

# **Significance of the mitochondrial permeability transition in the regulation of cell death**

**Ph.D. Thesis**

**Alíz Szabó**

**Program leader: Professor Balázs Sümegei, D.Sc.**

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

**2011**

## Abbreviations

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| ANT                           | adenine nucleotide translocase          |
| ATP                           | adenosine triphosphate                  |
| Bcl-2                         | B-cell lymphoma                         |
| BH                            | Bcl-2 homology                          |
| CsA                           | cyclosporine A                          |
| CypD                          | cyclophilin D                           |
| $\Delta\psi$                  | mitochondrial membrane potential        |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | hydrogen peroxide                       |
| JNK                           | c-Jun N-terminal kinase                 |
| MMP                           | mitochondrial membrane permeabilization |
| MPT                           | mitochondrial permeability transition   |
| OM                            | outer membrane                          |
| PARP                          | poly(ADP-ribose) polymerase             |
| RNS                           | reactive nitrogen species               |
| ROS                           | reactive oxygen species                 |
| siRNA                         | small interfering RNA                   |
| SOD                           | superoxide dismutase                    |
| VDAC                          | voltage-dependent anionic channel       |

## Introduction

It is well-known that dysregulation of the balance between cell death and survival leads to development of various diseases such as cancer, autoimmune diseases and neurodegenerative disorders. Influence on cell death processes provides opportunity for treatment of these diseases. Both the inhibition as well as the activation of cell death could be efficient for the *clinician* depending on the nature of the disease.

Apoptosis is a highly programmed cell death which can be activated by various factors. Mitochondria play a key role in the apoptotic process; their damage, which involves permeabilization of the mitochondrial membrane, activates a series of events that leads to cell death.

Based on the recent developments in mitochondrial research, increased pharmacological and pharmaceutical efforts have lead to the emergence of „mitochondrial medicine" as a new field of biomedical research. Targeting of biologically active molecules to mitochondria in living cells will open avenues for manipulating mitochondrial functions, which may result in the selective protection, repair, or eradication of cells.

We previously synthesized a panel of different structures carrying a cyclic nitroxide group and demonstrated their SOD (superoxide dismutase) mimetic characteristics; in addition, some of these structures were shown to have cytoprotective properties. In the present work, we studied the effect of new apolar mitochondria targeted triphenylphosphonium derivatives (SOD mimetics) and PARP inhibitors in mitochondria related cell death in different experimental circumstances in order to investigate their possible therapeutic applications.

### **The role of mitochondria in cell death**

Mitochondria play a critical role in maintaining the bioenergetic status of cells and, in addition, have a second crucial function: the control of cell death processes. These cell death processes have long been considered to be an important target for drug discovery.. Several studies have shown that apoptosis induction is strongly associated with the anticancer activity of many chemical agents. Moreover, chemoresistance of cancer cells often results from defects in apoptosis signaling. Therefore, alternative mitochondrial cell death mechanisms, such as mitochondrial permeability transition (MPT)-mediated necrotic cell death or autophagy could play important roles in anti-cancer therapy.

### **The mitochondrial permeability transition (M)**

The MPT pore, a non-specific channel originally thought to span both mitochondrial membranes, mediates the increases in mitochondrial permeability associated with cell death. The pore itself is permeable to solutes up to 1.5 kDa. This causes equilibration of H<sup>+</sup> across the inner membrane, which dissipates  $\Delta\Psi_m$  and inhibits ATP production. A concomitant influx of water causes swelling of the mitochondria, which stretches the membranes to the point where the outer membrane fails. The mitochondrial pore is redox, Ca<sup>2+</sup>, voltage, adenine nucleotide, and pH sensitive.

The composition of PT pores remains controversial. Based upon biochemical and pharmacological studies, the pore was proposed to consist of the voltage-dependent anion channel (VDAC) in the outer membrane, the adenine nucleotide translocase (ANT) in the inner membrane and cyclophilin D (CypD) in the matrix. However, recent genetic knockout studies challenge the validity of this model by showing that the MPT still occurs in mitochondria that are deficient in ANT, VDAC and even CypD, although some properties of the MPT are altered.

### **The Bcl-2 family**

Bcl-2 is the prototype member of a family of proteins containing at least one Bcl-2 homology (BH) region. For classification purposes, the family may be divided into antiapoptotic multidomain proteins (prototypes: Bcl-2, Bcl-XL), which contain four BH domains (BH1234); proapoptotic multidomain proteins (prototypes: Bax, Bak), which contain three BH domains (BH123); and proapoptotic BH3-only proteins (prototypes: Bid, Bad). The main site of action of Bcl-2-like proteins is probably the mitochondrial membrane. As a rule, BH1234 proteins mainly reside in OM, where they protect mitochondria against MMP, presumably by binding to and neutralizing other proapoptotic proteins from the Bcl-2 family, which on the contrary induce MMP. Some data indicate that Bcl-2 and Bcl-XL can interact with sessile mitochondrial proteins including ANT and VDAC. In vitro, the overexpression of Bcl-2 in cells or the addition of Bcl-2 to isolated mitochondria reduces the PT probability.

### **PARP inhibitors**

The nuclear enzyme poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) is activated in response to DNA damage. Single- and/or double-strand DNA breaks induce the production of branched chain ADP-ribose polymers that are covalently attached to numerous nuclear proteins like histones or the PARP itself and this process represents an early event in DNA repair.

Overactivation of PARP can lead to depletion of cellular NAD<sup>+</sup> and ATP which results in cell dysfunction and cause necrotic cell death. In the absence of DNA damage, PARP is not necessary for survival. Therefore PARP-1 inhibition is a promising mechanistic target for drug development in the context of various forms of inflammation, ischemia, and cancer therapy.

Although it is well-documented that inhibition of PARP-1 has cytoprotective effects against oxidative stress, there is growing evidence suggesting that inhibition of PARP-1 sensitizes cells to DNA-damaging agents.

Although several classes of PARP inhibitors move toward clinical development, new compounds are still needed. In our previous studies we found that modification of cardiovascular drugs, such as mexiletine, amiodarone, or trimetazidine, with pyrroline nitroxide precursors provided the parent compounds with additional antioxidant and radical scavenging activity. For example, alkylation of trimetazidine secondary amine with a 2,2,5,5-tetramethyl-2,5-dihydropyrrolin-3-ylmethyl group provided protection from ischemia-reperfusion induced contractile dysfunction. This approach well suits the new stream of drug research, e.g., incorporation of two drug pharmacophores in a single molecule with the intention to exert dual (cardiovascular and antioxidant) action. We considered the combination of nitroxides and their sterically hindered amine precursors with PARP inhibitors, realizing that most of the deleterious processes resulting from PARP activation are initiated by harmful reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS). These types of compounds would inhibit not only poly-ADP-ribosylation but simultaneously would suppress or decrease the harmful effect of initiator ROS and RNS as well.

### **Mitochondria targeted triphenylphosphonium derivative**

The presence of mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ) alterations is an important characteristic of cancer cells. Many groups have shown that the mitochondrial transmembrane potential in carcinoma cell lines is significantly higher than in normal cell lines. If the plasma and mitochondrial transmembrane potentials are both negative, molecules with cationic properties can be driven electrophoretically through these membranes, resulting in their accumulation inside the energized mitochondria of tumor cells. Triphenylphosphonium derivatives of vitamin E, ubiquinone, N-tert-butyl- $\alpha$ -phenylnitron, and, more recently, nitroxides, were the first antioxidant molecules shown to predominantly localize in mitochondria. These initial attempts demonstrated that mitochondria-targeted antioxidants may have a highly cytoprotective effect, particularly against apoptosis.

Lipophilic organic cations, such as rhodamine-123 and  $^3\text{H}$ -tetraphenylphosphonium ( $^3\text{H}$ -TPP), were used for to measure mitochondrial potentials in tumor cells. Although mitochondria-directed triphenylphosphonium derivatives have limited tumor specificity, cytostatic agents targeted to the mitochondria may have therapeutic significance. In fact, paramagnetically-modified triphenylphosphonium salts have been widely used for biophysical studies of membranes for decades; and their therapeutic potential as mitochondria-targeting, small, non-vitamin-like antioxidants is becoming increasingly appreciated.

## **Aims of the study**

We synthesized a number of PARP-1 inhibitor compounds (benzimidazole derivatives), that have SOD mimetic activity. The aim of the present study was the following:

- To screen their inhibitory effect on the PARP activation and cell death induced by  $\text{H}_2\text{O}_2$
- To analyse their antioxidant effect/ hydroxyl radical scavenging ability
- To elucidate their oxidative metabolism on a rat model
- To investigate the relationship between PARP inhibitory and antioxidant effect

It has been shown, that a number of mitochondria targeted antioxidant molecules by coupling with a triphenylphosphonium-group were more effective even at a lower concentration than their unsubstituted counterparts. We investigated new triphenylphosphonium derivatives of mitochondria-directed SOD mimetic nitroxides, however we observed that changing the hydrophobicity of these compounds, by attaching a bulky apolar side-chain, reversed their cytoprotective effects, resulting in cell death even at micromolar concentration. Therefore, the aim of the present study was the following:

- To verify the accumulation of HO-3814 in the mitochondria
- To describe the effect of hydrophobic derivatization on cell death by measuring cell viability of three tumor cell lines
- To compare the effect of the apolar SOD mimetic (HO-3814) with that of well-known anti-cancer drugs on cell viability in tumor cell lines
- To determine the type of cell death induced by HO-3814

- To investigate the molecular mechanism of the cytotoxic effect of this compound
- To describe the effect of HO-3814 on the mitochondrial permeability transition and on the stability of the mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ )
- To show the effect of Cyclophilin D suppression by siRNA technique on cell death and mitochondrial depolarisation induced by HO-3814 using a PANC-1 cell model
- To show the effect of Bcl-2 overexpression on HO-3814 induced mitochondrial depolarisation and cell death

## **Conclusions**

### **The inhibitory effect of benzimidazole derivatives on the PARP activation and cell death induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

Among the tested compounds **3h** and **4h** were found to be the best-performing PARP inhibitors. We found low correlation between the cell death inhibitory and PARP inhibitory effect.

### **Their antioxidant effect/ hydroxyl radical scavenging ability**

We established that compound **4h** appears to be the best antioxidant and PARP inhibitor regarding the PARP enzyme inhibition, cell death inhibition, and hydroxyl radical-scavenging results.

### **Their oxidative metabolism on a rat model**

We found that sterically hindered secondary amine moiety of PARP inhibitor **4h** is oxidized to nitroxide **3h**, while nitroxide **3h** and its hydroxylamine are in equilibrium in the rat model.

### **The relationship between PARP inhibitory and antioxidant effect**

We observed that the results of PARP inhibition and antioxidant studies did not correlate. The cell death inhibition is based not only on the PARP enzyme inhibition but probably on the ROS scavenging activity also.

In summary these results indicate the advantages of combining an antioxidant nitroxide or nitroxide precursor with a PARP inhibitor molecule to decrease or eliminate the deleterious processes initiated by reactive oxygen and reactive nitrogen species (ROS and RNS). In this

respect these compounds may have therapeutic potential in the future, however further biological studies are needed.

#### **Intracellular localization of HO-3814**

We verified, that this compound was accumulated in the mitochondria using mass spectrometric detection after cellular subfractionation.

#### **Effect of hydrophobic derivatization on cell death in three tumor cell lines**

We presented evidences at the first time that increasing lipophilicity of mitochondria targeted SOD mimetics inverted their cytoprotective properties inducing cell death in three different tumor cell lines used, indicating that the cytotoxic effect of HO-3814 could be the result of a general, rather than a cell-specific mechanism.

#### **Comparison of the effect of HO-3814 and well-known anti-cancer drugs on cell viabilities**

We found that PANC-1 cells were much more sensitive to HO-3814 than cisplatin. Because gemcitabine is the first line drug in pancreatic tumor therapy, we tested the sensitivity of PANC-1 cells toward gemcitabine. We found that gemcitabine even at the highest concentration used, caused only a slight decrease in the viability of PANC-1 cells under our experimental conditions, indicating that HO-3814 was much more effective in inducing cell death in PANC-1 cells than either of the anti-cancer drugs used. These results suggest that apolar mitochondria-directed SOD mimetics may have therapeutic potential in the management of pancreatic tumors.

#### **Determination of the type of cell death induced by HO-3814**

We established that HO-3814-induced cell death was predominantly necrotic.

#### **The molecular mechanism of the cytotoxic effect of HO-3814**

We analysed the effect of the mitochondrial permeability transition inhibitor, cyclosporine A, as well as inhibitors of ERK, p38, JNK and Akt kinase signalling pathways, a PARP inhibitor, a caspase inhibitor, and the antioxidants quercetine and N-acetyl-cysteine, on the cell viability of PANC-1 cells treated with HO-3814. We found that none of them had any effect on HO-3814 induced cell death indicating that most likely, none of these intracellular pathways were involved.



### **Effect of HO-3814 on isolated mitochondria**

HO-3814 was found to provoke mitochondrial swelling and loss of the mitochondrial membrane potential destabilizing the mitochondrial membrane system that was not inhibited by cyclosporine, suggesting that CypD was likely not involved in the mitochondrial permeability transition.

### **Effect of Cyclophilin D suppression by siRNA technique on cell death and mitochondrial depolarisation induced by HO-3814**

We showed that HO-3814- induced cell death and mitochondrial depolarisation was not affected by cyclophilin D-suppression confirming our results for isolated mitochondria.

### **Effect of Bcl-2 overexpression on HO-3814 induced mitochondrial depolarization and cell death**

When PANC-1 cells were overexpressing Bcl-2, a mitochondrial membrane system stabilizing protein, we found that the overexpression diminished the effects of HO-3814. These data suggest that HO-3814 induces cell death by destabilization of the mitochondrial inner and outer membrane systems, resulting in a collapse of membrane potential, leading to necrotic cell death.

In summary we provided evidence that changing hydrophobicity of mitochondria directed SOD mimetics reversed their cytoprotective effect inducing permeabilization of the mitochondrial membrane systems and necrotic cell death. Traditionally, necrosis of cancer cells was associated with poor prognosis since the resulting chronic inflammation was found to encourage tumor growth. However, malfunctioning of apoptotic mechanisms in many types of tumor cells increased the value of necrosis as a clinical focus recently. In this respect, hydrophobic mitochondria directed SOD mimetics may have therapeutic potential in the future.

## Acknowledgements

This work was supported by AOKKA-34039-1/2009 and 34039-23/2009 as well as Hungarian National Research Grants OTKA 68469, K-73738 and K81123.

I would like to thank Prof. Balázs Sümegi and Prof. Ferenc Gallyas for supporting my work with smart advices and thought-provoking ideas and giving me the opportunity to work in the Institute of Biochemistry and Medical Chemistry.

I thank my colleagues Krisztina Kovács, Zita Bognár, Eszter Bognár, Enikő Hocsák and László Mester for their co-operation and for the friendly and convivially atmosphere in our lab.

I thank Helena Halász, Istvánné Pásztor, László Girán and Bertalan Horváth for their excellent technical help.

I also thank Prof. Kálmán Hideg, Prof. Tamás Kálai and Mária Balog, Department of Organic and Pharmacological Chemistry, Faculty of Medicine, University of Pecs for synthesizing and conveying in this study presented compounds.

# **A mitokondriális permeabilitás tranzíció jelentősége a sejthalál szabályozásában**

**PhD tézis**

**Szabó Alíz**

**Programvezető: Prof. Sümegei Balázs D.Sc.**

**Pécsi Tudományegyetem, Ált. Orvostudományi Kar  
Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet**

**Pécs**

**2011**

## Rövidítések

|                               |  |
|-------------------------------|--|
| ANT                           | adenin nukleotid transzlokáz           |
| ATP                           | adenozin-trifoszfát                    |
| Bcl-2                         | B-sejtes limfóma                       |
| BH                            | Bcl-2 homológia                        |
| CsA                           | ciklosporin A                          |
| CypD                          | ciklofilin D                           |
| $\Delta\psi$                  | mitokondriális membrán potenciál       |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | hidrogén-peroxid                       |
| JNK                           | c-Jun N-terminális kináz               |
| MPT                           | mitokondriális permeabilitás tranzíció |
| PARP                          | poli(ADP-ribóz)polimeráz               |
| SOD                           | szuperoxid-dizmutáz                    |
| VDAC                          | feszültség függő anion csatorna        |

## Bevezetés

Jól ismert, hogy a sejthalál és a túlélés közötti egyensúly felborulása különböző betegségek (például tumor, autoimmun betegségek, neurodegeneratív kórképek) kialakulásához vezet. A sejthalál folyamatok befolyásolása lehetőséget nyújthat ezen betegségek kezelésére. A betegség természetétől függően mind a sejthalál aktiválása, mind a gátlása hatékony lehet a klinikus számára.

Az apoptózist, vagy programozott sejthalált számos faktor aktiválhatja. A mitokondriumok kulcsszerepet játszanak az apoptózis folyamatában; károsodásuk - amely magában foglalja a mitokondriális membrán permeabilizációját – számos eseményt aktivál, amely sejthalálhoz vezet.

A mitokondriális kutatásban bekövetkező fejlődés során fokozódott gyógyszerészeti törekvések egy új terület, a “mitokondriális medicina” kialakulásához vezettek. A biológiailag aktív molekulák élő sejtek mitokondriumaiba juttatása utat nyithat a mitokondriális funkciók befolyásolásához, amely talán a sejtek szelektív védelmét, javítását vagy megsemmisítését eredményezheti.

Korábban számos különböző szerkezetű ciklikus nitroxid csoporttal rendelkező molekulát szintetizáltunk, melyek SOD mimetikus jellemzőit igazoltuk, továbbá néhány esetben kimutattuk, hogy citoprotektív hatással bírnak. A jelen dolgozatban új, apoláros mitokondriumba irányított trifenilfoszfónium származékok (SOD mimetikumok) és PARP gátlók mitokondriális hatásait vizsgáltuk különböző kísérleti körülmények között, hogy esetleges terápiás alkalmazhatóságukra fényt derítsünk.

### **A mitokondriumok szerepe a sejthalálban**

A mitokondriumok kulcsszerepet játszanak a sejtek bioenergetikai státuszának fenntartásában, továbbá van egy másik kiemelkedő funkciójuk is: a sejthalál folyamatainak szabályozása. Ezek a sejthalál folyamatok régóta fontos célpontjai a gyógyszerfejlesztésnek. Több tanulmány kimutatta, hogy az apoptózis indukciója szoros összefüggésben van számos kémiai vegyület tumorelles hatásával. Továbbá a rákos sejtek kemorezisztenciája hátterében gyakran a sérült apoptotikus útvonalak állnak. Ezért az alternatív mitokondriális sejthalál mechanizmusok, mint például a mitokondriális permeabilitás tranzíció indukálta nekrozis vagy az autofágia fontos szerepet játszhatnak a tumor ellenes terápiában.

## **A mitokondriális permeabilitás tranzíció (MPT)**

Az MPT pórusról – amely egy nem specifikus csatorna - eredetileg azt gondolták, hogy mindkét mitokondriális membránt átíveli, és felelős a sejthalállal kapcsolatos megnövekedett mitokondriális permeabilitásért. A pórus áteresztőképessége 1,5 kDa. Nyitása a protonok egyensúlyát eredményezi a belső membrán két oldalán, így összeomlik a membránpotenciál, és leáll az ATP szintézis. A víz beáramlása a mitokondriumok duzzadását eredményezi, ami egy bizonyos pont után a külső membrán szakadásához vezethet.

Az MPT pórus összetétele vitatott. Biokémiai és farmakológiai tanulmányok alapján a következő komponenseket tartalmazza: a külső membránban elhelyezkedő feszültség függő anion csatornát (VDAC), a belső membránban lokalizálódó adenin nukleotid transzlokázt (ANT) és a mátrixban lévő ciklofilin D-t (CypD). Azonban újabb genetikai knockout vizsgálatok kétségbe vonják a fenti modell helyességét. Ugyanis az ANT, VDAC és CypD hiányos mitokondriumokban is indukálható MPT.

## **A Bcl-2 család**

A Bcl-2 a legalább egy Bcl-2 homológia régiót (BH) tartalmazó fehérjecsalád prototípusa. A család tagjai három csoportba sorolhatók: mind a négy BH doménnel (BH1234) rendelkező antiapoptotikus multidomén fehérjék (pl. Bcl-2 és Bcl-X<sub>L</sub>); három BH domént (BH123) tartalmazó proapoptotikus multidomén fehérjék (pl. Bax, Bak), és a csak BH3 domént tartalmazó proapoptotikus fehérjék (pl. Bid, Bad). A Bcl-2 szerű fehérjék hatásának fő helyszíne a mitokondrium membrán. A BH1234 fehérjék rendszerint a külső membránban tartózkodnak, ahol védik a mitokondriumot a mitokondriális membrán permeabilizáció ellen. Néhány irodalmi adat azt mutatja, hogy a Bcl-2 és Bcl-X<sub>L</sub> kölcsönhatásba léphet az ANT-vel (adenin nukleotid transzlokáz) és a VDAC-vel (feszültség függő anion csatorna).

## **PARP gátlók**

A nukleáris poli(ADP-ribóz) polimeráz-1 enzim DNS károsodások esetén aktiválódik. A DNS egyes illetve kettős szálú törése elágazó láncú ADP-ribóz polimerek képződéséhez vezet, melyek számos nukleáris fehérjéhez (pl. hisztonok), vagy magához a PARP-hoz kapcsolódnak. Ez a folyamat a DNS repair egy korai eseménye. A PARP enzim overaktivációja azonban celluláris NAD<sup>+</sup> és ATP hiányhoz vezethet, amely a sejtek működési zavarát, majd nekrozist eredményez. Mivel DNS károsodás hiányában a PARP enzim nem

szükséges a túléléshez, a PARP-1 gátlása ígéretes célpontnak tűnik a gyulladással, ischémiával és tumor terápiával kapcsolatos gyógyszerfejlesztés során.

Habár számos irodalmi adat alátámasztja, hogy a PARP-1 gátlása véd az oxidatív stresszel szemben, újabb tanulmányok kimutatták, hogy a PARP-1 gátlása érzékenyíti a sejteket a DNS károsító ágensekre.

Korábbi tanulmányaink során azt tapasztaltuk, hogy a kardiovaszkuláris gyógyszerek, mint például a mexiletin, amiodaron vagy trimetazidin nitroxid prekuzorral történő módosítása során az eredeti molekula antioxidáns és szabadgyökfogó aktivitásra tett szert. Jelen tanulmányban nitroxidokkal és a sztérikusan gátolt amin prekuzoraikkal kombináltuk a PARP gátlókat, ugyanis ismert, hogy a PARP aktivációból származó legtöbb károsító folyamat háttérben a reaktív oxigén és nitrogén szabadgyökök állnak. Ezen típusú vegyületek nemcsak a poli-ADP-ribosilációt gátolják, hanem egyidejűleg elnyomják vagy csökkentik a reaktív oxigén és nitrogén szabadgyökök károsító hatását.

### **Mitokondriumba irányított trifenil-foszfónium származékok**

Számos kutatócsoport kimutatta, hogy a tumor sejtek szignifikánsan magasabb mitokondriális membrán potenciállal ( $\Delta\Psi_m$ ) rendelkeznek, mint a normál sejtek. Ha mind a plazma, mind a mitokondriális transzmembrán potenciál negatív, a kation tulajdonságú molekulák át tudnak jutni ezeken a membránokon, így fel tudnak halmozódni a tumor sejtek mitokondriumaiban. Az E vitamin, ubikinon, N-tert-butil- $\alpha$ -fenilnitron és újabban a nitroxidok trifenilfoszfónium származékai voltak az első antioxidáns molekulák, amelyekről kimutatták, hogy túlnyomórészt a mitokondriumban lokalizálódnak. Ezek a korábbi kísérletek azt mutatták, hogy a mitokondriumba irányított antioxidánsok nagyobb citoprotektív hatással rendelkezhetnek különösen az apotózissal szemben.

A lipofil szerves kationokat, mint például a rodamin123-at vagy a  $^3\text{H}$ -tetrafenilfoszfóniumot a tumor sejtek mitokondriális potenciáljának mérésére használták. Habár a mitokondriumba irányított trifenilfoszfónium származékok korlátozott tumor specificitással rendelkeznek, a citosztikus vegyületek mitokondriumba irányításának terápiás jelentősége lehet.

## Célkitűzés

Munkánk során számos SOD mimetikus aktivitású PARP-1 gátló vegyületet (benzimidazol származékot) szintetizáltunk. Ezért jelen tanulmány célja a következő:

- Ezen molekulák PARP aktivációra és H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> indukálta sejthalálra gyakorolt gátló hatásának vizsgálata
- Antioxidáns hatásuk/ szabadgyök fogó képességük analízise
- Oxidatív metabolizmusuk tisztázása patkány modellen
- A PARP gátlás és az antioxidáns hatás közötti kapcsolat felderítése

Korábban számos mitokondriumba irányító trifenilfoszfónium csoporttal rendelkező antioxidáns molekuláról kimutatták, hogy még alacsonyabb koncentrációban is jóval hatékonyabbak, mint szubsztituátlan párjaik. Új, mitokondriumba irányított SOD mimetikus nitroxidok trifenilfoszfónium származékainak vizsgálata során azonban megfigyeltük, hogy a hidrofóbicitásuk hosszú apoláros oldallánccal történő megváltoztatása megszüntette citoprotektív hatásukat, ugyanis mikromolos koncentrációban sejthalált indukáltak. Ezért jelen tanulmány további célja a következő:

- A HO-3814 mitokondriális felhalmozódásának igazolása
- A hidrofób módosítás sejthalálra gyakorolt hatásának vizsgálata tumoros sejtvonalakon
- Az apoláros SOD mimetikum (HO-3814) és ismert citosztatikumok hatásának összevetése tumoros sejtvonalakon
- A HO-3814 indukálta sejthalál típusának azonosítása
- A citotoxicitás hatásmechanizmusainak felderítése
- A HO-3814 mitokondriális permeabilitás tranzícióra és mitokondriális membrán potenciálra ( $\Delta\Psi_m$ ) gyakorolt hatásának vizsgálata
- A ciklofilin D szupressziójának hatása a HO-3814 indukálta sejthalálra és mitokondriális depolarizációra
- A Bcl-2 overexpresszió hatása a HO-3814 indukálta sejthalálra és mitokondriális depolarizációra



## Konklúzió

### **A benzimidazol származékok PARP aktivációra és H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> indukálta sejthalálra gyakorolt gátló hatása**

Megállapítottuk, hogy a vizsgált vegyületek közül a **3h** és **4h** bizonyultak a leghatékonyabbnak PARP gátlás szempontjából. Alacsony összefüggést találtunk a PARP és sejthalál gátló hatás között.

### **Antioxidáns hatásuk/ szabadgyök fogó képességük**

Kimutattuk, hogy a **4h** vegyület a legjobb antioxidáns a vizsgált molekulák közül.

### **Oxidatív metabolizmusuk**

Megfigyeltük, hogy a PARP inhibitor **4h** szterikusán gátolt szekunder amin része **3h** nitroxiddá oxidálódott, míg a **3h** nitroxid és hidroxiaminja egyensúlyban voltak a patkány modellben.

### **A PARP gátlás és az antioxidáns hatás közötti kapcsolat**

Azt találtuk, hogy a PARP gátlás és az antioxidáns vizsgálatok eredményei nem állnak összefüggésben egymással. A sejthalál gátlása tehát nemcsak a PARP enzim gátlásán alapszik, hanem a szabadgyök fogó hatástól is függ.

Összefoglalva, ezen eredmények alapján egy antioxidáns nitroxid vagy nitroxid prekursor kombinálása egy PARP gátló molekulával képes csökkenteni vagy megszüntetni a reaktív oxigén vagy nitrogén szabadgyökök előidézte káros folyamatokat. Ebben a tekintetben ezeknek a vegyületeknek terápiás jelentősége lehet a jövőben, azonban ehhez még további biológiai vizsgálatok szükségesek.

### **A HO-3814 intracelluláris lokalizációja**

Igazoltuk, hogy a vizsgált vegyület a mitokondriumban akkumulálódott.

### **A hidrofób módosítás sejthalálra gyakorolt hatása tumoros sejtvonalakon**

Elsőként szolgáltatunk bizonyítékot arra, hogy a mitokondriumba irányított SOD mimetikumok lipofilitásának növelése megfordította citoprotektív tulajdonságukat, és citotoxikussá váltak.

#### **A HO-3814 és ismert citosztatikumok hatásának összevetése tumoros sejtvonalakon**

Kimutattuk, hogy a PANC-1 sejtek sokkal érzékenyebbek voltak HO-3814-re, mint ciszplatinra. Mivel a gemcitabin az elsődlegesen alkalmazott citosztatikum a hasnyálmirigy tumor terápiában, teszteltük a PANC-1 sejtek gemcitabinnal szembeni érzékenyégét is. Azt találtuk, hogy a gemcitabin kísérleti körülményeink között az alkalmazott legmagasabb koncentrációban is csak kismértékben tudta csökkenteni a sejtek túlélését. Ezek az adatok azt sugallják, hogy az apoláros, mitokondriumba irányított SOD mimetikumoknak terápiás jelentősége lehet a pankreász tumorok kezelésében.

#### **A HO-3814 indukálta sejthalál típusának azonosítása**

Megállapítottuk, hogy a HO-3814 indukálta sejthalál túlnyomórészt nekrotikus volt.

#### **A HO-3814 citotoxicitásának hatásmechanizmusa**

Különböző kináz inhibitorok (p38, JNK, ERK, AKT inhibitorok), kaspáz III inhibitor, N-acetil-cisztein, PARP inhibitor (HO-3089), valamint az MPT inhibitor CSA jelenlétében vizsgáltuk a HO-3814 PANC-1 sejtek túlélésére gyakorolt hatását. Azt tapasztaltuk, hogy egyik inhibitor sem tudta csökkenteni a HO-3814 indukálta sejthalál mértékét. Ezek az adatok azt mutatják, hogy az apoláros SOD mimetikum nem ezeken az ismert útvonalakon keresztül hat.

#### **A HO-3814 mitokondriális hatása**

Kimutattuk, hogy a HO-3814 mitokondriális duzzadást és membrán depolarizációt indukált, mely nem volt gátolható ciklosporin A-val, jelezve, hogy a ciklofilin D valószínűleg nem érintett a mitokondriális permeabilitás tranzícióban.

- **A ciklofilin D szupressziójának hatása a HO-3814 indukálta sejthalálra és mitokondriális depolarizációra**

Kimutattuk, hogy a ciklofilin D szupressziója nem volt hatással a HO-3814 indukálta sejthalálra és mitokondriális depolarizációra, alátámasztva az izolált mitokondriumon kapott eredményeinket.

## **A Bcl-2 overexpressziójának hatása a HO-3814 indukálta sejthalálra és mitokondriális depolarizációra**

Megállapítottuk, hogy a Bcl-2 overexpresszója csökkentette a HO-3814 citotoxikus hatását. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a HO-3814 a mitokondriális külső és belső membránrendszert destabilizálja, amely a membránpotenciál összeomlásához, végül nekrotikus sejthalálhoz vezet.

Összefoglalva, ezen eredmények alapján bizonyítékot szolgáltatunk arra, hogy a mitokondriumba irányított SOD mimetikumok hidrofóbicitásának növelése megváltoztatta citoprotektív tulajdonságukat, és a mitokondriális membránrendszer permeabilizálásán keresztül nekrotikus sejthalálhoz vezetett. Mivel különféle tumoros sejtek kemorezisztenciájáért gyakran a sérült apoptotikus mechanizmusok a felelősek, a nekrozist indukáló apoláros mitokondriumba irányított SOD mimetikumoknak terápiás jelentőségük lehet a jövőben.

## **Köszönetnyilvánítás**

Munkánkat az AOKKA--34039-1/2009 és 34039-23/2009, valamint az OTKA 68469, K-73738 és K81123 támogatták.

Köszönettel tartozom Dr. Sümegi Balázs és Dr. Gallyas Ferenc Professzor uraknak, akik gyakorlati tanácsaikkal és gondolatébresztő ötleteikkel segítették munkámat, illetve lehetővé tették, hogy kísérleteimet a Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézetben végezhessem.

Köszönöm kollégáimnak, Kovács Krisztinának, Bognár Zitának, Bognár Eszternek, Hocsák Enikőnek és Mester Lászlónak a közös munkát valamint a vidám és baráti hangulatban eltöltött időt.

Köszönöm Halász Heléna, Pásztor Istvánné Anna, Girán László és Horváth Bertalan asszisztensek segítségét.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm Dr. Hideg Kálmán és Dr. Kálai Tamás Professzor uraknak valamint Balog Máriának, hogy megszintetizálták és rendelkezésünkre bocsátották a dolgozatban bemutatott vegyületeket.

## **Publications/Publikációk**

### **Publications related to the thesis / Dolgozathoz kapcsolódó publikációk:**

1. **Aliz Szabo**, Maria Balog, Laszlo Mark, Gergely Montsko, Zsuzsanna Turi, Ferenc Gallyas Jr., Balazs Sumegi, Tamas Kalai, Kalman Hideg, Krisztina Kovacs. Induction of mitochondrial destabilization and necrotic cell death by apolar mitochondria-directed SOD mimetics. *Mitochondrion*. 2011 May; 11(3):476-487. **IF: 4,145 (2010)**
2. Tamas Kalai, Maria Balog, **Aliz Szabo**, Gergely Gulyas, Jozsef Jeko, Balazs Sumegi, Kalman Hideg. 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 Mar 26; 52(6):1619-1629. **IF: 4,802 (2009)**

### **Further publications / További publikációk**

1. Arpad Szanto, Eva E Hellebrand, Zita Bogнар, Zsuzsanna Tucsek, **Aliz Szabo**, Ferenc Gallyas Jr., Balazs Sumegi, Gabor Varbiro. PARP-1 inhibition-induced activation of PI-3-kinase-Akt pathway promotes resistance to taxol. *Biochem Pharmacol*. 2009 Apr 15; 77(8):1348-1357. **IF: 4,237 (2009)**
2. Arpad Szanto, Zita Bogнар, Andras Szigeti, **Aliz Szabo**, Laszlo Farkas, Ferenc Gallyas Jr. Critical role of bad phosphorylation by Akt in cytostatic resistance of human bladder cancer cells. *Anticancer Res*. 2009 Jan; (1):159-164. **IF: 1,428 (2009)**
3. Krisztina Kovacs, Katalin Hanto, Zita Bogнар, Antal Tapodi, Eszter Bogнар, Gyongyi N. Kiss, **Aliz Szabo**, Gabor Rappai, Tamas Kiss, Balazs Sumegi, Ferenc Gallyas Jr. Prevalent role of Akt and ERK activation in cardioprotective effect of Ca<sup>2+</sup> channel- and beta-adrenergic receptor blockers. *Mol Cell Biochem*. 2009Jan; 321(1-2):155-164. **IF: 1,896 (2009)**
4. Laszlo Mester, **Aliz Szabo**, Tamas Atlasz, Krisztina Szabadfi, Dora Reglodi, Peter Kiss, Boglarka Racz, Andrea Tamas, Ferenc Gallyas Jr., Balazs Sumegi, Eniko Hocsak, Robert Gabriel, Krisztina Kovacs. 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 Jul; 16(1):68-76. **IF: 2,439 (2009)**

5. Gabriella Horvath, Boglarka Racz, Dora Reglodi, Krisztina Kovacs, Peter Kiss, Ferenc Gallyas Jr, Zita Bognar, **Aliz Szabo**, Tamas Magyarlaki, Eszter Laszlo, Andrea Lubics, Andrea Tamas, Gabor Toth, Peter Szakaly. Effects of PACAP on mitochondrial apoptotic pathways and cytokine expression in rats subjected to renal ischemia/reperfusion. *J Mol Neurosci*. 2010 Nov; 42(3):411-418. **IF: 2,720 (2009)**
6. Krisztina Szabadfi, Laszlo Mester, Dora Reglodi, Peter Kiss, Norbert Babai, Boglarka Racz, Krisztina Kovacs, **Aliz Szabo**, Andrea Tamas, Robert Gabriel, Tamas Atlasz. Novel neuroprotective strategies in ischemic retinal lesions. *Int J Mol Sci*. 2010 Feb 3; 11(2):544-61. **IF: 1,387 (2009)**
7. Eniko Hocsak, Boglarka Racz, **Aliz Szabo**, Eva Pozsgai, Andras Szigeti, Edit Szigeti, Ferenc Gallyas Jr, Balazs Sumegi, Szaniszló Javor, Szabolcs Bellyei. TIP47 confers resistance to taxol-induced cell death by preventing the nuclear translocation of AIF and Endonuclease G. *Eur J Cell Biol*. 2010 Nov; 89(11):853-61. **IF: 3,314 (2009)**
8. Eniko Hocsak, Boglarka Racz, **Aliz Szabo**, Laszlo Mester, Edit Rapolti, Eva Pozsgai, Szaniszló Javor, Szabolcs Bellyei, Ferenc Gallyas Jr, Balazs Sumegi, Andras Szigeti. TIP47 protects mitochondrial membrane integrity and inhibits oxidative-stress-induced cell death. *FEBS Lett*. 2010 May 25. [Epub ahead of print] **IF: 3,541 (2009)**
9. Krisztian Banyai, Jon R. Gentsch, Vito Martella, Agnes Bogdan, Viktoria Havasi, Peter Kisfali, **Aliz Szabo**, Ilona Mihaly, Peter Molnar, Bela Melegh, Gyorgy Szucs. Trends in the epidemiology of human G1P[8] rotaviruses: a hungarian study. *J Infect Dis*. 2009 Nov; 1:S222-S227. **IF: 5,865**

**Total IF: 35,771**

**Total citations:30**

### **Abstracts / Absztraktok**

1. Jakus Péter, Farkas Viktória, **Szabó Alíz**, Sándor Attila: A glikogén szintáz kináz-3 egy új szerepe: a zsírsavszintézis szabályozása az acetyl-CoA karboxiláz foszforilezése révén. 35. Membrán-transzport Konferencia, Sümeg, 2005. május 24-27.
2. **Aliz Szabo**, Zita Bognar, Arpad Szanto, Eniko Hocsak, Katalin Hanto, Edina Pandur, Judit Nagy, Viktor Poor, Balazs Sumegi: Induction of NfκB dependent COX-2 expression in liver cells by amiodarone. 36. Membrán-transzport Konferencia, Sümeg, 2006. május.

3. Pandur Edina, **Szabó Alíz**, Montskó Gergely, Radnai Balázs, Sipos Katalin: A hepcidin expressziójának intacelluláris szabályozása. Sejtanalitika Konferencia, Budapest, 2006. május 4-6.
4. Antal Tapodi, Katalin Hanto, Izabella Solti, **Aliz Szabo**, Gabor Varbiro, Ferenc Gallyas Jr., Kalman Hideg, Balazs Sumegi: Functional inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase by siRNA technique. RNAi 2006: Advances in RNA Interference Research- Oxford, 2006. március 22-23.
5. Tucsek Zsuzsanna, Radnai Balázs, Szabó Zoltán, Dolowschiák Tamás, Hocsák Enikő, **Szabó Alíz**, Solti Izabella, Bognár Eszter, Vető Sára, ifj. Gallyas Ferenc, Lóránd Tamás és Sümegi Balázs: A PJ34 protektív hatása az IK11 indukálta oxidatív stresszben HepG2 sejtvonalon. 36. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2006. május 23-26.
6. Arpad Szanto, **Aliz Szabo**, Zita Bognar, Antal Tapodi, Peter Jakus, Sara Veto, Zsuzsanna Tucsek, Viktor Poor, Balazs Sumegi: Inhibition of PARP influence the taxol induced cell death in cultured cells: 36. Membrán-transzport Konferencia, Sümeg, 2006. május.
7. Hocsák Enikő, Bellyei Szabolcs, Szigeti András, Boronkai Árpád, Tucsek Zsuzsanna, **Szabó Alíz**, Vető Sára, Berki Timea, Sümegi Balázs: A PP17B fehérje strukturális és funkcionális vizsgálatai. 36. Membrán-transzport Konferencia, Sümeg, 2006. május.
8. Sara Veto, Izabella Solti, **Aliz Szabo**, Zsuzsanna Tucsek, Viktoria Nemeth, Eniko Hocsak, Balazs Veres, Zoltan Berente, Balazs Sumegi: Involvement of AKT/protein kinase B pathway induction in the protective effect of poly-(ADP-ribose) polymerase 1 inhibition in endotoxin-induced septic sock. 36. Membrán-transzport Konferencia, Sümeg, 2006. május.
9. Nagy Judit, Pandur Edina, **Szabó Alíz**, Montskó Gergely, Bognár Zita, Peti Attila, Sipos Katalin: A ferroportin egy hepcidin hormon által szabályozott vas transzporter. 36. Membrán-transzport Konferencia, Sümeg, 2006. május.
10. Pandur Edina, Nagy Judit, **Szabó Alíz**, Montskó Gergely, Sipos Katalin: A mitokondrium jelentősége a transláció szabályozásában humán sejtekben 36. Membrán-transzport Konferencia, Sümeg, 2006. május.
11. Nagy Judit, Pandur Edina, **Szabó Alíz**, Montskó Gergely, Bognár Zita, Sipos Katalin: A humán RNáz L Inhibitor szerepe a translációban **Sejtanalitika Konferencia**, Budapest, 2006. május 4-6.
12. Pandur Edina, **Szabó Alíz**, Montskó Gergely, Radnai Balázs, Sipos Katalin: A hepcidin expressziójának intacelluláris szabályozása. Sejtanalitika Konferencia, Budapest, 2006. május 4-6.

13. Bognár Zita, Szántó Árpád, **Szabó Alíz**, Hantó Katalin, Ifj. Gallyas Ferenc, Sümegi Balázs: Egy módosított amiodarone analóg és az amiodarone szerepének összehasonlítása apoptotikus és nekrotikus sejthalálban. Biokémiai vándorgyűlés 2006, Pécs, 2006 szept.
14. **Szabó Alíz**, Bognár Zita.; Szántó Árpád.; Tapodi Aatal.; Solti Izabella.; Kovács Krisztina.; ifj. Gallyas Ferenc.; Sümegi Balázs: HO-3538, egy új SOD mimetikus mPT inhibitor amiodarone analóg molekula. Magyar Szabadgyök Kutató Társaság IV. Konferenciája, Pécs, 2007. október 11-13.
15. **Szabó Alíz**, Rápolti Edit, Gál Janka, Balog Mária, Kiss Tamás, Kálai Tamás, Sümegi Balázs, Hideg Kálmán: Mitokondrium permeabilizáció és sejthalál kiváltása mitokondriumba irányított SOD mimetikumokkal. 39. Membrán-transzport Konferencia, Sümeg, 2009. május 19-22

## **Presentations / Előadások**

1. Ifj. Gallyas Ferenc, Bognár Zita, Radnai Balázs, Tapodi Antal, Hantó Katalin, **Szabó Alíz**, Poór Viktor, Jakus Péter, Várbíró Gábor, Sümegi Balázs: Poly-(ADP-ribose)polymerase inhibitors influence the taxol induced cell death in cultured cells. PARP 2005, Newcastle- October 2005.
2. Balazs Sumegi, Sara Veto, Zsuzsanna Tucsek, Izabella Solti, Eniko Hocsak, Eszter Bognar, **Aliz Szabo**, Ferenc Gallyas Jr.: PARP and inflammatory and kinase pathways: relevance for endotoxic shock. Semmelweis Symposium-Nitric Oxide and Nitrosative Stress in the Cardiovascular System, Thermal Hotel Helia, Budapest, Hungary, October 29-31 2006.
3. **Szabó Alíz**, Kovács Krisztina, Bognár Eszter, N. Kiss Gyöngyi, Sümegi Balázs, ifj. Gallyas Ferenc: AKT és ERK aktiváció univerzális szerepe a poli(ADP-ribóz)polimeráz inhibitorok, Ca<sup>2+</sup> csatorna blokkolók kardioprotektív hatásában. Biokémiai vándorgyűlés 2007, Debrecen, 2007. augusztus 26-29.
4. **Szabó Alíz**, Kiss Tamás, Jancsó Gábor, Wéber György, Róth Erzsébet, Bognár Zita, Kovács Krisztina, Ifj. Gallyas Ferenc: A poszt kondicionálás hatása a jelátviteli útvonalak aktivitására különböző szövetekben hasi aorta műtétet követő reperfüzió során. MKT 2008. évi Kongresszusa, Balatonfüred, 2008. május 8-10.

5. Hocsák Enikő, Mester László, **Szabó Alíz**, Kovács Krisztina, Szigeti András, Bellyei Szabolcs, Sümegi Balázs, ifj. Gallyas Ferenc: Mitokondrium mediálta sejthalál indukciója egy új BH3 domént tartalmazó fehérjével. Magyar Humángenetikai Társaság VII. Kongresszusa, Pécs, 2008. július 11-13.
6. Mester László, Hocsák Enikő, **Szabó Alíz**, Kovács Krisztina, Bellyei Szabolcs, Szigeti András, Boronkai Árpád, Pozsgai Éva, ifj. Gallyas Ferenc, Sümegi Balázs: Egy új-16.2 kD- kis hősook fehérje azonosítása és a jelátviteli folyamatokra gyakorolt szerepének vizsgálata. Magyar Humángenetikai Társaság VII. Kongresszusa, Pécs, 2008. július 11-13.
7. **Szabó Alíz**, Balog Mária, Kovács Krisztina, Kiss Tamás, Kálai Tamás, Sümegi Balázs, Hideg Kálmán: Mitokondrium permeabilizáció és sejthalál kiváltása mitokondriumba irányított SOD mimetikumokkal. Biológus Doktoranduszok Konferenciája, Pécs, 2009. november 12-13.
8. **Szabó Alíz**, Kovács Krisztina, Balog Mária, Kálai Tamás, Hideg Kálmán, ifj. Gallyas Ferenc, Sümegi Balázs: Mitokondriális destabilizáció és sejthalál indukciója mitokondriumba irányított apoláris SOD mimetikummal. 40. Membrán-transzport Konferencia, Sümeg, 2010. május 18-21.
9. **Szabó Alíz**, Kovács Krisztina, Balog Mária, Kálai Tamás, Hideg Kálmán, ifj. Gallyas Ferenc, Sümegi Balázs: Triarilfoszfónium vegyületek mitokondriális hatása. A Pécsi Tudományegyetem Orvostudományi és Egészségtudományi Szakosztályának Ülése, Pécs, 2011. március 7.