

EREDETI KÖZLEMÉNYEK**Az Akt fehérje szerepének vizsgálata a mitokondriális
dinamikában oxidatív stressz esetén*****Bárándi Gergő^{1,2}, Gombos Katalin³, Szabó Aliz², Fekete Katalin²***¹Pécsi Tudományegyetem Egészségtudományi Kar²Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar³Pécsi Tudományegyetem Klinikai Központ**Összefoglalás**

Bevezetés: Korábban kimutattuk, hogy a HO-3089 (egy antioxidáns poli(ADP-ribóz) polimeráz (PARP) inhibitor) szignifikánsan csökkenti a hidrogén-peroxid (H₂O₂)-indukálta sejthalál, valamint a mitokondriális és nukleáris fragmentáció mértékét, tehát megvédi a mitokondriumokat és a sejtmagokat az oxidatív stressztől. A legújabb irodalmi adatok azt mutatják, hogy a PARP gátlás citoprotektív hatása az Akt útvonal aktiválásán keresztül valósul meg, ugyanakkor PARP inhibitor esetében még nem tanulmányozták a mitokondriális fúzió és az Akt útvonal kapcsolatát.

Célkitűzés: Jelen kutatás során azt vizsgáltuk, hogy az Akt fehérje gátlása miként befolyásolja a HO-3089 mitokondriális dinamikára és nukleáris fragmentációra, illetve sejttúlélésre gyakorolt hatását oxidatív stresszben.

Módszer: Ehhez az Akt-ot egy Akt inhibitorral (MK-2206) gátoltuk, majd a HeLa sejtek mitokondriumait MitoTracker Red festékkel, a sejtmagokat pedig Hoechst 33342-vel jelöltük meg, és fluoreszcens mikroszkóppal tettük láthatóvá. Továbbá szulforodamin B teszt segítségével megnéztük, miként módosítja az Akt gátlása a PARP inhibitor citoprotektív hatását H₂O₂ kezelést követően. A kapott adatokat a Microsoft Excel 2010 software segítségével alakítottuk át oszlopdiagramokká, a statisztikai analízis elvégzéséhez pedig a SPSS 20.0 IBM Corporation programot használtunk.

Eredmények: A kontroll sejtekhez viszonyítva az Akt szupresszált sejtekben a HO-3089 nem tudta csökkenteni ($p > 0,05$) a ROS indukálta mitokondriális és nukleáris fragmentációt, illetve sejthalált.

Megbeszélés: Ezek az adatok azt mutatják, hogy az aktív Akt jelenléte szükséges a HO-3089 citoprotektív hatásának kifejtéséhez.

Kulcsszavak: Akt fehérje; oxidatív stressz; poli(ADP-ribóz) polimeráz; mitokondriális dinamika

Assessment of the role of Akt protein in mitochondrial dynamics during oxidative stress**Summary**

Introduction: We have previously demonstrated that HO-3089 (a poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitor with antioxidant property) significantly reduces hydrogen peroxide (H₂O₂)-induced cell death, as well as mitochondrial and nuclear fragmentation, thus it can protect mitochondria and nuclei from oxidative stress. Recent data show that the cytoprotective effect of PARP inhibition is mediated through the activation of Akt pathway, however, the relationship between mitochondrial fusion and the Akt pathway has not been studied in the case of PARP inhibitors.

Objective: In the present study, we investigated how inhibition of Akt protein affects the effect of HO-3089 on mitochondrial dynamics, nuclear fragmentation and cell survival in oxidative stress.

Method: For this, Akt was inhibited with an Akt inhibitor (MK-2206), then the mitochondria of HeLa cells were labeled with MitoTracker Red, the nuclei were labeled with Hoechst 33342 and visualized by fluorescence microscopy. Furthermore, using a sulforhodamine B test, we investigated whether the inhibition of Akt modifies the cytoprotective effect of PARP inhibitor after H₂O₂ treatment. Data were converted into bar graphs using Microsoft Excel 2010 software, and SPSS 20.0 IBM Corporation software was used for statistical analysis.

Results: Compared to control cells, HO-3089 in Akt suppressed cells was unable to reduce ($p > 0.05$) ROS-induced mitochondrial and nuclear fragmentation and cell death, respectively.

Discussion: These data indicate that the presence of active Akt is required to exert the cytoprotective effect of HO-3089.

Keywords: Akt protein; oxidative stress; poly(ADP-ribose) polymerase; mitochondrial dynamics

Irodalom

1. Guo R, Gu J, Zong S, Wu M, et al.: Structure and mechanism of mitochondrial electron transport chain. *Biomed J.* **2018**; 41: 9-20.
2. Paupe V, Prudent J.: New insights into the role of mitochondrial calcium homeostasis in cell migration. *Biochem Biophys Res Commun.* **2018**; 500: 75-86.
3. Larosa V, Remacle C.: Insights into the respiratory chain and oxidative stress. *Biosci Rep.* **2018**; 38.
4. Lee H, Smith SB, Yoon Y.: The short variant of the mitochondrial dynamin OPA1 maintains mitochondrial energetics and cristae structure. *J Biol Chem.* **2017**; 292: 7115-7130.
5. MacVicar T, Langer T.: OPA1 processing in cell death and disease - the long and short of it. *J Cell Sci.* **2016**; 129: 2297-2306.
6. Tilokani L, Nagashima S, Paupe V, Prudent J.: Mitochondrial dynamics: overview of molecular mechanisms. *Essays Biochem.* **2018**; 62: 341-360.
7. Ashrafi G, Schwarz TL.: The pathways of mitophagy for quality control and clearance of mitochondria. *Cell Death Differ.* **2013**; 20: 31-42.
8. Wang W, Wang Y, Long J, Wang J, et al.: Mitochondrial fission triggered by hyperglycemia is mediated by ROCK1 activation in podocytes and endothelial cells. *Cell Metab.* **2012**; 15: 186-200.
9. Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ.: Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiol Rev.* **2014**; 94: 909-950.
10. Feno S, Butera G, Vecellio Reane D, Rizzuto R, et al.: Crosstalk between Calcium and ROS in Pathophysiological Conditions. *Oxid Med Cell Longev.* **2019**; 2019: 9324018.
11. Kowaltowski AJ, Castilho RF, Vercesi AE.: Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. *FEBS Lett.* **2001**; 495: 12-15.
12. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* **2007**; 35: 495-516.
13. Sas K, Szabo E, Vecsei L.: Mitochondria, Oxidative Stress and the Kynurenine System, with a Focus on Ageing and Neuroprotection. *Molecules.* **2018**; 23.
14. Jagtap P, Szabo C.: Poly(ADP-ribose) polymerase and the therapeutic effects of its inhibitors. *Nat Rev Drug Discov.* **2005**; 4: 421-440.
15. Eliasson MJ, Sampei K, Mandir AS, Hurn PD, et al.: Poly(ADP-ribose) polymerase gene disruption renders mice resistant to cerebral ischemia. *Nat Med.* **1997**; 3: 1089-1095.
16. Ahmad A, Vieira JC, de Mello AH, de Lima TM, et al.: The PARP inhibitor olaparib exerts beneficial effects in mice subjected to cecal ligation and puncture and in cells subjected to oxidative stress without impairing DNA integrity: A potential opportunity for repurposing a clinically used oncological drug for the experimental therapy of sepsis. *Pharmacol Res.* **2019**; 145: 104263.
17. Tao X, Chen X, Hou Z, Hao S, et al.: Protective Functions of PJ34, a Poly(ADP-ribose) Polymerase Inhibitor, Are Related to Down-Regulation of Calpain and Nuclear Factor-kappaB in a Mouse Model of Traumatic Brain Injury. *World Neurosurg.* **2017**; 107: 888-899.
18. Zhang L, Yao J, Wang X, Li H, et al.: Poly (ADP-ribose) synthetase inhibitor has a heart protective effect in a rat model of experimental sepsis. *Int J Clin Exp Pathol.* **2015**; 8: 9824-9835.
19. Wang S, Yang FJ, Shang LC, Zhang YH, et al.: Puerarin protects against high-fat high-sucrose diet-induced non-alcoholic fatty liver disease by modulating PARP-1/PI3K/AKT signaling pathway and facilitating mitochondrial homeostasis. *Phytother Res.* **2019**; 33: 2347-2359.

20. Cseh AM, Fabian Z, Quintana-Cabrera R, Szabo A, et al.: PARP Inhibitor PJ34 Protects Mitochondria and Induces DNA-Damage Mediated Apoptosis in Combination With Cisplatin or Temozolomide in B16F10 Melanoma Cells. *Front Physiol.* **2019**; 10: 538.
21. Hocsak E, Cseh A, Szabo A, Bellyei S, et al.: PARP inhibitor attenuated colony formation can be restored by MAP kinase inhibitors in different irradiated cancer cell lines. *Int J Radiat Biol.* **2014**; 90: 1152-1161.
22. Liu Q, Gheorghiu L, Drumm M, Clayman R, et al.: PARP-1 inhibition with or without ionizing radiation confers reactive oxygen species-mediated cytotoxicity preferentially to cancer cells with mutant TP53. *Oncogene.* **2018**; 37: 2793-2805.
23. Kalai T, Balog M, Szabo A, Gulyas G, et al.: New poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitors with antioxidant activity based on 4-carboxamidobenzimidazole-2-ylpyrroline and -tetrahydropyridine nitroxides and their precursors. *J Med Chem.* **2009**; 52: 1619-1629.
24. Tapodi A, Bogнар Z, Szabo C, Gallyas F, et al.: PARP inhibition induces Akt-mediated cytoprotective effects through the formation of a mitochondria-targeted phospho-ATM-NEMO-Akt-mTOR signalosome. *Biochem Pharmacol.* **2019**; 162: 98-108.
25. Tapodi A, Debreceni B, Hanto K, Bogнар Z, et al.: Pivotal role of Akt activation in mitochondrial protection and cell survival by poly(ADP-ribose)polymerase-1 inhibition in oxidative stress. *J Biol Chem.* **2005**; 280: 35767-35775.
26. Szabo A, Sumegi K, Fekete K, Hocsak E, et al.: Activation of mitochondrial fusion provides a new treatment for mitochondria-related diseases. *Biochem Pharmacol.* **2018**; 150: 86-96.
27. del Campo A, Parra V, Vasquez-Trincado C, Gutierrez T, et al.: Mitochondrial fragmentation impairs insulin-dependent glucose uptake by modulating Akt activity through mitochondrial Ca²⁺ uptake. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* **2014**; 306: E1-E13.