

**Identification and characterization of novel regulators in  
mitochondria related cell death**

**Ph.D. Thesis**

**Enikő Hocsák**

**Program leader: Prof. Balázs Sümegi, DSc**

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

**Pécs, Hungary**

**2010**

## Abbreviations

**A23187**, 5-(methylamino)-2-((2R,3R,6S,8S,9R,11R)-3,9,11-trimethyl-8-[(1S)-1-methyl-2-oxo-2-(1H-pyrrol-2-yl)ethyl]-1,7-dioxaspiro[5.5]undec-2-yl)methyl)-1,3-benzoxazole-4-carboxylic acid; **ADRP**, adipose differentiation-related protein; **AIF**, apoptosis inducing factor; **ANT**, adenine nucleotide translocase; **Bcl-2**, B-cell lymphoma; **C-400**, 5-(and-6)-carboxy-2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate; **CIN**, cervical intraepithelial neoplasia; **CypD**, cyclophilin D; **cyt-c**, cytochrome *c*; **CsA**, cyclosporine A; **DIABLO**, direct IAP-binding protein of low isoelectric point [pI]; **DMEM**, Dulbecco's modified Eagle's medium; **dsiRNA**, diced small interfering ribonucleic acid; **Endo G**, endonuclease G; **Etoposide**, 4'-demethyl - epipodophyllotoxin 9 - [4,6-O-(*R*)-ethylidene-beta-D-glucopyranoside], 4' - (dihydrogen phosphate); **FCS**, fetal calf serum; **FITC**, fluorescein isothiocyanate; **G418**, (2R,3S,4R,5R,6S)-5-amino-6-[(1R,2S,3S,4R,6S)-4,6-diamino-3-[(2R,3R,4R,5R)-3,5-dihydroxy-5-methyl-4-methylaminooxan-2-yl]oxy-2-hydroxycyclohexyl]oxy-2-(1-hydroxyethyl)oxane-3,4-diol; **GFP**, green fluorescent protein; **GST**, glutathione S-transferase; **HBP22**, heme binding protein 1; **IPTG**, isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside; **JC-1**, 5,5,6,6-tetrachloro-1,1,3,3 -tetraethylbenzimidazolyl-carbocyanine iodide; **M6PR**, mannose 6-phosphate receptors; **MMP**, mitochondrial membrane permeabilization; **MTT**, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; **mPT**, mitochondrial permeability transition;  $\Delta\psi$  mitochondrial membrane potential; **NCBI**, National Center for Biotechnology Information; **PAT**, perilipin, adipophilin, and TIP47; **PBS**, phosphate buffered saline; **PCR**, Polymerase Chain Reaction; **pI**, isoelectric point; **PI**, propidium iodide; **PP17b**, placental tissue protein 17b; **PTP**, permeability transition pore; **PTPC**, permeability transition pore complex; **Rh-123**, rhodamine-1,2,3; **ROS**, reactive oxygen species; **siRNA**, small interfering RNA; **Smac**, second mitochondrial activator of caspases; **SOUL/HBP2**, heme binding protein 2; **Taxol**, (2 $\alpha$ ,4 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,7 $\beta$ ,10 $\beta$ ,13 $\alpha$ )-4,10-bis (acetyloxy)-13-[[*(2R,3S)*-3-(benzoylamino)-2-hydroxy-3-phenylpropanoyl]oxy]-1,7-dihydroxy-9-oxo-5,20-epoxytax-11-en-2-yl benzoate; **TIP47**, tail interacting protein of 47 kDa; **t-TIP47**, truncated-TIP47; **VDAC**, voltage-dependent anionic channel

## Introduction

For the past 15 years our laboratory has been involved of identified several genes with previously unknown functions that affected cell death processes such as tail interacting protein of 47 kDa (TIP47) or Heme Binding Protein 2 (HBP2/ SOUL). In this study the effect of these proteins in mitochondrial related cell death is described.

This work provides compelling evidence of the protective effect of TIP47 which exerts an antiapoptotic effect on cell survival by inhibiting the activation of proapoptotic proteins, by assisting the effect of anti-apoptotic proteins and by the direct stabilization of the mitochondrial membrane potential.

We identified genes, which in contrast, destabilize the mitochondrial membrane system, such as SOUL, which sensitized fibroblast cells to cell death in the absence of elevated ROS formation. In the presence of subthreshold calcium, recombinant SOUL provoked mitochondrial permeability transition (mPT) *in vitro*, which was inhibited by cyclosporine A (CsA). *In vivo*, SOUL overexpression enhanced the dissipation of mitochondrial membrane potential, as well as SOUL promoted necrotic death in etoposide and A23187 treated cells, which effect was prevented by CsA.

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

The cell's decision to die from necrosis or apoptosis is dictated at least in part by the abundance of intracellular energy stores. Indeed, whereas apoptosis requires a minimal amount of intracellular ATP, necrosis is generally accompanied by its total depletion.

The intrinsic cell death pathway involves the initiation of apoptosis as a result of a disturbance of intracellular homeostasis. In this pathway, mitochondria are critical for the execution of cell death, and so this pathway has been referred to as the mitochondrial cell death pathway.

### **Mitochondrial Membrane Polarization ( $\Delta\psi$ ):**

Mitochondrial membrane permeabilization (MMP) is frequently the decisive event that delimits the frontier between survival and death. Local players that determine the propensity to MMP include the pro- and antiapoptotic members of the B-cell lymphoma (Bcl-2) family, proteins from the mitochondrial permeability transition pore complex, as well as a plethora of

interacting partners including mitochondrial lipids. The inhibition of MMP constitutes an important strategy for the pharmaceutical prevention of unwarranted cell death. Conversely, induction of MMP in tumor cells constitutes the goal of anticancer chemotherapy .

MMP is characterized by several hallmarks that include:

- 1) the release of cytochrome *c* (cyt-*c*), second mitochondria-derived activator of caspase/direct inhibitor of apoptosis binding protein (IAP) with a low isoelectric point (pI) (Smac/DIABLO), through the mitochondrial outer membrane and the subsequent activation of effector caspases;
- 2) the release of caspase-independent apoptogenic death effectors, such as apoptosis inducing factor (AIF) and endonuclease G (EndoG);
- 3) a bioenergetic catastrophe including the arrest of oxidative phosphorylation, as well as the accumulation of reactive oxygen species (ROS),
- 4) an alteration of the  $\Delta\psi$  of the mitochondrial inner membrane.

According to current knowledge, the principal mechanism leading to inner membrane permeabilization is the so-called “permeability transition.”

### **The mitochondrial permeability transition (mPT):**

The mitochondrial permeability transition (mPT) refers to a transition in the permeability of the mitochondrial inner membrane that occurs when mitochondria in vitro are treated with calcium [Ca<sup>2+</sup>] or reagents that increase oxidative stress.

The exact molecular nature of the permeability transition pore, the PTP is still a matter of debate, although an emerging consensus considers a multicomponent protein complex, the PTPC, and not a single protein, as being responsible for the opening of PTP. PTPC is assembled at the contact sites of the mitochondrial membranes and that its scaffold structure is based on the dynamic interaction between VDAC, ANT, and CypD. The voltage-dependent anionic channel, VDAC protein is a pore in the mitochondrial outer membrane that allows low molecular weight solutes to pass and gain access to inner membrane transport systems. The adenine nucleotide translocator, ANT is a structural component of the MPT, and matrix cyclophilin D (CypD) bound to complexes of VDAC and the ANT to form the MPT.

### **BH3 domain proteins, the Bcl-2 family:**

BH3 domain-only proteins play a significant role in the processes of cell death and survival. Mammalian cells express a group of evolutionarily conserved proteins known as the Bcl-2 family. The effect of Bcl-2 proteins on the apoptotic process is due to the presence of one or more conserved regions of amino acid sequences, known as Bcl-2 homology (BH)

domains. Based on their function, Bcl-2 proteins can have either proapoptotic (Bax, Bad, Bak, Bim, and Bid) or antiapoptotic (Bcl-2 and Bcl-xL) properties.

There are data indicating that proapoptotic Bcl-2 homologues can activate mPT in oxidative stress showing that an oxidant-damaged mitochondrial membrane system can react differently to BH3 domain proteins. In addition, the oligomer Bax alone can induce mitochondrial permeability transition and complete *cyt-c* release without oxidative stress, indicating that under certain conditions, BH3 domain proteins can contribute to mitochondrial inner membrane permeabilization, mPT, and necrotic death.

It was also demonstrated that antiapoptotic Bcl-xL can bind to the VDAC-1 barrel laterally at strands 17 and 18 and can influence mitochondrial permeabilization. Therefore, antiapoptotic Bcl-2 protein can also influence (protect) the inner mitochondrial system, probably via interaction with VDAC.

### **The TIP47 protein:**

Tail-interacting protein (TIP47) is a member of the perilipin/ adipophilin/TIP47 (PAT) family, which also includes perilipin, adipose differentiation-related protein (ADRP), S3-12 and OXPAT proteins. PAT family surface proteins are components of the plasma membrane and they influence cellular lipid metabolism and also insulin signaling, by means of controlling access of lipases to stored lipid esters. PAT proteins are characterized by primary sequence homology, which is evolutionary conserved across all species. The distribution of PAT proteins varies among different tissues: while the expression of perilipin and S3-12 proteins is restricted to adipose and steroidogenic tissues, ADRP and TIP47 are found ubiquitously. The critical role of PAT proteins in the packaging and storage of neutral lipids and as components of lipid droplets has been established by a number of studies.

TIP47 was primarily identified as a possible cargo protein involved in the delivery of mannose 6-phosphate receptors (M6PR) from endosomes to the trans-Golgi network. It was shown to bind to the cytoplasmic domains of cation-independent and cation-dependent M6PR and to be transported to late endosomes by binding to Rab9 GTPase. The recognition of a sequence homology between ADRP and TIP47 led to the discovery that TIP47, like other PAT family members, associates with lipid droplets. Although this finding was initially questioned, the role of TIP47 in lipid metabolism was subsequently confirmed by various sources. Besides its apparent function in lipid metabolism, TIP47, along with other PAT proteins, influences insulin signaling. The combined knockout of ADRP and TIP47 was shown to lead to decreased insulin sensitivit. A recent study reported the possible role of TIP47 in Human

Immunodeficiency Virus (HIV-1) infection. TIP47, as a cellular cofactor, was found to play a part in Env incorporation, allowing the encounter and physical association between HIV-1 Gag and Env proteins during the viral assembly process.

Parallel to studies conducted by other laboratories, our work-group carried out experiments to elucidate the role of TIP47, which shed new light on the function of this controversial protein. TIP47 was found to be identical to a soluble, pregnancy-related placental tissue protein 17b (PP17b). Of particular significance was the discovery, that, compared to normal cervical tissue, TIP47 is overexpressed in cervix carcinoma, as is its messenger RNA in the HeLa cancer cell line. Moreover, a correlation could be detected between the level of TIP47 expression and the different stages of cervical intraepithelial neoplasia (CIN). Moderate immunohistochemical staining of the dysplastic cells was apparent in CIN I-II, whereas strong staining was observed in CIN III and *in situ* carcinoma. Recently, the role of TIP47 as a potential tumor marker of cervical carcinoma was suggested. Since TIP47 is secreted into the serum, and its level is elevated in the progression of the tumor to invasive or metastatic carcinoma and mitigated after treatment, the monitoring of TIP47 by immunological methods may be beneficial for cervical cancer patients.

However, to this date, there is no data available for its possible role in tumor development, or in regulation of cell death.

### **SOUL/HBP2, a novel BH3 domain protein:**

Role of heme-containing proteins in the regulation of cell death and survival are well characterized. They can affect formation of reactive oxygen species hence induction of direct oxidative damages as well as induction of mitochondrial permeability transition (mPT).

Heme-binding protein 1 (HBP22) is an ubiquitously expressed protein having high affinity for heme and protoporphyrine. Human SOUL (SOUL) is a 23 kDa haem-binding protein that was first identified as the PP23 protein isolated from human full-term placentas. SOUL is expressed just in some specific tissues, has more than 40% sequence homology with HBP22, and has much higher binding affinity for porphyrines than HBP22.

SOUL facilitates mitochondrial permeability transition and cell death without affecting reactive oxygen production. The data base search indicated that heme-binding protein 2/SOUL has a BH3 domain-like structure. The presence of a BH3 domain in SOUL and the above data indicate that this protein besides binding heme may have a role in the processes of cell death and survival. In present we provide evidence for the sensitization effect of SOUL in hydrogen-peroxide-induced cell death, the facilitation of the release of pro-apoptotic mitochondrial

proteins and the promotion of the collapse of MMP both in living cells and *in vitro* in isolated mitochondria. SOUL promote the permeabilization of both outer and inner mitochondrial membranes in oxidative stress.

SOUL can facilitate cell death in Taxol and A23187-treated cells. Taxol is a mitotic inhibitor used in cancer chemotherapy. Paclitaxel stabilizes microtubules and as a result, interferes with the normal breakdown of microtubules during cell division. A23187 is a mobile ion-carrier that forms stable complexes with divalent cations (ions with a charge of +2). A23187 is also known as Calcium ionophore. The ionophore is used to increase intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  levels in intact cells and to induce apoptosis in some cells.

Analyzing the protein sequence data base, we found that SOUL contained a sequence with a high similarity to BH3 domains, suggesting that this feature may account for its observed cell death-facilitating effect. Previously, SOUL was reported to be strongly expressed in retina, the pineal gland, and liver. We found that it was expressed in various tissues to different extents.

## **Aims of study**

The present study is aimed at a more in-depth study of these two regulator proteins, including:

- To describe the effect of TIP47 on cell death by measuring cell viability of TIP47 overexpressing and control cells treated by different types of cell death inducing agents
- To show the effect of TIP47 suppression by siRNA technique on cell death in overexpressing and control cells using a HeLa cell model
- To analyse in role of TIP47 of both apoptotic and necrotic cell death
- To find intracellular localization of TIP47 in oxidative stress
- To describe the effect of TIP47 on the mitochondrial permeability transition and on the stability of the Mitochondrial Membrane Potential ( $\Delta\psi$ )
- To elucidate the effect of TIP47 on ROS-production in TIP47 overexpressing and control cells
- To find the effect of TIP47 on the pro- and anti-apoptotic signaling pathways

- To show the effect of deletion of the putative BH3 domain on the cell death
- To determine of the role of PTPC in the SOUL-induced sensitization toward oxidative stress
- To describe the effect of SOUL on cell death is inhibited by the overexpression of anti-apoptotic proteins
- To describe the effect of SOUL on the hydrogen-peroxide-induced collapse of MMP

## **Conclusions**

### **1. Effect of TIP47 on cell death**

We examined effect of TIP47 in different conditions by treating cells with cell death inducing agents and detecting the living using MTT assay. Hydrogen-peroxide causes oxidative stress and Taxol affects the microtubule system. In the presence of excess TIP47 cells seemed to have increased resistance against the above mentioned drugs in our experiment. This effect was statistically significant and was detected with all kinds of drugs used.

### **2. Effect of TIP47 suppression by siRNA technique on cell death**

Gene silencing is generally used to describe the "switching off" of a gene by a mechanism other than genetic modification. This process caused by the lack of this specific protein. When TIP47 was silenced using specific dsRNAs in cells endogenously expressing it significant sensitization was observed against the cell death inducing agents as expected.

### **3. Role of TIP47 in cell death**

We used flow cytometry and fluorescent microscopy in this experiment. Cells were treated with different agent and were stained with propidium iodide and FITC-conjugated Annexin V to distinguish between the two types of cell death. When we treated the TIP47 transfected cells, the cells died mainly by early apoptosis, and the number of late apoptotic and necrotic cells decreased drastically. Taxol treatment activated AIF and Endo G and induced



their translocation in mock-transfected fibroblast cells. It is of interest that, in TIP47-transfected cells treatment with Taxol did not alter the intracellular localization of these proteins.

#### **4. Intracellular localization of TIP47 in oxidative stress**

We detected TIP47's subcellular localization with Western blot after fractionating cells endogenously producing high amount of TIP47. According to our results TIP47 was found in the cytoplasm, but after hydrogen peroxide treatment it was also present in the mitochondrial fraction in a smaller quantity.

#### **5. Effect of TIP47 on the mitochondrial permeability transition and on the Mitochondrial Membrane Potential ( $\Delta\psi$ )**

We provide that TIP47 can bind to mitochondria and protect mitochondrial membrane integrity, as well as prevent oxidative stress induced cell death. First we tracked the change of the mitochondrial membrane potential in TIP47-overexpressing NIH3T3 cells using fluorescent microscopy. In the TIP47 transfected cells the mitochondrial membrane potential remained stable after treatment. This result reised our interest and we isolated mitochondria from rat liver to detect direct effect of recombinant TIP47 in vitro. Recombinant TIP47 not induced mitochondrial permeability transition when we added subthreshold concentrations of calcium. These data supports our view that TIP47 protects cell by stabilizing mitochondrial membrane.

#### **6. Effect of TIP47 on ROS-production**

We could not observe any significant difference between controls or TIP47-overexpressing cells indicating that TIP47 did not contribute to ROS-formation.

#### **7. Effect of TIP47 on the pro- and anti-apoptotic signaling pathways**

We investigated the effect of TIP47 on cell viability and on the pro- and anti-apoptotic signaling pathways in cells, following treatment with the chemotherapeutic agent, Taxol. We found, that TIP47 over-expressed cells increased levels of Bcl-2 and reduced levels of Bax and cleaved caspase-3, as opposed to the control cells.

## **8. Role of mPT complex in the SOUL-induced sensitization toward oxidative stress**

We observed that SOUL-overexpressing cells are sensitized to hydrogen-peroxide while the cyclophilin D suppressed cells had similar sensitivity toward it than the sham-transfected cells. We performed similar experiments with  $\Delta$ BH3-SOUL overexpressing cells. Blocking mPT by suppressing cyclophilin D inhibited mitochondrial permeability transition and blocked the cell death sensitizing effect of SOUL in oxidative stress.

## **9. Effect of deletion of the putative BH3 domain on the cell death**

We showed that SOUL promotes the permeabilization of both outer and inner mitochondrial membranes in oxidative stress and that its effect can be reversed by deleting the putative BH3 sequence from SOUL. When we deleted a 9 amino acid (LREDGKVF) sequence that was assumed to be functional in its putative BH3 domain, SOUL failed to sensitize  $H_2O_2$  induced cell death.

## **10. Effect of SOUL on cell death is inhibited by the overexpression of anti-apoptotic proteins**

When cells were co-overexpressing Bcl-2 or Bcl-x<sub>L</sub>, overexpressed SOUL could not facilitate necrotic cell death induced by hydrogen-peroxide. Data from flow cytometry showed that the cell death facilitated by SOUL was mainly necrotic. SOUL promoted necrotic cell death induced by oxidative stress, and this effect was counteracted by the presence of anti-apoptotic Bcl-2 homologues.

## **11. Effect of SOUL on the $H_2O_2$ -induced collapse of MMP**

SOUL facilitated cell death by the promotion of the collapse of mitochondrial membrane potential (MMP) in living cells. This protein sensitized the cells to cell death by interacting with the mPT complex since cyclophilin D is integral protein of the complex and anti-apoptotic Bcl-2 analogues can inhibit mPT by binding to VDAC and other components of the complex.

# **Új regulátorok azonosítása és vizsgálata a mitokondrium mediálta sejthalál folyamatában**

**PhD tézis**

**Hocsák Enikő**

**Programvezető: Prof. Sümegi Balázs DSc**

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

**Pécs  
2010.**

## Rövidítések

**A23187**, 5-(metilamino)-2-((2R,3R,6S,8S,9R,11R)-3,9,11-trimetil-8-[(1S)-1-metil-2-oxo-2-(1H-pirrol-2-yl)ettil]-1,7-dioxaspiro[5.5]undec-2-yl)metil)-1,3-benzoxazole-4-karboxilsav;  
**ADRP**, adipofilin; **AIF**, apoptózis indukáló faktor; **ANT**, adenin nukleotid transzlokáz; **Bcl-2**, B-sejt limfóma; **C-400**, 5-(and-6)-carboxi-2', 7'-diklorodihidrofluorescein diacetát; **CIN**, cervikális intraepithelialis neoplázia; **CypD**, cyclophilin D; **cyt-c**, cytochrome c; **CsA**, cyclosporine A; **DIABLO**, alacsony izoelektromos ponttú [pI]direkt IAP kötő fehérje; **DMEM**, Dulbecco's modified Eagle's medium; **dsiRNS**, kis interferáló ribonukleinsav; **Etoposide**, 4'-demetil-epipodofillotoxin 9-[4,6-O-(R)-etilidene-beta-D-glucopiranozid], 4'-(dihidrogén fosfát); **FCS**, főtális borjú szérum; **FITC**, fluorescein isotiocianát **G418**, (2R,3S,4R,5R,6S)-5-amino-6-[(1R,2S,3S,4R,6S)-4,6-diamino-3-[(2R,3R,4R,5R)-3,5-dihidroxi-5-metil-4 metilaminooxan-2-il]oxi-2-hidroxiciclohexil]oxi 2-(1-hidroxietyl)oxane-3,4-diol; **GFP**, zöld fluoreszcens protein; **GST**, glutation S-transferáz; **HBP22**, hem kötő protein 1; **IPTG**, isopropil- $\beta$ -D-thiogalactopiranosid; **JC-1**, 5,5,6,6-tetracloro-1,1,3,3 - tetraetilbenzimidazolil-karboecianin iodid; **M6PR**, mannóz 6-foszfát receptor; **MMP**, mitokondriális membrán permeabilizáció; **MTT**, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromid; **mPT**, mitokondriális permeabilitás tranzíció;  $\Delta\psi$ , mitokondrium membrán potenciál; **NCBI**, National Center for Biotechnology Information; **PAT**, perilipin, adipophilin, és TIP47; **PBS**, phosphate buffered saline; **PCR**, Polimeráz lánreakció; **pI**, isoelectric pont; **PI**, propidium jodid; **PP17b**, placentális szövet protein 17b; **PTP**, permeabilitás tranzíciós pórus; **PTPC**, permeabilitás tranzíciós pórus komplex; **Rh-123**, rhodamine-1,2,3; **ROS**,reaktív oxigén gyök; **siRNS**,kis interferáló RNS; **Smac**, második mitokondriális kaszpáz aktivátor; **SOUL/HBP2**, hem kötő protein 2; **Taxol**, (2 $\alpha$ ,4 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,7 $\beta$ ,10 $\beta$ ,13 $\alpha$ )-4,10-bis (acetiloxi)-13-[(2R,3S)-3-(benzoilamino)-2-hidroxi-3-fenilpropanoil]oxi}-1,7-dihidroxi-9-oxo-5,20-epoxitax-11-en-2-il benzoát; **TIP47**, 47 kDa tail interacting protein; **t-TIP47**, csonkolt-TIP47; **VDAC**, feszültség függő anion csatorna

## Bevezetés

Munkacsoportunk az elmúlt 15 évben részt vett számos korábban ismeretlen funkciójú gén azonosításában és tanulmányozásában, mint például a TIP47 és a HBP2/SOUL fehérjék. Ebben az értekezésben ezeknek a fehérjéknek a hatását vizsgáltam a mitokondriális sejthalál folyamatára.

Ez a munka meggyőző bizonyítékokat nyújt a TIP47 védő hatására, amely antiapoptotikus hatást egyrészt a proapoptotikus fehérjék aktivációjának gátlása révén fejt ki; másrészt támogatja az anti-apoptotikus fehérjék hatását és direkt képes stabilizálni a mitokondriális membránpotenciált.

Azonosítottunk olyan géneket is - ilyen a SOUL - amelyek ellentétes hatásúak, destabilizálják a mitokondriális membrán-rendszert, érzékenyítik sejteket a sejthalálra. Munkámban a SOUL fehérjéről előzőleg már leírt eredményekre alapozva kívántam alaposabban fényt deríteni sejthalálban betöltött szerepére.

### **A mitokondrium szerepe a sejthalálban:**

A mitokondriumok sejtlégzési működéseinek közvetlen vagy következményes sérülése miatt az energiakonzerváló ATP-molekulák termelése csökken, ami a sejt és környezete közötti ozmotikus egyensúlyt fenntartó iontranszportokat gátolja. Ezért a sejt az ozmotikus vízfelvétel miatt duzzadni kezd, rövidesen felszakad: a sejt mint integrált élő rendszer megszűnik.

A mitokondriumnak szerepe lehet vagy van a programozott sejthalál beindításában, és ez nem a sérült mitokondrium ATP-termelésének csökkenésével vagy megszűnésével kapcsolatos, hanem pl. egy antiapoptotikus mitokondriális fehérje (BCL-2) és családjának működésével. Az egyes halál- és túlélési szignálok különböző citoplazmatikus, vagy membránban található pro- és antiapoptotikus fehérjéket aktiválnak, és végső fokon ezek membránba kötődésén, vagy mitokondriumba kerülésén keresztül születik meg egy mitokondriális szintű döntés a halálról vagy a túlélésről. Ezért szokás a mitokondriumot az apoptotikus jelek integrátorának nevezni.

A mPT szerepe mind az apoptózisban mind a nekrozisban bizonyított. A belső mitokondriális membránban elhelyezkedő megacsatorna megnyílása különféle ingerhatásokra - mint pl. a megemelkedett kalcium szint - megtörténhet, mely a membrán két oldalán jelenlévő ionkülönbség kiegyenlítéséhez, a membrán közötti fehérjék és a mitokondriális mátrix kiáramlásához vezet, amely végsősorban a mitokondriális membránpotenciál ( $\Delta\psi$ ) eltűnését és a légzési lánc szétkapcsolódását okozza. Számos anyag, így a ciklosporin A is,

képes megakadályozni a mPT pórus megnyílását. A membránpotenciál eltűnése maga után vonja a mitokondriális fehérjék – mint pl. a citokróm c – kiszabadulását, ezáltal a kaszpáz-kaszád aktivációját, mely apoptotikus sejthalálhoz vezet. A mPT pórus megnyílását követő szabályozhatatlan térfogatváltozás a mitokondrium megduzzadásával jár, mely végül a membránok szétszakadásához és nekrotikus sejthalálhoz vezet.

### **A TIP47 fehérje:**

Tail-interacting fehérje (TIP47) tagja a perilipin / adipophilin/TIP47 (PAT) családnak, mely magában foglalja a perilipint, az egér adipofilint (ADRP), S3-12 és az OXPAT fehérjéket. A PAT család felszíni fehérjéi a plazma membrán alkotóelemei, a sejtek lipid anyagcseréjét, valamint az inzulin szignált befolyásolják a lipázok szabályozása révén a tárolt lipid észterek hozzáféréséhez. A PAT proteinek elsődlegesen szekvencia homológiával jellemezték, amely során kiderült, hogy a PAT domén evolúciósan konzerválódott valamennyi fajnál. A PAT fehérjék eloszlása különböző szövetekben változik: míg a perilipin és az S3-12 fehérjék megjelenése zsírszövetre és szteroidogén szövetekre korlátozódik, az ADRP és TIP47 minden szövetben megtalálhatók. Több tanulmány a PAT fehérjék legfőbb szerepét a neutrális lipidek és lipid cseppek komponenseinek csomagolásában és tárolásában határozta meg.

A TIP47 fehérjét az elsők között azonosították, mint egy lehetséges szállító fehérjét. Részt vesz a mannóz-6-foszfát receptorok (M6PR) szállításában az endoszómákból a transz-Golgi hálózatiig. A szekvencia homológia vizsgálat során kiderült, hogy a TIP47 is lipid cseppekhez asszociált fehérje. A lipid metabolizmusban nyilvánvaló funkciója mellett a TIP47 is befolyásolja az inzulin szignált. A kombinált ADRP és TIP47 génkiütés csökkent inzulin érzékenységhez vezetett. Egy nemrégiben készült tanulmány szerint a TIP47 szerepet játszik a humán immundeficiencia vírus (HIV-1) fertőzésben. A TIP47-ről, mint celluláris kofaktorról kiderült, hogy részt vesz az Env beépítésében, így lehetővé teszi a HIV-1 Gag és Env fehérjék találkozását és fizikai kapcsolódását a vírus összeszerelési folyamat során.

Más laboratóriumokkal párhuzamosan a mi munkacsoportunk is végzett kísérleteket a TIP47 szerepének tisztázása érdekében, amelyek új fényt vethetnek a fehérje ellentmondásos funkciójára. Csoportunk megállapította, hogy a TIP47 azonos az oldható, terhességgel összefüggő placenta szöveti fehérje 17b-vel (PP17b). Különös jelentősége volt a felfedezésnek, hogy a normál méhnyak szövetekhez képest, a TIP47 overexpresszálódik a cervix karcinómában, ilyen pl. a HeLa sejtvonal. Sőt, korreláció volt kimutatható a TIP47 expresszió szintjében a cervicalis intraepithelialis neoplasia (CIN) különböző szakaszaiban. A

diszpláziás sejtek immunhisztokémiai vizsgálatával a CIN I-II fázisban enyhe, míg CIN III fázisban és in situ karcinómánál is erős festés volt megfigyelhető a sejtek citoplazmájában.

Ez idáig semmilyen adat nem állt rendelkezésünkre a TIP47 lehetséges szerepéről a daganatok kialakulásában, illetve a sejthalál szabályozásában, ezért vizsgálatainkat megpróbáltuk ez irányban folytatni.

### **SOUL/HBP2, egy új, BH3 domént tartalmazó fehérje:**

A hem tartalmú fehérjék szerepe a sejthalál és a túlélés szabályozásában jól ismert folyamat. Hatással lehetnek a reaktív oxigén gyökök képződésére, direkt oxidatív károsodást okozva, valamint a mitokondriális permeabilitás tranzíciót (MPT) indukálnak.

Hem-kötő fehérje 1 (HBP22) egy mindenütt expresszáldó fehérje, amely nagy affinitással köti a hemet és protoporfirint. A humán SOUL (SOUL) egy 23 kDa nagyságú hem-kötő fehérje, amelyet először PP23 fehérje néven izoláltak humán placentából. A SOUL-t csak néhány szövetexpresszálja, több mint 40%-ban azonos a szekvenciája a HBP22-vel és sokkal nagyobb affinitással kötődik a porfirinekhez, mint a HBP22. A SOUL reaktív oxigén gyökök termelés nélkül képes facilitálni a mitokondriális permeabilitás tranzíciót és a sejthalált. Adatbázis vizsgálataink kimutatták, hogy a hem-kötő fehérje 2/SOUL tartalmaz egy BH3 domén szerű szerkezetet. A BH3 domén jelenléte a SOUL fehérjében és a fenti adatok azt mutatják, hogy ez a fehérje amellelt, hogy hemet köt, szerepe lehet a sejthalálban és túlélésben. Előzőleg kísérletekkel igazoltuk a SOUL érzékenyítő hatását a hidrogén-peroxid által indukált sejthalálban és leírtuk, hogy elősegíti a pro-apoptotikus mitokondriális fehérjék kiáramlását és támogatja az MMP összeomlását mind az élő sejtekben és az „in vitro” izolált mitokondriumokban is. A SOUL elősegíti a permeabilitását mind a külső, mind a belső mitokondriális membránnak oxidatív stressz során. Kimutattuk, hogy a Taxol és A23187-kezelt sejtekben is elősegíti a SOUL a sejthalált. A Taxol a daganatellenes kemoterápiában használt mitotikus inhibitor. A paklitaxel stabilizálja a mikrotubulusokat, és ennek eredményeként a sejtosztódás során zavarja a normális lebomlásban a mikrotubulusokat. Az A23187 egy mobilis ion-karrier, amely stabil komplexeket képez a kétértékű kationokkal, kalcium ionoforként is ismert. Az ionofort használják az intracelluláris  $Ca^{2+}$  szint növelésére ép sejtekben és néhány sejtben apoptózis indukcióra.

Adatbázisokban a teljes fehérje szekvenciát elemezve azt találtuk, hogy a SOUL tartalmaz egy szekvenciát, ami nagy hasonlóságot mutat a BH3 doménnel, ami igazolhatja a megfigyelt sejthalál-elősegítő hatást.

## Célkitűzés

Jelen tanulmány célja két szabályozó fehérje alaposabb vizsgálata, beleértve a következőket:

- A TIP47 fehérje sejthalálra vonatkozó hatásának jellemzése TIP47-et túltermelő sejtekben a sejtek túlélésének vizsgálatával különböző sejthalált okozó szerekkel történt kezelések után.
  - A TIP47 fehérje siRNA technikával történt kiütése okozta hatások vizsgálata túltermelő és kontroll sejtekben.
  - A TIP47 szerepének vizsgálata apoptotikus és nekrotikus sejthalálban
  - A TIP47 fehérje intracelluláris lokalizációjának vizsgálata oxidatív stressz során.
  - A TIP47 fehérje szerepének ismertetése mitokondriális permeabilitás tranzícióban és a mitokondriális membránpotenciál elvesztésében
  - A TIP47 fehérje hatása a szabadgyök termelésre kontroll és TIP47 túltermelő sejtekben.
  - A TIP47 hatása a pro és anti apoptotikus jelátviteli folyamatokra.
- 
- A BH3 domén deléciójának hatása a sejthalálra a SOUL fehérjében.
  - A PTPC szerepe az oxidatív stresszben a SOUL indukált sejthalál érzékenyítésben.
  - A SOUL hatása a sejthalálra az anti-apoptotikus fehérjék overexpressziójának gátlásával.
  - A SOUL hatása a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> indukált MMP összeomlásra.



# Konklúzió

## 1. A TIP47 hatása a sejthalálra

Egy fehérje overexpresszálásával információkat nyerhetünk annak lehetséges funkciójáról. A TIP47 hatását úgy vizsgáltuk, hogy különböző sejthalált indukáló szerrel kezeltük a sejteket, majd az élők számát MTT assay segítségével vizsgáltuk. Kiválasztottunk néhány szert, melyek segítségével megvizsgálhattuk a két fehérje hatását. A hidrogén-peroxid oxidatív stresszt okoz, a Taxol a microtubuláris rendszert támadja. Kísérleteinkben azok a sejtek, melyek a TIP47 fehérjét túltermelték, nagyobb ellenállást mutattak a fent említett szerek iránt. Rendszerünkben a TIP47 megvédte a sejteket a sejthaláltól. Ez a hatás statisztikailag szignifikánsnak bizonyult és minden általunk használt szer esetében megfigyelhető volt. Ennek megfelelően találtunk egy korábban még nem jellemzett fehérjét, mely gátolja a sejthalál folyamatát.

## 2. A TIP47 elnyomás hatása a sejthalálra

A gén-elnyomás szélesen elterjedt módszerré vált különféle fehérjék specifikus kiütésében. Az adott fehérje hiányából indirekten következtetni lehet annak funkciójára. Amikor az endogénean expresszáló sejtekben a TIP47-et speciális dsiRNS technikával elnémítottuk, a vártaknak megfelelően a vizsgált sejtek érzékenyebbé váltak az általunk használt sejthalált indukáló szerekkel szemben. A gén-elnyomásos és a túltermeltetési kísérletek eredménye egyértelműen azt bizonyítja, hogy az általunk talált fehérje gátolja a sejthalált.

## 3. A TIP47 szerepe a különböző sejthalál formákban

Ebben a kísérletsorozatban áramlási citometriával és fluoreszcens mikroszkópos felvételekkel demonstráltuk a sejtekben végbemenő folyamatokat. A sejteket kezeltük az előbb már említett sejthalál indukáló szerekkel és propídium-jodid és FITC konjugált Annexin V jelöléseket alkalmaztunk. A kontroll sejtekhez képest, a TIP47-et túltermelő sejtekben kezelést követően a sejtek inkább korai apoptózisban szenvedtek, a késői apoptózist és a nekrozist mutató sejtek száma drasztikusan lecsökkent. A Taxol kezelést követően a kontroll sejtekben AIF és EndoG transzlokáció volt megfigyelhető a fibroblaszt sejtekben. A TIP47 overexpresszió ezeket a folyamatokat meggátolta.

#### **4. A TIP47 intracelluláris lokalizációja oxidatív stresszben**

A TIP47 sejten belüli elhelyezkedését vizsgáltuk olyan sejtekben, amelyek normális körülmények között is nagy mennyiségben expresszálják a TIP47 fehérjét. Eredményeinkből kiderült, hogy ez a normálisan a citoplazmában lokalizálódó fehérje hidrogén-peroxid kezelés hatására jelentős mennyiségben megjelenik a mitokondriumban a citoplazmában található fehérjemennyiség kárára.

#### **5. A TIP47 hatása a mitokondriális permeabilitás tranzícióra és membrán potenciálra**

A mitokondriális permeabilitás tranzíció szerepe a sejthalálban egy alaposan tanulmányozott jelenség. Hogy a TIP47 fehérje lehetséges hatásmechanizmusát megtaláljuk, *in vivo* és *in vitro* is vizsgáltuk hatását a mitokondriumra. Bizonyítottuk, hogy a TIP47 kötődik a mitokondriumhoz és részt vesz a mitokondriális membrán integritásának védelmében, valamint megakadályozza az oxidatív stressz által kiváltott sejthalált. Először is a membránpotenciál változását követtük nyomon a TIP47-túltermelő NIH3T3 sejtekben fluoreszcens mikroszkóppal. A TIP47 transzfektált sejtekben a membránpotenciál stabil maradt a kezelés után. Ez a felismerés felkeltette érdeklődésünket. Patkány májból izoláltunk mitokondriumot, hogy *in vitro* vizsgálhassuk a TIP47 direkt hatását. A vizsgálatokból kiderült, hogy a TIP47 nem indukált mitokondriális permeabilitás tranzíciót sem önmagában, sem amikor hozzá küszöb alatti koncentrációban kalciumot adtunk. Ezek az adatok alátámasztják azt a kezdeti feltevésünket, hogy a TIP47 a mitokondriális membrán stabilizálásával védi a sejtet a sejthaláltól.

#### **6. A TIP47 hatása a ROS termelésre**

A TIP47-et overexpresszáló sejtek vizes és lipid fázisában is megmértük az endogén és az indukált ROS termelést. Nem találtunk arra nézve bizonyítékot, hogy a TIP47-nek *in vivo*, hatása lenne a ROS termelésre.

#### **7. A TIP47 hatása a pro- és anti-apoptotikus jelátviteli útvonalakra**

Vizsgáltuk a TIP47 hatását a sejtek életképességére és a pro-és anti-apoptotikus jelátviteli utakra a sejtekben Taxol kezelést követően. Azt találtuk, hogy a kontroll sejtekkel szemben a TIP47 túltermelő sejtekben megnövekedett a Bcl-2 mennyisége és csökkent a Bax és hasított kaszpáz-3 mennyisége.

## **8. A PTPC szerepe az oxidatív stresszben a SOUL indukált sejthalál érzékenyítésben**

Megfigyeltük, hogy a SOUL-túltermelő sejtek érzékenyebbé váltak a hidrogén-peroxid kezelésre, míg a cyclophilin D szupresszált sejtek érzékenysége hasonló volt a kezelésre, mint a kontroll sejteké. Hasonló kísérleteket végeztünk a  $\Delta$ BH3-SOUL túltermelő sejtekben. cyclophilin D elnyomásával gátoltuk a mitokondriális permeabilitás tranzíciót és blokkolta a SOUL sejthalált érzékenyítő hatását oxidatív stresszben.

## **9. A BH3 domén deléciójának hatása a sejthalálra a SOUL fehérjében**

Kimutattuk, hogy a SOUL elősegíti mind a külső, mind a belső mitokondriális membrán permeabilizációt oxidatív stressz során és ez a hatása visszafordítható a SOUL feltételezett BH3 szekvenciájának törlésével. 9 aminosavnyi (LREDGKVF~~D~~) szekvenciát kivágtunk a SOUL szekvenciájából, amiről előzetes szekvencia analízis során úgy gondoltuk, hogy a funkcionális BH3 domén. A mutáns SOUL elvesztette érzékenyítő szerepét a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> által indukált sejthalálban.

## **10. A SOUL hatása a sejthalálban az anti-apoptotikus fehérjék overexpressziójának gátlásával**

Amikor a sejtekben ko-expresszáltuk a Bcl-2 vagy a Bcl-XL-t, az overexpresszált SOUL nem facilitálta a sejteket a hidrogén-peroxid által indukált nekrotikus sejthalálra. Az áramlási citometriából származó adatok azt mutatták, hogy a SOUL inkább a nekrozis irányába tolja el a sejthalált. Összefoglalva, a SOUL elősegítette az oxidatív stressz által kiváltott nekrotikus sejthalált, ami kísérleteinkben ellensúlyozható volt az anti-apoptotikus Bcl-2 homológok jelenlétével.

## **11. A SOUL hatása a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> indukált MMP összeomlásra**

A SOUL az élő sejtekben a mitokondriális membránpotenciál (MMP) összeomlásának előmozdításával facilitálta a sejthalál folyamatát. Kimutattuk, hogy ez a fehérje érzékenyíti a sejteket a sejthalálra azáltal, hogy kölcsönhatásban áll a PTPC-vel a cyclophilin D-n keresztül és az anti-apoptotikus Bcl-2 analógok gátolhatják az mPT-t, kötődve a VDAC-hoz és a komplex más komponenseihez.

## Publications / Publikációk

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

1. **Eniko Hocsak**, Boglarka Racz, Aliz Szabo, Laszlo Mester, Edit Rapolti, Szaniszlo 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 Jul 2;584(13):2953-60. **IF: 3,541 (2009)**
2. **Eniko Hocsak**, Boglarka Racz, Aliz Szabo, Eva Pozsgai, Andras Szigeti, Edit Szigeti, Ferenc Gallyas Jr., Balazs Sumegi, Szaniszlo Javor, Szabolcs Bellyei. TIP47 confers resistance to taxol- induced cell death by preventing the nuclear translocation of AIF and Endonuclease G. Eur JCB. in press. **IF: 3,314 (2009)**
3. Andras Szigeti, **Eniko Hocsak**, Edit Rapolti, Boglarka Racz, Arpad Boronkai, Eva Pozsgai, Balazs Debreceni, Zita Bognar, Szabolcs Bellyei, Balazs Sumegi, and Ferenc Gallyas, Jr. Facilitation of Mitochondrial Outer and Inner Membrane Permeabilization and Cell Death in Oxidative Stress by a Novel Bcl-2 Homology 3 Domain Protein. J Biol Chem. 2010 Jan 15;285(3):2140-51. **IF: 5,328 (2009)**

### Publication not related to the thesis / Egyéb közlemények:

1. Mester L, Szabo A, Atlasz T, Szabadfi K, Reglodi D, Kiss P, Racz B, Tamas A, Gallyas F Jr, Sumegi B, **Hocsak E**, Gabriel R, Kovacs K. 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: 2,43**
2. Szigeti A, Minik O, **Hocsak E**, Pozsgai E, Boronkai A, Farkas R, Balint A, Bodis J, Sumegi B, Bellyei S.: Preliminary study of TIP47 as a possible new biomarker of cervical dysplasia and invasive carcinoma. Anticancer Res. 2009; 29: 717-724. **IF: 1,428**
3. Bellyei S, Szigeti A, Pozsgai E, Boronkai A, Gomori E, **Hocsak E**, Farkas R, Sumegi B, Gallyas F Jr.: Preventing apoptotic cell death by a novel small heat shock protein. Eur J Cell Biol. 2007 Mar; 86(3):161-71. **IF: 3,224**
4. Bellyei S, Szigeti A, Boronkai A, Pozsgai E, Gomori E, Melegh B, Janaky T, Bognar Z, **Hocsak E**, Sumegi B, Gallyas F Jr.: Inhibition of cell death by a novel 16.2 kD heat shock

protein predominantly via Hsp90 mediated lipid rafts stabilization and Akt activation pathway. Apoptosis. 2007 Jan; 12(1):97-112. **IF: 3,043**

5. Szigeti A, Bellyei S, Gasz B, Boronkai A, **Hocsák E**, Minik O, Bognar Z, Varbiro G, Sumegi B, Gallyas F Jr.: Induction of necrotic cell death and mitochondrial permeabilization by heme binding protein 2/SOUL. FEBS Lett. 2006 Nov 27; 580(27):6447-54. **IF: 3,372**
6. Bányai K, Forgách P, Erdélyi K, Martella V, Bogdán A, **Hocsák E**, Havasi V, Meleg B, Szucs G.: Identification of the novel lapine rotavirus genotype P[22] from an outbreak of enteritis in a Hungarian rabbitry. Virus Res. 2005 Nov; 113(2):73-80. **IF: 2,562**

**Cumulative IF: 28,242**

**All citation: 29**

#### **Abstracts / Absztraktok:**

1. **Hocsák Enikő**, Rácz Boglárka, Szabó Alíz, Bellyei Szabolcs, Szigeti Edit, Mester László, ifj. Gallyas Ferenc, Sümegi Balázs, Szigeti András: A TIP47 fehérje a mitokondrium membrán stabilizálásával részt vesz a mitokondrium mediálta sejthalál szabályozásában, 40. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2010. május 18-21.
2. **Hocsák Enikő**, Rápolti Edit, Jávor Szaniszló, Rácz Boglárka, Szigeti András, Szabó Alíz, Sümegi Balázs: A TIP47 fehérje gátolja az oxidatív stressz indukált apoptózist és nekrozist. 39. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2009. május 19-22.
3. Rápolti Edit, Szigeti András, Boronkai Árpád, **Hocsák Enikő**, Rácz Boglárka, Szabó Alíz, Pozsgai Éva, Bognár Zita, Bellyei Szabolcs, Sümegi Balázs, ifj. Gallyas Ferenc: Egy új, BH3 domén fehérje oxidatív stresszben elősegíti a mitokondrium belső és külső membránjának permeabilizációját. 39. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2009. május 19-22.
4. Rácz Boglárka, Rápolti Edit, **Hocsák Enikő**, Gasz Balázs, Gallyas Ferenc Jr., Kiss Péter, Horváth Gabriella, Tamás Andrea, Lubics Andrea, Tóth Gábor, Sümegi Balázs, Reglődi Dóra: Effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in ischemic and oxidative stress-induced cardiomyocyte damage. 39. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2009. május 19-22.
5. Mester László, Szabó Alíz, Atlasz Tamás, Szabadfi Krisztina, Reglődi Dóra, Kiss Péter, Rácz Boglárka, Tamás Andrea, Ifj. Gallyas Ferenc, Sümegi Balázs, **Hocsák Enikő**,

- Gábrriel Róbert, Kovács Krisztina: 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. 39. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2009. május 19-22.
6. Szigeti A., Bellyei Sz., Boronkai Á., Pozsgai É., Rápolti E., **Hocsák E.**, Mester L., Sümegi B.: A SOUL-fehérje mitokondriális permeabilitás-tranzíció keresztül nekrotikus sejthalált indukál. 38. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2008. május 20-23.
  7. Németh Viktória, Montskó Gegő, Solti Izabella, Vető Sára, Tucsek Zsuzsanna, **Hocsák Enikő**, Márk László: Komplex biológiai minták GSH tartalmának meghatározása ioncsapdás tömegspektrometria segítségével. A Magyar Biokémiai Egyesület 2006. évi Vándorgyűlése, Pécs, 2006. augusztus 30- szeptember 2.
  8. Bognár Eszter, Solti Izabella, Németh Viktória, Bartha Éva, Tucsek Zsuzsanna, Vető Sára, **Hocsák Enikő**, Nagyné Kiss Gyöngyi, Sümegi Balázs, Berente Zoltán: A glükózfelvétel és a kapcsolódó intracelluláris jelátviteli utak vizsgálata izolált szívmodellen. A Magyar Biokémiai Egyesület 2006. évi Vándorgyűlése, Pécs, 2006. augusztus 30- szeptember 2.
  9. Zsuzsanna Tucsek, Balazs Radnai, Zoltan Szabo, Tamas Dolowschiak, **Eniko Hocsak**, Aliz Szabo, Jr. Ferenc Gallyas, Tamas Lorand, and Balazs Sumegi: The effect of the IK11, an E - 4 - arylidene-3-isochromanone on the Hep G2 human hepatocellular carcinoma cell line. Semmelweis Symposium – Nitric Oxide and Nitrosative stress in the Cardiovascular System, Budapest, 2006. okt. 29-31.
  10. Balazs Radnai, Zsuzsanna Tucsek, BalazsVeres, Katalin Hanto, Peter Jakus, Balazs Debreceni, Zita Bognar, **Eniko Hocsak**, Denes Grasz, Ferenc Gallyas Jr. and Balazs Sumegi: Effect of a PARP inhibitor, HO-3089 on the gene expression profiles of LPS stimulated RAW 264,7 murine macrophages. Semmelweis Symposium – Nitric Oxide and Nitrosative stress in the Cardiovascular System, Budapest, 2006. okt. 29-31.
  11. Tucsek Zsuzsanna, Radnai Balázs, Szabó Zoltán, Dolowschiák Tamás, **Hocsák Enikő**, Szabó Alíz, Solti Izabella, Bognár Eszter, Vető Sára, ifj.Gallyas Ferenc, Loránd Tamás és Sümegi Balázs: A PJ34 protektív hatása az IK11 indukálta oxidatív stresszben HepG2 sejtvonalon. 36. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2006. május 23-26.
  12. **Hocsák Enikő**, Bellyei Szabolcs, Szigeti András, Boronkai Árpád, Tucsek Zsuzsanna, Szabó Alíz, Vető Sára, Berki Tímea, Sümegi Balázs: A PP17B fehérje strukturális és funkcionális vizsgálatai. 36. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2006. május 23-26.

13. Bellyei Sz., Szigeti A., Boronkai Á., Bognar Z., **Hocsák E.**, Tucsek Zs., Pozsgai É., Gallyas F. Jr., Sumegi B.: Egy új 16,2 kDa nagyságú kis molekulású hű-sokk szerű fehérje bemutatása. 36. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2006. május 23-26.
14. Boronkai Árpád, Bellyei Szabolcs, Szigeti András, **Hocsák Enikő**, Tucsek Zsuzsanna, Sümegi Balázs: A galectin-13 jellemzése, sejthalál indukáló hatása. 36. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2006. május 23-26.
15. Szigeti András, Bellyei Szabolcs, Boronkai Árpád, Bognár Zita, Gasz Balázs, Szabó Zoltán, Tucsek Zsuzsanna, **Hocsák Enikő**, Komlósi Katalin, Várbíró Gábor, Melegh Béla, Janaky Tamás, Sümegi Balázs, ifj. Gallyas Ferenc: MPTIP1, az első csak BH3 domént tartalmazó permeability transition-t indukáló fehérje. 36. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2006. május 23-26.
16. 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 shock. 36. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2006. május 23-26.
17. Solti Izabella, Bognár Zita, Németh Viktória, Bognár Eszter, Vető Sára, **Hocsák Enikő**, Nagyné Kiss Gyöngyi, Szántó Árpád, Várbíró Gábor, Sümegi Balázs: Taxol hatása a mitokondriumra és a szabadgyök képződésre. 36. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2006. május 23-26.
18. Aliz Szabo, Zita Bognar, Arpad Szanto, **Eniko Hocsak**, Katalin Hanto, Edina Pandur, Judit Nagy, Viktor Poor, Balazs Sumegi: Induction of NFkB dependent COX-2 expression in liver cells by amiodarone. 36. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2006. május 23-26.
19. Ferenc Gallyas Jr., Balazs Veres, Balazs Radnai, **Eniko Hocsak**, Balazs Sumegi: Significant role of cytoprotective kinase signalling mechanisms in the protective effect of PARP inhibitors in a murine septic shock model. 30<sup>th</sup> FEBS Congress - 9<sup>th</sup> IUBMB Conference Budapest, Hungary 2<sup>nd</sup>-7<sup>th</sup> July, 2005. FEBS J. 2005; 272: 424-425.
20. Anita Palfi, Ambrus Toth, Katalin Hanto, **Eniko Hocsak**, Robert Halmosi, Eszter Szabados, Kalman Hideg, Balazs Sumegi, Kalman Toth: Contribution of intracellular signaling cascades to the cardioprotective effect of poly (ADP-ribose) polymerase inhibitors in myocardial ischemia-reperfusion. 30<sup>th</sup> FEBS Congress - 9<sup>th</sup> IUBMB Conference Budapest, Hungary 2<sup>nd</sup>-7<sup>th</sup> July, 2005. FEBS J. 2005; 272: 311-311.

## Presentations / Előadások:

1. **Hocsák Enikő**, Szabó Alíz, Szigeti András, Ifj. Gallyas Ferenc, Sümegi Balázs: A TIP47 fehérje gátolja az oxidatív stressz indukált sejthalált, Biológus Doktoranduszok Konferenciája, Pécs, 2009. November 12-13.
2. Ifj. Gallyas Ferenc, **Hocsák Enikő**, Pozsgai Éva, Szigeti András, Bellyei Szabolcs, Sümegi Balázs: Mitokondriális membrán-permeabilitást szabályozó új mechanizmusok, 39. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2009. május 19-22.
3. **Hocsák Enikő**: A SOUL fehérje mitokondriális permeabilitás tranzíciók keresztül nekrotikus sejthalált indukál. PTE Grastyán Endre VII. Országos Interdiszciplináris Konferencia, Pécs, 2009. március 23 – 25.
4. **Hocsák Enikő**: A SOUL fehérje mitokondriális permeabilitás tranzíciók keresztül nekrotikus sejthalált indukál. XIV. Korányi Frigyes Tudományos Fórum, Budapest, 2009. március 26.
5. Szigeti András, **Hocsák Enikő**, Sümegi Balázs, ifj. Gallyas Ferenc: SOUL: Egy új BH3-domaint tartalmazó fehérje, amely regulálja a mitokondriális permeabilitás tranzíciós pórust. A Magyar Biokémiai Egyesület 2008. évi Vándorgyűlése, Szeged, 2008 aug. 31-szept. 3.
6. **Hocsák Enikő**, Mester László, Szabó Alíz, Krisztina Kovács, Szigeti András, Bellyei Szabolcs, Sümegi Balázs, Gallyas Ferenc Jr.: Mitokondrium mediálta sejthalál indukciója egy új BH3 domént tartalmazó fehérjével. Magyar Humángenetikai Társaság VII. Kongresszusa, Pécs, július 11-13.
7. Mester László, **Hocsák Enikő**, Szabó Alíz, Krisztina Kovács, Bellyei Szabolcs, Szigeti András, Boronkai Árpád, Pozsgai Éva, Gallyas Ferenc Jr., Sümegi Balázs: Egy új-16.2 kD-kis hősokk fehérje azonosítása és a jelátviteli folyamatokra gyakorolt szerepének a vizsgálata. Magyar Humángenetikai Társaság VII. Kongresszusa, Pécs, július 11-13.
8. **Hocsák Enikő**, Jávor Szaniszló, Bellyei Szabolcs, Szigeti András, Boronkai Árpád, Sümegi Balázs: A PP17b/TIP47 fehérje strukturális és funkcionális vizsgálatai. PTE Grastyán Endre VI. Országos Interdiszciplináris Konferencia, Pécs, 2008. március 26 – 28.
9. Radnai Balázs, Tucsek Zsuzsanna, **Hocsák Enikő**, Vető Sára, Németh Viktória, Bognár Eszter, Grász Dénes, Berente Zoltán, ifj. Gallyas Ferenc, Sümegi Balázs: A ferulaldehid hatása az LPS indukálta endotoxikus sokkra egerekben. A Magyar Biokémiai Egyesület 2006. évi Vándorgyűlése, Pécs, 2006. augusztus 30- szeptember 2.



10. 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, Budapest, 2006. okt. 29-31.
11. Sümegi Balázs, Kovács Krisztina, Tapodi Antal, Hantó Katalin, Radnai Balázs, ifj. Gallyas Ferenc, **Hocsák Enikő**, Hideg Kálmán: Az ADP-riboziláció szerepe a PI3-kináz, Akt és MAPk jelátviteli útvonalak szabályozásában. XIII. Sejt és Fejlődésbiológiai Napok, Eger, 2005. ápr. 10-12.
12. Bellyei Sz., Szigeti A., Boronkai Á., Bognár Z., **Hocsák E.**, Tucsek Zs., Pozsgai É., Gallyas F. Jr., Sümegi B.:Egy új 16.2 kDa nagyságú kis molekulásúlyú hő-sokk szerű fehérje bemutatása. 36. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2006. május 23-26.
13. Szigeti András, Bellyei Szabolcs, Gasz Balázs, Boronkai Árpád, **Hocsák Enikő**, Minik Orsolya, Bognár Zita, Várbíró Gábor, Sümegi Balázs, Ifj. Gallyas Ferenc: Egy, BH3 domén-t tartalmazó, mitokondriális permeability transition-t indukáló fehérje azonosítása. Magyar Biokémiai Egyesület (MBKE) 2006. évi vándorgyűlése, Pécs, 2006. augusztus 30-szeptember 2.
14. Bellyei Sz., Szigeti A., Boronkai Á., Bognár Z., **Hocsák E.**, Pozsgai É., Gallyas F. Jr., Sümegi B.:Egy új 16.2 kDa nagyságú kis molekulásúlyú hő-sokk szerű fehérje funkcionális analízise. Magyar Biokémiai Egyesület (MBKE) 2006. évi vándorgyűlése, Pécs, 2006. augusztus 30- szeptember 2.
15. Boronkai Árpád, Bellyei Szabolcs, Szigeti András, **Hocsák Enikő**, Németh Viktória, Sümegi Balázs: A galectin-13 indukálta apoptózis molekuláris mechanizmusai. Magyar Biokémiai Egyesület (MBKE) 2006. évi vándorgyűlése, Pécs, 2006. augusztus 30. - szeptember 2.