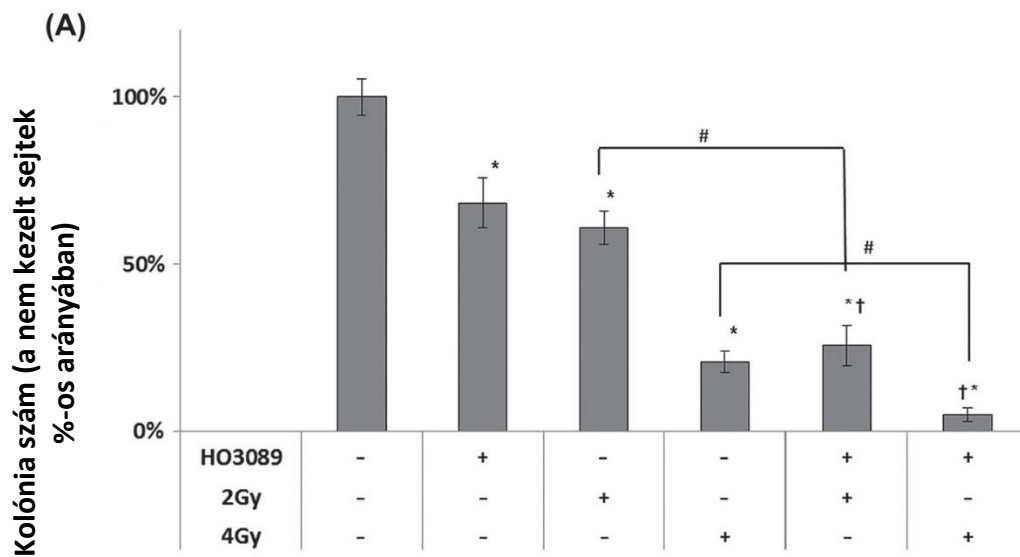
4. Kísérletes munkáink, eredmények

Kísérletes munkáink során a PARP gátlás, irradiáció és két ismert kemoterápiás szer, a ciszplatin és temozolomide hatását vizsgáltuk különböző tumor sejtvonalak kolónia formációs készségére, sejthalálra, illetve a mitokondriális struktúra és funkció változásaira. Ezen felül megfigyeltük mitogen-aktivált protein kináz (MAPK) és sejthalál útvonalak különböző kezelésekre mutatott foszforilációs változásait, illetve a MAPK inhibitorok hatását a vizsgált sejtek kolónia formációs készségének változására.

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

A PARP gátlás szinergisztikus hatása irradiációval több tanulmányból ismert [218]. Kísérletes munkánk során, a HO3089 PARP gátló és irradiáció hatását vizsgáltuk külön-külön vagy kombinációban A549 humán tüdő adenokarcinóma sejtvonalon.

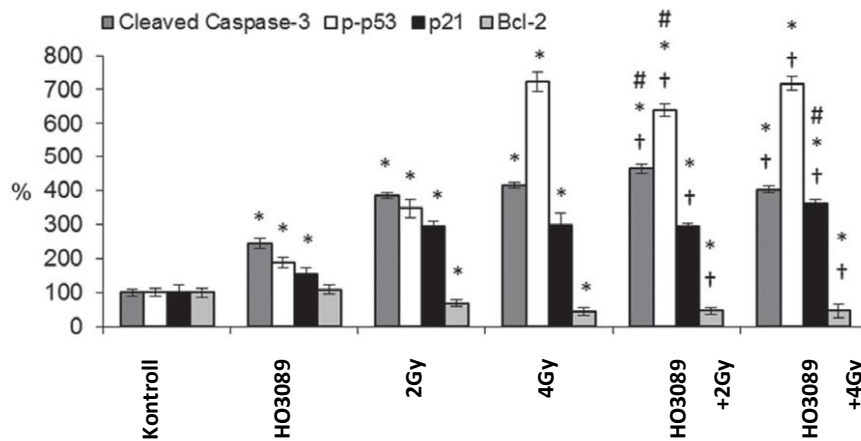
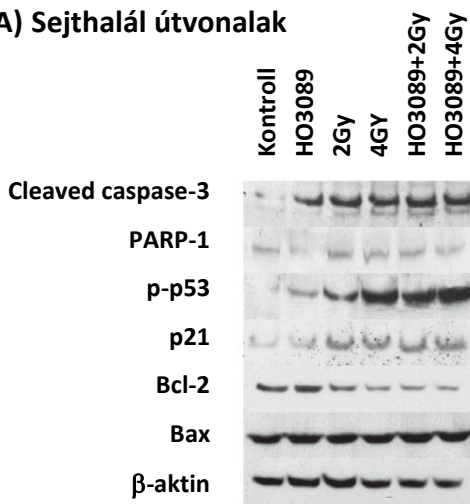
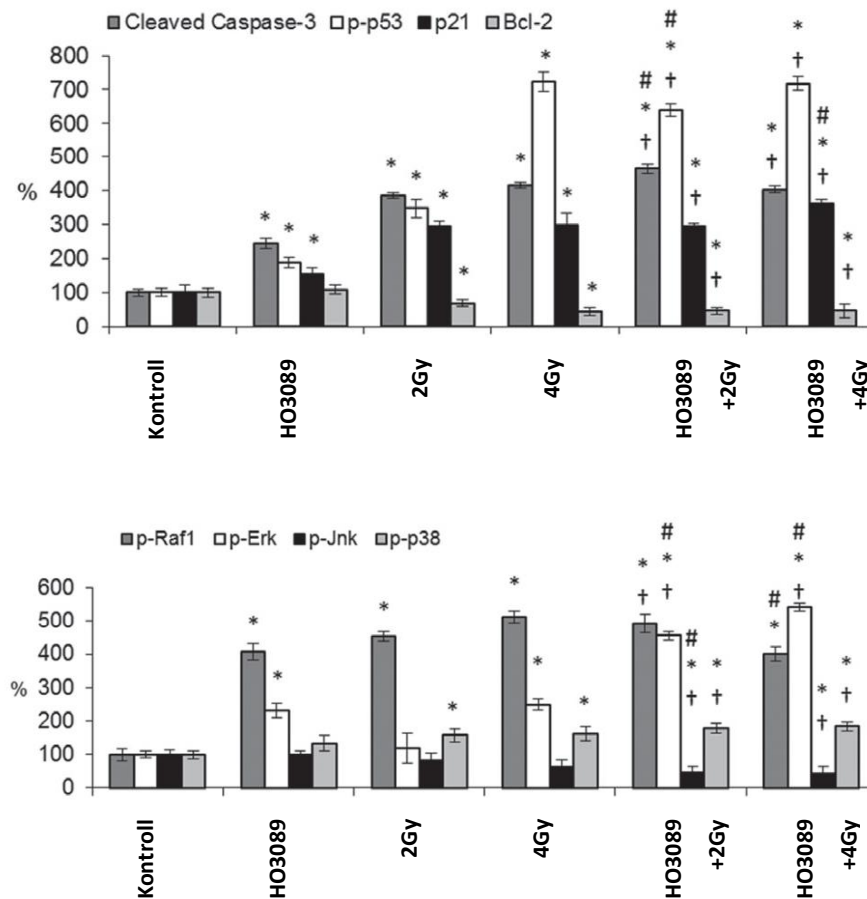
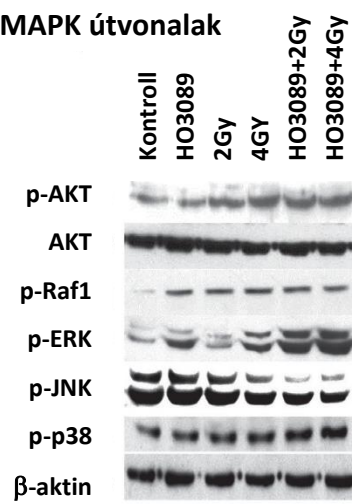
Megfigyeléseink szerint a HO3089 előkezelés jelentősen csökkentette az A549 sejtek kolónia képző kapacitását besugárzást követően. A kezeletlen csoporthoz képest a 2 és 4 Gray-jel történő besugárzás HO3089 kezelés nélkül vagy annak jelenlétében átlagosan 60.98%, 20.73%, 25.61% és 4.88%-ra csökkentette le a kolóniák arányát a kontroll csoporthoz képest. A HO3089 előkezelés ebben az esetben is, önmagában is szignifikánsan csökkentette a sejtek kolónia formációs képességét (68.29 % SEM * $P < 0,05$) a kontroll csoporthoz képest. (5A ábra). A Western blot analízissel HO3089 PARP gátló PAR-szintet csökkentő hatása volt detektálható (5B ábra).



5.ábra A besugárzás és a HO3089 hatása az A549 sejtek kolónia formációs készségére és a PAR expresszióra. (A) A kolónia formáció eredményeit mutatjuk A549 tüdő adenokarcinóma sejteken 2Gy vagy 4Gy besugárzást követően és/vagy HO3089 PARP inhibitor kezelés után. A kolóniák számát a nem kezelt sejtek százalékos arányában fejeztük ki. * $P < 0,05$ a kontroll értékekhez képest; # $p < 0,05$ a megfelelő 2 vagy 4Gy-el besugárzott csoporthoz képest; † $p < 0,05$ a HO3089-el kezelt csoport értékeihez képest. Három független kísérlet reprezentatív ábráját mutatjuk. Az adatokat egy-utas ANOVA-val analizáltuk Tukey *post hoc* teszttel (alfa = 0,05; $n \geq 3$). (B) A PAR szinteket Western blottal a fent leírtak szerint kezelt sejthomogenizátumokból analizáltuk. Béta-aktint használtunk loading kontrollként.

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 A549 sejtekben kifejtett irradiációt érzékenyítő hatásának háttérében rejlő biokémiai folyamatok megértése érdekében megvizsgáltuk a fehérje expressziós és aktivációs változásokat 24 órával a besugárzást követően (6. ábra).

(A) Sejthalál útvonalak**(B) MAPK útvonalak**

6. ábra (A) és (B). Western blot: a HO3089 hatása az ábrán jelölt szignalizációs útvonalak tagjainak foszforilációs állapotára 2 és 4 Gy besugárzással vagy anélkül A549 sejtekben. Különböző kezelési kombinációkat használtunk, ahogy azt az ábrákon jelöltük. A fehérje expressziós változásokat 24 órával a kezelés után analizáltuk, Western blot technikával. β -aktint alkalmaztunk loading kontrollként. Három független kísérlet reprezentatív ábráit mutatjuk. A három független kísérlet pixel denzitásait átlag \pm SEM-ben fejeztük ki, azon jelátviteli fehérjéknél, melyeket a kezelések befolyásoltak. (* $p < 0.05$ a kontroll értékekhez képest, # $p < 0.05$ a megfelelő 2 vagy 4Gy-el besugárzott csoporthoz képest; † $p < 0.05$ a HO3089-el kezelt csoport értékeihez képest). Az adatokat egy-utas ANOVA-val analizáltuk Tukey *post hoc* teszttel (alfa = 0,05; $n \geq 3$).

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 nem okozott detektálható AKT aktivációt önmagában, a teljes AKT mennyiség egyik kezelés hatására sem mutatott változást.

A PARP gátlás határozott p53 aktivációt okozott, mindeközben, pedig dózis-függő megnövekedett p53 foszforiláció volt megfigyelhető, a sugárzás mértékének növelésével párhuzamosan (246% és 623%-os növekedés). Ez a hatás még nyilvánvalóbb volt, ha a kezelést HO3089-el egészítettük ki. Az 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 antiapoptotikus BCL-2 szintje lecsökkent minden kezelésben, kivéve ha a HO3089 kezelést önmagában alkalmaztuk. A PARP expresszióban nem tapasztaltunk változást az egyes kezelések között. Az A549 sejtvonalban a Raf-1 foszforiláció, a kontroll csoporton kívül minden egyéb kezelés esetén egyenlő mértékben 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. Ez még kifejezettebb volt, ha magasabb besugárzási dózist, 4 Gy-t alkalmaztunk (átlagosan 19% -al a HO3089 kezelés és átlagosan 148% -al a besugárzás esetén). A kombinációs kezelés is ERK1/2 foszforilációhoz vezetett.

A JNK/SAPK foszforiláció dózisfüggő csökkenését figyeltük meg besugárzás esetén (16% és 38% átlagos csökkenés a kontrollhoz képest). Ez jellemző volt HO3089 jelenlétében is. A p38 MAPK foszforilációja is detektálható volt besugárzás hatására (57% és 61% átlagos emelkedés a kontrollhoz képest). Mely szintén jellemző volt a HO3089 kezelés esetén is.

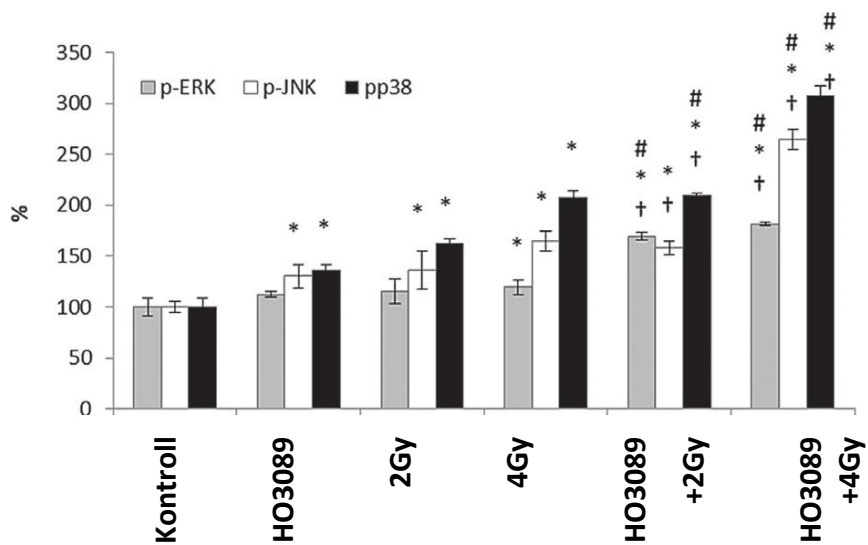
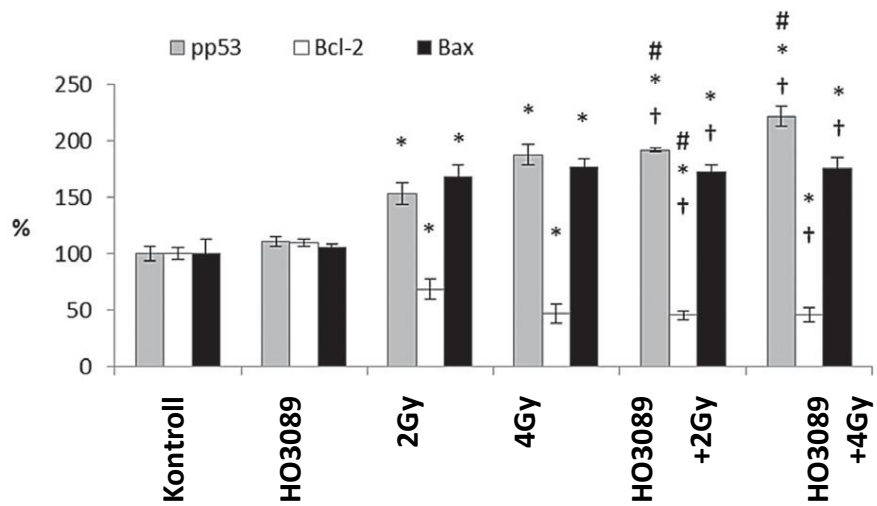
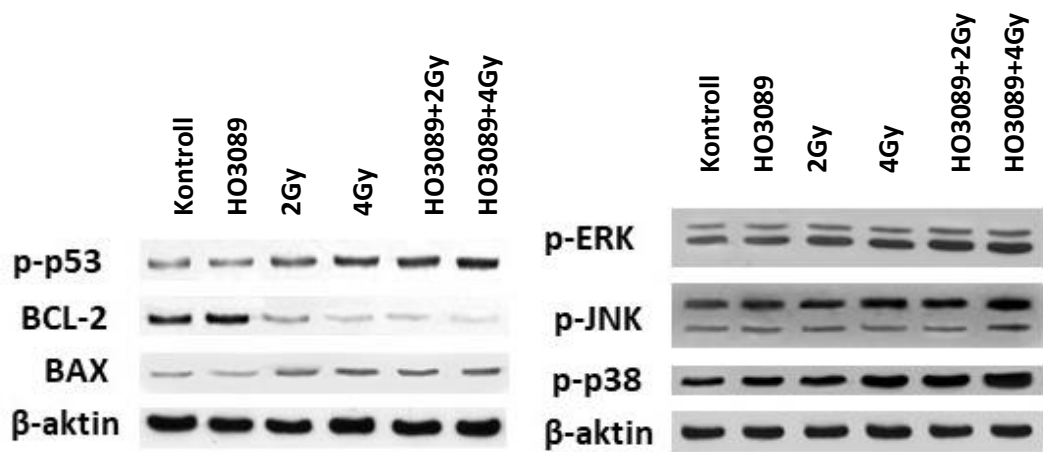
Annak érdekében, hogy kiderítsük, hogy a megfigyelt változások jelen vannak-e más sejtvonalakban is, megismételtük kezeléseinket 4T1 emlő karcinóma sejteken is.

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

Azt találtuk, hogy a foszfo p53 szintet a HO3089 önmagában nem befolyásolta, azonban sugárkezelés hatására a foszforiláció dózis-függően nőtt (7. ábra). További szignifikáns foszforiláció emelkedést tapasztaltunk besugárzott és PARP gátlóval kezelt sejtekben (91% és 121%-os emelkedés). Nem találtunk szignifikáns BCL-2 expressziós emelkedést a kizárólag HO3089-el kezelt sejtekben, ezzel szemben szignifikáns dózis-függő csökkenést figyeltünk meg besugárzást követően (32% és 54%-os frakció csökkenés a kontrollhoz képest), amelyet a PARP gátlás tovább fokozott. A HO3089 önmagában nem befolyásolta a BAX expressziót, azonban szignifikáns emelkedést figyeltünk meg besugárzást követően, ami független volt mind a besugárzás mértékétől, mind a PARP gátlástól (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 (30%, 36% és 63% átlagos emelkedés).

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). HO3089-el előkezelt majd besugárzott sejtek esetén is, emelkedést figyeltünk meg a p38 foszforilációban (109% és 206%-os átlagos emelkedés a kontroll csoporthoz képest).



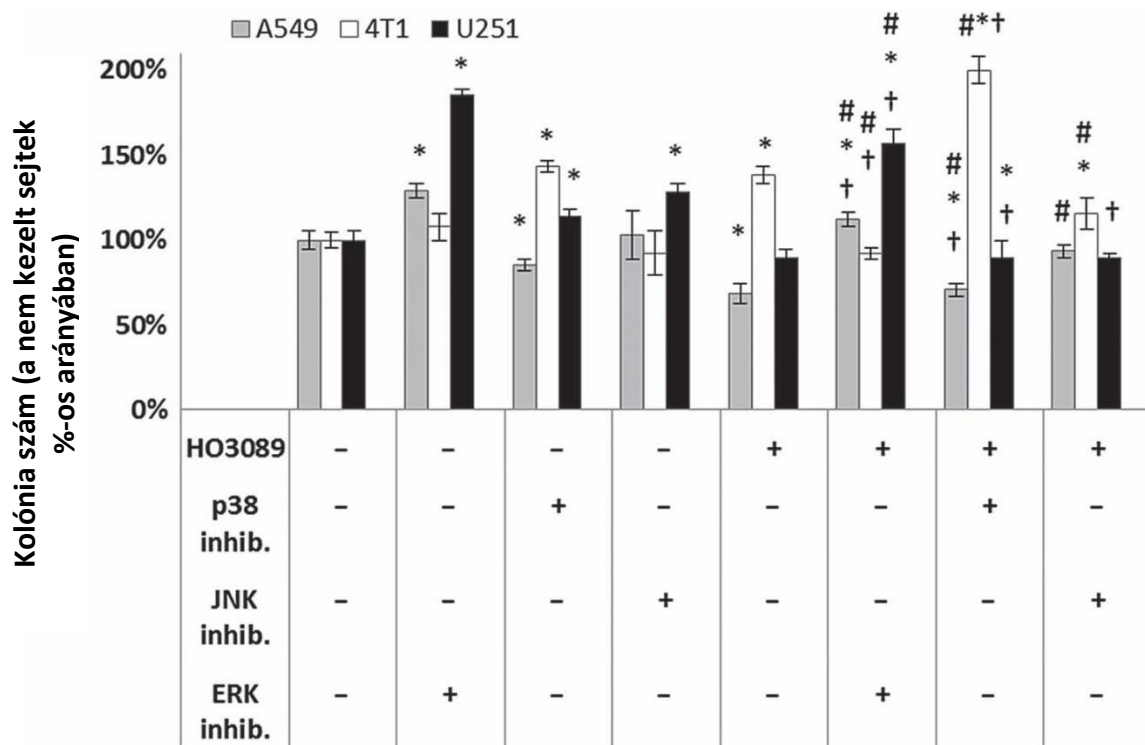
7.ábra A HO3089 hatása a jelölt jelátviteli fehérjék foszforilációs állapotára 2 és 4Gy besugárzást követően vagy anélkül 4T1 sejtekben. A kísérletes körülmények, módszerek és kiértékelési módszer megegyeznek a 6. ábránál leírtakkal.

További kísérletünkben azt kívántuk megvizsgálni, milyen hatást érünk el a PARP gátlás okozta kolónia formáció gátlásban, amennyiben a kezeléseinket MAPK inhibitorokkal egészítjük ki.

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

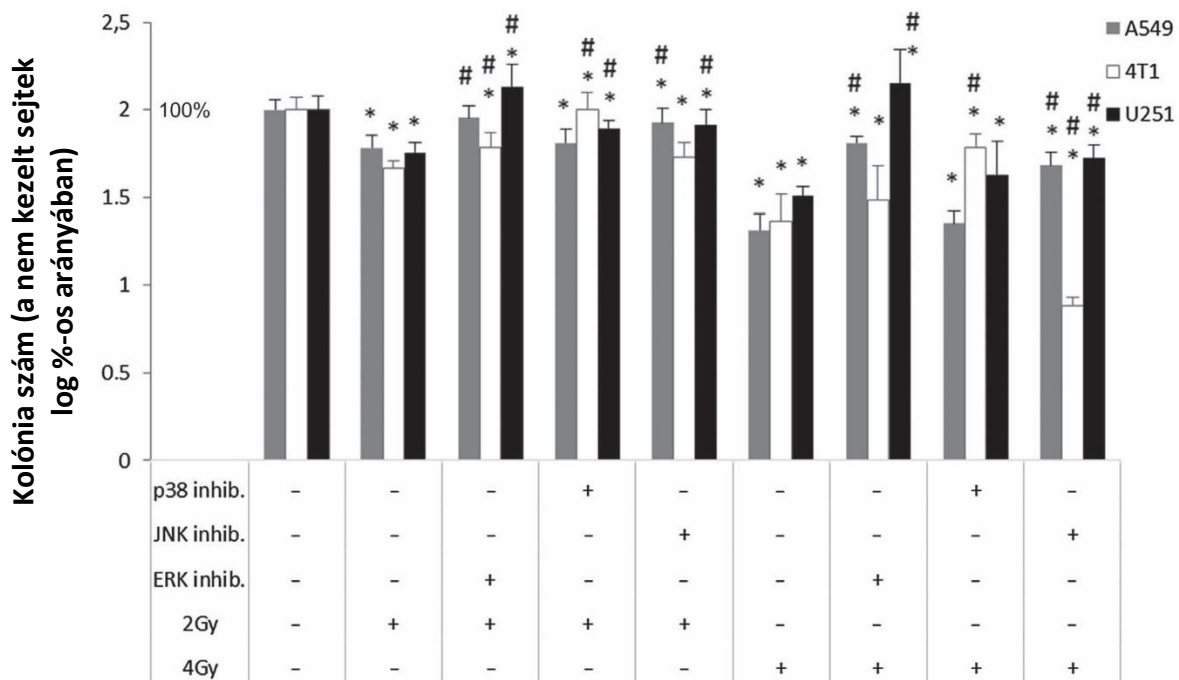
Szelektív inhibitorok használatával vizsgáltuk meg az egyes MAPK fehérjék kölcsönhatását a HO3089-el mindhárom sejtvonalon (8. ábra).

A MAPK inhibitorral végzett kezelések közül A549 és U251 sejtvonalon az ERK1/2 inhibitor használata esetén szignifikáns, 29% és 85.7%-os átlagos kolónia szám növekedést figyeltünk meg a kontroll csoporthoz képest. A P38 MAPK inhibitor a leghatékosabbnak a 4T1 sejtek kolónia formációs készségét stimulálta, de elősegítette az U251 sejtek klonogenitását is, míg ugyanezt az A549 sejtekben csökkentette. Szignifikáns kolónia formációs képesség növekedést okozott a JNK inhibitor II az U251 glioblasztóma sejtvonalon. A HO3089 előkezelés ellentétes hatással volt a sejtprolifерációra az A549 és 4T1 sejtvonalon míg nem volt hatással az U251 sejtvonala. Míg az ERK1/2 gátlás HO3089 előkezeléssel együtt szignifikánsan javította a sejtek klonogenitását az A549 és U251 esetén (12 és 57%-os javulás a kontrollhoz képest), ellenkezőleg hatott a 4T1 sejtekben. Mindeközben a p38 inhibitorral lényeges kolónia formációs készség növekedést értünk el a 4T1 sejtek esetén HO3089 együttes alkalmazása esetén. Ez a hatás nem volt jellemző a másik két sejtvonala. 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.



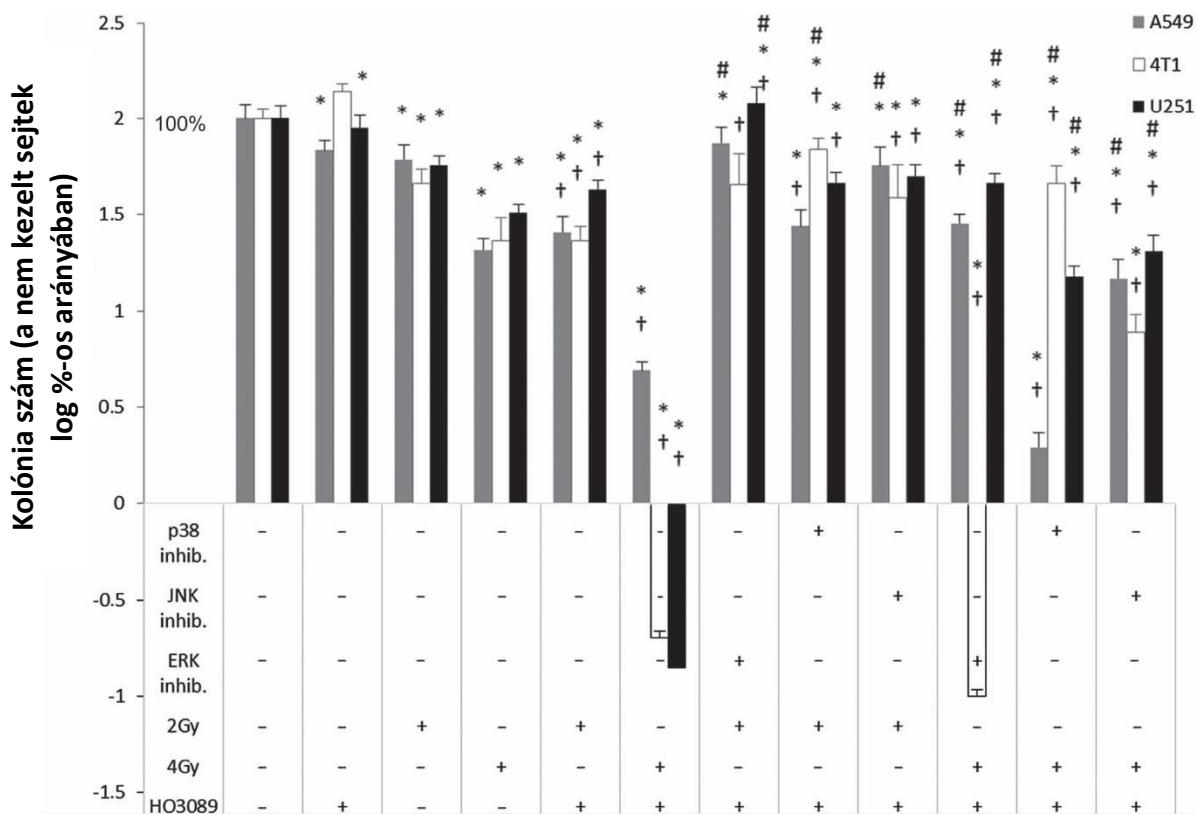
8. ábra. A MAPK inhibitorok és HO3089 hatása a A549, U251 és 4T1 kolónia formációs készségére. A sejteket ERK1/2-, p38 MAPK- vagy JNK-inhibitor jelenlétében tenyésztettük HO3089 kezeléssel kiegészítve vagy anélkül. A plateket kristályibolya festékkel festettük majd a kolóniákat megszámláltuk. A kezelések menete a diagramok alatt olvasható. Három független kísérlet eredményeit átlag \pm SEM-ben fejeztük ki. (* $p < 0.05$ a kontroll értékekhez képest, # $p < 0.05$ HO3089-el kezelt csoport értékeihez képest; † $p < 0.05$ a megfelelő MAPK inhibitorral kezelt csoporthoz képest). Az adatokat egy-utas ANOVA-val analizáltuk Tukey *post hoc* teszttel ($\alpha = 0,05$; $n \geq 3$).

A PARP és MAPK inhibitorok közötti kapcsolat meghatározását követően, a MAP kináz inhibitorok és a besugárzás kölcsönhatását kívántuk megvizsgálni. Az eredményeket a %-os értékek log(10) értékeként jelöltük, a nem kezelt, nem besugárzott sejtek százalékos arányában kifejezve (9. ábra).



9. ábra. A MAPK inhibitorok és a 2 vagy 4 Gy-el történt besugárzás hatása a A549, U251 és 4T1 sejtek kolónia formációs készségére. A sejteket irradiáció nélkül vagy 2 illetve 4 Gy sugárerősséggel történt kezelés után, ERK1/2-, p38 MAPK- vagy JNK-inhibitor jelenlétében 7 napig tenyésztettük. A kezelések menetét a diagramok alatt jelöltük. Három független kísérlet eredményeit a nem kezelt sejtek %-os átlagában \pm SEM-ben fejeztük ki. Az y tengely logaritmikus. (* $p < 0.05$ a kontroll értékekhez képest, # $p < 0.05$ a megfelelő 2 vagy 4Gy-el besugárzott csoporthoz képest). Az adatokat egy-utas ANOVA-val analizáltuk Tukey *post hoc* teszttel (alfa = 0,05; $n \geq 3$).

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 sugár dózis függvényében nem változott vagy csökkent kolónia formációs kapacitás figyeltünk meg JNK inhibitor kezelésre. A p38 MAP inhibitor megnövelte a besugárzott sejtekben a kolóniák számát, legjelentősebben a 4T1 sejtekben, míg a másik két sejt típusra nem volt hatással.



10. ábra. A HO3089 és MAPK inhibitorok, illetve a 2Gy és 4Gy erősségű besugárzás hatása az A549, U251 és 4T1 sejtvonalakra. A sejteket a szélesztést követően a jelölt erősségű besugárzásnak tettük ki a különböző inhibitorok jelenlétében vagy anélkül, majd 7 napig tenyésztettük, kristályibolyával festettük és kvantifikáltuk a kolóniákat. A kezelések protokollja a diagram alatt olvasható. Három független kísérlet eredményeit a nem kezelt sejtek %-os átlagában \pm SEM-ben fejeztük ki. Az y tengely logaritmikus. (* p <0.05 a kontroll értékekhez képest, # p <0.05 a megfelelő 2 vagy 4Gy-el besugárzott csoporthoz képest, † p 0.05 a megfelelő MAPK inhibitorral kezelt kontroll csoporthoz képest). Az adatokat egy-utas ANOVA-val analizáltuk Tukey *post hoc* teszttel (alfa = 0,05; $n \geq 3$).

A besugárzást megelőző HO3089 kezelés szignifikánsan lecsökkentette a sejt proliferációs készséget minden sejtvonalon (10. ábra). Ugyanebben a kezelési kombinációban az ERK1/2 gátlás elősegítette a kolónia formációs készséget az A549 és U251 sejtekben. Szignifikáns kolónia formáció növekedést figyeltünk meg a JNK/SAPK gátlás esetén is. Ez a hatás már alacsony dózisú besugárzás esetén is jelen volt A549 sejtekben, míg U251 és 4T1 sejtekben csak magasabb dózisok esetén volt megfigyelhető. 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 dózisú 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.

Erre a fent leírt kutatási eredményeinket követően intézetünkben is született kísérletes példa, melyben a MAPK útvonalat találtuk a PARP gátlás mitokondriális védő mechanizmusainak hátterében [214].

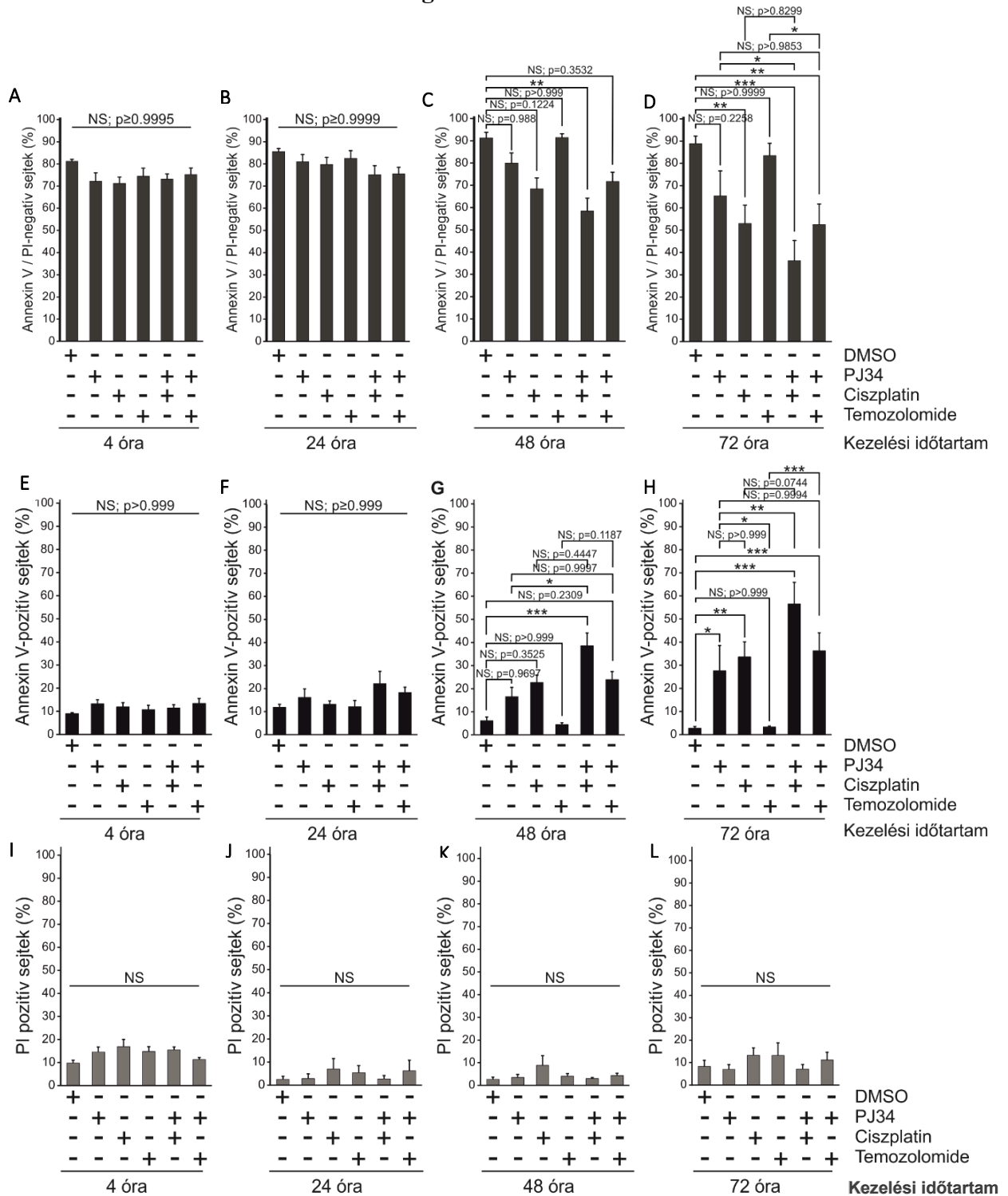
A számos adat, mely a PARP-1 felfedezése óta bizonyította annak hatását a mitokondriális metabolizmusra, ill. az, hogy a PARP gátlás kapcsán olyan mitokondriális védő hatások figyelhetők meg, mint például a mitokondriális membrán potenciál megtartás, csökkent oxigén/glükóz fogyasztás vagy a csökkent ROS koncentráció, arra adott elméleti alapot, hogy a következőkben megfigyeljük a PARP gátlás mitokondriális struktúrára és funkcióra gyakorolt hatását [219].

Kísérleteinkhez a B16F10 egér melanóma sejt vonalat alkalmaztuk, mely viszonylag nagy mérete miatt megfelelő modellnek bizonyult, mikroszkópos vizsgálatainkhoz.

A PARP inhibitorok citotoxicitást fokozó hatása ciszplatin és temozolomide együttes használatakor számtalan tumor modellből ismert [51, 52].

Kísérleteink során a sejteket ciszplatinnal vagy temozolomide-dal kezeltük önmagukban vagy PJ34-el kiegészítve és megfigyeltük hatásukat a B16F10 sejtek kolónia formációs kapacitására és citotoxicitására.

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

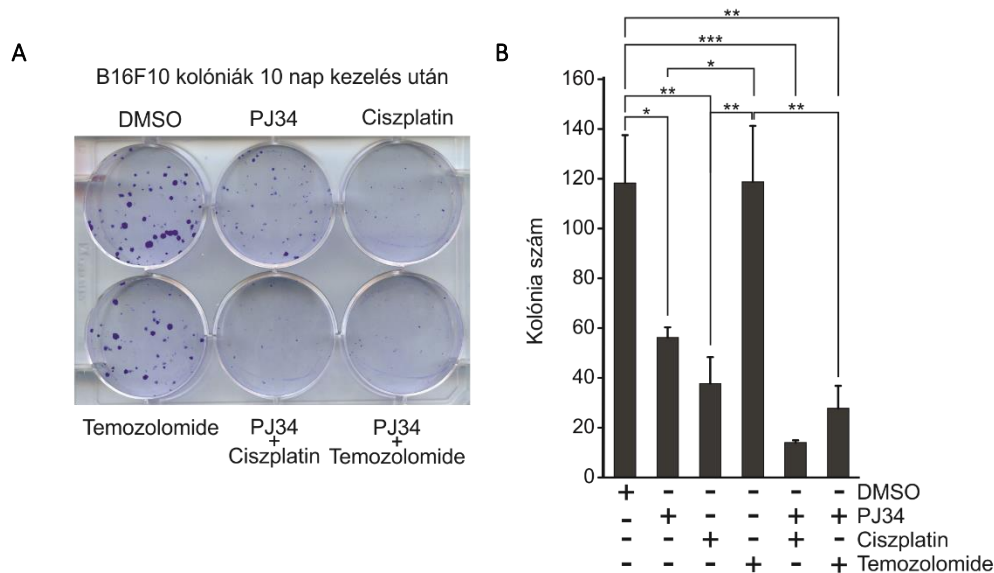


11. ábra. A PJ34 és ciszplatin vagy temozolomide kombinációs kezelések hatása a B16F10 melanóma sejtek citotoxicitására. A sejteket a megfelelő ábra jelölések szerint kezeltük, Annexin V^{FITC} (AV) és propidium-jodid (PI) festéssel jelöltük és flow citometriás analízist végeztünk. AV és PI kettős-negatív élő (A-D), AV pozitív apoptotikus sejtek (E-H) és PI pozitív nekrotikus sejtek (I-L) az összes sejt %-os arányában lettek kifejezve 4 (A, E, I), 24 (B, F, J), 48 (C, G, K) és 72 (D, H, L) órás kezeléseket követően.

A PJ34, ciszplatin és temozolomide kombinációs kezelések sejttúlélést befolyásoló hatásának vizsgálatához a sejteket Annexin V^{FITC} és propídium joddal jelöltük és Flow citométeres analízist végeztünk (11A-L ábrák). Azt találtuk, hogy sem a citosztatikus ágensek sem pedig a PJ34 nem fejtett ki citotoxikus hatást az első 24 órában (11A és B ábra). 48 órás kezelést követően a PJ34 enyhe de nem szignifikáns citotoxicitást okozott (11C ábra) ami tovább emelkedett 72 órás kezelés során (11D ábra). Hasonló eredmény volt megfigyelhető a ciszplatinnal kezelt sejtek esetén, ahol 72 órás kezelésnél szignifikáns sejt túlélés csökkenést tapasztaltunk (11D ábra). Ez a hatás azonban még kiemelkedőbb volt a PJ34-ciszplatin kombinációval 48 és 72 órán át kezelt sejtek esetén (11C és D ábra). A ciszplatinnal szemben, a temozolomide nem mutatott citotoxikus hatást a B16F10 sejtekben (11A-D ábra). PJ34-gyel kiegészített temozolomide 72 órás kezelés esetén csökkent sejttúlélést mértünk, mely azonban nem mutatott statisztikai szignifikanciát a PJ34 kezeléshez képest (11D ábra). Az első 4 órában nem figyeltünk meg változást az apoptotikus (Annexin V pozitív) és nekrotikus (propídium jodid pozitív) sejtek arányában (11E ábra, 11I ábra). 24 óra elteltével a sejtek festődése alapján apoptotikus folyamatok elindulására következtethettünk, ez azonban nem mutatott statisztikai szignifikanciát (11F ábra). 48 órás kezelés hatására a PJ34 és ciszplatin kombinációs kezelés szignifikáns emelkedést okozott az Annexin V-pozitív sejtek arányában (11G ábra). 72 órával a kezelés megkezdése után a temozolomide kivételével minden kezelés szignifikánsan megnövelte az apoptózis mértékét: kombinációban kifejezettebben, mint önálló kezelések esetén (11H ábra).

Nem figyeltünk meg szignifikáns változást a nekrozis mértékében (11I-L ábra).

A PJ34, ciszplatin és temozolomide kezelések citosztatikus hatásának vizsgálatához kolónia formációs vizsgálatot végeztünk (12A, B ábra).

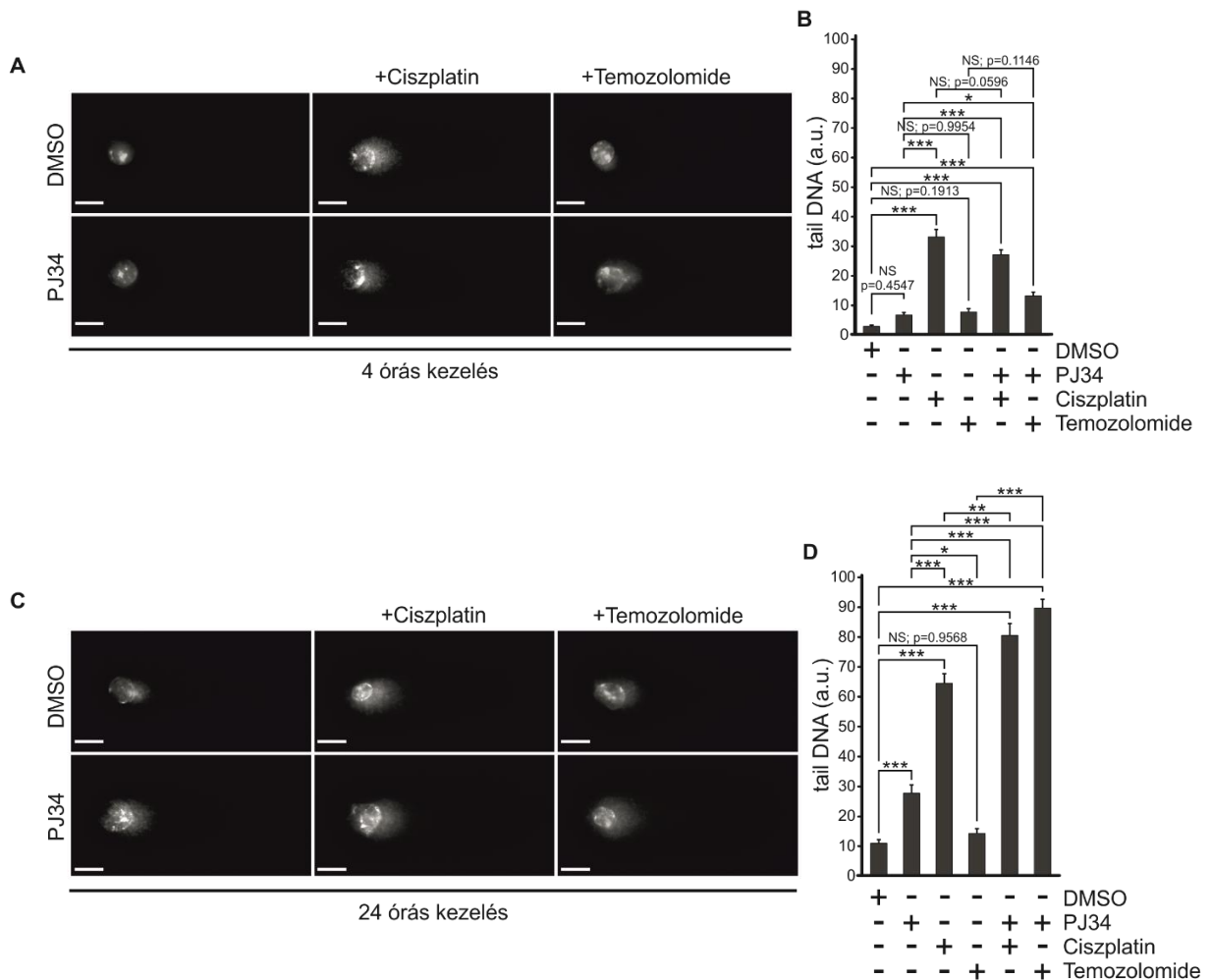


12. ábra. A PJ34 és ciszplatin vagy temozolomide kombinációs kezelések hatása a B16F10 melanóma sejtek kolónia formációs készségére. A B16F10 sejteket az ábra jelöléseknek megfelelően kezeltük, és 10 nap kezelés után Coomassie blue festéssel jelöltük. Ábráinkon a reprezentatív kísérletet (A) és a kísérletek kvantitatív kiértékelését (B) mutatjuk. Az értéket az átlag+SEM szerint ábráztuk, N=3, *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001, NS=nem szignifikáns.

Mind a PJ34 mind pedig a ciszplatin csökkentette a B16F10 sejtek kolónia formációs kapacitását nem úgy, mint a temozolomide, mely nem volt rá hatással. Ez a hatás még kifejezettebb volt a ciszplatin kezelt kultúrákban, ahol a kolóniák száma több mint 60%-al csökkent 10 nappal a kezelés megkezdése után. A temozolomide önmagában nem befolyásolta a B16F10 sejtek kolónia formációs kapacitását, habár enyhén csökkentette azt a PJ34-el kiegészített kezelések esetén (12A, B ábra).

A fent leírt eredmények háttérben zajló mechanizmusok elemzése érdekében a PJ34, ciszplatin és temozolomide DNS károsító képességét alkaline single cell gel electrophoresis assay és a különböző kezeléseket követő nukleáris fragmentáció elemzése alapján határoztuk meg (13A-D ábra).

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



13. ábra. A PJ34 és ciszplatin vagy temozolomide kombinációs kezelések hatása a sejthalálra és a nukleáris fragmentációra B16F10 melanóma sejtekben.

A sejteket 4 (**A, B**) vagy 24 (**C, D**) órás kezelésnek tettük ki, ahogy az ábrán jelöltük, és modified alkaline single cell gel electrophoresis assay-t végeztünk a DNS károsodás detektálására. Legalább 25 véletlenszerűen kiválasztott sejtet vizsgáltunk kezelésenként. A comet attribútumokat (tail DNA) ImageJ software segítségével analizáltuk. Három független kísérlet eredményét ábrázoltuk reprezentatív ábrákkal (**A, C**) és bar diagramokkal (**B, D**) az átlag+SEM tail DNA értékek arbitrary unit mértékegységben vannak kifejezve (a.u.).

A kezeléseket követően 25 random kiválasztott sejtet elemeztünk az egyes kezelések esetén.

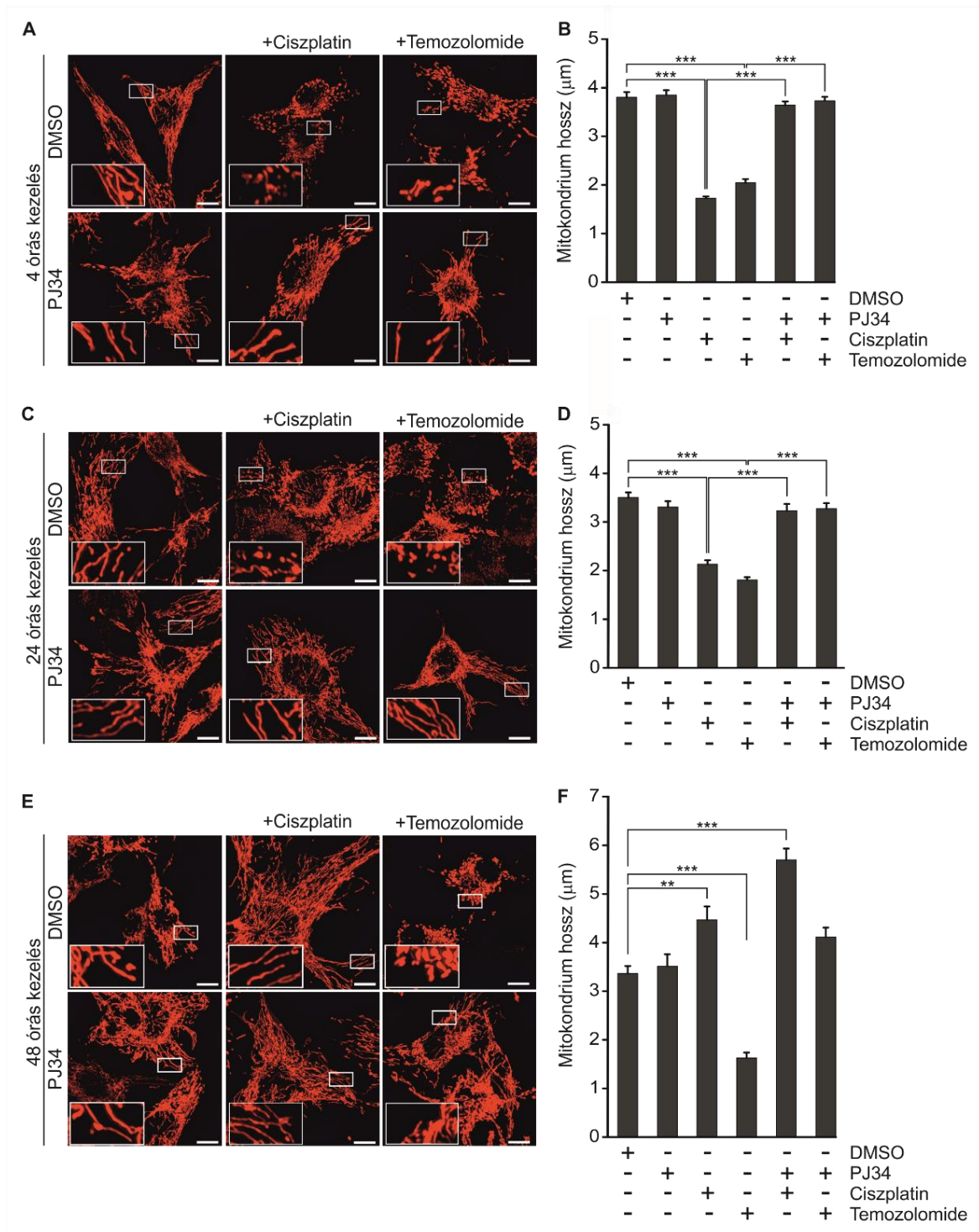
Azt találtuk, hogy minden kezelés DNS fragmentációt okozott (13A-D ábra). A temozolomide-kezelt sejtek hasonló mértékben mutattak DNS károsodást, mint a PJ34 esetében, azonban a leghatásosabb kezelést a ciszplatin esetén figyeltük meg. A PJ34-gyel és ciszplattal vagy

A következőkben kvantifikáltuk a ciszplatinnal vagy temozolomide-dal önmagukban vagy PJ34-gyel kiegészített kezelésnek alávetett sejtek apoptotikus sejtmagjainak számát (14A-D ábra). 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 (14B ábra). A PJ34 és temozolomide kombinációs kezelés jelentősebb apoptotikus nukleáris morfológia változáshoz vezetett mint a temozolomide önmagában (14B ábra). 48 órás kezelést követően a PARP gátlás megnövelte az apoptotikus morfológiájú sejtek számát, ami még kifejezettebb volt ciszplatinnal együtt alkalmazva (14D ábra).

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

Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk a ciszplatin és temozolomide kezelések hatását önmagukban vagy PJ34 kezeléssel kiegészítve a B16F10 sejtek mitokondriális struktúrájára, a B16F10 sejtekkel mitochondria-directed red fluorescent proteint (B16F10^{mtRFP}) expresszáltattunk és megvizsgáltuk a mitokondriális hálózat integritását (15. ábra).

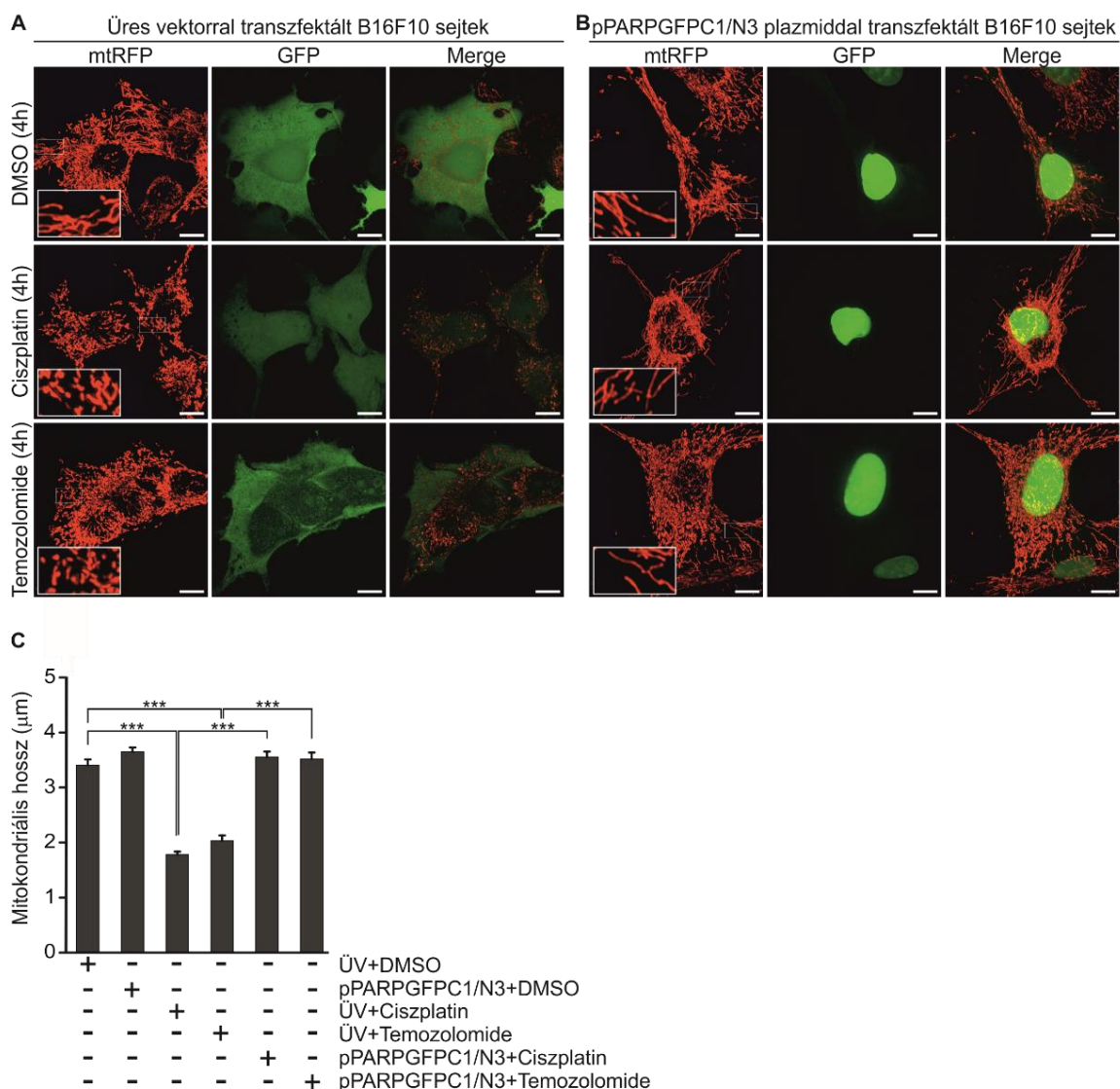


15. ábra. A PJ34 és ciszplatin vagy temozolomide kezelés hatása a mitokondriális fragmentációra. A B16F10^{mtRFP} sejteket ciszplatinnal, temozolomide-dal, PJ34-el és ezek kombinációival kezeltük. A konfokális mikroszkópos képek z-stack rekonstrukcióját mutatjuk a kezelés megkezdése után 4 (A) 24 (C) és 48 (E) órával. A B, D és F panelek mutatják az átlagos mitokondrium hosszúság kvantifikálását 4, 24- és 48-óra kezelést követően. Az értéket átlag+SEM szerint ábrázoltuk, N=3, **p<0.01; ***p<0.001, NS=nem szignifikáns. Scale bar: 10 μm.

Más modellekből származó irodalmi adatokkal egyetértésben, a ciszplatin már rövid, 4 órás kezelésnél is mitokondriális fragmentációt okozott (15A és B ábra). Hasonlóan gyors mitokondriális struktúra szétesés volt megfigyelhető a temozolomide-dal kezelt sejteken (15A és B ábra). Ezzel szemben a PJ34 mediálta farmakológiai PARP gátlás önmagában nem volt hatással a mitokondriális struktúrára. Sőt, 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 (15E és F ábra).

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}) (16A-C ábra).

A PARP^{DN} úgy hat, mint egy domináns negatív PARP enzim, mely az endogén PARP-okkal versenyez a PARP gátló lókuszek felismeréséért, anélkül, hogy mindenközben PARilációs aktivitást végezne. A PARP^{DN} ektópiás expresszálása ugyanakkor nem befolyásolja a mitokondriális hálózat struktúráját (16A-C ábra). A ciszplatin vagy temozolomide-dal kezelt sejtekben azonban a PARP^{DN} ellensúlyozta a citosztatikus szerek mitokondriális struktúra roncsoló hatását. Ez alátámasztja azt a feltevést, hogy a PJ34 mitokondriális fragmentációt csökkentő hatásai az endogén poli(ADP-ribozil)ációs aktivitás lecsökkentésével vannak összefüggésben.



16. ábra. A PARP^{DN}, ciszplatin vagy temozolomide kezelések hatása a mitokondriális fragmentációra B16F10 sejtekben. A B16F10 sejteket ko-transzfektáltuk vagy mtRFP és üres vektorral (EV) (A és C) vagy mtRFP és pPARPGFPC1/N3 plazmiddal (B és C), az ábrajelöléseknek megfelelően kezeltük 4 órán át majd kvantifikáltuk a mitokondriális hosszúságot. A és B ábrák mutatják a reprezentatív z-stack rekonstrukciókat, míg a C panel mutatja az átlagos mitokondrium hosszúság kvantifikálását 4-órás kezelést követően. Az értéket átlag+SEM szerint ábrázoltuk, N=3, ***p<0.001, NS=nem szignifikáns. Scale bar: 10 µm.

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 hatásának mélyrehatóbb vizsgálatára, tanulmányoztuk a Dinamin-szerű 120 kDa OPA1 mitokondriális protein OPA1 expressziós változásait. Az OPA1 izoformák arányos expressziója létfontosságú a mitokondriális fúzió

A kezelések első 24 órájában sem az OPA1 rövid, sem pedig hosszú izoformáinak expressziójában nem mértünk változást (17A₁, A₂, B₁ és B₂ ábra). Ezzel szemben S-OPA1 frakció növekedést tapasztaltunk a PJ34-gyel és ciszplatinnal 48 órán át kezelt sejtek esetén (17C₁ és C₂ ábra). Hasonló jellegű változás volt megfigyelhető a PJ34 és temozolomide kombinációs kezelések esetén, azonban a denzitometriás kiértékelések ez esetben nem mutattak szignifikáns különbséget.

Összefoglalva, S-OPA1 akkumulációt figyeltünk meg azokban a kezelésekben, melyek mind PJ34-gyel, mind ciszplatinnal kezelve voltak, és kisebb mértékben a PJ34-temozolomide kombinációs kezelések esetén 48 óránál, ott, ahol párhuzamosan mitokondriális fúziót is találtunk. Mivel az S-OPA1 expressziós változás nem korrelál a megfigyelt mitokondriális struktúra károsodással, feltételezzük, hogy a ciszplatin, temozolomide és PJ34-gyel kapcsolatos mitokondriális morfológia változásokat nem az OPA1 mitokondriális struktúrára kifejtett hatása közvetítheti.

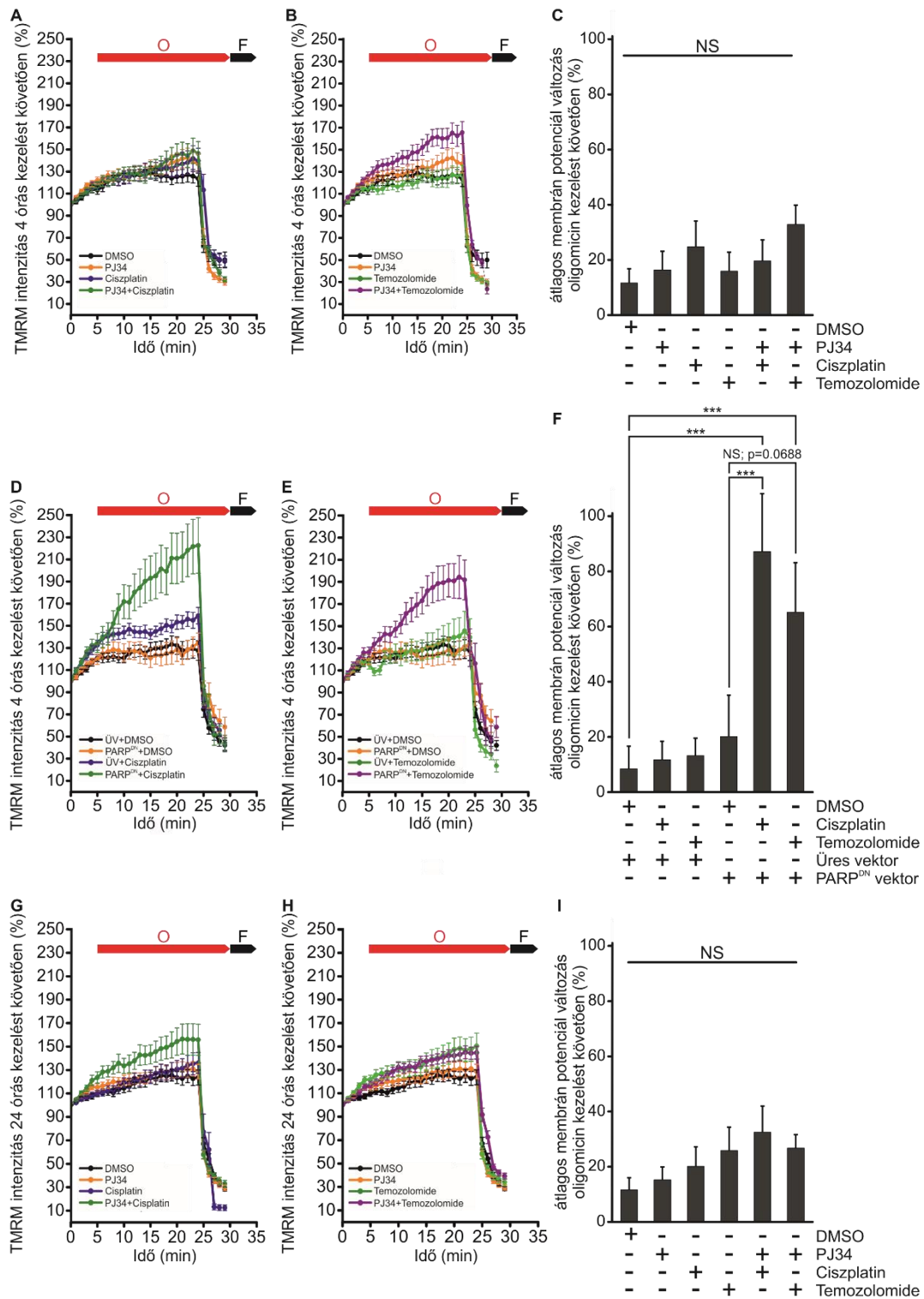
A mitokondriális morfológia szoros összefüggésben áll a mitokondriális funkcióval és metabolizmussal. Ennek megfelelően a belső membránon keresztüli elektrokemikus potenciál csökkenést L-OPA1 hasítódás, S-OPA1 felgyülemelés és mitokondriális fragmentáció kíséri [113] [108, 110]. Mivel a humán melanóma xenograftokról úgy tudjuk, hogy a tumorok közül egyike azoknak, amelyek a legmagasabb oxigén fogyasztást mutatják, elmondható, hogy az egészséges mitokondriális metabolizmus kulcs jelentőséggel bír a melanóma sejtek túlélésében [220] [221]. Annak vizsgálatára, hogy a ciszplatin, temozolomide és PJ34 közvetített mitokondriális hatások összefüggnek-e funkcionális változásokkal, megvizsgáltuk a mitokondriális légzési lánc működését, lemérve a sejteken belül a mitokondriális membrán potenciál változásokat (ψ_m) (18. ábra).

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

A mitokondriális légzési lánc működésének vizsgálatára az előzetesen ciszplatinnal, temozolomide-dal és PJ34-gyel kezelt B16F10 sejteket az ATP szintetáz inhibitor oligomicinnel kezeltük, majd monitoroztuk a membrán potenciált (18. ábra).

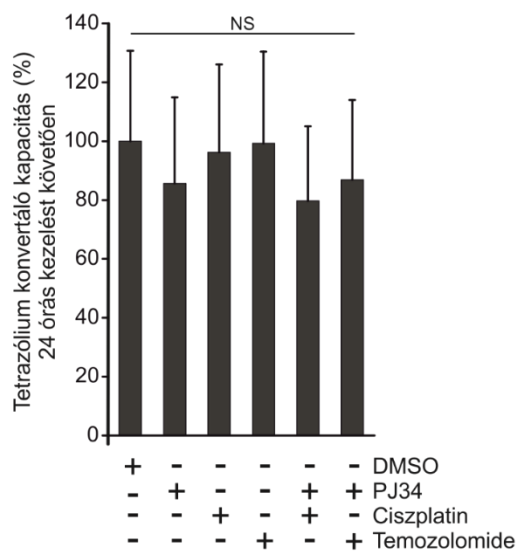
Pozitív kontrollként a mitokondriális belső membránt szétkapcsoló karbonil cianid p-trifluoromethoxifenil hidrazone (FCCP)-t használtuk minden kezelésünk végén. Úgy találtuk, hogy sem a ciszplatin, sem a temozolomide, sem pedig a PJ34 nem befolyásolta önmagában a ψ_m -t. Érdekes módon, nem tapasztaltunk mitokondriális membrán potenciál összeesést azokban a sejtekben sem, ahol a PJ34 és ciszplatin vagy temozolomide kombinációs kezeléseket alkalmaztuk (18A-C és G-I ábra). 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 (18A-C ábra).

A mitokondriális membrán hiperpolarizációs folyamatok PARiláció függésének vizsgálatára megismételtük kísérleteinket a domináns negatív PARP-1 mutánssal (PARP^{DN}) transzfektált B16F10 sejteken. A (PARP^{DN}) expresszió önmagában nem befolyásolta a mitokondriális membrán potenciált. Ezzel ellenkezőleg, a ciszplatinnal vagy temozolomide-dal kezelt PARP^{DN}-t expresszáló B16F10 sejtekben kifejezetten megemelkedett membrán potenciál volt mérhető (18D-F ábra). 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.



18. ábra. A PJ34 és ciszplatin vagy temozolomide kezelések hatása a B16F0 sejtek mitokondriális membrán potenciáljára. A vad típusú (A-C és G-I panelek) és PARP^{DN}-expresszáló B16F10 sejteket (D-F panelek) 4 (A-F) és 24 óras (G-I) kezelésekként tettük ki TMRM-ben inkubáltuk majd 30 percen keresztül monitoroztuk a sejtek piros fluoreszcencia kibocsátását, mely a mitokondriális transzmembrán potenciállal korrelált. Minden kezelésben a sejteket 2 μ M oligomicinnel és 2.5 μ M FCCP-vel kezeltük, 5 és 25 perccel a mérés megkezdését követően. O=oligomicin, F=FCCP, ÜV=üres vektor. C, F és I panelek mutatják a mitokondriális membrán potenciál változását az oligomicin kezelést követően. Az értéket átlag+SEM szerint ábrázoltuk, N=3, ***p<0.001, NS=nem szignifikáns.

Kiegészítésképpen megvizsgáltuk az esetleges összefüggést a PJ34 mediálta citotoxikus hatásfokozás és a mitokondriális NADPH 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 (19. ábra).



19. ábra. A PJ34 nem befolyásolja a B16F10 sejtek NADPH redukáló képességét. A B16F10 sejtek esetleges mitokondriális NADPH redukáló képességének megváltozására,- esetlegesen a megfigyelt citotoxikus hatások háttérében,- MTT assay-t végeztünk. A B16F10 sejteket PJ34 (10 μ M), ciszplatin (25 μ M) vagy temozolomide (25 μ M) –al kezeltük 24 órán át. Nem figyeltünk meg szignifikáns eltérést a mitokondriális NADPH redukáló képesség megváltozásában az egyes kezelések között. A kezelési csoportok tetrazolium konvertáló kapacitását a DMSO kontroll csoport arányában fejeztük ki. Az értéket átlag+SEM szerint ábrázoltuk, N=3, NS=nem szignifikáns.

Összefoglalva, adataink arra utalnak, hogy a PJ34 kiváltotta mitokondriális és citotoxikus hatások egymással párhuzamosan zajló, de egymástól független mechanizmusok, melyek nem korrelálnak egymással, és a PARP gátlás végleges hatása e folyamatok összesített végeredményéből következtethető.

5. Megbeszélés és következtetések

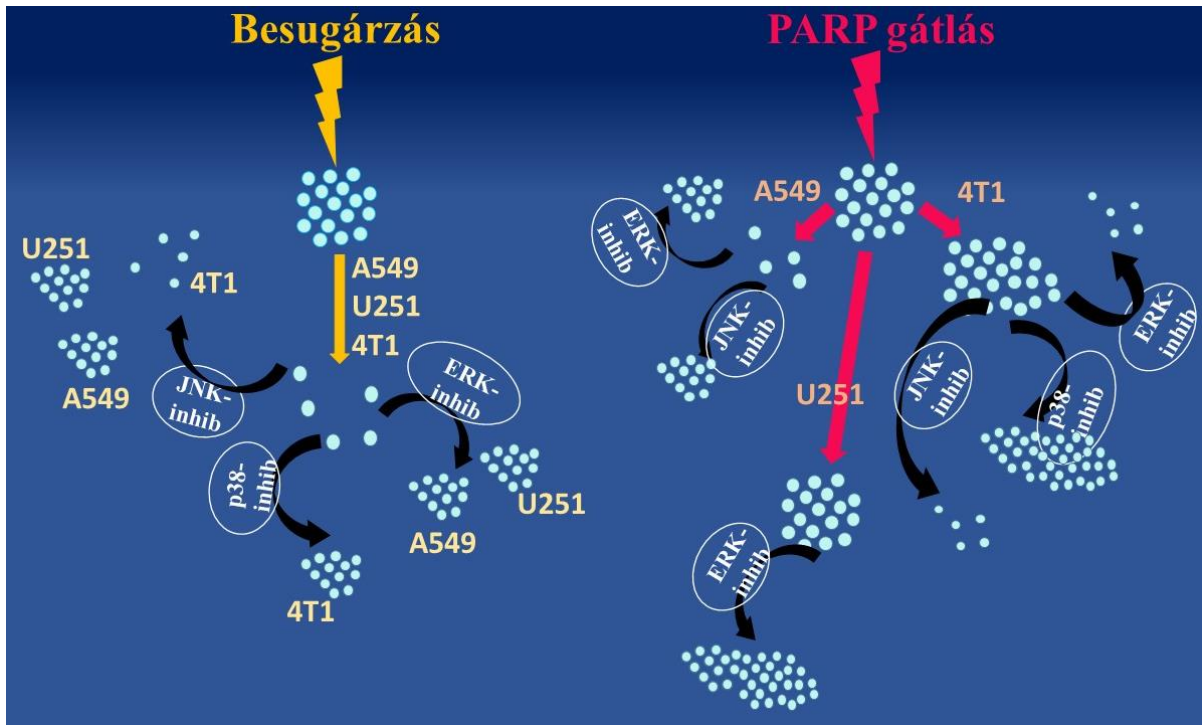
Az irodalomból jól ismert a PI3K-PTEN-Akt-mTOR, Ras-Raf-MEK-Erk1/2 vagy a JNK/SAPK és p38 MAPK útvonalak növekedési faktorokra vagy környezeti stressz faktorokra adott aktivációjának jelentősége olyan biológiai folyamatokban mint az apoptózis, mitózis vagy a sejt differenciáció [222]. Abnormális regulációjuknak szerepet tulajdonítunk számos tumoros megbetegedésben, immunológiai kórképből vagy gyulladásszerű folyamatban. A MAPK szignalizáció három fő jelátviteli útvonala, ERK, p38 és JNK, számos más kináz fehérje aktivációjában játszik szerepet. E jelátviteli útvonalak jelentőségének felismerése a tumorok kialakulásában új target terápiai lehetőségeket vetett fel [223] [224] [225] [226] [227] [228] [229].

Mint azt a bevezetőben részletesen ismertettem, a MAPK jelátviteli útvonalak és a PARP-1 lehetséges kapcsolatáról számos irodalmi adat számolt be, azonban kiemelendő, hogy a vizsgálatok eredményei nem voltak egyöntetűek; úgy tűnik a PARP-1 és a kanonikus jelátviteli útvonalak kapcsolata függ a sejtípustól adott esetben tumor típustól és a sejtes környezettől.

A fent említett szignalizációs útvonalak aktivációjának és jelentőségének tesztelésére egyrészt megfigyeltük a fehérjék aktivációs változását PARP gátlásra, illetve irradiációs kezelésre, másrészt megvizsgáltuk a sejtek klonogenitásának változását különböző MAPK inhibitorok alkalmazása során (20. ábra).

A besugárzott tumorsejtek megnövekedett érzékenysége PARP gátlásra irodalmi adatokból ismert jelenség [230] [231] [232] és bizonyos kísérletes munkák azt találták, hogy háttérben az EGFR-ERK szignalizáció modulációja is felvethető [233]. A kísérletes munkáinkban használt potens PARP inhibitor, a HO3089 kapcsán előzetesen azt találtuk, hogy PI3K-AKT aktivációt, illetve a JNK és p38 MAPK útvonalak aktivációjának csökkenését okozza [234] [235] [236] [237] [195] azonban jelen vizsgálataink során az ERK1/2 aktivációját igazoltuk

HO3089 hatására az U251 humán glioblasztóma és A549 humán tüdő adenokarcinóma sejtvonalakon.



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

Besugárzás hatására mindhárom sejtvonalban 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.

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, ezzel ellentétben U251 sejtekben növelte a kolónia formációs készséget. Adataink előzetes, az U251 sejtvonallal kapcsolatos irodalmi adatokkal összhangban állnak [238], melyek az ERK1/2 sejthalált elősegítő szerepét támasztják alá glioblasztómában irradiáció hatására.

Ugyanezt figyeltük meg JNK gátlás során, vagyis az U251 és A549 sejtvonalakon nőtt a sejtek kolónia formációs kapacitása amennyiben az irradiációval történő kezelést JNK inhibitorral egészítettük ki. Ezzel szemben a 4T1 sejtek klonogenitása 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 elősegítette a kolónia formációt 4T1 sejtekben mind HO3089 kezelést, mind irradiációt követően, míg az U251 vagy az A549 sejtekre nem volt hatással.

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 [231] [232]. A humán A549 és U251 sejtek klonogenitását pozitívan befolyásolta az, ha a besugárzást és PARP gátlást követően ERK1/2 inhibitorral alkalmaztunk vagyis feltehetőleg ez esetben is, a toxicitás szabályozásában az ERK1/2 jelátvitelnek szerepe lehet. A JNK inhibitor adagolás elősegítette a HO3089-al előkezelt és irradiációnak kitett A549, U251 és 4T1 sejtek klonogenitását, a p38 inhibíció pedig jelentősen megnövelte a HO3089-al előkezelt és irradiációnak kitett 4T1 sejtek klonogenitását.

Előzetes irodalmi adatokkal egyetértésben, a kaszpáz-3 csak enyhén befolyásolta a PARP gátló közvetítette sejttoxicitást az általunk megfigyelt sejtmodellekben is [239].

Bemutattuk, hogy az A549 sejtekben a HO3089 és az irradiáció is önmagában aktiválta 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. Ebből arra következtethetünk, hogy ebben a sejtvonalban a p38 MAPK útvonalnak lehet lényeges kolonogenitást gátló szerepe.

Azt is megfigyeltük, hogy az irradiációs kezelés HO3089 expozícióval vagy anélkül, szignifikánsan csökkentette a BCL-2 expressziót. Ennek háttérében egyik lehetséges mechanizmus lehet, hogy mint az irodalmi adatokból ismeretes, a PARP gátlás csökkenti az NF-kappaB aktivációt [75] [240] [241] [242], az NF-kappaB viszont fontos a BCL-2 expresszió stimulációjában [243] [244].

A DNS károsodások során általánosan megfigyelt jelenség a p53 aktivációja az intrinzik apoptotikus útvonal során [245]. A p53 felel a mitokondrium külső membrán permeabilizálásáért ezáltal különböző proapoptotikus faktorok felszabadulásáért. Ebből logikusan következik, hogy a tumorelleses szerek (beleértve az irradiációt) sikeressége és apoptózis indukáló készsége, nagyban függ attól hogy a sejtek vad típusú p53-al rendelkeznek-e vagy sem [246] [245] [247]. A PARP gátlás elősegíti a p53 sejtmagból történő exportját, mely hozzájárul a sejthalál aktivációjához [248]. 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 nagyban 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 [230] [249] [250] [251] [252] [253].

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 alkalmazásuk esetén.

A platina származékokra épülő kemoterápia évtizedek óta különböző humán tumorok terápiás alapját képezik. Tradicionálisan elfogadott az a vélekedés, hogy sejtkárosító hatásuk hátterében a nukleáris platina-DNS adduktok képződése áll, mely DNS sérüléshez, sejtciklus megálláshoz, végül apoptózishoz vezethet [254, 255]. Ezzel egyidejűleg erős DNS károsodásra adott sejtválaszt indukálnak, mely szintén hozzájárul sejtkárosító hatásukhoz, nagyrészt a nagymértékű PARP aktiváció miatt [256, 257]. A poli(ADP-ribozi)láció és a ciszplatin hatásának kapcsolata már évtizedekkel ezelőtt felmerült, a PARP-1 DNS-károsodás kijavításában játszott repair szerepére alapozva [258]. Ez az elképzelés összhangban áll azokkal a megfigyelésekkel, melyek a PARP-1 megnövekedett szintjét mutatták ki számos humán tumorban, ideértve a magas-stádiumú asztrocitómákat, kolorektális karcinómát, hepatocelluláris karcinómát vagy malignus emlő tumorokat [259] [260] [261] [262]. Ezek a tanulmányok azt is kimutatták, hogy a megnövekedett PARP-1 szintek, látszólag egyenes arányt mutatnak a tumorok malignitásának fokával, és fordított arányban változnak a betegek túlélési rátájával, ezáltal a PARP-1-et prognosztikus markerré és tumor terápiás célponttá tették [5]. Az, hogy a PARP-1 a humán primer melanocitákban proliferációt okoz, PARilációtól független mechanizmussal, a sejt túlélést elősegítő microphthalmia transcription factor (*MITF*) onkogén indukciójával, a PARP-1 karcinogenezisben játszott sokrétű szerepét bizonyítja és tovább támogatja target terápiás felhasználhatóságát [263] [264].

A PARP gátlás humán melanómában való terápiás felhasználhatóságát támasztja alá egy friss retrospektív tanulmány, melyben 66 metasztatikus melanómában szenvedő beteget vizsgáltak. A betegeket konvencionális kemoterápiával kezelték és azt találták, hogy a kemoterápiára adott válasz fordított arányban állt egy bizonyos egy pontos nukleotid polimorfizmussal (single nucleotide polymorphism, SNP) bíró PARP-1 variáns kifejeződésével (rs1805407, SNP rs1805407) [265]. A megfigyelés, hogy az ABT-888 vagy olaparib, két jól ismert PARP gátló használata javítja a kemoterápiás szerek hatékonyságát az SNP rs1805407 hordozó

sejtekben azt sugallja, hogy ez a variáns nagyobb PARP-1 aktivitással bír, és tovább támogatja a konvencionális tumorterápiás szerek és PARP inhibitorok lehetséges szinergizmusának lehetőségét.

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. Míg a ciszplatin DNS kettős kötéseket okoz és akadályozza a replikációt, a temozolomide a DNS alkilációja/metilációja által okoz sejthalált. A melanóma az egyik legagresszívabb malignus tumor típus, mely számos repair és sejtciklus reguláló defektussal bír. Ezek között említendő a gyakran fellelhető nukleotid excíziós repair defektusok és a BRCA2 gén mutációja is [266-269], mely felveti PARP gátlás sikeres felhasználásának lehetőségét ebben a tumor típusban [47]. Bizonyos *in vitro* tanulmányok arról számoltak be, hogy a PARP gátlók csökkentették a melanóma sejtek metasztatikus kapacitását, míg más *in vivo* tanulmányokban a PARP gátlás temozolomide-dal kombinálva megnövelte a progresszió nélküli túlélési időt metasztatikus melanómában szenvedő betegeknél [264, 270, 271]. A mitokondriális funkcióknak azóta tulajdonítunk különösen nagy jelentőséget a melanómában, amióta a mitokondriális biogenezis és funkció szabályozó Peroxisome proliferator-activated receptor Gamma Coactivator 1-alpha (PGC-1 α) direkt regulátorát, a MITF1 amplifikációját találták melanóma különböző típusaiban [272]. A PGC-1 α befolyásolja a sejt anyagcserét azáltal, hogy képes fokozni az oxidatív foszforilációt, mitokondriális biogenezist és oxigén fogyasztás mértékét [273] [274] [275]. Mindazonáltal kevés irodalmi adat ismeretes a PARP gátlók melanómában kifejtett hatásáról, mely ösztönzőleg hatott arra, hogy melanóma sejteken is vizsgáljuk meg a PARP gátlás hatásait.

Nagy különbséget találtunk a ciszplatin és temozolomide toxicitásban a B16F10 sejteken.

A ciszplatin lassan kiváltódó citotoxicitást mutatott, mely csak 72 óra után vált szignifikánssá, ezzel szemben a temozolomide nem mutatott szignifikáns sejtpusztulást a B16F10 sejtekben a

megfigyelt időintervallumon belül. Másrészt a PJ34 megnövelte mindkét szer citotoxikus hatását, mely nagyobb volt, mint a PJ34-gyé önmagában, és ez a hatás temozolomide esetében még kifejezettebb volt. Hasonló potencírozó hatást figyeltünk meg a nukleáris fragmentáció, apoptózis vizsgálat és kolónia formációs vizsgálatok esetén. Eredményeink összhangban állnak más kutatócsoportok PARP gátlás és temozolomide kölcsönös hatását vizsgáló eredményeivel [276]. Habár a pontos mechanizmus még felderítésre vár, a megfigyelt különbségek a ciszplatin és temozolomide PARP inhibícióval mutatott szinergisztikus hatásában, különböző hatásmechanizmusokat sejtetnek. Csakugyan, a ciszplatinról úgy gondoljuk, hogy a DNS kettős kötésével vezet a proliferáció gátlásához és esetlegesen apoptózishoz [277]. Ezzel szemben a temozolomide elsősorban a DNS guanin reziduumok metilálásával fejt ki citotoxicitását, ami a repair során kettős szálú DNS törések megjelenéséhez vezet. A temozolomide alkotta alkilcsoportokat az O⁶-alkilguanine DNA akiltranszferáz (MGMT) enzim képes kijavítani, mely enzim számos tumor típusban expresszálódik, beleértve a B16F10 sejteket is, mely ezáltal negatívan befolyásolhatja a temozolomide hatását [278] [279].

Humán melanóma xenografton végzett kísérletekben a sejtek extrém magas oxigén fogyasztását mutatták ki, mely azt sugallja, hogy ezen tumor sejtek megfelelő működése nagyban függhet a mitokondriális metabolizmus épségétől [220, 221]. Mivel a ciszplatinnal kezelt sejtekben crista vesztés és külső membrán szétesés figyelhető meg, a ciszplatinnal végzett kísérletes adatok citotoxicitásának hátterében alternatív effektorokat, mint például mitokondriális targeteket vetettek fel [280] [281]. A ciszplatinnal kezelt B16F10 sejtek mitokondriális morfológia analízise során mi is szétterjedt és robosztus 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. Előző irodalmi adatokkal egyetértésben [282] [283] [284], azt találtuk, hogy a PARP gátlás önmagában nem befolyásolja a

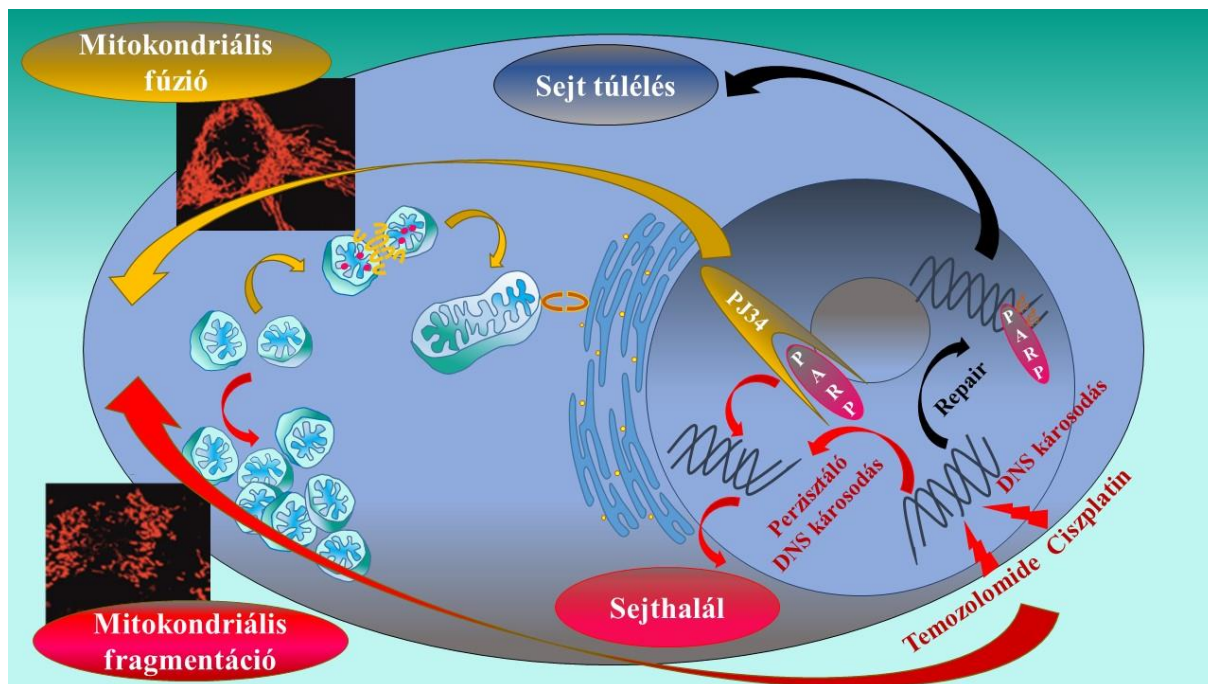
mitokondriális morfológiát. Sőt, a PJ34 megvédte a mitokondriális hálózat integritását a ciszplatin és temozolomide okozta fisszióval szemben. Ennek a megfigyelésnek azért is tulajdoníthatunk jelentőséget, mert előzetes *in vitro* tanulmányok azt találták, hogy például glioblasztómában a temozolomide-dal szembeni szerzett rezisztencia mechanizmusok egyikéért mitokondriális adaptációs mechanizmus, a légzési lánc strukturális átalakítása felel [285]. Továbbá az a megfigyelés, hogy a PARP gátlás mitokondriális struktúra és funkció védő szerepet mutatott melanóma sejtekben, felhívja a figyelmet arra is, hogy ez a védő hatás, tumor sejtek esetén, hozzájárulhat a tumorsejtek energia háztartásának védelméhez.

A mitokondriális dinamika egyik fő regulátora az OPA1, egy nagy dinamin-szerű GTP-áz, mely elősegíti a mitokondrium fúzióját [110]. Az OPA1 a fúziós hatását a hosszú és rövid izoformáinak megtartásával biztosítja, bár ennek pontos mechanizmusa még tisztázásra vár [286]. Az S-OPA1 és L-OPA1-ből álló oligomerek hozzájárulnak a mitokondriális crista struktúrák felépítéséhez, ezáltal a fiziológias mitokondriális struktúra megtartásához, mely az OPA1-nek a mitokondriális dinamikában játszott szerepétől látszólag független feladata [109]. Számos stimulus hatására, ideértve az összeesett membrán potenciált, csökkent mitokondriális ATP szintet vagy pro-apoptotikus szignalizációt, az L-OPA1 elhasítódik az Yme1L és OMA1 proteázok által [107] [110], mely az OPA1 oligomerek dekompozíciójához, és a mitokondriális fúzió gátlásához vezet [113] [108] [287] [288]. Érdekes módon a PJ34 és citosztikus szereknek kitett B16F10 sejtekben 48 órás kezelést követően az OPA1 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. Így, annak tisztázása, hogy az S-OPA1 izoforma akkumulálódása valóban szerepet játszik-e a farmakológiai PARP

gátlás kemoterápiás szerek citotoxicitást potencírozó hatásában, további kísérletes munkát kíván.

A jelenlegi, széles körben elfogadott álláspont szerint, a mitokondriális fragmentáció jobbára 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 fisszót, nem védte meg az apoptotikus folyamatoktól. Ebből a PJ34-nek a B16F10 sejtek túlélésében és a mitokondriális morfológia változásában betöltött egymástól független szerepeire következtethetünk. Ezt az elképzelést támasztja alá az az adatunk, hogy a PJ34 elősegítette citotoxicitást nem kísérte mitokondriális belső membrán potenciál esés, amely a mitokondriális metabolizmus károsodásának jellegzetessége.

Ugyanakkor eredményeink szerint a celluláris PARiláció csökkenése mitokondriális hiperpolarizációhoz vezet, mely nukleáris és mitokondriális, egymástól elkülönülő PARilációfüggő folyamatok jelenlétére utal. Mivel a PJ34 potencírozta citotoxicitást a sejt túlélést elősegítő mitokondriális hatások előzik meg, úgy, mint mitokondriális fúzió és megemelkedett mitokondrium membrán polarizáció, arra is következtethetünk, hogy az elhúzó mitokondriális depolarizáció mitokondriális károsodáshoz vezet, például ROS produkció által. Összefoglalva, adataink azt sugallják, hogy a PARP gátlás ciszplatinnal és temozolomide-dal alkalmazott domináns, hosszú távú hatása a DNS károsodás, valószínűleg a repair kapacitás gátlásával. A PARP-gátlás okozta DNS repair károsodás elősegíti az alkiláló szerek okozta nukleáris DNS károsodás felhalmozódását és nukleáris fragmentációt, mely felülírja a látszólag protektív és sejt túlélést elősegítő mitokondriális hatásokat (21. ábra). Adataink összhangban vannak az irodalmi adatokkal, melyek szerint a PARP gátlás végső hatását az összefüggő, adott sejten belüli molekuláris folyamatok összessége határozza meg [289].



21. 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 fúzionáltságát. Az ábra a szerző műve mely a szövegben hivatkozott irodalmi adatok és a kísérletes eredményeink alapján készült.

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 kezelések 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. Lodish, H.F., *Molecular cell biology*. 2013, New York: W.H. Freeman and Co.
2. 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.
3. Otto, H., et al., *In silico characterization of the family of PARP-like poly(ADP-ribose)transferases (pARTs)*. *BMC Genomics*, 2005. **6**: p. 139.
4. Vyas, S., et al., *A systematic analysis of the PARP protein family identifies new functions critical for cell physiology*. *Nat Commun*, 2013. **4**.
5. Cseh, A.M., et al., *Poly(adenosine diphosphate-ribose) polymerase as therapeutic target: lessons learned from its inhibitors*. *Oncotarget*, 2017. **8**(30): p. 50221-50239.
6. Kleine, H., et al., *Substrate-Assisted Catalysis by PARP10 Limits Its Activity to Mono-ADP-Ribosylation*. *Molecular Cell*. **32**(1): p. 57-69.
7. Aguiar, R.C., et al., *B-aggressive lymphoma family proteins have unique domains that modulate transcription and exhibit poly(ADP-ribose) polymerase activity*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(40): p. 33756-65.
8. Shieh, W.M., et al., *Poly(ADP-ribose) Polymerase Null Mouse Cells Synthesize ADP-ribose Polymers*. *Journal of Biological Chemistry*, 1998. **273**(46): p. 30069-30072.
9. 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.
10. Langelier, M.-F., A.A. Riccio, and J.M. Pascal, *PARP-2 and PARP-3 are selectively activated by 5' phosphorylated DNA breaks through an allosteric regulatory mechanism shared with PARP-1*. *Nucleic Acids Research*, 2014. **42**(12): p. 7762-7775.
11. Kameshita, I., et al., *Poly (ADP-Ribose) synthetase. Separation and identification of three proteolytic fragments as the substrate-binding domain, the DNA-binding domain, and the automodification domain*. *J Biol Chem*, 1984. **259**(8): p. 4770-6.
12. Decker, P., D. Isenberg, and S. Muller, *Inhibition of Caspase-3-mediated Poly(ADP-ribose) Polymerase (PARP) Apoptotic Cleavage by Human PARP Autoantibodies and Effect on Cells Undergoing Apoptosis*. *Journal of Biological Chemistry*, 2000. **275**(12): p. 9043-9046.
13. Tao, Z., et al., *Domain C of human poly(ADP-ribose) polymerase-1 is important for enzyme activity and contains a novel zinc-ribbon motif*. *Biochemistry*, 2008. **47**(21): p. 5804-13.
14. Desmarais, Y., et al., *Enzymological properties of poly(ADP-ribose)polymerase: characterization of automodification sites and NADase activity*. *Biochim Biophys Acta*, 1991. **1078**(2): p. 179-86.
15. Altmeyer, M., et al., *Molecular mechanism of poly(ADP-ribosylation) by PARP1 and identification of lysine residues as ADP-ribose acceptor sites*. *Nucleic Acids Res*, 2009. **37**(11): p. 3723-38.
16. Masson, M., et al., *XRCC1 Is Specifically Associated with Poly(ADP-Ribose) Polymerase and Negatively Regulates Its Activity following DNA Damage*. *Mol Cell Biol*, 1998. **18**(6): p. 3563-71.
17. Langelier, M.F., et al., *Crystal structures of poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) zinc fingers bound to DNA: structural and functional insights into DNA-dependent PARP-1 activity*. *J Biol Chem*, 2011. **286**(12): p. 10690-701.

18. Wacker , D.A., et al., *The DNA Binding and Catalytic Domains of Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1 Cooperate in the Regulation of Chromatin Structure and Transcription*. Molecular and Cellular Biology, 2007. **27**(21): p. 7475-7485.
19. Sastry, S.S. and E. Kun, *The interaction of adenosine diphosphoribosyl transferase (ADPRT) with a cruciform DNA*. Biochem Biophys Res Commun, 1990. **167**(2): p. 842-7.
20. Gradwohl, G., A. Mazen, and G. de Murcia, *Poly(ADP-ribose) polymerase forms loops with DNA*. Biochem Biophys Res Commun, 1987. **148**(3): p. 913-9.
21. Lonskaya, I., et al., *Regulation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 by DNA structure-specific binding*. J Biol Chem, 2005. **280**(17): p. 17076-83.
22. 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.
23. Maffi, S.K., et al., *Glutathione content as a potential mediator of the vulnerability of cultured fetal cortical neurons to ethanol-induced apoptosis*. J Neurosci Res, 2008. **86**(5): p. 1064-76.
24. Zhou, J., et al., *AMPK mediates a pro-survival autophagy downstream of PARP-1 activation in response to DNA alkylating agents*. FEBS Lett, 2013. **587**(2): p. 170-7.
25. Duan, Y., R.A. Gross, and S.S. Sheu, *Ca(2+)-dependent generation of mitochondrial reactive oxygen species serves as a signal for poly(ADP-ribose) polymerase-1 activation during glutamate excitotoxicity*. J Physiol, 2007. **585**(Pt 3): p. 741-58.
26. Liaudet, L., et al., *Activation of poly(ADP-Ribose) polymerase-1 is a central mechanism of lipopolysaccharide-induced acute lung inflammation*. Am J Respir Crit Care Med, 2002. **165**(3): p. 372-7.
27. Du, X., et al., *Inhibition of GAPDH activity by poly(ADP-ribose) polymerase activates three major pathways of hyperglycemic damage in endothelial cells*. J Clin Invest, 2003. **112**(7): p. 1049-57.
28. Chiu, H.J., D.A. Fischman, and U. Hammerling, *Vitamin A depletion causes oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and PARP-1-dependent energy deprivation*. Faseb j, 2008. **22**(11): p. 3878-87.
29. 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.
30. Gagne, J.P., et al., *Proteome-wide identification of poly(ADP-ribose) binding proteins and poly(ADP-ribose)-associated protein complexes*. Nucleic Acids Res, 2008. **36**(22): p. 6959-76.
31. Satoh, M.S., G.G. Poirier, and T. Lindahl, *Dual function for poly(ADP-ribose) synthesis in response to DNA strand breakage*. Biochemistry, 1994. **33**(23): p. 7099-106.
32. Durkacz, B.W., et al., *(ADP-ribose)_n participates in DNA excision repair*. Nature, 1980. **283**(5747): p. 593-6.
33. 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.
34. 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.
35. Liu, Y., F.A. Kadyrov, and P. Modrich, *PARP-1 enhances the mismatch-dependence of 5'-directed excision in human mismatch repair in vitro*. DNA Repair (Amst), 2011. **10**(11): p. 1145-53.
36. 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.

37. Dantzer, F., et al., *Base Excision Repair Is Impaired in Mammalian Cells Lacking Poly(ADP-ribose) Polymerase-1*. *Biochemistry*, 2000. **39**(25): p. 7559-7569.
38. El-Khamisy, S.F., et al., *A requirement for PARP-1 for the assembly or stability of XRCC1 nuclear foci at sites of oxidative DNA damage*. *Nucleic Acids Res*, 2003. **31**(19): p. 5526-33.
39. Vodenicharov, M.D., et al., *Base excision repair is efficient in cells lacking poly(ADP-ribose) polymerase I*. *Nucleic Acids Research*, 2000. **28**(20): p. 3887-3896.
40. Allinson, S.L., Dianova, II, and G.L. Dianov, *Poly(ADP-ribose) polymerase in base excision repair: always engaged, but not essential for DNA damage processing*. *Acta Biochim Pol*, 2003. **50**(1): p. 169-79.
41. Ström, C.E., et al., *Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) is not involved in base excision repair but PARP inhibition traps a single-strand intermediate*. *Nucleic Acids Res*, 2011. **39**(8): p. 3166-75.
42. Campalans, A., et al., *Distinct spatiotemporal patterns and PARP dependence of XRCC1 recruitment to single-strand break and base excision repair*. *Nucleic Acids Research*, 2013.
43. Kang, H.C., et al., *Iduna is a poly(ADP-ribose) (PAR)-dependent E3 ubiquitin ligase that regulates DNA damage*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. **108**(34): p. 14103-8.
44. Lin, W., et al., *Isolation and Characterization of the cDNA Encoding Bovine Poly(ADP-ribose) Glycohydrolase*. *Journal of Biological Chemistry*, 1997. **272**(18): p. 11895-11901.
45. Oka, S., J. Kato, and J. Moss, *Identification and characterization of a mammalian 39-kDa poly(ADP-ribose) glycohydrolase*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(2): p. 705-13.
46. de Murcia, J.M., et al., *Requirement of poly(ADP-ribose) polymerase in recovery from DNA damage in mice and in cells*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1997. **94**(14): p. 7303-7307.
47. 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.
48. Farmer, H., et al., *Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy*. *Nature*, 2005. **434**(7035): p. 917-921.
49. 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.
50. Augustine, T., et al., *Sensitization of colorectal cancer to irinotecan therapy by PARP inhibitor rucaparib*. *Invest New Drugs*, 2019.
51. 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.
52. 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.
53. Rottenberg, S., et al., *High sensitivity of BRCA1-deficient mammary tumors to the PARP inhibitor AZD2281 alone and in combination with platinum drugs*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008. **105**(44): p. 17079-17084.
54. Ali, M., et al., *Vasoactivity of AG014699, a Clinically Active Small Molecule Inhibitor of Poly(ADP-ribose) Polymerase: a Contributory Factor to Chemopotential In vivo?* *Clinical Cancer Research*, 2009. **15**(19): p. 6106-6112.
55. 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.

56. 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.
57. 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.
58. Mullard, A., *European regulators approve first PARP inhibitor*. Nat Rev Drug Discov, 2014. **13**(12): p. 877-877.
59. Tulin, A. and A. Spradling, *Chromatin Loosening by Poly(ADP)-Ribose Polymerase (PARP) at Drosophila Puff Loci*. Science, 2003. **299**(5606): p. 560-562.
60. Pinnola, A., et al., *Nucleosomal core histones mediate dynamic regulation of poly(ADP-ribose) polymerase I protein binding to chromatin and induction of its enzymatic activity*. J Biol Chem, 2007. **282**(44): p. 32511-9.
61. Berger, N.A., et al., *Poly(ADP-ribose) polymerase mediates the suicide response to massive DNA damage: studies in normal and DNA-repair defective cells*. Princess Takamatsu Symp, 1983. **13**: p. 219-26.
62. Cipriani, G., et al., *Nuclear poly(ADP-ribose) polymerase-I rapidly triggers mitochondrial dysfunction*. J Biol Chem, 2005. **280**(17): p. 17227-34.
63. Formentini, L., et al., *Poly(ADP-ribose) catabolism triggers AMP-dependent mitochondrial energy failure*. J Biol Chem, 2009. **284**(26): p. 17668-76.
64. Buonvicino, D., et al., *Glucose Deprivation Converts Poly(ADP-ribose) Polymerase-I Hyperactivation into a Transient Energy-producing Process*. J Biol Chem, 2013. **288**(51): p. 36530-7.
65. Fouquerel, E., et al., *ARTD1/PARP1 negatively regulates glycolysis by inhibiting hexokinase I independent of NAD(+) depletion*. Cell Rep, 2014. **8**(6): p. 1819-31.
66. Andrabi, S.A., et al., *Poly(ADP-ribose) polymerase-dependent energy depletion occurs through inhibition of glycolysis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(28): p. 10209-14.
67. Miramar, M.D., et al., *NADH Oxidase Activity of Mitochondrial Apoptosis-inducing Factor*. Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(19): p. 16391-16398.
68. Yu, S.W., et al., *Apoptosis-inducing factor mediates poly(ADP-ribose) (PAR) polymer-induced cell death*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(48): p. 18314-9.
69. Cao, G., et al., *Critical role of calpain I in mitochondrial release of apoptosis-inducing factor in ischemic neuronal injury*. J Neurosci, 2007. **27**(35): p. 9278-93.
70. Vosler, P.S., et al., *Calcium dysregulation induces apoptosis-inducing factor release: cross-talk between PARP-1- and calpain-signaling pathways*. Exp Neurol, 2009. **218**(2): p. 213-20.
71. Susin, S.A., et al., *Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor*. Nature, 1999. **397**(6718): p. 441-6.
72. Joza, N., et al., *Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death*. Nature, 2001. **410**(6828): p. 549-54.
73. Wang, Y., et al., *Poly (ADP-ribose) (PAR) Binding to Apoptosis-Inducing Factor Is Critical For PAR Polymerase-1-Dependent Cell Death (Parthanatos)*. Sci Signal. **4**(167): p. ra20.
74. Soriano, F.G., et al., *Resistance to Acute Septic Peritonitis in Poly(ADP-ribose) Polymerase-1-Deficient Mice*. Shock, 2002. **17**(4): p. 286-292.
75. Oliver, F.J., et al., *Resistance to endotoxic shock as a consequence of defective NF-kappaB activation in poly (ADP-ribose) polymerase-1 deficient mice*. Embo j, 1999. **18**(16): p. 4446-54.

76. Hassa, P.O. and M.O. Hottiger, *A role of poly (ADP-ribose) polymerase in NF-kappaB transcriptional activation*. Biol Chem, 1999. **380**(7-8): p. 953-9.
77. Oliver, F.J., J. Menissier-de Murcia, and G. de Murcia, *Poly(ADP-ribose) polymerase in the cellular response to DNA damage, apoptosis, and disease*. Am J Hum Genet, 1999. **64**(5): p. 1282-8.
78. Szabo, C., et al., *Poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors ameliorate nephropathy of type 2 diabetic Leprdb/db mice*. Diabetes, 2006. **55**(11): p. 3004-12.
79. Koonin, E.V., *The origin and early evolution of eukaryotes in the light of phylogenomics*. Genome Biology, 2010. **11**(5): p. 1-12.
80. Martin, W. and M. Muller, *The hydrogen hypothesis for the first eukaryote*. Nature, 1998. **392**(6671): p. 37-41.
81. Portier, P., *Les Symbiotes*. Masson (Paris) 1918.
82. Copeland, D.E. and A.J. Dalton, *An Association between Mitochondria and the Endoplasmic Reticulum in Cells of the Pseudobranch Gland of a Teleost*. J Biophys Biochem Cytol, 1959. **5**(3): p. 393-6.
83. Zalman, L.S., H. Nikaïdo, and Y. Kagawa, *Mitochondrial outer membrane contains a protein producing nonspecific diffusion channels*. Journal of Biological Chemistry, 1980. **255**(5): p. 1771-1774.
84. de Kroon, A.I., et al., *Phospholipid composition of highly purified mitochondrial outer membranes of rat liver and Neurospora crassa. Is cardiolipin present in the mitochondrial outer membrane?* Biochim Biophys Acta, 1997. **1325**(1): p. 108-16.
85. Hunter, D.R. and R.A. Haworth, *The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. I. The protective mechanisms*. Arch Biochem Biophys, 1979. **195**(2): p. 453-9.
86. Zinser, E., et al., *Phospholipid synthesis and lipid composition of subcellular membranes in the unicellular eukaryote Saccharomyces cerevisiae*. J Bacteriol, 1991. **173**(6): p. 2026-34.
87. Krämer, R. and M. Klingenberg, *Reconstitution of adenine nucleotide transport with purified ADP, ATP-carrier protein*. FEBS Letters, 1977. **82**(2): p. 363-367.
88. Rousset, S., et al., *The biology of mitochondrial uncoupling proteins*. Diabetes, 2004. **53 Suppl 1**: p. S130-5.
89. Perkins, G., et al., *Electron Tomography of Neuronal Mitochondria: Three-Dimensional Structure and Organization of Cristae and Membrane Contacts*. Journal of Structural Biology, 1997. **119**(3): p. 260-272.
90. Bernardi, P. and G.F. Azzone, *Cytochrome c as an electron shuttle between the outer and inner mitochondrial membranes*. J Biol Chem, 1981. **256**(14): p. 7187-92.
91. Cogliati, S., et al., *Mitochondrial Cristae Shape Determines Respiratory Chain Supercomplexes Assembly and Respiratory Efficiency*. Cell. **155**(1): p. 160-171.
92. Haworth, R.A. and D.R. Hunter, *The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. II. Nature of the Ca²⁺ trigger site*. Arch Biochem Biophys, 1979. **195**(2): p. 460-7.
93. Herrmann, J.M. and J. Riemer, *The Intermembrane Space of Mitochondria*. Antioxidants & Redox Signaling, 2010. **13**(9): p. 1341-1358.
94. B. Alberts, A.J., J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and G. and P. Walter, *Molecular Biology of the Cell, 5th Edition*. Science, New York, NY. 2008. 1616 pp., ISBN 978-0-8153-4105-5.
95. Moraes, C.T., L. Kenyon, and H. Hao, *Mechanisms of Human Mitochondrial DNA Maintenance: The Determining Role of Primary Sequence and Length over Function*. Mol Biol Cell, 1999. **10**(10): p. 3345-56.

96. Hollenbeck, P.J. and W.M. Saxton, *The axonal transport of mitochondria*. J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 23): p. 5411-9.
97. Detmer, S.A. and D.C. Chan, *Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(11): p. 870-9.
98. Chen, H., et al., *Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development*. J Cell Biol, 2003. **160**(2): p. 189-200.
99. Bereiter-Hahn, J. and M. Voth, *Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria*. Microsc Res Tech, 1994. **27**(3): p. 198-219.
100. Campello, S. and L. Scorrano, *Mitochondrial shape changes: orchestrating cell pathophysiology*. EMBO Rep, 2010. **11**(9): p. 678-84.
101. Hales, K.G. and M.T. Fuller, *Developmentally regulated mitochondrial fusion mediated by a conserved, novel, predicted GTPase*. Cell, 1997. **90**(1): p. 121-9.
102. Santel, A. and M.T. Fuller, *Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin*. J Cell Sci, 2001. **114**(Pt 5): p. 867-74.
103. Rojo, M., et al., *Membrane topology and mitochondrial targeting of mitofusins, ubiquitous mammalian homologs of the transmembrane GTPase Fzo*. J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 8): p. 1663-74.
104. Koshiba, T., et al., *Structural basis of mitochondrial tethering by mitofusin complexes*. Science, 2004. **305**(5685): p. 858-62.
105. 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.
106. de Brito, O.M. and L. Scorrano, *Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria*. Nature, 2008. **456**(7222): p. 605-610.
107. Anand, R., et al., *The i-AAA protease YME1L and OMA1 cleave OPA1 to balance mitochondrial fusion and fission*. J Cell Biol, 2014. **204**(6): p. 919-29.
108. Ishihara, N., et al., *Regulation of mitochondrial morphology through proteolytic cleavage of OPA1*. The EMBO Journal, 2006. **25**(13): p. 2966-2977.
109. Frezza, C., et al., *OPA1 controls apoptotic cristae remodeling independently from mitochondrial fusion*. Cell, 2006. **126**(1): p. 177-89.
110. 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.
111. MacVicar, T. and T. Langer, *OPA1 processing in cell death and disease - the long and short of it*. 2016. **129**(12): p. 2297-306.
112. Delettre, C., et al., *Mutation spectrum and splicing variants in the OPA1 gene*. Hum Genet, 2001. **109**(6): p. 584-91.
113. Duvezin-Caubet, S., et al., *Proteolytic Processing of OPA1 Links Mitochondrial Dysfunction to Alterations in Mitochondrial Morphology*. Journal of Biological Chemistry, 2006. **281**(49): p. 37972-37979.
114. Szabadkai, G., et al., *Drp-1-Dependent Division of the Mitochondrial Network Blocks Intraorganellar Ca²⁺ Waves and Protects against Ca²⁺-Mediated Apoptosis*. Molecular Cell, 2004. **16**(1): p. 59-68.
115. Smirnova, E., et al., *Dynammin-related Protein Drp1 Is Required for Mitochondrial*. Mol Biol Cell, 2001. **12**(8): p. 2245-56.
116. Li, X. and S.J. Gould, *The dynammin-like GTPase DLPI is essential for peroxisome division and is recruited to peroxisomes in part by PEX11*. J Biol Chem, 2003. **278**(19): p. 17012-20.
117. James, D.I., et al., *hFis1, a novel component of the mammalian mitochondrial fission machinery*. J Biol Chem, 2003. **278**(38): p. 36373-9.

118. Yoon, Y., et al., *The mitochondrial protein hFis1 regulates mitochondrial fission in mammalian cells through an interaction with the dynamin-like protein DLP1*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(15): p. 5409-20.
119. Shaw, J.M. and J. Nunnari, *Mitochondrial dynamics and division in budding yeast*. Trends in Cell Biology. **12**(4): p. 178-184.
120. Ingerman, E., et al., *Dnml forms spirals that are structurally tailored to fit mitochondria*. The Journal of Cell Biology, 2005. **170**(7): p. 1021-1027.
121. Labrousse, A.M., et al., *C. elegans dynamin-related protein DRP-1 controls severing of the mitochondrial outer membrane*. Mol Cell, 1999. **4**(5): p. 815-26.
122. Parone, P.A., et al., *Preventing mitochondrial fission impairs mitochondrial function and leads to loss of mitochondrial DNA*. PLoS One, 2008. **3**(9): p. e3257.
123. Benard, G., et al., *Mitochondrial bioenergetics and structural network organization*. Journal of Cell Science, 2007. **120**(5): p. 838-848.
124. Twig, G., et al., *Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy*. The EMBO Journal, 2008. **27**(2): p. 433-446.
125. Bach, D., et al., *Mitofusin-2 determines mitochondrial network architecture and mitochondrial metabolism. A novel regulatory mechanism altered in obesity*. J Biol Chem, 2003. **278**(19): p. 17190-7.
126. Chen, H., A. Chomyn, and D.C. Chan, *Disruption of Fusion Results in Mitochondrial Heterogeneity and Dysfunction*. Journal of Biological Chemistry, 2005. **280**(28): p. 26185-26192.
127. Gomes, L.C., G. Di Benedetto, and L. Scorrano, *During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability*. Nat Cell Biol, 2011. **13**(5): p. 589-98.
128. Molina, A.J., et al., *Mitochondrial networking protects beta-cells from nutrient-induced apoptosis*. Diabetes, 2009. **58**(10): p. 2303-15.
129. Amchenkova, A.A., et al., *Coupling membranes as energy-transmitting cables. I. Filamentous mitochondria in fibroblasts and mitochondrial clusters in cardiomyocytes*. J Cell Biol, 1988. **107**(2): p. 481-95.
130. Yoneda, M., T. Miyatake, and G. Attardi, *Complementation of mutant and wild-type human mitochondrial DNAs coexisting since the mutation event and lack of complementation of DNAs introduced separately into a cell within distinct organelles*. Mol Cell Biol, 1994. **14**(4): p. 2699-712.
131. Lemasters, J.J., *Selective mitochondrial autophagy, or mitophagy, as a targeted defense against oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging*. Rejuvenation Res, 2005. **8**(1): p. 3-5.
132. Benard, G., et al., *Mitochondrial bioenergetics and structural network organization*. J Cell Sci, 2007. **120**(Pt 5): p. 838-48.
133. Kissová, I., et al., *Uth1p Is Involved in the Autophagic Degradation of Mitochondria*. Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(37): p. 39068-39074.
134. Xue, L., G.C. Fletcher, and A.M. Tolkovsky, *Mitochondria are selectively eliminated from eukaryotic cells after blockade of caspases during apoptosis*. Current Biology. **11**(5): p. 361-365.
135. Twig, G., et al., *Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy*. Embo j, 2008. **27**(2): p. 433-46.
136. Narendra, D., et al., *Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy*. J Cell Biol, 2008. **183**(5): p. 795-803.
137. Narendra, D.P., et al., *PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin*. PLoS Biol, 2010. **8**(1): p. e1000298.

138. Jin, S.M., et al., *Mitochondrial membrane potential regulates PINK1 import and proteolytic destabilization by PARL*. J Cell Biol, 2010. **191**(5): p. 933-42.
139. Nunnari, J. and A. Suomalainen, *Mitochondria: In Sickness and in Health*. Cell. **148**(6): p. 1145-1159.
140. Parsons, M.J. and D.R. Green, *Mitochondria in cell death*. Essays Biochem, 2010. **47**: p. 99-114.
141. Alano, C.C., et al., *NAD(+) depletion is necessary and sufficient for PARP-1 – mediated neuronal death*. J Neurosci, 2010. **30**(8): p. 2967-78.
142. Takeyama, N., N. Matsuo, and T. Tanaka, *Oxidative damage to mitochondria is mediated by the Ca(2+)-dependent inner-membrane permeability transition*. Biochem J, 1993. **294** (Pt 3): p. 719-25.
143. Sonntag, C.v., *The chemical basis of radiation biology*. 1989, London; Philadelphia, PA: Taylor & Francis.
144. Szabados, E., et al., *BGP-15, a nicotinic amidoxime derivate protecting heart from ischemia reperfusion injury through modulation of poly(ADP-ribose) polymerase*. Biochem Pharmacol, 2000. **59**(8): p. 937-45.
145. Halmosi, R., et al., *Effect of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors on the ischemia-reperfusion-induced oxidative cell damage and mitochondrial metabolism in Langendorff heart perfusion system*. Mol Pharmacol, 2001. **59**(6): p. 1497-505.
146. 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.
147. Irie, H.Y., et al., *Distinct roles of Akt1 and Akt2 in regulating cell migration and epithelial-mesenchymal transition*. J Cell Biol, 2005. **171**(6): p. 1023-34.
148. Zhong, H., et al., *Modulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics*. Cancer Res, 2000. **60**(6): p. 1541-5.
149. Yang, J.Y., et al., *Insulin stimulates Akt translocation to mitochondria: implications on dysregulation of mitochondrial oxidative phosphorylation in diabetic myocardium*. J Mol Cell Cardiol, 2009. **46**(6): p. 919-26.
150. Su, C.C., et al., *Mitochondrial Akt-regulated mitochondrial apoptosis signaling in cardiac muscle cells*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2012. **302**(3): p. H716-23.
151. Kennedy, S.G., et al., *Akt/Protein kinase B inhibits cell death by preventing the release of cytochrome c from mitochondria*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(8): p. 5800-10.
152. Ong, S.B., et al., *Inhibiting mitochondrial fission protects the heart against ischemia/reperfusion injury*. Circulation, 2010. **121**(18): p. 2012-22.
153. Ong, S.B., et al., *Akt protects the heart against ischaemia-reperfusion injury by modulating mitochondrial morphology*. Thromb Haemost, 2015. **113**(3): p. 513-21.
154. Varanita, T., et al., *The Opa1-Dependent Mitochondrial Cristae Remodeling Pathway Controls Atrophic, Apoptotic, and Ischemic Tissue Damage*. Cell Metab, 2015. **21**(6): p. 834-44.
155. Baker, M.J., et al., *Stress-induced OMA1 activation and autocatalytic turnover regulate OPA1-dependent mitochondrial dynamics*. Embo j, 2014. **33**(6): p. 578-93.
156. Bleau, A.M., et al., *PTEN/PI3K/Akt pathway regulates the side population phenotype and ABCG2 activity in glioma tumor stem-like cells*. Cell Stem Cell, 2009. **4**(3): p. 226-35.
157. Mogi, M., et al., *Akt signaling regulates side population cell phenotype via Bcrp1 translocation*. J Biol Chem, 2003. **278**(40): p. 39068-75.

158. Takada, T., et al., *Regulation of the cell surface expression of human BCRP/ABCG2 by the phosphorylation state of Akt in polarized cells*. *Drug Metab Dispos*, 2005. **33**(7): p. 905-9.
159. Wang, H., et al., *Akt mediates metastasis-associated gene 1 (MTA1) regulating the expression of E-cadherin and promoting the invasiveness of prostate cancer cells*. *PLoS One*, 2012. **7**(12): p. e46888.
160. 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.
161. 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.
162. Cohen-Armon, M., et al., *DNA-Independent PARP-1 Activation by Phosphorylated ERK2 Increases Elk1 Activity: A Link to Histone Acetylation*. *Molecular Cell*, 2007. **25**(2): p. 297-308.
163. Weaver, A. and E. Yang, *Beyond DNA Repair: Additional Functions of PARP-1 in Cancer*. *Frontiers in Oncology*, 2013. **3**(290).
164. Pearson, G., et al., *Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions*. *Endocr Rev*, 2001. **22**(2): p. 153-83.
165. di Mari, J.F., R. Davis, and R.L. Saffirstein, *MAPK activation determines renal epithelial cell survival during oxidative injury*. *Am J Physiol*, 1999. **277**(2): p. F195-203.
166. Arany, I., et al., *Cisplatin-induced cell death is EGFR/src/ERK signaling dependent in mouse proximal tubule cells*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2004. **287**(3): p. F543-9.
167. Roberts, P.J. and C.J. Der, *Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer*. *Oncogene*, 2007. **26**(22): p. 3291-3310.
168. Miller, C.R., K.E. Oliver, and J.H. Farley, *MEK1/2 inhibitors in the treatment of gynecologic malignancies*. *Gynecol Oncol*, 2014. **133**(1): p. 128-37.
169. Koul, H.K., M. Pal, and S. Koul, *Role of p38 MAP Kinase Signal Transduction in Solid Tumors*. *Genes & cancer*, 2013. **4**(9-10): p. 342-359.
170. Wagner, E.F. and A.R. Nebreda, *Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development*. *Nat Rev Cancer*, 2009. **9**(8): p. 537-49.
171. Nebreda, A.R. and A. Porras, *p38 MAP kinases: beyond the stress response*. *Trends Biochem Sci*, 2000. **25**(6): p. 257-60.
172. Kyriakis, J.M. and J. Avruch, *Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation*. *Physiol Rev*, 2001. **81**(2): p. 807-69.
173. Karin, M. and E. Gallagher, *From JNK to pay dirt: jun kinases, their biochemistry, physiology and clinical importance*. *IUBMB Life*, 2005. **57**(4-5): p. 283-95.
174. Weston, C.R. and R.J. Davis, *The JNK signal transduction pathway*. *Curr Opin Cell Biol*, 2007. **19**(2): p. 142-9.
175. Rincon, M. and R.J. Davis, *Regulation of the immune response by stress-activated protein kinases*. *Immunol Rev*, 2009. **228**(1): p. 212-24.
176. Gao, Y.J., et al., *Selective inhibition of JNK with a peptide inhibitor attenuates pain hypersensitivity and tumor growth in a mouse skin cancer pain model*. *Exp Neurol*, 2009. **219**(1): p. 146-55.
177. Posthumadeboer, J., et al., *Targeting JNK-interacting-protein-1 (JIP1) sensitises osteosarcoma to doxorubicin*. *Oncotarget*, 2012. **3**(10): p. 1169-81.
178. 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.

179. Schroeter, H., et al., *c-Jun N-terminal kinase (JNK)-mediated modulation of brain mitochondria function: new target proteins for JNK signalling in mitochondrion-dependent apoptosis*. *Biochem J*, 2003. **372**(Pt 2): p. 359-69.
180. Donovan, N., et al., *JNK phosphorylation and activation of BAD couples the stress-activated signaling pathway to the cell death machinery*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(43): p. 40944-9.
181. Puri, P.L., et al., *Induction of terminal differentiation by constitutive activation of p38 MAP kinase in human rhabdomyosarcoma cells*. *Genes & development*, 2000. **14**(5): p. 574-584.
182. Ordonez-Moran, P., et al., *RhoA-ROCK and p38MAPK-MSK1 mediate vitamin D effects on gene expression, phenotype, and Wnt pathway in colon cancer cells*. *J Cell Biol*, 2008. **183**(4): p. 697-710.
183. Lee, R.J., et al., *pp60(v-src) induction of cyclin D1 requires collaborative interactions between the extracellular signal-regulated kinase, p38, and Jun kinase pathways. A role for cAMP response element-binding protein and activating transcription factor-2 in pp60(v-src) signaling in breast cancer cells*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(11): p. 7341-50.
184. Recio, J.A. and G. Merlino, *Hepatocyte growth factor/scatter factor activates proliferation in melanoma cells through p38 MAPK, ATF-2 and cyclin D1*. *Oncogene*, 2002. **21**(7): p. 1000-8.
185. Neve, R.M., T. Holbro, and N.E. Hynes, *Distinct roles for phosphoinositide 3-kinase, mitogen-activated protein kinase and p38 MAPK in mediating cell cycle progression of breast cancer cells*. *Oncogene*, 2002. **21**(29): p. 4567-76.
186. Kumar, S., J. Boehm, and J.C. Lee, *p38 MAP kinases: key signalling molecules as therapeutic targets for inflammatory diseases*. *Nat Rev Drug Discov*, 2003. **2**(9): p. 717-26.
187. Mayer, R.J. and J.F. Callahan, *p38 MAP kinase inhibitors: A future therapy for inflammatory diseases*. *Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies*, 2006. **3**(1): p. 49-54.
188. Bachelor, M.A. and G.T. Bowden, *UVA-mediated activation of signaling pathways involved in skin tumor promotion and progression*. *Semin Cancer Biol*, 2004. **14**(2): p. 131-8.
189. Timoshenko, A.V., et al., *COX-2-mediated stimulation of the lymphangiogenic factor VEGF-C in human breast cancer*. *British journal of cancer*, 2006. **94**(8): p. 1154-1163.
190. Karin, M., *Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression*. *Nature*, 2006. **441**(7092): p. 431-6.
191. Mantovani, A., et al., *Cancer-related inflammation*. *Nature*, 2008. **454**(7203): p. 436-44.
192. Robaszkiewicz, 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.
193. Olson, J.M. and A.R. Hallahan, *p38 MAP kinase: a convergence point in cancer therapy*. *Trends Mol Med*, 2004. **10**(3): p. 125-9.
194. Xu, Y., et al., *Poly(ADP-ribose) polymerase-1 signaling to mitochondria in necrotic cell death requires RIP1/TRAF2-mediated JNK1 activation*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(13): p. 8788-95.
195. Mester, L., et al., *Protection against chronic hypoperfusion-induced retinal neurodegeneration by PARP inhibition via activation of PI-3-kinase Akt pathway and suppression of JNK and p38 MAP kinases*. *Neurotox Res*, 2009. **16**(1): p. 68-76.

196. Radnai, B., et al., *Protective effect of the poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor PJ34 on mitochondrial depolarization-mediated cell death in hepatocellular carcinoma cells involves attenuation of c-Jun N-terminal kinase-2 and protein kinase B/Akt activation.* Mol Cancer, 2012. **11**: p. 34.
197. Leboucher, G.P., et al., *Stress-Induced Phosphorylation and Proteasomal Degradation of Mitofusin 2 Facilitates Mitochondrial Fragmentation and Apoptosis.* Mol Cell, 2012. **47**(4): p. 547-57.
198. Senyilmaz, D., *Regulation of mitochondrial morphology and function by Stearoylation of TfR1.* 2015. **525**(7567): p. 124-8.
199. Brady, N.R., A. Hamacher-Brady, and R.A. Gottlieb, *Proapoptotic BCL-2 family members and mitochondrial dysfunction during ischemia/reperfusion injury, a study employing cardiac HL-1 cells and GFP biosensors.* Biochim Biophys Acta, 2006. **1757**(5-6): p. 667-78.
200. 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.
201. Huang, D., et al., *Angiotensin II promotes poly(ADP-ribosylation) of c-Jun/c-Fos in cardiac fibroblasts.* J Mol Cell Cardiol, 2009. **46**(1): p. 25-32.
202. Pietsch, E.C., et al., *The p53 family and programmed cell death.* Oncogene, 2008. **27**(50): p. 6507-6521.
203. Cory, S. and J.M. Adams, *The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch.* Nat Rev Cancer, 2002. **2**(9): p. 647-56.
204. Leu, J.I., et al., *Mitochondrial p53 activates Bak and causes disruption of a Bak-Mcl1 complex.* Nat Cell Biol, 2004. **6**(5): p. 443-50.
205. Hou, Z., et al., *Down-expression of poly(ADP-ribose) polymerase in p53-regulated pancreatic cancer cells.* Oncology letters, 2018. **15**(2): p. 1943-1948.
206. Okuda, A., et al., *Poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors activate the p53 signaling pathway in neural stem/progenitor cells.* BMC neuroscience, 2017. **18**(1): p. 14-14.
207. Gartel, A.L. and A.L. Tyner, *The Role of the Cyclin-dependent Kinase Inhibitor p21 in Apoptosis 1 Supported in part by NIH Grant R01 DK56283 (to A. L. T.) for the p21 research and Campus Research Board and Illinois Department of Public Health Penny Severns Breast and Cervical Cancer grants (to A. L. G.).* [Molecular Cancer Therapeutics](#), 2002. **1**(8): p. 639-649.
208. Madison, D.L., D. Stauffer, and J.R. Lundblad, *The PARP inhibitor PJ34 causes a PARP1-independent, p21 dependent mitotic arrest.* DNA repair, 2011. **10**(10): p. 1003-1013.
209. Martin-Oliva, D., et al., *Inhibition of Poly(ADP-Ribose) Polymerase Modulates Tumor-Related Gene Expression, Including Hypoxia-Inducible Factor-1 Activation, during Skin Carcinogenesis.* Cancer Research, 2006. **66**(11): p. 5744-5756.
210. Malanga, M., et al., *Poly(ADP-ribose) Binds to Specific Domains of p53 and Alters Its DNA Binding Functions.* Journal of Biological Chemistry, 1998. **273**(19): p. 11839-11843.
211. 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.
212. 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.

213. 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.
214. 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.
215. Bardos, G., et al., *BGP-15, a hydroximic acid derivative, protects against cisplatin- or taxol-induced peripheral neuropathy in rats*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2003. **190**(1): p. 9-16.
216. Miwa, M., et al., *Poly(adenosine diphosphate ribose) synthesis during the cell cycle of transformed hamster lung cells*. *Cancer Res*, 1973. **33**(6): p. 1306-9.
217. Lodhi, N., A.V. Kossenkov, and A.V. Tulin, *Bookmarking promoters in mitotic chromatin: poly(ADP-ribose)polymerase-1 as an epigenetic mark*. *Nucleic Acids Research*, 2014.
218. Guillot, C., et al., *PARP inhibition and the radiosensitizing effects of the PARP inhibitor ABT-888 in in vitro hepatocellular carcinoma models*. *BMC Cancer*, 2014. **14**(1): p. 603.
219. 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.
220. Kallinowski, F., et al., *Blood flow, metabolism, cellular microenvironment, and growth rate of human tumor xenografts*. *Cancer Res*, 1989. **49**(14): p. 3759-64.
221. Barbi de Moura, M., et al., *Mitochondrial respiration--an important therapeutic target in melanoma*. *PLoS One*, 2012. **7**(8): p. e40690.
222. 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.
223. Kim, D.S., et al., *Sphingosine-1-phosphate-induced ERK activation protects human melanocytes from UVB-induced apoptosis*. *Arch Pharm Res*, 2003. **26**(9): p. 739-46.
224. Gao, L., et al., *Ras-associated protein-1 regulates extracellular signal-regulated kinase activation and migration in melanoma cells: two processes important to melanoma tumorigenesis and metastasis*. *Cancer Res*, 2006. **66**(16): p. 7880-8.
225. Lee, K.B., et al., *Proton induces apoptosis of hypoxic tumor cells by the p53-dependent and p38/JNK MAPK signaling pathways*. *Int J Oncol*, 2008. **33**(6): p. 1247-56.
226. Lee, K.B., et al., *Low energy proton beam induces tumor cell apoptosis through reactive oxygen species and activation of caspases*. *Exp Mol Med*, 2008. **40**(1): p. 118-29.
227. Affolter, A., et al., *Activation of mitogen-activated protein kinase extracellular signal-related kinase in head and neck squamous cell carcinomas after irradiation as part of a rescue mechanism*. *Head Neck*, 2011. **33**(10): p. 1448-57.
228. Ma, Z.C., et al., *Ferulic acid protects lymphocytes from radiation-predisposed oxidative stress through extracellular regulated kinase*. *Int J Radiat Biol*, 2011. **87**(2): p. 130-40.
229. Marampon, F., et al., *MEK/ERK inhibitor U0126 increases the radiosensitivity of rhabdomyosarcoma cells in vitro and in vivo by downregulating growth and DNA repair signals*. *Mol Cancer Ther*, 2011. **10**(1): p. 159-68.
230. 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.
231. 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.

232. 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.
233. Hagan, M.P., A. Yacoub, and P. Dent, *Radiation-induced PARP activation is enhanced through EGFR-ERK signaling*. J Cell Biochem, 2007. **101**(6): p. 1384-93.
234. Kalai, T., et al., *New poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitors with antioxidant activity based on 4-carboxamidobenzimidazole-2-ylpyrroline and -tetrahydropyridine nitroxides and their precursors*. J Med Chem, 2009. **52**(6): p. 1619-29.
235. Alexy, T., et al., *Inhibition of ADP-evoked platelet aggregation by selected poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors*. J Cardiovasc Pharmacol, 2004. **43**(3): p. 423-31.
236. Kovacs, K., et al., *Critical role of PI3-kinase/Akt activation in the PARP inhibitor induced heart function recovery during ischemia-reperfusion*. Biochem Pharmacol, 2006. **71**(4): p. 441-52.
237. Kovacs, K., et al., *Prevalent role of Akt and ERK activation in cardioprotective effect of Ca(2+) channel- and beta-adrenergic receptor blockers*. Mol Cell Biochem, 2009. **321**(1-2): p. 155-64.
238. Tomiyama, A., et al., *MEK-ERK-dependent multiple caspase activation by mitochondrial proapoptotic Bcl-2 family proteins is essential for heavy ion irradiation-induced glioma cell death*. Cell Death Dis, 2010. **1**: p. e60.
239. Gangopadhyay, N.N., et al., *Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) induces apoptosis in lung cancer cell lines*. Cancer Invest, 2011. **29**(9): p. 608-16.
240. Veres, B., et al., *Regulation of kinase cascades and transcription factors by a poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor, 4-hydroxyquinazoline, in lipopolysaccharide-induced inflammation in mice*. J Pharmacol Exp Ther, 2004. **310**(1): p. 247-55.
241. Zerfaoui, M., et al., *Poly(ADP-ribose) polymerase-1 is a determining factor in Crm1-mediated nuclear export and retention of p65 NF-kappa B upon TLR4 stimulation*. J Immunol, 2010. **185**(3): p. 1894-902.
242. Tang, Y., et al., *Inhibition of arginine ADP-ribosyltransferase 1 reduces the expression of poly(ADP-ribose) polymerase-1 in colon carcinoma*. Int J Mol Med, 2013. **32**(1): p. 130-6.
243. Catz, S.D. and J.L. Johnson, *BCL-2 in prostate cancer: a minireview*. Apoptosis, 2003. **8**(1): p. 29-37.
244. Zhao, X., et al., *Pokemon reduces Bcl-2 expression through NF- κ B p65: a possible mechanism of hepatocellular carcinoma*. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, 2011. **4**(6): p. 492-497.
245. 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.
246. 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.
247. Galluzzi, L., et al., *Targeting p53 to mitochondria for cancer therapy*. Cell Cycle, 2008. **7**(13): p. 1949-55.
248. 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.
249. Dedes, K.J., et al., *PTEN deficiency in endometrioid endometrial adenocarcinomas predicts sensitivity to PARP inhibitors*. Sci Transl Med, 2010. **2**(53): p. 53ra75.
250. Issaeva, N., et al., *6-thioguanine selectively kills BRCA2-defective tumors and overcomes PARP inhibitor resistance*. Cancer Res, 2010. **70**(15): p. 6268-76.

251. 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.
252. 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.
253. 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.
254. Rosenberg, B., L. Van Camp, and T. Krigas, *Inhibition of Cell Division in Escherichia coli by Electrolysis Products from a Platinum Electrode*. Nature, 1965. **205**(4972): p. 698-699.
255. Takahara, P.M., et al., *Crystal structure of double-stranded DNA containing the major adduct of the anticancer drug cisplatin*. Nature, 1995. **377**(6550): p. 649-52.
256. Thomadaki, H. and A. Scorilas, *Breast cancer cells response to the antineoplastic agents cisplatin, carboplatin, and doxorubicin at the mRNA expression levels of distinct apoptosis-related genes, including the new member, BCL2L12*. Ann N Y Acad Sci, 2007. **1095**: p. 35-44.
257. Kelland, L., *The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy*. Nat Rev Cancer, 2007. **7**(8): p. 573-84.
258. Burkle, A., et al., *Increased poly(ADP-ribosylation) in intact cells by cisplatin treatment*. Carcinogenesis, 1993. **14**(4): p. 559-61.
259. Murnyák, B., et al., *PARP1 expression and its correlation with survival is tumour molecular subtype dependent in glioblastoma*. Oncotarget, 2017. **8**(28): p. 46348-46362.
260. Dörsam, B., et al., *PARP-1 protects against colorectal tumor induction, but promotes inflammation-driven colorectal tumor progression*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2018. **115**(17): p. E4061-E4070.
261. Rojo, F., et al., *Nuclear PARP-1 protein overexpression is associated with poor overall survival in early breast cancer*. Annals of Oncology, 2011. **23**(5): p. 1156-1164.
262. Li, J., et al., *PARP-1 serves as a novel molecular marker for hepatocellular carcinoma in a Southern Chinese Zhuang population*. Tumor Biology, 2017. **39**(7): p. 1010428317706914.
263. Choi, J., et al., *A common intronic variant of PARP1 confers melanoma risk and mediates melanocyte growth via regulation of MITF*. Nature Genetics, 2017. **49**: p. 1326.
264. Rodriguez, M.I., et al., *PARP-1 regulates metastatic melanoma through modulation of vimentin-induced malignant transformation*. PLoS Genet, 2013. **9**(6): p. e1003531.
265. Abecassis, I., et al., *PARP1 rs1805407 Increases Sensitivity to PARP1 Inhibitors in Cancer Cells Suggesting an Improved Therapeutic Strategy*. Scientific Reports, 2019. **9**(1): p. 3309.
266. Moran, A., et al., *Risk of cancer other than breast or ovarian in individuals with BRCA1 and BRCA2 mutations*. Fam Cancer, 2012. **11**(2): p. 235-42.
267. Cancer Research Campaign (CRC) Genetic Epidemiology Unit, S.R.L., Cambridge, U.K., *Cancer risks in BRCA2 mutation carriers*. J Natl Cancer Inst, 1999. **91**(15): p. 1310-6.
268. Mersch, J., et al., *Cancers Associated with BRCA1 and BRCA2 Mutations other than Breast and Ovarian*. Cancer, 2015. **121**(2): p. 269-75.

269. Di Lucca, J., et al., *Variants of the xeroderma pigmentosum variant gene (POLH) are associated with melanoma risk*. *Eur J Cancer*, 2009. **45**(18): p. 3228-36.
270. Plummer, R., et al., *Phase I study of the poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor, AG014699, in combination with temozolomide in patients with advanced solid tumors*. *Clin Cancer Res*, 2008. **14**(23): p. 7917-23.
271. Tentori, L., et al., *Stable depletion of poly (ADP-ribose) polymerase-1 reduces in vivo melanoma growth and increases chemosensitivity*. *Eur J Cancer*, 2008. **44**(9): p. 1302-14.
272. Corazao-Rozas, P., et al., *Mitochondrial oxidative stress is the Achille's heel of melanoma cells resistant to Braf-mutant inhibitor*. *Oncotarget*, 2013. **4**(11): p. 1986-98.
273. LeBleu, V.S., et al., *PGC-1 α mediates mitochondrial biogenesis and oxidative phosphorylation to promote metastasis*. *Nat Cell Biol*, 2014. **16**(10): p. 992-15.
274. Vazquez, F., et al., *PGC1 α expression defines a subset of human melanoma tumors with increased mitochondrial capacity and resistance to oxidative stress*. *Cancer Cell*, 2013. **23**(3): p. 287-301.
275. Haq, R., et al., *Oncogenic BRAF regulates oxidative metabolism via PGC1 α and MITF*. *Cancer Cell*, 2013. **23**(3): p. 302-15.
276. Erice, O., et al., *MGMT Expression Predicts PARP-Mediated Resistance to Temozolomide*. *Mol Cancer Ther*, 2015. **14**(5): p. 1236-46.
277. Prestayko, A.W., et al., *Cisplatin (cis-diamminedichloroplatinum II)*. *Cancer Treat Rev*, 1979. **6**(1): p. 17-39.
278. Hau, P., R. Stupp, and M.E. Hegi, *MGMT methylation status: the advent of stratified therapy in glioblastoma?* *Dis Markers*, 2007. **23**(1-2): p. 97-104.
279. Shih, Y.L., et al., *Casticin induces DNA damage and inhibits DNA repair-associated protein expression in B16F10 mouse melanoma cancer cells*. *Oncol Rep*, 2016. **36**(4): p. 2094-100.
280. 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.
281. Rosen, M., M. Figliomeni, and H. Simpkins, *The interaction of platinum antitumor drugs with mouse liver mitochondria*. *Int J Exp Pathol*, 1992. **73**(1): p. 61-74.
282. Tapodi, A., et al., *PARP inhibition induces Akt-mediated cytoprotective effects through the formation of a mitochondria-targeted phospho-ATM-NEMO-Akt-mTOR signalosome*. *Biochem Pharmacol*, 2018.
283. Orsucci, D., M. Mancuso, and G. Siciliano, *Mitochondria, oxidative stress and PARP-1 network: a new target for neuroprotective effects of tetracyclines?* *J Physiol*, 2008. **586**(10): p. 2427-8.
284. Fan, J., T.M. Dawson, and V.L. Dawson, *Cell Death Mechanisms of Neurodegeneration*. *Adv Neurobiol*, 2017. **15**: p. 403-425.
285. Oliva, C.R., et al., *Acquisition of temozolomide chemoresistance in gliomas leads to remodeling of mitochondrial electron transport chain*. *J Biol Chem*, 2010. **285**(51): p. 39759-67.
286. Del Dotto, V., et al., *OPA1 Isoforms in the Hierarchical Organization of Mitochondrial Functions*. *Cell Reports*, 2017. **19**(12): p. 2557-2571.
287. Guillery, O., et al., *Metalloprotease-mediated OPA1 processing is modulated by the mitochondrial membrane potential*. *Biol Cell*, 2008. **100**(5): p. 315-25.
288. Ehses, S., et al., *Regulation of OPA1 processing and mitochondrial fusion by m-AAA protease isoenzymes and OMA1*. *J Cell Biol*, 2009. **187**(7): p. 1023-36.

289. 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; ⁸Szentagothai 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.

¹Department of Biochemistry and Medical Chemistry, Medical School, University of Pecs, 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

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

¹Department of Biochemistry and Medical Chemistry, University of Pécs Medical School, Pécs, Hungary; ²Department of Biology, University of Padova, Padova, Italy; ³Conway 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

¹Department of Biochemistry and Medical Chemistry, University of Pécs, Medical School, Pécs, Hungary; ²Department of Biology, University of Padua, Padua, Italy; ³Conway 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 Rubén Quintana-Cabrera-t és 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 sejtbiológiai 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.