

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Jankó Laura

**A PARP-2 enzim szerepe az autofágia és a mitokondriális
morfológia szabályozásában**

DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2021

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**A PARP-2 enzim szerepe az autofágia és a mitokondriális
morfológia szabályozásában**

Jankó Laura

Témavezető: Prof. Dr. Bay Péter



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2021

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	1
Rövidítések jegyzéke	4
I. Bevezetés	9
1.1. A PARP enzimek és az autofágia kapcsolata	9
1.2. A PARP-2 szerepe a mitokondriális biogenezisben	10
II. Irodalmi áttekintés	11
2.1. A PARP enzimes család és a PARP-2 enzim	11
2.1.1. A PARP enzimes család	11
2.1.2. A poli(ADP-ribozil)áció mechanizmusa	13
2.1.3. A PARP-2 enzim	15
2.1.3.1. A PARP-2 enzim szerkezete és szabályozása	15
2.1.3.2. A PARP-2 enzim biológiai funkciói	17
2.2. Az autofágia	20
2.2.1. Az autofágia fogalma és típusai	20
2.2.2. Az autofágia molekuláris mechanizmusa	22
2.2.3. Az autofágia szabályozása	25
2.2.3.1. A mTOR kináz komplex és az autofágia kapcsolata	25
2.2.3.2. Az AMPK szerepe az autofágia szabályozásában	26
2.2.4. Az autofágia fiziológias és patológias szerepe	27
2.2.5. Az autofágia és a PARP enzimek kapcsolata	29
2.3. A mitokondrium	30
2.3.1. A mitokondrium felépítése	30
2.3.2. Mitokondriális minőségkontroll	31
2.3.2.1. Mitokondriális dinamika	32
2.3.2.2. Mitofágia	34
2.3.2.3. A mitokondriális ROS-termelés	36
III. Célkitűzések	38
IV. Anyagok és módszerek	39
4.1. Anyagok	39
4.2. Sejtenyésztés	39

4.3. Géncsendesítés	40
4.4. Sejtproliferáció vizsgálata	41
4.5. Sejthalál vizsgálata	41
4.6. Konfokális mikroszkópia	41
4.6.1. Mitokondriális hálózat tanulmányozása	42
4.6.2. Savas pH-jú organellek vizsgálata	42
4.6.3. Immunfluoreszcencia	42
4.7. Totál RNS izolálás és RT-qPCR	43
4.8. Celluláris ATP koncentráció meghatározása	45
4.9. SDS-PAGE és Western blot	45
4.10. Szuperoxid-termelés mérése	47
4.11. A lipidperoxidáció vizsgálata	47
4.12. Az oxigénfogyasztás meghatározása	47
4.13. Elektronmikroszkópia	48
4.14. Statisztikai analízis	48
V. Eredmények	49
5.1. A modell sejtvonalak validálása	49
5.2. A PARP-2 csendesítés gátolja az autofágiát	50
5.2.1. A PARP-2 csendesítés gátolja az autofágiát immortalizált mioblaszt sejtekben	50
5.2.2. A PARP-2 hiány hatására az autofágiában fellépő zavar az AMPK gátlásától és a SIRT1 indukciójától függ	54
5.2.3. A PARP-2 hiány növeli a LC3-pozitív vezikulumok számát primer sejtek esetén is	58
5.2.4. A PARP-2 aktivitása szerepet játszik az autofágiában	60
5.3. A PARP-2 enzim csendesítése a mitokondriális hálózat fragmentációját okozza, illetve növeli a mitokondriális ROS-termelést	61
5.3.1. A PARP-2 hiányában mitokondriális fragmentáció lép fel	61
5.3.2. A SIRT1 aktiváció, a mitofágia, illetve a mitokondriális dinamikában bekövetkező változások nincsenek hatással a PARP-2 hiányában fellépő mitokondriális fragmentációra	65
5.3.3. A PARP-2 csendesítés során a mitokondriális hálózatban bekövetkező változás nem csak az immortalizált mioblaszt sejtekre jellemző	68
5.3.4. A PARP-2 hiánya oxidatív stresszt indukál	72

5.3.5. A PARP-1-nek és a PARP-3-nak nincs szerepe a PARP-2 hiány által előidézett megváltozott mitokondriális morfológiában	77
VI. Megbeszélés	81
6.1. A PARP-2 depléciója esetén az autofágia zavart szenved	81
6.2. A PARP-2 hiánya mitokondriális fragmentációt okoz és oxidatív stresszt indukál.....	84
VII. Összefoglalás	87
VIII. Summary	88
IX. Irodalomjegyzék	89
X. Tárgyszavak	105
Köszönetnyilvánítás	106
Publikációs lista	107
Függelék	109

Rövidítések jegyzéke

ADP	adenozin-difoszfát
AICAR	5-aminoimidazol-4-karboxiamid ribonukleotid
Akt	protein kináz B
AMP	adenozin-monofoszfát
AMPK	AMP aktivált kináz
ANOVA	varianciaanalízis
Atg	autophagy-related protein/gene
ATP	adenozin-trifoszfát
Bad	Bcl-2-associated agonist of cell death
Bak	Bcl-2 antagonist killer 1
Bax	Bcl-2-associated X protein
BCA	bikinolinil-dikarbonsav
Bcl-2	B cell lymphoma 2
Bnip3	Bcl-2 interacting protein 3
BRCA	breast cancer gene
BSA	borjú szérum albumin
BUB3	budding uninhibited by benzimidazoles 3
cAMP	ciklikus AMP
CD	cluster of differentiation
CENPA/B	centromer protein A/B
Cox17	citokróm c oxidáz
CREB	cAMP válaszelem kötő fehérje
CTL	kontroll
Cyt C	citokróm c
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DEP	dishevelled, Egl-10 and pleckstrin
Deptor	DEP domént tartalmazó mTOR interakciós fehérje
DMEM	Dulbecco által módosított Eagle médium
DPQ	3,4-dihidro-5-[4-(1-piperidinil)butoxi]-1(2H)-izokinolinon
Drp1	dinamin-related protein 1
DTT	ditiotreitól

EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
eIF4E	eukarióta transzlációs iniciációs faktor 4E
ER	endoplazmatikus retikulum
ER α	ösztrogén receptor α
ETL	elektrontranszportlánc
EX-527	6-klór-2,3,4,9-tetrahidro-1H-karbazol-1-karboxamid
FAD	flavin-adenin-dinukleotid
FAK	fokális adhézis kináz
FAT	FRAP-ATM-TRAP
FBS	magzati borjú szérum
FIP200	FAK family kinase-interacting protein of 200 kDa
Fis1	fission 1 protein
FITC	fluoreszcein-izotiocianát
FKBP12	12 kDa FK506-binding protein
FK506	takrolimusz
FOXO	forkhead box O fehérje
FUNDC1	FUN14 domain containing 1
GLUT4	glükóz transzporter 4
GPX	glutation-peroxidáz
GSH	redukált glutation
GSK3	glikogén-szintáz-kináz 3
GTP	guanozin-trifoszfát
HDL	high-density lipoprotein
HIF1 α	hipoxia indukált faktor 1 α
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril-koenzim A
HOPS	homotypic fusion and vacuole protein sorting complex
HP1 α	heterochromatin protein 1 α
HR2	heptad repeat 2
HRP	tormaperoxidáz
Hsc70	heat shock cognate 71 kDa protein
HSL	hormon szenzitív lipáz
iNOS	indukálható nitrogén-monoxid szintáz
IRS1	inzulin-receptor szubsztrát 1
KFERQ	lizin-fenilalanin-glutaminsav-arginin-glutamin pentapeptid

LAMP-2A	lizoszóma-asszociált membránfehérje 2A
LC3	mikrotubulus-asszociált fehérje 1A/1B-könnyűlánc 3
LIR	LC3-kölcsönható régió
Lys	lizin
MAPK	mitogén-aktivált protein kináz
MEF	egér embrionális fibroblaszt
Mfn1/2	mitofuzin 1/2
MHCII	major histocompatibility complex class II
miRNS	mikroRNS
mLST8	mammalian lethal with sec-13 protein 8
MNNG	metil-nitro-nitrozo-guanidin
mSin1	mammalian stress-activated MAPK-interacting protein 1
mtDNS	mitokondriális DNS
mTOR	mammalian/mechanistic target of rapamycin kinase
mTORC1/2	mammalian/mechanistic target of rapamycin kinase complex 1/2
mtUPR	mitochondrial unfolded protein response
NAC	N-acetil-L-cisztein
NAD ⁺	oxidált nikotinamid-adenin-dinukleotid
NADP ⁺	oxidált nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát
Nduf	NADH:ubiquinon oxidoreduktáz
NEG	negatív kontroll
NKT	természetes ölüsejt
NLS	nukleáris lokalizációs szignál
NoLS	nukleoláris lokalizációs szignál
Nox4	NADPH-oxidáz 4
NR	nikotinamid-ribozid
NTyr	nitrotirozin
Opa1	optic atrophy 1
PAGE	poliakrilamid gélelektroforézis
PAM	presequence translocase-associated motor
PAR	poli(ADP-ribóz)
PARG	poli(ADP-ribóz) glikohidroláz
PARiláció	poli(ADP-ribozil)áció
PARL	presenilins-associated rhomboid-like

PBS	foszfát puffer
PCR	polimeráz láncreakció
PDCD4	programmed cell death 4
PE	foszfatidil-etanolamin
PGC-1 α	peroxiszóma proliferátor aktivált receptor kofaktor 1 α
PIKK	foszfatidil-inozitol 3-kináz-kapcsolt protein kináz
Pink1	PTEN indukált kináz 1
PI3K	foszfatidil-inozitol 3-kináz
PJ34	N-(5,6-dihidro-6-oxo-2-fenantridinil)-2-acetamid
PMSF	fenil-metil-szulfonil-fluorid
PPAR	peroxiszóma proliferátor aktivált receptor
PRAS40	proline-rich Akt substrate of 40 kDa
PRDX	peroxiredoxin
Protor	protein observed with Rictor
PTEN	foszfatáz és tenzin homológ foszfatáz
Puma	p53 upregulated modulator of apoptosis
p62	szekvesztoszóma-1
Raptor	regulatory-associated protein of mammalian target of rapamycin
Rictor	rapamycin-insensitive companion of mTOR
ROS	reaktív oxigén központú vegyületek
RT-qPCR	reverz transzkripció-kapcsolt kvantitatív PCR
RXR	retinoid X receptor
SAM	sorting and assembly machinery
SAP	scaffold-associated protein
SD	standard hiba
SDS	nátrium-dodecil-szulfát
SEM	átlag szórása
Ser	szerin
shRNS	short hairpin RNA
siRNS	small inhibitory RNA
SIRT1	sirtuin 1
SNAP	synaptosomal-associated protein
SNARE	SNAP receptor
SOD	szuperoxid-dizmutáz

SRB	szulforodamin B
SREBP	sterol regulatory element-binding protein
Syx17	szintaxin 17
TBARS	tiobarbitursav reaktív termékek
TBS	Tris-sel pufferezt sóoldat
TCA	triklórecetsav
Thr	treonin
TIF1 β	transcriptional intermediary factor 1 β
Tim	belső mitokondriális membrán transzlokáz
Tom	külső mitokondriális membrán transzlokáz
Tris	trisz-(hidroximetil)-amino-metán
TRF2	telomeric repeat binding factor 2
TSC	tuberous sclerosis protein
TTF-1	thyroid transcription factor 1
ULK1/2	Unc-51 like autophagy activating kinase
VAMP7	vesicle-associated membrane protein 7
Vps	vacuolar protein sorting
XRCC1	X-ray repair cross-complementing protein 1
3-AB	3-aminobenzamid
3-MA	3-metil-adenin
3'UTR	3' untranslated region
4EBP	initiation factor 4E-binding protein
4HNE	4-hidroxinonenál

I. Bevezetés

A PARP enzimesalád minden tagjára jellemző egy katalitikus aktivitással rendelkező domén, mely a szubsztrátként használt NAD^+ -ot nikotinamidra és ADP-ribózra hasítja, majd az ADP-ribóz egységeket felhasználva nagyméretű PAR polimereket szintetizál. A PARP enzimek által katalizált PARilációs reakció egy evolúciósan konzervált posztranszlációs fehérje módosítás (Schreiber és mtsai, 2006; Hottiger és mtsai, 2010). A fehérjecsalád egyik tagja a PARP-2 enzim, mely a sejtbeli PARP aktivitás 10-15%-áért felelős (Shieh és mtsai, 1998; Ame és mtsai, 1999; Schreiber és mtsai, 2002; Szanto és mtsai, 2012). A PARP-2 enzimet először a DNS hibajavításban azonosították, azonban azóta már számos fiziológiás és patofiziológiás folyamatban leírták szerepét, mint génexpressziós szabályozó mechanizmusok, mitokondriális folyamatok szabályozása, a sejtek oxidatív károsodásra adott válasza, a spermatogenezis, illetve bizonyos immunfolyamatok (Dantzer és mtsai, 2006; Kofler és mtsai, 2006; Maeda és mtsai, 2006; Yelamos és mtsai, 2006; Bai és mtsai, 2007; Quenet és mtsai, 2009; Li és mtsai, 2010; Bai és mtsai, 2011; Farres és mtsai, 2013; Szanto és mtsai, 2014; Farres és mtsai, 2015).

1.1. A PARP enzimek és az autofágia kapcsolata

Az eukarióta sejtek homeosztázisának fenntartásának érdekében elengedhetetlen az anabolikus és a katabolikus folyamatok egyensúlya. Az autofágia egy evolúciósan konzervált intracelluláris folyamat, mely során a sejt a saját makromolekuláit vagy organelumait a lizoszómális lebontó rendszer segítségével degradálja (Klionsky, 2005; Mizushima, 2007). Az autofágiával történő elimináció fő szabályozói a sejtek energiaszintjének szenzorai, az AMPK és a mTOR komplexek (Hoyer-Hansen és Jaattela, 2007; Hosokawa és mtsai, 2009; Jung és mtsai, 2009; Jung és mtsai, 2010; Chen és Klionsky, 2011; Alers és mtsai, 2012). Számos patofiziológiás folyamatban mutatták ki az autofágia szerepét vagy diszregulációját, például neurodegeneratív betegségek, illetve a tumorigenezis során (Qu és mtsai, 2003; Ravikumar és mtsai, 2004; Nixon és mtsai, 2005; Komatsu és mtsai, 2006; Martinez-Vicente és mtsai, 2008; Mizushima és mtsai, 2008; Cheung és Ip, 2009).

A mai napig a PARP enzimesalád két tagjáról, a PARP-1 és a PARP-10 enzimről igazolták, hogy képes valamilyen módon beavatkozni az autofágia folyamatába. A PARP-1-et proautofág faktorként azonosították, mely nagymértékű citosztatikus károsodás esetén

indukálja az autofágiát (Munoz-Gamez és mtsai, 2009; Zhou és mtsai, 2013; Rodriguez-Vargas és mtsai, 2016). A PARP-10 enzimet a p62 interakciós partnereként írták le, azonban az autofágia szabályozásában betöltött szerepe eddig tisztázatlan (Kleine és mtsai, 2012). Értekezésem első felében a PARP-2 enzim és az autofágia kapcsolatát vizsgáltuk, mely kapcsolat eddig felderítetlen.

1.2. A PARP-2 szerepe a mitokondriális biogenezisben

A mitokondriumok az eukarióta sejtek energiatermelő központjainak tekinthető organellumok, melyek változatos alakot, méretet, mennyiséget mutathatnak a sejtek típusától, illetve differenciáltsági állapotától függően. Azonban nemcsak az ATP szintézis, hanem számos egyéb intracelluláris folyamatban is szerepük van, például az intracelluláris kalcium koncentráció befolyásolásában vagy az apoptózis kezdeti lépései során. A mitokondriumok hibátlan működése esszenciális ezen funkciók helyes ellátásához. A mitokondriális minőségkontroll több szinten megvalósuló jól szabályozott folyamatokból áll, melyek működésében bekövetkező negatív változások patofiziológiás folyamatok kialakulásához vezethetnek, mint a diabetes mellitus, neurodegeneráció vagy az arteriosclerosis (Ashrafi és Schwarz, 2013; Valero, 2014; Ni és mtsai, 2015; Pickles és mtsai, 2018).

A PARP-2 enzim és a mitokondrium kapcsolatát számos esetben azonosították már. A PARP-2 depléció SIRT1 aktivációt eredményez, mely mitokondriális biogenezist okoz és növeli az oxidatív metabolizmust a fő mitokondriális enzimek expressziójának fokozása révén. Emellett a PARP-2 knockout egerekben emelkedett mitokondriális tartalom és mtDNS mennyiség figyelhető meg, mely korrelál a PARP-2 hiányában az izmokban és a májban megfigyelhető oxidatív fenotípussal (Bai és mtsai, 2011; Szanto és mtsai, 2012; Mohamed és mtsai, 2014). Ezen adatok miatt döntöttünk amellett, hogy a PARP-2 és a mitokondrium kapcsolatát tovább tanulmányozzuk.

II. Irodalmi áttekintés

2.1. A PARP enzimcsalád és a PARP-2 enzim

2.1.1. A PARP enzimcsalád

A poli(ADP-ribóz) polimeráz (PARP) enzimek emberben egy 17 tagú fehérjecsaládot alkotnak, mely fehérjecsalád összes tagja egy konzervált katalitikus domént tartalmaz, mely az aktív centrumot alakítja ki az enzimben (Virag és Szabo, 2002; Ame és mtsai, 2004). A PARP enzimek kutatása bő 50 évvel ezelőtt, az 1960-as években kezdődött, amikor Chambon és munkatársai először azonosították a poli(ADP-ribóz) polimeráz enzimaktivitást (Chambon és mtsai, 1963). A Chambon által azonosított nukleáris fehérjét, mely a detektált enzimaktivitásért felelős, poli(ADP-ribóz) polimeráznak, később PARP-1-nek nevezték el. Így az enzimcsalád először megismert és azóta is legjobban tanulmányozott és kutatott tagja a PARP-1 enzim. A 2010-es évek eleje óta szorgalmazzák PARP-kutatók (Hottiger és mtsai, 2010), hogy egységes nomenklaturát vezessenek be az ADP-ribozilációt végző enzimekre, mivel a PARP enzimeket nem polimerázoknak, hanem transzferázoknak tartja a terület. Az ADP-ribozil csoport transzfert végző enzimeket összefoglaló néven ADP-ribozil-transzferázoknak nevezzük. Ebben a csoportosításban a PARP enzimek a diftéria-szerű ADP-ribozil-transzferázok alcsoportjához tartoznak. Azonban a jelenlegi nomenklaturális ajánlás szerint a PARP rövidítést nem oldjuk fel, hanem történelmi okokból megtartjuk (Luscher és mtsai, 2021). Emlősökben a 17 tagú PARP enzimcsalád négy tagja, a PARP-1, a PARP-2, a tankiráz-1 (PARP-5a) és a tankiráz-2 (PARP-5b) képes valódi poli(ADP-ribóz) (PAR) polimerek szintézisére; a többi enzim mono- vagy oligo(ADP-ribozil)álja a fehérjéket, illetve található közöttük inaktív katalitikus doménnel rendelkező enzim is, a PARP-13 (Hottiger és mtsai, 2010). A különböző enzimeket eltérő gének kódolják, emellett a gének kromoszómákon belüli lokalizációja is variábilis; helyük nem korlátozódik egy vagy néhány kromoszómára. A PARP enzimek elsősorban a sejtmagban lokalizálódnak, de más organelumokban is azonosították már jelenlétüket: a tankirázokat és a PARP-12-t a Golgi-komplex transz ciszternáiban, a PARP-9-et a plazmamembrán közelében, míg a PARP-16-ot az endoplazmatikus retikulumban detektálták (Hassa és mtsai, 2006; Vyas és mtsai, 2013). A PARP-1 enzim felelős a sejtekben lévő össz-PARP aktivitás 85-90%-áért, a PARP-2 a 10-15%-ért, míg az enzimcsalád többi tagjának PARP aktivitása hozzájuk viszonyítva

elenyészőnek tekinthető (Ame és mtsai, 1999; Schreiber és mtsai, 2002; Szanto és mtsai, 2011).

Habár a PARP enzimeket először a DNS hibajavításban azonosították, azonban a mai napig csak a PARP-1, a PARP-2 és a PARP-3 enzimekről igazolták, hogy a DNS károsodása képes indukálni aktivitásukat (Ame és mtsai, 1999; Schreiber és mtsai, 2002; Boehler és Dantzer, 2011). Mindhárom enzimre jellemző a N-terminális végen található DNS-kötő domén jelenléte, mellyel az enzim képes a DNS törésekhez kapcsolódni és ezáltal aktívvá válni. Nagymértékű genotoxikus stressz, a DNS-ben bekövetkező kijavíthatatlan mértékű károsodás esetén ezen PARP enzimek szintje akár több százszorosára is emelkedhet a sejtekben. Azonban a túlzott mértékű PARP aktiváció fokozott NAD^+ felhasználással és következményesen NAD^+ hiánnyal jár. A NAD^+ újrászintetizálása kimerítheti a sejt ATP készletét, emellett a NAD^+ -függő metabolikus útvonalak is károsodást szenvedhetnek, mely végső soron nekrotikus sejthalálhoz vezethet (Virag és Szabo, 2002).

A PARP-3 enzim aktivitása révén a fehérjék mono(ADP-ribozil)ációját végzi. A PARP-3 enzimet először a DNS kettős száltörések javításában a nem homológ végek összekapcsolása során írták le. Azonosították szerepét a kromoszóma átrendeződésben, a mitotikus szegregációban, transzkripciós szabályozási folyamatokban, illetve a sejtciklus során is. A PARP-3 a sejtmagban a centroszómák közvetlen környezetében, illetve a citoplazmában lokalizálódik. Emelkedett PARP-3 kifejeződés figyelhető meg a duodénumban és a vékonybélben (Augustin és mtsai, 2003). PARP-3 csendesítés hatására a mitokondriális transzmembrán potenciál csökken, mely arra utal, hogy a PARP-3 részt vesz a mitokondriális ROS szabályozásában. A PARP-3 hiányában megjelenő fokozott ROS-produkció forrása a mitokondriális NADPH-oxidáz (Nox4). A PARP-3 hiánya és a megnövekedett Nox4-függő ROS-termelés gátolja a mTORC2 útvonal aktivitását (Rodriguez-Vargas és mtsai, 2020).

A PARP enzimek első leírása óta számos olyan vegyületet azonosítottak, melyek képesek gátolni ezen enzimek működését (Curtin és Szabo, 2013). A legelső PARP gátlószer egy nikotinamid analóg, a 3-aminobenzamid (3-AB) volt, mely a NAD^+ -hoz hasonló szerkezetéből adódóan képes az enzim katalitikus centrumához kapcsolódni (Purnell és Whish, 1980). Az 1990-es években számos PARP-gátló hatású vegyületet írtak le és a 3-AB-től nagyságrendekkel hatásosabb gátlószereket is azonosítottak (Banasik és mtsai, 1992; Griffin és mtsai, 1995). Azonban a gátló vegyületek nem szelektívek egy adott PARP enzimre, mivel ezen inhibitorok az enzimekben olyan régiókhoz kapcsolódnak, melyek az enzimes család legtöbb tagjában konzerváltak (Oliver és mtsai, 2004). Fontos kiemelni, hogy a

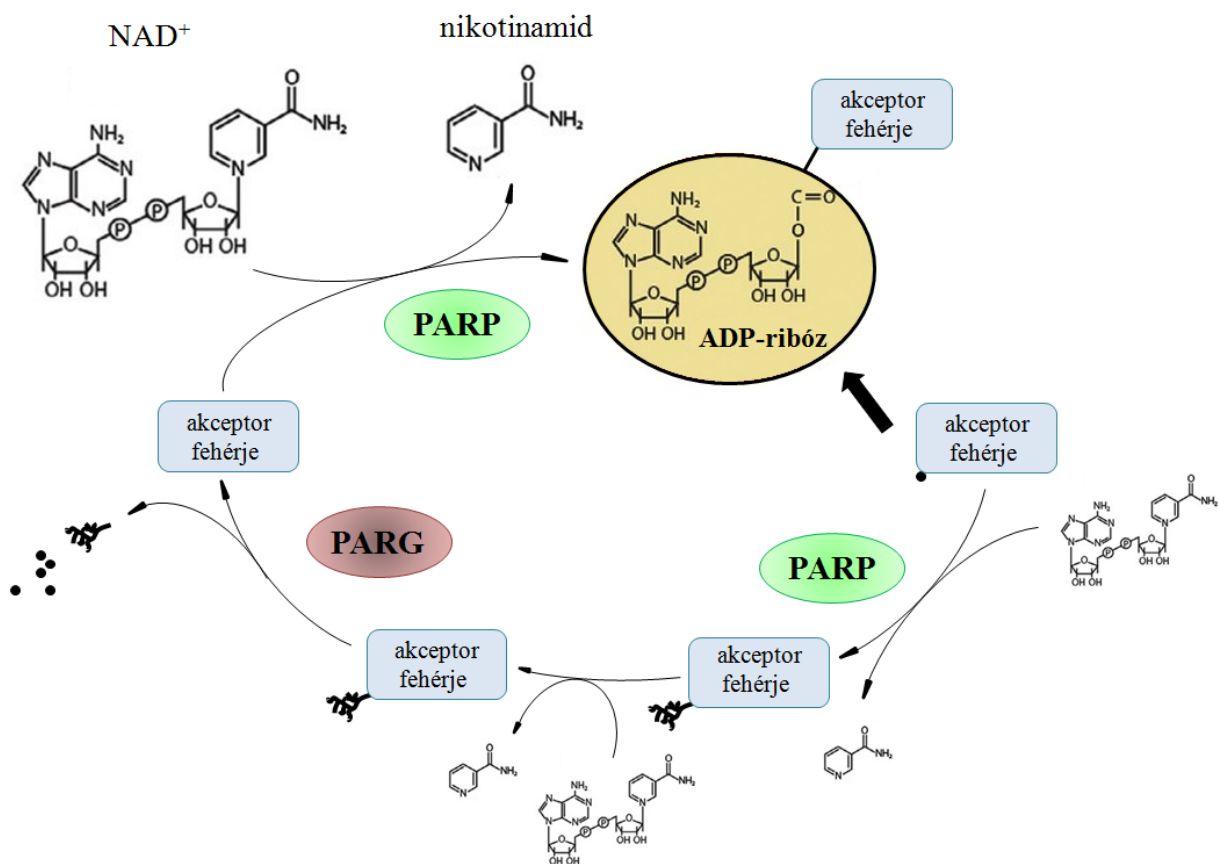
humán gyógyászatban már számos PARP gátlószert alkalmaznak (Olaparib, Rucaparib, Talazoparib, Niraparib, Veliparib), legtöbbjük BRCA-mutációt hordozó daganattípusokban monoterápiaként vagy más citosztatikumokkal kombinációban alkalmazzák. Ezek mellett több potenciális PARP gátlószert (PJ34, CEP-9722, E7016, INO-1001) találunk a gyógyszerkutató különböző klinikai és preklinikai fázisaiban (Kurnit és mtsai, 2018; Sigorski és mtsai, 2020).

2.1.2. A poli(ADP-ribozil)áció mechanizmusa

A PARP enzimek által katalizált poli(ADP-ribozil)ációs (PARilációs) reakció egy evolúciósan konzervált reverzibilis poszttranszlációs módosítás. A PARilációs reakció fontos szerepet játszik többféle fiziológiás és patofiziológiás folyamatban: szerepe van a DNS hibajavításban, a sejtosztódásban, a sejtek energia metabolismusában, a sejthalálban, valamint bizonyos jelátviteli folyamatok szabályozásában, befolyásolhatja a transzkripciót, hozzájárul a genom stabilitásának fenntartásához, módosíthatja a kromatin szerkezetét, illetve részt vesz, a hisztonok poszttranszlációs módosításán keresztül, az epigenetikai kód kialakításában is (Hassa és mtsai, 2006; Quenet és mtsai, 2009; Bai és mtsai, 2015; Gupte és mtsai, 2017). A PARP enzimek által katalizált poszttranszlációs módosításnak számos akceptor fehérjéje ismert. Manapság több mint 200 olyan fehérjét azonosítottak, melyek PARilálódnak. Ilyen fehérjék többek között hisztonok, egyes transzkripció faktorok, topoizomerázok, illetve egyéb sejtmagi fehérjék (Hassa és mtsai, 2006; Daniels és mtsai, 2015). A PARiláció sok esetben megváltoztatja egy fehérje fizika-kémiai és így biológiai tulajdonságait, ezáltal hatással lehet a fehérje stabilitására, az aktivitására vagy az általa kialakítani képes kölcsönhatásokra (Schreiber és mtsai, 2006; Bai, 2015).

Az aktivált PARP enzim a PARilációs reakció során NAD^+ -ot használ fel szubsztrátként, melyet nikotinamidra és ADP-ribózra hidrolizál, majd az ADP-ribóz egységekből lineáris vagy elágazó láncú homopolimereket hoz létre, melyeket PAR polimereknek nevezünk. A PAR polimer egységei között glikozidos ribóz-ribóz α -1,2 kötések alakulnak ki (Alvarez-Gonzalez és Jacobson, 1987). A PAR polimerek féléletideje rövid, 1 perc alatti. A polimerek szintézise és degradációja egy teljes szubsztrát ciklust alkot, mely folyamat több lépésből áll. Az aktiválódott enzim először egy ADP-ribózt kapcsol kovalensen az akceptor fehérjékben lévő megfelelő glutamát, aszpartát vagy lizin, ritkábban cisztein, szerin, hisztidin, arginin vagy tirozin aminosav oldalláncok γ -karboxil csoportjához (Althaus

és Richter, 1987; Sanderson és Cohen, 2020). Az elongációs lépés során a polimer lánc hosszabbodik, újabb ADP-ribóz egységek épülnek a polimer láncba, újabb glikozidos kötések jönnek létre. A polimer lánc elágaztatása nagyjából 20 ADP-ribóz egységenként történik. A láncba beépülő ADP-ribóz egységek száma variábilis, a néhány egységtől akár a 200 egységig is terjedhet (Hayashi és mtsai, 1983). Az autoPARiláció során az aktiválódott enzimen, míg a transzPARilációs folyamatban a PARilálódni képes fehérjéken jönnek létre PAR polimerek. A PARP enzimeken képződő polimerláncok az enzimet gátolják, így védenek az enzimek túlzott aktivációja ellen. A PAR polimereken található glikozidos kötések a poli(ADP-ribóz) glikohidroláz (PARG), az ADP-ribozil-akceptor-hidroláz-3 és az ADP-ribozil-proteinliáz enzimek hasítják, mely folyamat során, végső soron, szabad ADP-ribózok keletkeznek (Kawaichi és mtsai, 1983; Oka és mtsai, 2006) (1. ábra).



1. ábra A PAR polimer szintézisének mechanizmusa

Az aktiválódott PARP enzim a NAD⁺ hidrolízise során keletkező ADP-ribóz egységekből elágazó láncú homopolimert, poli(ADP-ribóz) (PAR) polimert épít az akceptor fehérjékre. A PAR polimereket a poli(ADP-ribóz) glikohidroláz (PARG) enzim hasítja szabad ADP-ribózokat hozva létre.

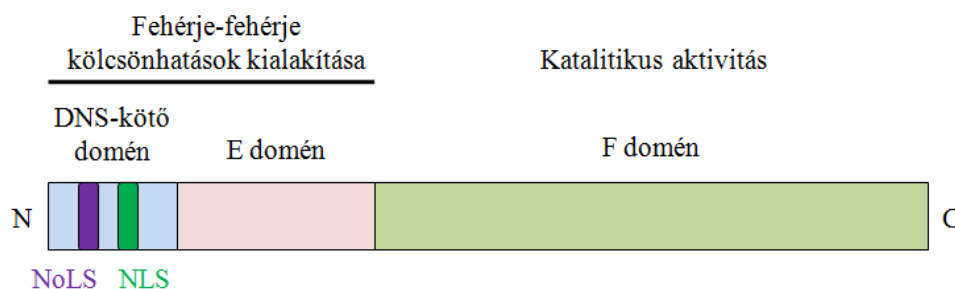
2.1.3. A PARP-2 enzim

2.1.3.1. A PARP-2 enzim szerkezete és szabályozása

Több évtizeden át a PARP-1-et tekintették az egyetlen fehérjének, mely képes a DNS károsodása után a PAR polimerek szintézisére. Shieh és munkatársai alacsony mértékű PARP aktivitást figyeltek meg PARP-1 knockout egerekből izolált fibroblaszt sejtekben (Shieh és mtsai, 1998). A PARP-1-re jellemző konzervált katalitikus domén jelenléte, illetve szerkezete segítette a kutatókat újabb PARP enzimek azonosításában, azonban a PARP-1 enzimben található egyéb domének és motívumok hiányozhatnak más PARP fehérjékből, ezek helyét eltérő domének vehetik át (Ame és mtsai, 1999; Johansson, 1999).

A PARP-2 enzimet kódoló gén emberben a 14. kromoszóma hosszú karján, a 14q11.2 kromoszómarégióban, míg egérben a 14. kromoszóma 14C1 régiójában található (Ame és mtsai, 1999). A PARP-2 gén translációja során egy 62 kDa méretű fehérje keletkezik, melynek két izoformáját azonosították és kialakulásuk az alternatív splicing-ra vezethető vissza (Ame és mtsai, 1999; Szanto és mtsai, 2012). A PARP-2 enzim szerkezete nagyfokú, hozzávetőlegesen 40%-os homológiát mutat a PARP-1 enzimével, viszont hiányzik belőle a PARP-1-ben megtalálható D domén, mely a PARP-1 automodifikációjáért felelős. Emellett 69%-os homológia figyelhető meg a PARP-1 és a PARP-2 C-terminális végén található katalitikus domén között, azonban a DNS-kötő doménjukban teljesen különböznek, ugyanis a PARP-1 enzimben található cink-ujj motívumok a PARP-2-ből teljesen hiányoznak (Ame és mtsai, 2004). A katalitikus domének eltérő felépítésének köszönhetően a két enzim eltérő DNS struktúrákat képes felismerni (Yelamos és mtsai, 2008). A PARP-2 enzim képes a homodimerizációra, illetve a PARP-1 enzimmel a heterodimerizációra, valamint a két enzim képes egymást PARilálni (Schreiber és mtsai, 2002).

A PARP-2 enzim 3 doménből felépülő multiprotein. A **DNS-kötő domén**, mely a fehérje N-terminális végén található, SAP motívumot, nukleáris lokalizációs szignált (NLS) és nukleoláris lokalizációs szignált (NoLS) foglal magában (Huber és mtsai, 2004). A SAP motívum segítségével kötődik az enzim a DNS AT-gazdag régióihoz, a NLS a sejtmagba, míg a NoLS a nukleoluszba való transzlokációért felelős (Kutuzov és mtsai, 2015). A középső **E domén**nek köszönhetően történik az automodifikáció, illetve a dimerizáció során is ennek a doménnek van szerepe. A fehérje C-terminális végén található a katalitikus aktivitással rendelkező **F domén**. A DNS-kötő és az E domén segítségével képes az enzim a fehérje-fehérje kölcsönhatások kialakítására (Szanto és mtsai, 2012) (**2. ábra**).



2. ábra Az egér PARP-2 enzim doménszerkezete

A N-terminális végen található a DNS-kötő domén, mely nukleoláris lokalizációs szignál (NoLS) és nukleáris lokalizációs szignál (NLS) szekvenciákat tartalmaz. A DNS-kötő és az E domén felelős a fehérje-fehérje interakciók kialakításáért. A C-terminálison található a katalitikus aktivitással rendelkező F domén.

A PARP-2 enzim, hasonlóan a PARP-1-hez, részt vesz a DNS hibajavításban (Ame és mtsai, 1999). Az enzim felfedezése után Schreiber és munkatársai felnőtt egerekben és egér embriókban tanulmányozták a PARP-2 expresszióját *in situ* hibridizáció módszerrel, mely során magas PARP-2 expressziót detektáltak a tímuszban, a vese kéregállományában, a lépben, a mellékvesékben, a gyomorban, a herékben, illetve az agy egyes területein, például a hippocampusban és a spinális ganglionban (Schreiber és mtsai, 2002).

Több mint 50, a PARP-2-vel kölcsönható fehérjét azonosítottak, melyek nagyon sokféle biológiai folyamatban vesznek részt. Vannak köztük a sejtciklusban, a sejthalálban, a DNS replikációban, a DNS hibajavításban, a transzkripcióban vagy az energiaháztartásban közreműködő fehérjék is (Hassa és mtsai, 2006; Isabelle és mtsai, 2010).

Mohamed és munkatársai leírták, hogy a miRNS-149 a PARP-2 génjének 3'UTR szekvenciájához kapcsolódva gátolja annak transzkripcióját, így csökkentve a PARP-2 expresszióját mRNA- és fehérjeszinten (Mohamed és mtsai, 2014). A PARP-2 szabályozása a fehérje poszttranszlációs módosításain keresztül is megvalósulhat. Az enzim DNS-kötő doménje két acetilációs hellyel (Lys36 és Lys37) rendelkezik. Az acetiláció erősen csökkenti a PARP-2 enzimaktivitását és DNS-hez való kötődését. Azonban ezek az acetilált lizinek az auto(ADP-ribozil)áció helyéül is szolgálhatnak, ugyanis deléciójukkor mérséklődött auto(ADP-ribozil)áció figyelhető meg (Haenni és mtsai, 2008). Emellett a Lys36 acetilációs hely a PARP-2 sejtmagba való transzportját is befolyásolhatja, mivel az enzim NLS szekvenciáján belül lokalizálódik. A Lys36 acetilációja nélkülözhetetlen a PARP-2 és az importin α alegységének interakciója során, mivel a PARP-2 acetilációs mintázatának hiánya esetén az enzim nem mutatható ki a sejtmagban (Haenni és mtsai, 2008). A transzkripció és a

poszttranszlációs módosítások mellett lipid-természetű vegyületeket és flavonoidokat is azonosítottak, melyek befolyásolják a PARP-2 expresszióját (Zhang és mtsai, 2014; Marton és mtsai, 2018; Zheng és mtsai, 2019).

2.1.3.2. A PARP-2 enzim biológiai funkciói

A PARP-2 DNS hibajavításban betöltött szerepét először az egyszálú DNS száltörések esetében igazolták. Később kimutatták a PARP-2 és a Ku proteinek közti kapcsolatot (Yelamos és mtsai, 2008). A Ku proteinek feladata a kettős DNS száltörések javítása, így a PARP-2 enzimnek szerepe lehet a kétszálú DNS száltörések javításában is. De nemcsak a DNS-ben kialakuló száltörések, hanem szabálytalan DNS formák, illetve bizonyos RNS típusokhoz való kapcsolódás is képes a PARP-2-t aktiválni (Leger és mtsai, 2014; Hanzlikova és mtsai, 2017). A felépülő PAR polimerek kapcsolódási felszín biztosítanak a többi DNS hibajavításban részt vevő fehérje számára a DNS törés helyén. Schreiber és munkatársai kimutatták, hogy PARP-2 hiányában is történik DNS hibajavítás, vagyis a PARP-2 nem esszenciális a DNS hibajavítása során, csak fokozza a hibajavítás hatékonyságát. A PARP-2 képes a bázis kivágási hibajavításban részt vevő fehérjékhez (DNS ligáz III, DNS polimeráz β és XRCC1) is kapcsolódni, ezekkel a fehérjékkel a PARP-1 is képes kölcsönhatást kialakítani. A XRCC1-ről emellett kimutatták, hogy képes negatívan szabályozni a PARP-2 aktivitását az enzim automodifikációs kapacitásának csökkentése révén (Schreiber és mtsai, 2002).

A sirtuin 1 (SIRT1) enzim a sirtuinok családjához tartozó NAD^+ -függő III. típusú deacetiláz enzim, melynek sejtben betöltött funkciója komplex: hozzájárul a sejtek metabolizmusának fenntartásához, szerepe van a DNS hibajavításban és a sejtek differenciálódása során, illetve részt vesz a heterokromatin kialakításában (Vaziri és mtsai, 2001; Blander és Guarente, 2004). Az aktív SIRT1 enzim a szubsztrátként használt NAD^+ -ot nikotinamidra és ADP-ribózra hidrolizálja, majd a lehasított acetyl csoportot hozzákapcsolja az ADP-ribózhoz 2'-O-acetyl-ADP-ribózt hozva létre. A sejtek NAD^+ koncentrációja nagymértékben befolyásolja az enzim aktivitását, az emelkedett NAD^+ koncentráció indukálja az enzimet (Houtkooper és mtsai, 2012). Az aktív SIRT1 enzim fehérjék deacetylálásán keresztül szabályoz számos, a sejtmetabolizmusban részt vevő enzimet és transzkripciós faktort. Célfehérjéi többek között a forkhead box O (FOXO) fehérjék, a peroxisóma proliferátor aktivált receptor kofaktor 1 α (PGC-1 α), a sterol regulatory element-binding protein 1 (SREBP-1), a cAMP válaszelem kötő fehérje (CREB) és a p53 (Nemoto és mtsai,

2005; Rodgers és mtsai, 2005; Lagouge és mtsai, 2006; Canto és Auwerx, 2012). A PARP-2 képes a SIRT1 génjének promóter régiójához kötödni és ennek köszönhetően gátolni a SIRT1 transzkripcióját. A PARP-2 hiányában fellépő SIRT1 aktiváció a FOXO1 és a PGC-1 α fehérjék deacetilációjához vezet. A FOXO1 és a PGC-1 α fehérjék deacetilációja és aktivációja a mitokondriális légzési láncban és a zsírsav oxidációban részt vevő enzimek expresszióját indukálja, mely mitokondriális biogenezishez vezet és serkenti az oxidatív metabolizmust (Bai és mtsai, 2011).

A PARP-2 több ponton képes regulálni a génexpressziót. Képes a kromatin szerkezetét módosítani a TIF1 β és a HP1 α transzkripciójának szabályozásán keresztül, valamint a PARP-2 közvetlen fizikai kölcsönhatást alakít ki a topoizomeráz I-el és a topoizomeráz II β -val, és ezen keresztül befolyásolja a DNS átrendeződését, hozzájárul a heterokromatin kialakulásához (Malanga és Althaus, 2004; Quenet és mtsai, 2008; Meyer-Ficca és mtsai, 2011). A PARP-2 transzkripciós faktorokkal, valamint a peroxiszóma proliferátor aktivált receptor γ (PPAR γ) és az ösztrogén receptor α (ER α) magreceptorokkal is képes kölcsönhatást kialakítani. A PPAR receptorcsalád 3 tagból áll, a PPAR α , a PPAR δ és a PPAR γ receptorokból, melyek a retinoid X receptorral (RXR) heterodimerizálódva képeznek aktív transzkripciós faktorokat és a válaszadó génjeik promóterében található válaszadó elemhez kötődve szabályozni a lipid-, a glükóz- és az energiahomeosztázist. A PPAR γ -ról kimutatták, hogy elengedhetetlen a fehérzsírsejtek differenciációja során. A PARP-2 a PPAR γ kofaktora, így szabályozza a PPAR γ célgénjeinek expresszióját és következményesen a zsírsejtek differenciációját. Egerekben a PARP-2 enzim depléciója lipodisztrófiához vezet, mely a preadipociták differenciációjának zavarára vezethető vissza (Bai és mtsai, 2007). Emellett a PARP-2 represszora a SREBP-1 és a SREBP-2 transzkripciós faktorok génjeinek, és ezen keresztül gátolja a koleszterol szintézist. Az alacsony PARP-2 expresszió fokozza a SREBP-1 és SREBP-2 által szabályozott gének kifejeződését. A PARP-2 knockout egerekben emelkedett koleszterin szint figyelhető meg a májban és a szérumban, illetve csökken a szérum HDL koncentrációja (Szanto és mtsai, 2014; Marton és mtsai, 2018).

A PARP-2 jelen van a konstitutív és a fakultatív heterokromatinban is, gyakran PARilált hisztonokkal vagy heterokromatin-kötő fehérjékkel asszociálva, melyek aktivitását a fizikai kölcsönhatás révén képes befolyásolni. Magasabb PARP-2 expresszió detektálható az inaktivált X kromoszóma, a Barr-test környezetében, azonban a PARP-2 X kromoszóma inaktivációja során betöltött szerepét eddig még nem azonosították (Dantzer és Santoro, 2013). A PARP-2 jelenléte a kromoszómák centromer és telomer régióinál is megfigyelhető,

melyek fenntartására szintén hatással van, hiszen a PARP-2 képes kötni és negatívan szabályozni a TRF2 fehérjét, mely a shelterin komplex részeként esszenciális a telomer formálásában (Dantzer és mtsai, 2004). A PARP-2 sejtciklus-függő módon képes kapcsolódni a kinetokór fehérjéihez, a CENPA-hoz, a CENPB-hez és a mitotikus orsó ellenőrző pont fehérjéhez, a BUB3-hoz. Ezen fehérjék a centromereknél jellemző heterokromatin kialakításában is közreműködnek (Saxena és mtsai, 2002). A PARP-1 és a PARP-2 enzimek együttes hiánya embrionális korban letális a kialakuló genomi instabilitás miatt, mely arra utal, hogy a PARP enzimek esszenciálisak a genom stabilitásának fenntartásában (Menissier de Murcia és mtsai, 2003). Emellett a PARP-2 fontos funkciót tölt be a spermatogenezisben is, mivel a folyamat során segít fenntartani a DNS integritását, illetve szerepe van a kromoszóma szegregációban is. PARP-2 knockout egerekben zavart szenved a spermatogenezis, a herék mérete, valamint az egerek fertilitása csökken (Dantzer és mtsai, 2006; Quenet és mtsai, 2009).

A PARP-2 szerepét a T-limfociták érési folyamatában, a thymopoiesis-ben is igazolták. Egerekben emelkedett PARP-2 expresszió tapasztalható azon területeken, ahol a timociták érése zajlik: a tímuszban, a lép fehér pulpa részén, illetve a Peyer-plakkokban. PARP-2 hiányában a CD4⁺CD8⁺ dupla pozitív sejtekben a Puma és a Noxa proapoptotikus gének fokozott expressziója figyelhető meg, mely proapoptotikus gének a DNS károsodásra aktiválódnak, így a PARP-2 enzimnek a dupla pozitív T-sejtek túlélésében van szerepe. PARP-2 depletált egerekben csökken a tímusz tömege, csökken a dupla pozitív sejtek száma, illetve ezeken a sejteken a T-sejt receptor expressziója is csökken (Yelamos és mtsai, 2006). Emellett a természetes ölüsejt (NKT) limfocita populációban is szuppresszió figyelhető meg PARP-2 depletált egerek májában és lépében (Filliol és mtsai, 2017), mely ugyancsak azt sugallja, hogy a T-limfociták érési folyamataiban PARP-2 hiányában zavarok lépnek fel. A PARP-2 szerepét az erythropoiesis-ben is azonosították: PARP-2 depletált egerekben emelkedett eritropoetin szint mellett eritrocitaszám- és élettartam-csökkenés figyelhető meg, valamint krónikus anémia alakul ki (Farres és mtsai, 2013; Farres és mtsai, 2015).

A PARP-2 fontos funkciót tölt be a tüdő morfogenezise során, az epitel sejtek differenciációja, illetve a születés utáni surfactant-képződés közben. A PARP-2 képes kölcsönhatást kialakítani a TTF-1 transzkripciós faktoral, mely a tüdőre specifikus gének, illetve a surfactant fehérje expresszióját szabályozza. A PARP-2–TTF-1 interakció során a PARP-2 aktivátorként serkenti a tüdő epitel sejtek differenciációját, illetve a surfactant fehérje képződését (Maeda és mtsai, 2006).

Szövet típus	PARP-2 hiányában fellépő fenotípus	Referencia
vázizom	a SIRT1 aktivációján keresztüli mitokondriális biogenezis és izomrost izotípus váltás	Bai és mtsai, 2011
máj	a SIRT1 aktivációján keresztüli mitokondriális biogenezis és szteatózis	Bai és mtsai, 2011
hasnyálmirigy	a SIRT1 aktivációján keresztül sérült β sejt funkció miatt kialakuló glükóz intolerancia	Bai és mtsai, 2011
zsírszövet	a PPAR γ csökkent transzaktiváló hatása miatt kialakuló lipodisztrófia	Bai és mtsai, 2007
here	a DNS hibajavítás zavara és az apoptózis indukciója révén kialakuló hímvarsejtszám-csökkenés	Dantzer és mtsai, 2004
tímusz	csökkent CD4 ⁺ CD8 ⁺ dupla pozitív T-sejtszám	Yelamos és mtsai, 2006
tüdő	csökkent surfactant-képződés	Maeda és mtsai, 2006

1. táblázat Összefoglaló táblázat a különböző szövetekben PARP-2 hiányában kialakuló fenotípusos változásokról

2.2. Az autofágia

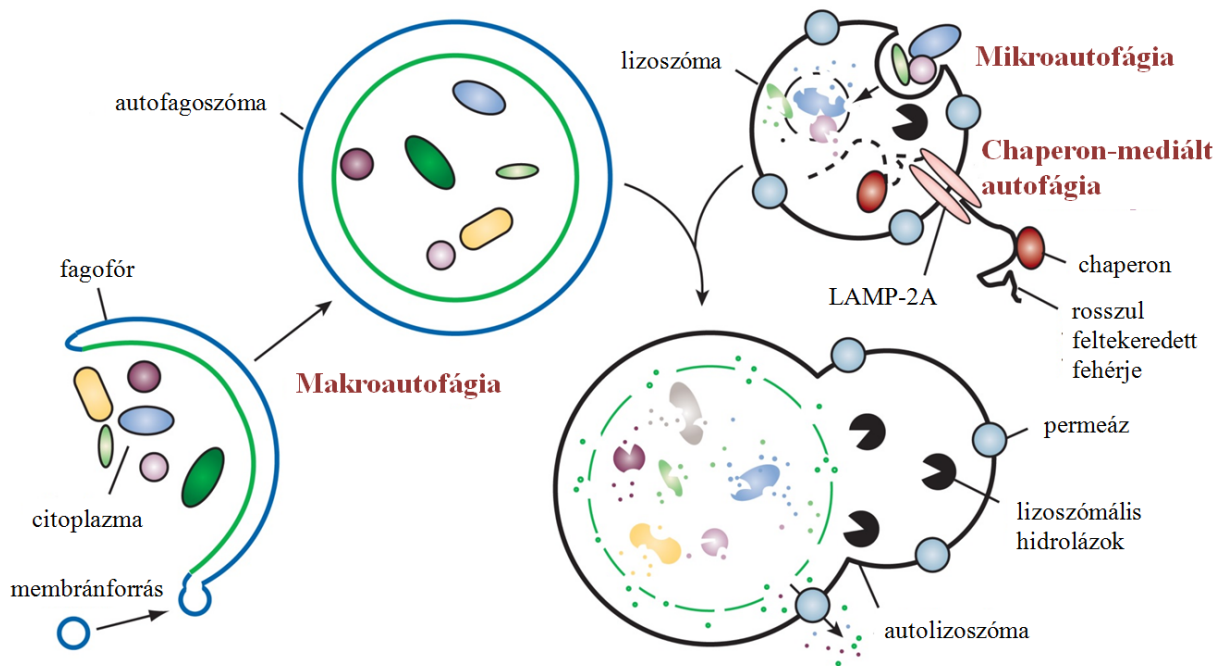
2.2.1. Az autofágia fogalma és típusai

Az autofágia egy evolúciósan konzervált önemésztő folyamat, mely során a sejt saját anyagai – fehérjék és organelumok – a lizoszómába kerülve degradálódnak. A folyamat minden eukarióta sejtben megfigyelhető, az autofágiában részt vevő fehérjék nagyfokú homológiát mutatnak alacsonyabb- és magasabbrendű eukarióta szervezetekben (Klionsky, 2005; Mizushima, 2007). Az autofágia első morfológiai leírásai az 1950-es évekből származnak, amikor szélesebb körben terjedni kezdtek az elektronmikroszkópos technikák. Az autofágia leírásának és korai tanulmányozásának egyik kiemelkedő alakja Christian de Duve volt, aki nemcsak a lizoszómákat azonosította 1955-ben, hanem elektronmikroszkópban tanulmányozva a sejteket olyan membránnal határolt sejtalkotókra is bukkant, melyek lizoszómával fuzionálnak és a sejt saját anyagainak, organelumait tartalmazzák (De Duve és mtsai, 1955; De Duve, 1964). De Duve javasolta az autofágia elnevezést az elektronmikroszkópos felvételeken látható önemésztő folyamatokra (De Duve és Wattiaux, 1966).

Az autofágiának 3 típusát különböztetjük meg aszerint, hogyan kerül a lebontandó anyag a lizoszómába: chaperon-mediált autofágia, mikroautofágia és makroautofágia

(Klionsky, 2005). A **chaperon-mediált autofágia** filogenetikailag magasabbrendű eukariótákban jelenik meg és fehérjékre nézve szelektív folyamat. A citoszólikus Hsc70 chaperon a citoszólban specifikusan olyan fehérjékhez kapcsolódik, melyek KFERQ pentapeptidből álló aminosavszekvenciát tartalmaznak, mely lizoszómába irányító szignál szekvenciaként működik. Ez a szekvencia a fehérjén belül bárhol megtalálható és akkor válik elérhetővé a Hsc70 chaperon számára, ha a fehérje térszerkezetében valamilyen változás következik be. A KFERQ szekvenciát tartalmazó fehérje kötött Hsc70 a lizoszómák membránjában található lizoszóma-asszociált membránfehérje 2A (LAMP-2A) fehérjéhez kapcsolódik, majd ko-chaperonok közreműködésével a lebontásra ítélt fehérje letekeredik és a LAMP-2A által képzett csatornán keresztül transzlokálódik a lizoszóma belsejébe miközben a citoszólikus Hsc70 leválik róla. A lizoszóma belsejében a fehérje egy lizoszómális Hsc70 dajkafehérjéhez kapcsolódik, majd a savas pH-n működő hidrolázok degradálják a fehérjét (Massey és mtsai, 2004; Cuervo, 2011). A **mikroautofágia** folyamatának kezdetén a lizoszóma membránján egy betüremkedés keletkezik, majd a lizoszóma bekebelezi a lebontandó anyagot. Mikroautofágiával egész organellumokat képes a sejt eliminálni, mely organellumok membránjukkal együtt bontódnak le. Szelektív és nem-szelektív formája is ismert. Szerepe főként a sejt túlélésében fontos, például éhezés vagy nitrogén-depriváció során, de rapamycin kezelés hatására is ez az autofágia típus a jellemző (Wang és Klionsky, 2003). A **makroautofágia** a legismertebb és legjobban tanulmányozott típusa az autofágiának, gyakran a szakirodalomban is csak autofágiaként hivatkoznak rá. A folyamat első lépéseként kialakul a *fagofór*, mely egy ciszternaszerű kettős izoláló membrán. A fagofór eredete máig tisztázatlan, származhat citoplazmatikus organellumokból (endoplazmatikus retikulum, Golgi-komplex, mitokondrium), a plazmamembránból, de akár újonnan is képződhet (Tooze és Yoshimori, 2010; Parkhitko és mtsai, 2013; Feng és mtsai, 2014). A fagofór körbezár egy citoplazmarészletet, ahol a lebontandó anyagok találhatóak és így alakul ki az *autofagoszóma*. Az autofagoszóma külső membránja először egy késői endoszómával fúzionálva hozza létre az *amfiszómát*, majd az amfiszóma egy lizoszómával egyesül, így alakul ki az *autolizoszóma*. Az autofagoszóma közvetlenül is fúzionálhat lizoszómával kialakítva az autolizoszómát. Az autolizoszómában lévő hidrolázok végzik a bekebelezett anyagok lebontását (Mizushima és mtsai, 2008) (**3. ábra**). A mikro- és a makroautofágiára is jellemző az organellum-szelektivitás, mely során a lizoszóma közvetlenül bekebelez vagy a fagofór körbevesz mitokondriumot (*mitofágia*), riboszómát (*ribofágia*), peroxiszómát (*pexofágia*) vagy endoplazmatikus retikulumot (*retikulofágia*) és megtörténik az organellum

szelektív eliminációja (Dunn és mtsai, 2005; Rodriguez-Enriquez és mtsai, 2006; Beau és mtsai, 2008; Cebollero és mtsai, 2012; Parkhitko és mtsai, 2013).



3. ábra Autofágia típusok

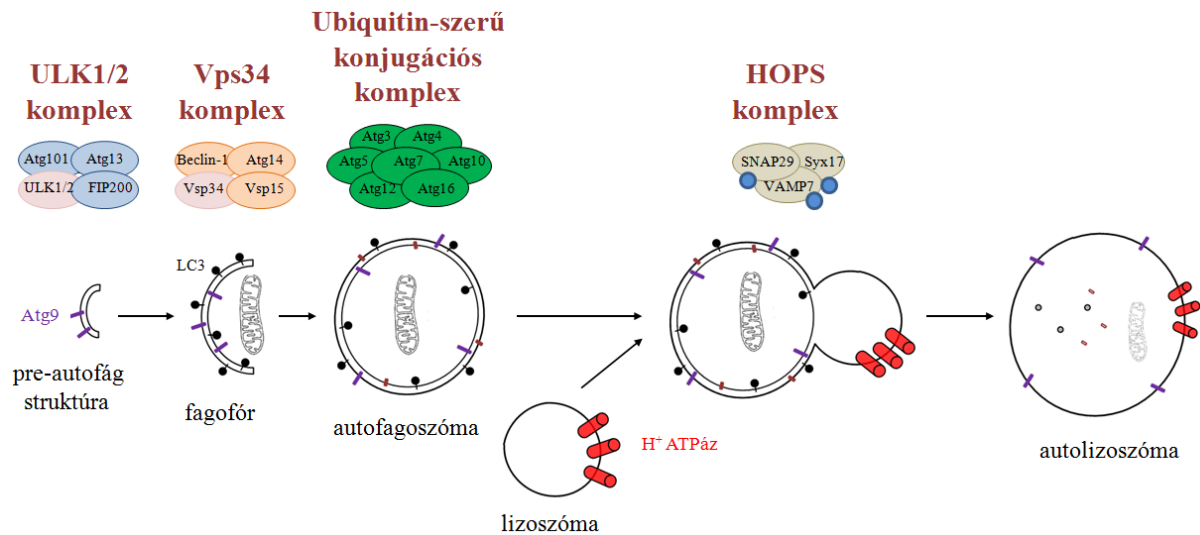
A makroautofágia során kettős izoláló membrán veszi körbe a lebontandó anyagot, kialakul az autofagoszóma, mely lizoszómával egyesülve autolizozómát hoz létre. A mikroautofágiánál a lizoszómális membrán betüremkedésén keresztül kerül be a lizoszóma belsejébe a lebontandó anyag. A chaperon-mediált autofágia során chaperonok ismerik fel a lebontandó fehérjéket, melyek a lizoszóma membránján található lizoszóma-asszociált membránfehérje 2A (LAMP-2A) által képzett csatornán át jutnak be a lizoszómába. A lizoszómális hidrolázok általi degradáció után a keletkező monomerek a megfelelő transzporterjeik segítségével a citoszólba kerülnek (Mizushima és mtsai, 2008 után módosítva).

2.2.2. Az autofágia molekuláris mechanizmusa

Az autofágia molekuláris mechanizmusát, a folyamatban részt vevő géneket először élesztőben (*Saccharomyces cerevisiae*) azonosították (Tsukada és Ohsumi, 1993). A 2000-es évek elejéig nem volt egységes nevezéktana az autofágiában azonosított géneknek és fehérjéknek, így 2003-ban Klionsky és munkatársai bevezették az *autophagy-related* kifejezésből az Atg betűszót (Klionsky és mtsai, 2003). Később az élesztőben felismert gének homológjait emlős sejtekben is leírták és az élesztőkben kialakított nomenklatúrára támaszkodva megalkották az emlős sejtekben zajló autofágiában részt vevő fehérjék nevezéktanát is, mely csak néhány esetben tér el az eredetitől. Emlősökben a mai napig 29 Atg és számos egyéb fehérjét írtak le, melyek szerepet játszanak az autofágia folyamatában.

Az Atg fehérjék nagy fehérjekomplexeket alakítanak ki. Az Atg fehérjék részt vesznek az autofágia indukciójában, felelősek az autofagoszóma kialakításáért, a lizoszómával történő fúziójáért és az autofágia folyamata során hierarchikus rendszert alkotnak (Lamb és mtsai, 2013).

Az autofágia első lépése az iniciáció, melyet az ULK1/2 kináz komplex végez, mely komplexnek az Atg fehérjéken (ULK1/2, Atg13, Atg101) kívül egyéb fehérjék (például FIP200) is tagjai. A komplexen belül a szerin/treonin kináz enzimaktivitásért az ULK1/2 fehérje a felelős és a komplex fő feladata, hogy az autofágia indukciójaként a fagofór kialakulását stimulálja. A fagofór kialakulásának első lépéseként kialakul a pre-autofág struktúra. Az Atg9 transzmembrán domént tartalmazó integráns membránfehérje a fagofór származási helyéről a fagofór membránjához kötve szállítódik az autofágia helyszínére. Következő lépésként a Vps34 komplex (Beclin-1, Atg14, Vps15, Vps34) létrehozza a fagofórt. Ez a komplex egy lipid kináz foszfatidil-inozitol 3-kináz-kapcsolt protein kináz (PIKK) komplex, mely foszfatidil-inozitol 3-kináz (PI3K) aktivitással rendelkezik. Az ubiquitin-szerű konjugációs rendszer (Atg3, Atg4, Atg5, Atg7, LC3, Atg10, Atg12, Atg16) alakítja ki az autofagoszómát. A LC3-at az Atg4 proteáz hasítja, majd az Atg5–Atg12–Atg16 komplex foszfatidil-etanolamint (PE) köt a LC3-hoz, mely horgonyként segíti a lebontandó anyagok fagofór általi körbevételét és végső soron az autofagoszóma kialakulását. A LC3 fehérje delipidált naszcens formáját LC3-I-nek, míg PE-konjugált formáját LC3-II-nek nevezzük. Az autofagoszóma lizoszómával történő fúziója a HOPS komplex (Syx17, SNAP29, VAMP7 és egyéb fehérjék) segítségével valósul meg, mely SNARE komplexet alkot az autofagoszóma és a lizoszóma membránja között. A lizoszómabeli alacsony pH kialakításáért a vakuoláris proton ATPázok a felelősek, melyek a lizoszóma membránjában lokalizálódnak és H^+ ionokat pumpálnak a lizoszóma lumenébe. Az autofágia utolsó lépéseként a savas pH-n működő enzimek végrehajtják az anyagok degradációját, majd a lebontás során keletkező monomerek a megfelelő transzporterek, permeázok segítségével visszakerülnek a citoszólba (Melendez és Neufeld, 2008; Glick és mtsai, 2010; Mizushima és Komatsu, 2011) (**4. ábra**).



4. ábra Az autofágia molekuláris mechanizmusa

Az autofágia kezdetekor az ULK1/2 komplex indukálja az autofágiát azáltal, hogy az Atg9-et hordozó pre-autofág struktúra az autofágia helyszínére szállítódik. A Vps34 komplex segíti a fagofór kialakítását. Az ubiquitin-szerű konjugációs rendszer kialakítja az autofagoszómát, mely körbeveszi a lebontandó organelumot vagy makromolekulát és felszínén LC3 fehérjék találhatóak. A HOPS komplex segítségével az autofagoszóma lizoszómával fúzionálva létrehozza az autolizoszómát.

Számos vegyületet azonosítottak, melyek serkentő vagy gátló hatásuk révén valamely ponton szabályozzák az autofágia folyamatát. Az aktivátorok mTOR-függő vagy mTOR-független módon képesek az autofágia indukciójára, legismertebb autofágia induktor a rapamycin. Az inhibitorok között vannak olyanok, melyek magának az autofágiának valamely lépését gátolják (chloroquine, bafilomycin A1, obatoclax, clarithromycin A), illetve találunk olyanokat is, melyek az autofágia szabályozásán keresztül képesek negatívan befolyásolni a folyamatot (például 3-metil-adenin (3-MA), mint PI3K inhibitor) (Sridharan és mtsai, 2011; Parkhitko és mtsai, 2013; Liu és mtsai, 2020). A chloroquine a 4-aminokinolin vegyületek közé tartozó lizoszomatrop ágensként képes bejutni a lizoszómákba és a lizoszómális pH emelésével gátolja a hidrolázokat, így megakadályozza a lizoszómális degradációt. Chloroquine kezelés hatására a LC3 fehérje PE-konjugált formája (LC3-II) halmozódik fel a sejtekben (Fedorko, 1967; Klionsky és mtsai, 2016).

2.2.3. Az autofágia szabályozása

2.2.3.1. A mTOR kináz komplex és az autofágia kapcsolata

Az autofágia fő szabályozója a mTOR kináz komplex. A mTOR egy szerin/treonin kináz, mely a sejtek energiaállapotát monitorozza és doménszerkezete alapján a PIKK kinázcsaládhoz tartozik. Neve a *Streptomyces hygroscopicus* által termelt rapamycinből származik, melyről kimutatták, hogy a FKBP12 fehérjéhez való kötődés után képes gátolni a mTORC1 működését (Heitman és mtsai, 1991). A mTOR kináz két szerkezeti és funkcionálisan eltérő multiprotein komplexből áll, melyek a mTORC1 és a mTORC2. A két komplex több eleme azonos, azonban tartalmaznak egyedi fehérjéket is: a mTORC1 komplex a TOR, Raptor, Deptor, mLST8 és PRAS40 fehérjékből, míg a mTORC2 a TOR, Rictor, Deptor, Protor, mLST8 és mSin1 fehérjékből épül fel. Mindkét komplexben a TOR fehérje felelős a kináz aktivitásért, míg a Deptor, a TOR kináz FAT doménjén keresztül gátolja annak aktivitását. A Raptor és a Rictor fehérjék hídként funkcionálnak, rajtuk keresztül kapcsolódnak a szabályozandó, a mTOR komplexekkel interakcióba lépő fehérjék. A mTORC2 érzéketlen a rapamycinre (Guertin és Sabatini, 2007; He és Klionsky, 2009).

A **mTORC1** két széleskörűen tanulmányozott targetje a S6 kináz és a 4EBP. A S6 kináznak két izoformája ismert, a p70 S6 kináz és a p90 S6 kináz, melyeket a mTORC1 képes foszforilálni. A mTORC1 aktiválja a p70 S6 kinázt a Thr389 foszforilációján keresztül. Az aktív p70 S6 kináz a S6 fehérje foszforilációval pozitívan szabályozza a riboszómális gének transzkripcióját, generálja a riboszóma biogenezist és sejtnövekedést indukál, proapoptotikus fehérjék (Bad, PDCD4) foszforilációjával gátolja az apoptózist, emellett a mTORC2 funkcióját is képes gátolni a Rictor közvetlen foszforilációja révén, illetve negatív visszacsatolásként a saját aktivitását is képes csökkenteni az IRS1 foszforilációja által (Magnuson és mtsai, 2012). A mTORC1 több ponton foszforilálhatja a 4EBP-t (Thr37, Thr46, Thr70, Ser65), melynek működése így gátlódik és beindulnak az eIF4E cap-függő transzlációs folyamatok (Hare és Harvey, 2017). Ugyanakkor a mTORC1 transzkripció faktorok foszforilálásán keresztül befolyásolja bizonyos gének transzkripcióját. Serkenti a lipid metabolizmust a SREBP-1 és a PPAR γ foszforilációján keresztül, míg a PGC-1 α foszforilációjával fokozza a mitokondriális metabolizmust, illetve a hipoxia indukált faktor 1 α (HIF1 α) foszforilációjával stimulálja az angiogenezist (Dodd és mtsai, 2015). A **mTORC2** legfontosabb célfehérjéje a protein kináz B (Akt), melyet a Ser473-on keresztül közvetlenül foszforilálni és így maximálisan aktiválni képes (Frias és mtsai, 2006). Az Akt-nak számos

targetje ismert: a FOXO3a transzkripció faktor és a kaszpáz-9 direkt foszforilációja révén, illetve a p53 gátlásán keresztül serkenti az apoptózist, a GSK3 gátlásával csökkenti a glukoneogenezist, a ciklin D1 gátlásával pedig indukálja a sejtciklust. Továbbá, az Akt a TSC1/2 komplexet foszforilálva serkenti a mTORC1 aktivitását (Gomez-Pinillos és Ferrari, 2012; Parkhitko és mtsai, 2013).

A mTORC1 autofágia gátlásban betöltött szerepe jól ismert folyamat (Jung és mtsai, 2010). Normál tápanyagellátottság mellett a mTORC1 köti az ULK1/2 fehérjét, majd az ULK1/2 és az Atg13 kinázokat direkt foszforilálva gátolja az autofágia kezdeti lépését (Hosokawa és mtsai, 2009). Emellett a mTORC1 szenzitív a lizozómákból kiáramló aminosavak koncentrációjára. Tápanyag-depléción esetén az ULK1/2 felszabadul a mTORC1 gátlása alól, kialakul a stabil ULK1/2 komplex és indukálódik az autofágia (Jung és mtsai, 2009; Chen és Klionsky, 2011) (**5. ábra**).

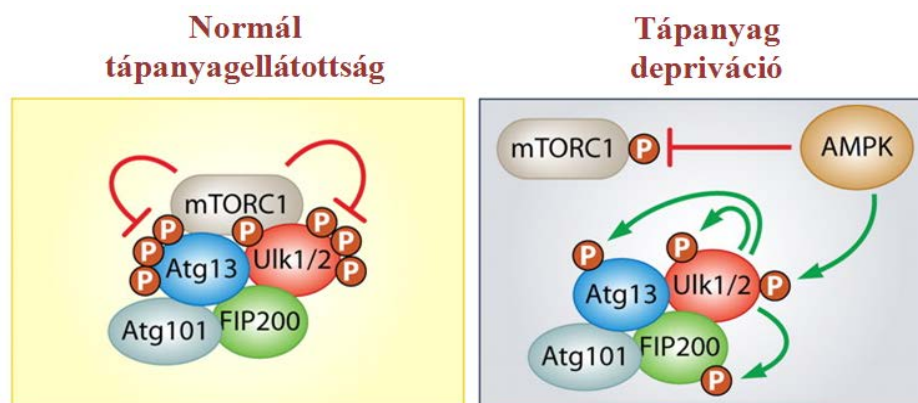
2.2.3.2. Az AMPK szerepe az autofágia szabályozásában

Az AMP aktivált kináz (AMPK) egy szerin/treonin kináz enzimkomplex, melynek fő feladata a sejtek energiaállapotának érzékelése. A sejtekben lévő AMP/ATP koncentrációjának arányát érzékeli: az AMP és az ATP az enzim γ doménjéhez kapcsolódik, de míg az AMP pozitívan, addig az ATP negatívan befolyásolja az enzim kináz aktivitását (Adams és mtsai, 2004). Az enzim 3 alegységből épül fel: a katalitikus aktivitással rendelkező α alegységből és két regulatórikus alegységből (β és γ alegység) (Hardie, 2007).

Az AMPK-nak számos targetfehérjéje ismert. Az AMPK szerepe komplex, számos sejtbeli folyamatban vesz részt, a fehérjéket direkt vagy indirekt módon szabályozza. Az AMPK a glikogén-szintáz foszforilálva gátolja annak működését, így a glikogén szintézist. Emellett serkenti a lipolízist a HSL-n keresztül, illetve gátolja a koleszterol szintézist a HMG-CoA reduktáz foszforilálása révén (Halse és mtsai, 2003). Transzkripció faktorok révén is képes befolyásolni a metabolizmust, például a PGC-1 α foszforilálása serkenti a glükóz transzporter 4 (GLUT4) transzportereken történő glükóz felvételt. Ezek mellett befolyásolja a glukoneogenezist, a sejtnövekedést és az inzulin szekréciót is (Kurth-Kraczek és mtsai, 1999; Winder és Hardie, 1999; Vega és mtsai, 2000).

Az AMPK mTORC1-függő és -független módon is képes szabályozni az autofágiát. ATP depléción esetén az AMPK gátolja a mTORC1 aktivitását, mivel foszforilálja a Raptort, illetve a TSC1/2 komplex fehérjéit, így az autofágia indukációjában közreműködő fehérjék

felszabadulnak a mTORC1 gátlása alól és indukálódik az autofágia (Hoyer-Hansen és Jaattela, 2007). Az ULK1 fehérje direkt foszforilációja aktiválja az ULK1/2 komplexet. Viszont az autofágia előrehaladtával a fehérjék/ organellumok lebontása növeli a sejtben az ATP koncentrációját, mely gátolja az AMPK aktivitását. Emellett negatív visszacsatolásként az ULK1/2 komplex képes foszforilálni és ezáltal gátolni az AMPK-t (Alers és mtsai, 2012) (5. ábra).



5. ábra Az autofágia mTORC1 és AMPK általi szabályozása

Normál tápanyagellátottság mellett a mTORC1 direkt foszforilálja az ULK1/2 komplexet, így gátolva az autofágia ULK1/2 komplex általi iniciációját. Tápanyag-depriváció esetén az AMPK a mTORC1 és az ULK1/2 foszforilálása révén aktiválja az ULK1/2 komplexet, mely generálja az autofágiát (Alers és mtsai, 2012 után módosítva).

2.2.4. Az autofágia fiziológias és patológias szerepe

Az autofágia folyamatosan jelen van a sejtekben. Nyugvó sejtekben nagyjából egyensúlyban vannak az anabolikus és a katabolikus folyamatok, az autofágia a sejt az elöregedett vagy hibásan működő organellumait/ fehérjeit eltávolítja és lehetővé teszi, hogy újak képződjenek. Ezt a folyamatot nevezzük **bazális autofágiának**. Tápanyag- vagy energiahiányos állapotokban, valamilyen stresszor hatására **stressz-indukált autofágia** jelentkezik. Éhezés alatt az autofágia segítségével számos anyag eliminálódik és szabad aminosavak vagy zsírsavak formájában felhasználhatóvá válik új fehérjék vagy az ATP szintéziséhez (Levine és Yuan, 2005). Az autofágia szigorúan szabályozott folyamat, az optimális szintjének alul- vagy túlműködése is sejthalálhoz vezethet (Singh és Cuervo, 2011). A programozott sejthalálnak azt a típusát, mely során autofág vezikulumok akkumulálódnak a sejtekben, II. típusú autofág sejthalálnak nevezzük. Ez a típusú sejthalál nagytömegű

sejtlebontás esetén válik szükségszerűvé, például az embriogenezis során (Mizushima és mtsai, 2008; Chen és Klionsky, 2011).

Az autofágia jelentőségét daganatos megbetegedésekben, illetve neurodegeneratív kórképekben is igazolták, de összefüggésbe hozható a szenescenciával és az immunválasszal is (Banerjee és mtsai, 2010; Jiang és Mizushima, 2014). A bazális autofágia zavarára vezethetők vissza bizonyos **neurodegeneratív konformációs betegségek**. Az Alzheimer-, a Parkinson-, a Huntington-kórban, illetve prionbetegségekben jellemzően fehérjeaggregátumok halmozódnak fel a neuronokban, melyek a sejt normál működését gátolják és neurodegenerációhoz vezethetnek. A sejt többféle módon próbálja eltávolítani ezeket az aggregátumokat, például autofágiával, mely folyamatot *aggregofágiának* nevezzük. *Ecetmuslica (Drosophila melanogaster)* és egér Huntington-modellekben megfigyelték, hogy a rossz konformációjú huntingtin fehérjét az autofágia segítségével is próbálja eliminálni a neuron (Ravikumar és mtsai, 2004). Az Alzheimer-kórban a β -amiloidok nagyméretű és jellegzetes β -redőben gazdag filamentáris szerkezetű aggregátumokat alkotnak, melyek plakkok formájában jelennek meg a neuronok közvetlen környezetében. A β -amiloid plakkok közelében disztrófiás neuritek figyelhetők meg, melyeket a felhalmozódó autofág vezikulumok okoznak és a tau fehérjék hiperfoszforilációja miatt alakulnak ki (Nixon és mtsai, 2005; Funderburk és mtsai, 2010). Parkinson-kórban Lewy-testek formájában aggregátumok képződnek, melyek legnagyobb részét α -szinuklein fehérjék alkotják. A Parkinson-kórban az α -szinuklein fehérjék több mint 90%-a hiperfoszforilált állapotban található meg, melyek konformációja megváltozik és β -redőben gazdag fibrillumokat alakítanak ki. A dopaminerg neuronokban megjelenő Lewy-testekben szolubilis α -szinuklein fehérjék, ubiquitinek és hiperfoszforilált α -szinukleinek detektálhatók, melyek lizoszómális lebonthatatlan plakkokat alakítanak ki a sejtekben (Martinez-Vicente és mtsai, 2008; Cheung és Ip, 2009). Kísérletes körülmények között az Atg5 és az Atg7 fehérjéket neurodegeneratív folyamatokban azonosították. *In vivo* egerek neuronjaiban az Atg5 vagy Atg7 fehérje depléciója esetén ubiquitinált fehérjék akkumulálódnak a neuronokban, mely végső soron a sejt pusztulásához vezet (Komatsu és mtsai, 2006; Mizushima és Hara, 2006).

Az **immunválasz** során az antigén prezentációban van jelentős szerepe az autofágiának. Az extracelluláris térből, *xenofágia* által a sejtekbe kerülő anyagok vagy az endogén eredetű, intracelluláris patogének is a lizoszómális lebontórendszer közreműködésének segítségével degradálódnak (Wileman, 2013). A lizoszómákban limitált proteolízissel keletkező peptidok a MHCII-n keresztül prezentálódnak a T-limfocitáknak,

beindítva ezzel az adaptív immunválaszt (Mizushima és mtsai, 2008; Kudchodkar és Levine, 2009; Levine és mtsai, 2011).

Az autofágia szabályozásában számos onkogént, illetve tumorszuppresszort azonosítottak, melyek az autofágiát pozitív vagy negatív módon képesek befolyásolni. A tumorprogresszió során az autofágia működése indukálhatja és gátolhatja is a **tumorigenézist**. A PI3K, a mTOR, a Bcl-2 onkogénként gátolják, míg a TSC1/2 komplex vagy a p53 tumorszuppresszorként serkentik az autofágiát (Mizushima és mtsai, 2008). Továbbá a Beclin-1 monoallélikus deléciója a humán emlő-, ovárium- és prosztata daganatos esetek 40-75%-ban megfigyelhető (Qu és mtsai, 2003). Ezzel ellentétben az Atg4 fehérjét állatmodellekben tumorszuppresszorként azonosították (Marino és mtsai, 2007).

2.2.5. Az autofágia és a PARP enzimek kapcsolata

A PARP enzimcsalád két tagjáról, a poli(ADP-ribozil)ációra képes PARP-1-ről, illetve a mono(ADP-ribozil)ációt végző PARP-10-ről írták le, hogy képes befolyásolni az autofágiát.

Számos alkalommal szolgáltatott bizonyítékot arra, hogy a PARP-1 enzim az autofágia pozitív regulátora. Az alkiláló ágensek vagy az ionizáló sugárzás a DNS károsodásához vezetnek, amely nagyfokú PARP-1 aktivációt indít el a sejtekben. PARP-1^{+/+} egér embrionális fibroblaszt (MEF) sejtek doxorubicinnel történő kezelése után nagymértékű PARP-1 aktiváció figyelhető meg, mely NAD⁺ és ATP deplációhoz vezet, illetve az autofagoszómák felhalmozódását okozza. Azonban az autofágia farmakológiai vagy genetikai gátlása PARP-1^{-/-} MEF sejtekben fokozott nekrozist eredményez, ami arra utal, hogy az autofágia PARP-1 által közvetített protektív szerepet játszik a kemoterápiában (Munoz-Gamez és mtsai, 2009). A PARP-1 az AMPK aktivációján keresztül segíti elő az autofágiát. A metil-nitro-nitrozo-guanidinra (MNNG) válaszul a Bax^{-/-} és Bak^{-/-} kettős-knockout MEF sejtekben aktiválódik a PARP-1, csökken az intracelluláris ATP szint, indukálódik az AMPK, illetve szuppresszálódik a mTORC1 és ezáltal aktiválódik az autofágia (Zhou és mtsai, 2013). A PARP-1 és az AMPK kölcsönhatását már több esetben kimutatták: a PARP-1 képes az AMPK-t PARilálni, míg az AMPK foszforilálhatja a PARP-1-et. Az AMPK PARilációja befolyásolja az éhezés alatt megjelenő autofágiát, mivel a PARP inhibitorokkal (PJ34, olaparib, DPQ) történő kezelés után az autofágia csökkent aktivitása mutatható ki (Rodriguez-Vargas és mtsai, 2016). Emellett tápanyag-depláció esetén az AMPK csökkent PARilációja

figyelhető meg, mely arra utal, hogy az AMPK teljes aktivitása szükséges a PARP-1 poszttranszlációs módosításához (Rodriguez-Vargas és mtsai, 2019).

A PARP-10 enzim és az autofágia kapcsolata kevésbé ismert terület. A PARP-10 képes kölcsönhatásba lépni a p62 fehérjével, mely a LC3 kötésére képes LC3-kölcsönható régió (LIR) motívumot tartalmazó fehérje és az autofagoszómális fehérjedegradációban van szerepe (Kleine és mtsai, 2012).

2.3. A mitokondrium

2.3.1. A mitokondrium felépítése

A mitokondriumok az eukarióta sejtekre jellemző, kettős membránnal határolt dinamikus organellek, melyek száma, mérete és alakja a sejt típusának, differenciáltsági állapotának, illetve energiaszükségletének megfelelően változik. A mitokondrium bakteriális eredetű, kialakulása az endoszimbionta elméletre vezethető vissza. A mitokondrium egyik fő feladatának az oxidatív foszforiláció során termelődő ATP szintézis tekinthető, így konvencionálisan a sejtek energiatermelő központjának is nevezhető. Az ATP szintézise mellett feladatai közé számos fiziológiai folyamat tartozik, többek között a citoszolikus kalcium homeosztázis fenntartása, illetve az apoptózis szabályozása (Parsons és Green, 2010). Nagy méretük és jellegzetes struktúrájuk alapján elektronmikroszkópos felvételeken könnyen felismerhető organellek. A mitokondriumok saját cirkuláris, kétszálú DNS-el rendelkeznek, melynek replikációja a sejtmagtól független folyamat. A mitokondriális DNS (mtDNS) akár ezer példányszámban is jelen lehet a sejtben. A mitokondriális genom 37 gént kódol, mely gének többek között az oxidatív foszforiláció génjeinek többségét, míg a többit a nukleáris DNS kódolja (Anderson és mtsai, 1981).

A **külső mitokondriális membrán** felépítése az eukarióta sejtmembránhoz hasonló, a membránt alkotó fehérjék és lipidek aránya megközelítőleg 50-50%. Porin fehérjék által kialakított nagyméretű transzmembrán csatornákat tartalmaz, melyek 5 kD alatti molekulákra permeabilisek. A külső membrán transzlokációs komplexe a külső mitokondriális membrán transzlokáz (Tom) komplex, mely a transzlokálódó fehérje szignál szekvenciáját felismerő Tom20, Tom22, Tom70 és a pórust képző Tom40 fehérjékből épül fel. A külső és a belső membrán között található **intermembrán térben** ionok és kis molekulák, például a citokróm c található. Továbbá az intermembrán térben a kisméretű belső mitokondriális membrán transzlokáz (Tim) fehérjék, a Tim9 és a Tim10 hexamert formálnak, majd komplexet alkotva

chaperonként működve segítik a fehérjék áthaladását a SAM komplex részvételével a külső mitokondriális membránba vagy a Tim22 komplexen keresztül a belső membránba. A **belső mitokondriális membrán** kardiolipinben gazdag, erősen impermeábilis, csak olyan anyagok jutnak át rajta, melyeknek specifikus transzporterei megtalálhatók a membránban. A belső mitokondriális membránban lévő transzporterek a Tim komplexek. A Tim23 komplex a belső membránba, illetve a hozzá asszociált PAM fehérje révén a mátrixba juttatja a fehérjéket, ahol megtörténik a szignál szekvencia lehasítása. A belső mitokondriális membrán betüremkedéseit **krisztáknak** nevezzük, melyeken az elektrontranszportlánc komplexek fehérjéi és az ATP-szintáz foglal helyet (Ellenrieder és mtsai, 2015).

Az elektrontranszportlánc öt komplexből épül fel: az I. komplex a NADH:ubiquinon oxidoreduktáz, a II. komplex a szukcinát-dehidrogenáz, a III. komplex az ubiquinon-citokróm c oxidoreduktáz, a IV. komplex a citokróm c oxidáz, az V. komplex az ATP-szintáz, mely F1FO-típusú ATPáz. A I-IV. komplex végzi az ubiquinon és a citokróm c közvetítésével a mitokondriális mátrix és az intermembrán tér között lévő protongrádiens kialakítását azáltal, hogy a NADH és FADH₂ redukálása közben keletkező H⁺ ionokat a mátrixból az intermembrán térbe pumpálják, miközben víz keletkezik. Az V. komplexnek nevezett ATP-szintáz a keletkezett protongrádiens által képzett membránpotenciált használja fel ATP szintézisre, miközben az általa képzett csatornán keresztül az intermembrán térből a mátrixba kerülnek a H⁺ ionok. A belső mitokondriális membrán által határolt **mátrixban** található többek között a piruvát-dehidrogenáz enzim, a citromsav-ciklus és a zsírsav β-oxidáció enzimkomplexei, a mitokondriális genom és riboszómák (Schmidt és mtsai, 2010; Straub és mtsai, 2016).

2.3.2. Mitokondriális minőségkontroll

A mitokondrium megfelelő működése nem csak a mitokondriális elektrontranszportláncához szükséges. A mitokondriális mátrixban számos esszenciális bioszintetikus útvonal lokalizálódik, így a mitokondriumok hibátlan funkciója az eukarióta sejtek hatékony működéséhez is nélkülözhetetlenek. Ha valamilyen módon károsodik a mitokondrium minőségellenőrző funkciója, olyan sérült mitokondriumok halmozódhatnak fel a sejtben, melyekre redukálódott ATP- és emelkedett reaktív oxigén központú vegyületek (ROS) termelése jellemző, illetve pro-apoptotikus fehérjék felszabadulásához vezethet, mely végső soron az apoptózis indukcióját okozhatja. A mitokondriális minőségellenőrző funkció

több szinten valósulhat meg, mely a károsodás mértékétől függ (Green és Van Houten, 2011; Ni és mtsai, 2015).

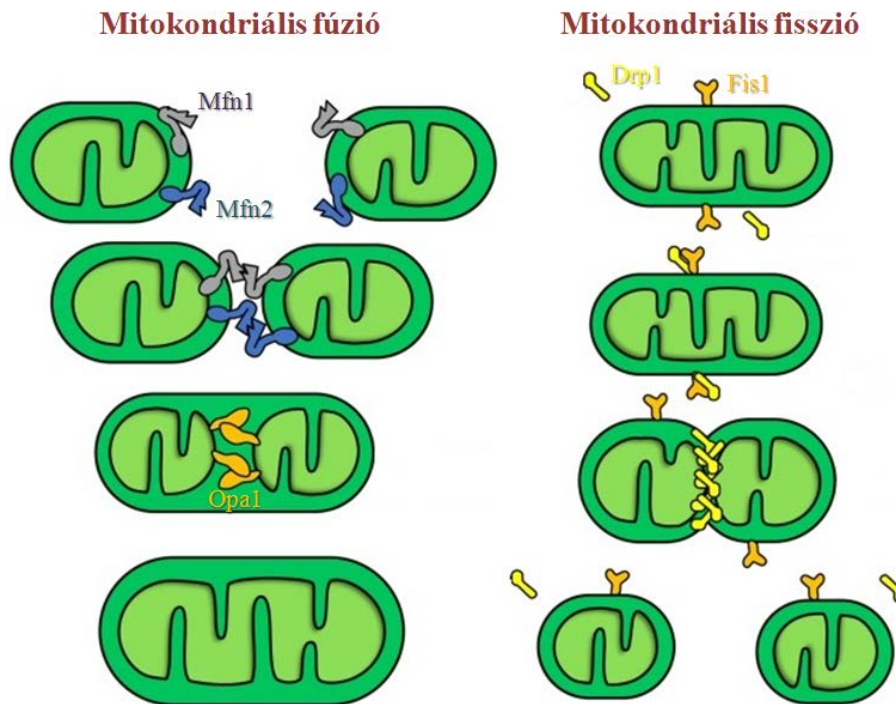
2.3.2.1. Mitokondriális dinamika

A mitokondriumok dinamikus hálózatot alakítanak ki a sejtekben, mely hálózat állandóan zajló fúziója–fissziója mellett a mitokondriumok sejten belüli lokalizációja is folyamatosan változik. A fúzió folyamata során a mitokondriumok egymással egyesülnek, míg a fisszió a mitokondriális hálózat fragmentálódását jelenti. Fiziológias körülmények között a mitokondriális fúzió és fisszió folyamata egyensúlyban van, mely folyamatoknak a mitokondriális integritás fenntartása által a megfelelő mitokondriális működésben van szerepe, mely elengedhetetlen a megfelelő mennyiségű ATP-termeléshez (Scott és Youle, 2010; Westermann, 2010; van der Bliek és mtsai, 2013; Tilokani és mtsai, 2018).

A mitokondriumok **fúziója** a mitofuzinok (Mfn1 és Mfn2) és az optic atrophy 1 (Opa1) fehérje közvetítésével zajlik. A fúzió kétlépéses folyamat, mely során először a külső, majd a belső mitokondriális membránok egyesülnek egymással. Két transzmembrán doménjuknak köszönhetően a külső mitokondriális membránban foglalnak helyet a mitofuzinok, melyek a citoszólba lógó C-terminális végen található HR2 doménjukkal homo- vagy heterodimerizálódva képesek két mitokondriumot térben közelíteni egymáshoz, mely folyamathoz a N-terminális végen található GTPáz doménnek köszönhetően a GTP hidrolízise során felszabaduló energiát használják fel (Santel és Fuller, 2001; Koshiba és mtsai, 2004). A belső membránok fúzióját a szintén GTPáz funkcióval rendelkező Opa1 fehérjék végzik. Az Opa1-nek két formája ismert: a hosszabb formája a belső membránhoz kapcsolódik egy, a N-terminális végen található transzmembrán horgony segítségével, míg a rövidebb változat a horgony lehasítása után keletkezik és szolubilis formában az intermembrán térben lokalizálódik. Mind a rövid, mind a hosszú formája képes a belső membránban elhelyezkedő negatív töltésű kardiolipinhez kapcsolódni, majd homo- vagy heterodimerizáció után a membránokat közelíteni egymáshoz (Mishra és mtsai, 2014; Ge és mtsai, 2020) (6. ábra).

A mitokondrium **fissziójáért** a Fis1 és a Drp1 fehérjék a felelősek. A Fis1 a külső mitokondriális membránban lokalizálódik a C-terminálisán található transzmembrán doménjének köszönhetően, míg a fehérje többi része a citoszól felé néz. A mitokondriális fissziót kiváltó esemény kezdetekor a Drp1 fehérje közvetlenül a Fis1-hez kapcsolódva iniciálja a

mitokondriumok szétválását (Mozdy és mtsai, 2000). A Drp1 GTPáz aktivitással rendelkező citoszólikus fehérje. A mitokondrium fissionájának helyszínén a Drp1 fehérjék homomultimer komplexet alkotva körbeveszik a mitokondriumot spirál formában, majd a GTP hidrolíziséből származó energiát felhasználva fragmentálják az organelumot (Lackner és Nunnari, 2009) (6. ábra).



6. ábra A mitokondriális dinamika

A mitokondriális fúzió folyamata során először a mitofuzinok (Mfn1 és Mfn2) közvetítésével a külső mitokondriális membránok, majd az optic atrophy 1 (Opa1) fehérje segítségével a belső mitokondriális membránok fuzionálnak. A mitokondriális fissionó alkalmával a külső mitokondriális membrán felszínén található Fis1 fehérjéhez kapcsolódik a citoszólikus Drp1, mely spirál alakú homomultimer komplexet képezve iniciálja a mitokondrium hasadását (Chiong és mtsai, 2014 után módosítva).

A mitokondriális dinamika nagyon érzékeny folyamat, mivel a fúzióban–fissionóban részt vevő valamely fehérje depléciója vagy helytelen működése is már az egyensúlyi folyamat felborulásához, a mitokondrium helytelen működéséhez vezethet. Míg a Mfn1 depletált MEF sejtekben a Mfn2 csak részben képes a hibátlan mitokondriális fúzió fenntartására, addig fordított esetben, a Mfn2 depléciója nem okoz fennakadást a mitokondriumok egyesülési folyamatában (Chen és mtsai, 2003). Egerekben tanulmányozva a mitofuzinok depléciója miopátiát okoz, mely embrionális korban *in utero* vagy közvetlenül születés után letális (Bertholet és mtsai, 2016). Az Opa1 homozigóta mutációja szintén letális *in utero*, míg heterozigóta mutációjakor fragmentált mitokondriális hálózat alakul ki, mely

csökkent mitokondriális légzést és mtDNS instabilitást eredményez, emellett egerekben kardiomiopátia, neurológiai rendellenességek, viselkedésbeli problémák és látási anomáliák figyelhetők meg (Alavi és mtsai, 2007; Davies és mtsai, 2007; MacVicar és Langer, 2016).

2.3.2.2. Mitofágia

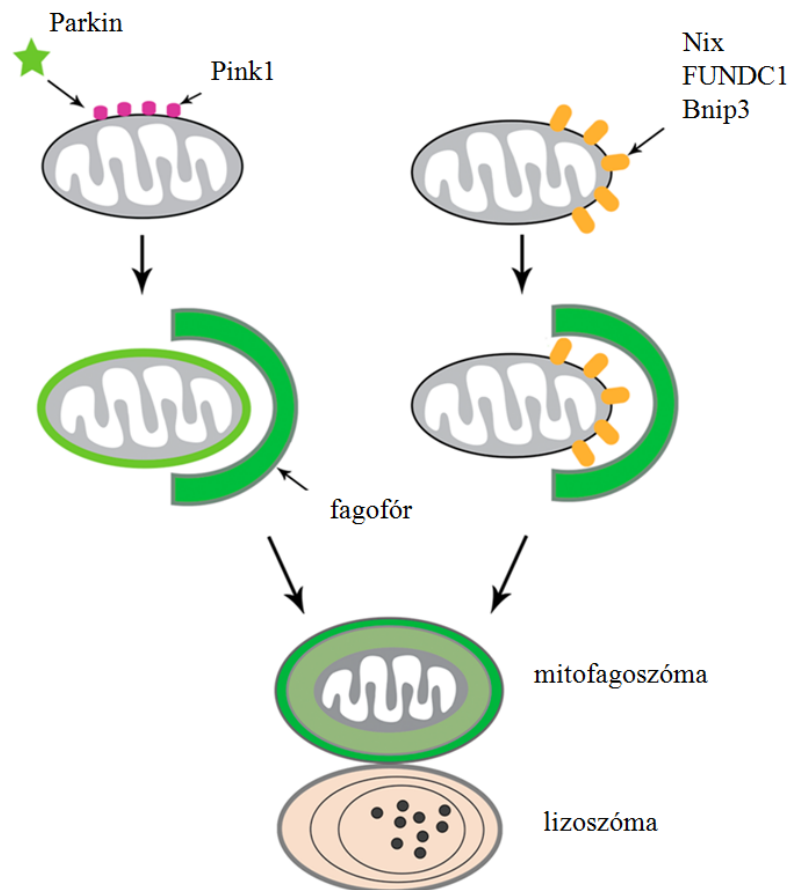
A mitofágia az autofágia azon típusa, mely folyamat során a mitokondriumok szelektív eliminálása történik meg. A mitofágia kifejezés a 2000-es évek elejéről származik, amikor szérum-depletált patkány hepatocitákat konfokális mikroszkóppal tanulmányozva a depolarizált mitokondriumok és a LC3-pozitív vezikulumok között kolokalizációs szignált fedeztek fel (Rodriguez-Enriquez és mtsai, 2006). A mitofágiának két útvonala különböztethető meg: az ubiquitin-mediált vagy Parkin-függő és a receptor-mediált vagy Parkin-független mitofágia (Parkhitko és mtsai, 2013) (**7. ábra**).

Az **ubiquitin-mediált mitofágia** folyamatában részt vevő két fő fehérje a Parkin és a PTEN indukált kináz 1 (Pink1). A Parkin egy citoszólikus E3 ubiquitin ligáz, melyet elsőként a Parkinson-kór kutatása során azonosítottak (Kitada és mtsai, 1998). A Pink1 egy szerin/treonin kináz, mely a külső mitokondriális membránban foglal helyet a N-terminális végen elhelyezkedő transzmembrán doménjének köszönhetően. Fiziológias körülmények között először a fehérje instabil, C-terminális részét a PARL proteáz hasítja le, majd további hasítások után a keletkező peptidek a citoszólban degradálódnak. A mitokondriális membránpotenciál megváltozásakor vagy a mitokondrium sérülésekor a PARL proteáz nem képes a Pink1 hasítására, ezért a Pink1 feldúsul a külső mitokondriális membránban és autofoszforylációt követően indukálódik a kináz aktivitása. Az aktivált Pink1 ubiquitint és a Parkin fehérjét foszforylálja, melyek szignálként szolgálnak az autofág receptorok számára és így indukálják a mitokondrium szelektív lebontását (Sekine és Youle, 2018).

A **receptor-mediált mitofágia** folyamatát olyan fehérjék (Bnip3, Nix, FUNDC1) iniciálják, melyek C-terminális transzmembrán doménjuknak köszönhetően a külső mitokondriális membránban jelennek meg és olyan motívumokat hordoznak, melyeket a fagofór felszínén lokalizálódó LC3 fehérje képes szelektíven felismerni. A fehérjék kölcsönhatása nyomán a fagofór körbeveszi a mitokondriumot és elkezdődik az organelum degradációja. A Bnip3 és a Nix fehérje nem minden szövetben expresszálódik fiziológias körülmények között, de hipoxia hatására mindkét fehérje expressziója indukálódik (Galvez és mtsai, 2006). Nix-függő mitofágia figyelhető meg a retikulociták differenciációjakor, mely

folyamat során a kialakult vörösvértestek mitokondriumai teljes mértékben eliminálódnak (Schweers és mtsai, 2007). A FUNDC1 fehérjét szintén a hipoxia-indukált mitofágia folyamata során azonosították. Normoxiás körülmények között a FUNDC1-et a Src kináz foszforilálja, mely működése hipoxiás körülmények között gátlódik, így a FUNDC1 defoszforilátlan állapotban nagyobb affinitással kötődik a LC3 fehérjéhez (Liu és mtsai, 2012).

Ubiquitin-mediált mitofágia Receptor-mediált mitofágia



7. ábra Mitofágia

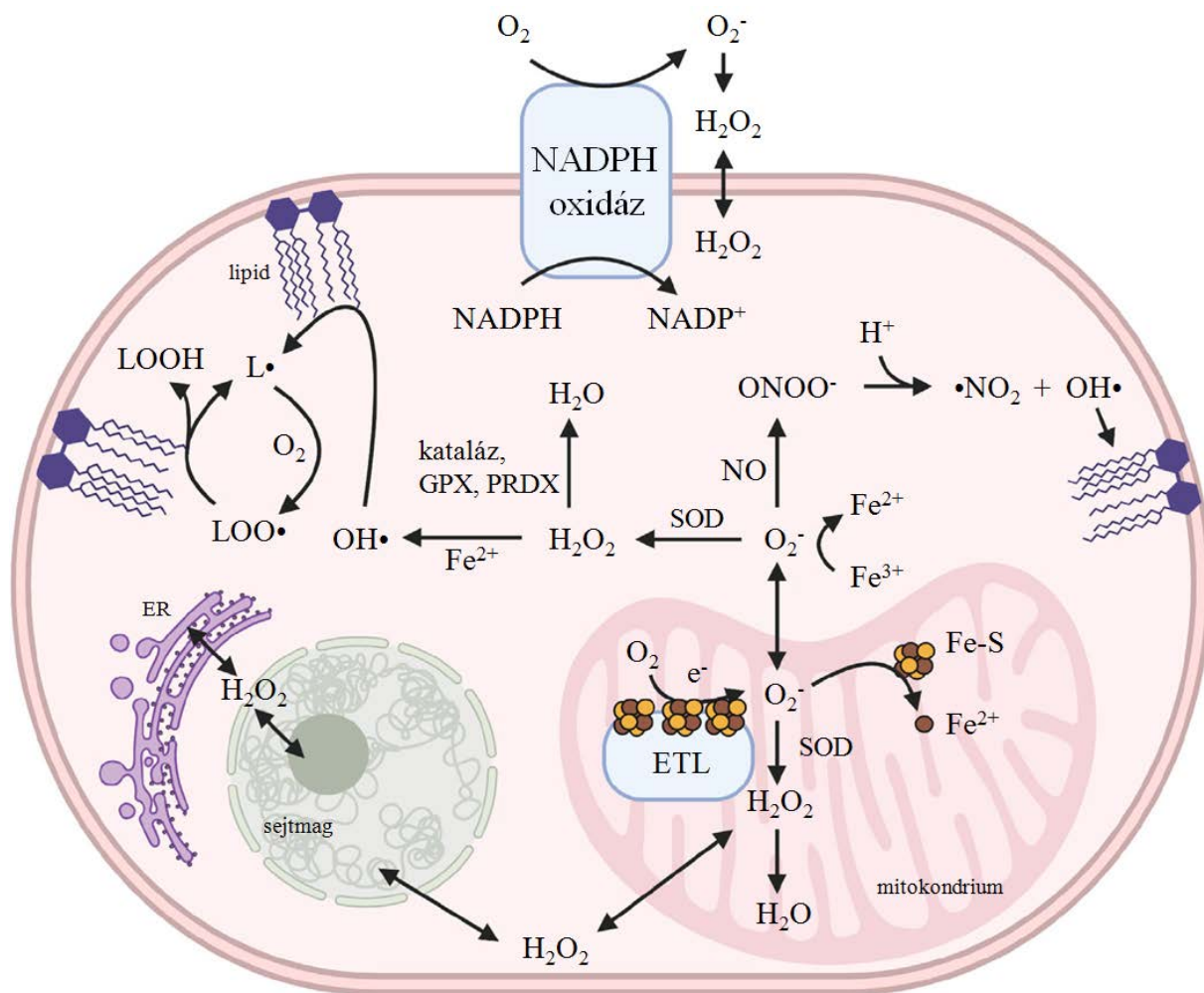
Az ubiquitin-mediált mitofágia a mitokondriális membránpotenciál megváltozásakor vagy a mitokondrium sérülése során lép fel. A Pink1 kináz feldúsul a külső mitokondriális membránban, majd a Parkin fehérjét és ubiquitineket foszforilálva indítja be a folyamatot. A receptor-mediált mitofágia olyan receptorok (Nix, FUNDC1, Bnip3) közvetítésével zajlik, melyek a külső mitokondriális membránban megjelenve kapcsolatot biztosítanak a fagofóron lévő LC3 fehérjével. A fagofórral körülvett mitokondrium, a mitofagoszóma lizoszómával fúzionál és megtörténik a mitokondrium szelektív lebontása (Cai és Jeong, 2020 után módosítva).

2.3.2.3. A mitokondriális ROS-termelés

A reaktív oxigén központú vegyületek nagy reakciókészséggel rendelkező oxigéntartalmú molekulák, melyek között gyökös és nem-gyökös termékeket is találunk. A szabadgyökök olyan atomok, ionok vagy molekulák, melyek egy vagy több párosítatlan elektronnal rendelkeznek. A sejtekben *in vivo* keletkező reaktív oxigén származékok a következők: szuperoxid anion (O_2^-), szinglet oxigén (1O_2), hidroxilgyök (OH^\bullet), peroxinitrit ($ONOO^-$), hidrogén-peroxid (H_2O_2). A reaktív oxigén termékek fontos szerepet töltenek be a sejtmetabolizmusban, hírvivő molekulaként szerepük van szignáltranszdukciós folyamatokban, illetve szabályozó funkciójuk is lehet (Harris és DeNicola, 2020).

A mitokondriumok felelősek a sejtekben keletkező szabadgyökök 90%-áért, de a sejtekben nem csak a mitokondriumok lehetnek endogén ROS-források: az endoplazmatikus retikulumban (ER) a fehérjék poszttranszlációs módosítása közben, a diszulfid hidak képződésénél, illetve a peroxiszómákban is termelődhetnek, emellett a NADPH-oxidázok is termelhetnek szabadgyököket. A mitokondriális elektrontranszportlánc két komplexe, az I. és a III. komplex is képes O_2^- képzésre. A szuperoxid aniont a szuperoxid-dizmutázok (SOD) alakítják át H_2O_2 -dá, melyet a kataláz és a glutation-peroxidáz (GPX) enzimek vízzé redukálnak. A funkciójukat vesztett mitokondriumokban az ATP-termelést ATP hidrolízis váltja fel, mely megnövekedett oxidatív stresszt indukál és ezen keresztül fehérje módosításokhoz, lipidperoxidációhoz és DNS károsodáshoz vezet (Harris és DeNicola, 2020).

A sejtekben endogén antioxidáns rendszer csökkenti a ROS-szintet, melynek tagjai olyan enzimek vagy kofaktorok, melyek részt vesznek a szabadgyökök eliminálásában. A glutation (GSH) a glutation-peroxidáz és a glutation-S-transzferáz enzimek kofaktoraként, míg a szulfiredoxin és a tioredoxin a peroxiredoxin (PRDX) enzimek regenerálásával segíti a szabadgyökszint mérséklését (Margis és mtsai, 2008; Lu és Holmgren, 2014) (**8. ábra**).



8. ábra Intracelluláris ROS-források

A NADPH-oxidáz és a mitokondriális elektrontranszportlánc (ETL) működése révén szuperoxid anion keletkezik (O_2^-), melyet a szuperoxid-dizmutáz (SOD) enzimek alakítanak át H_2O_2 -dá. A H_2O_2 a citoszólban peroxidázok (kataláz, glutation-peroxidáz (GPX), peroxiredoxin (PRDX)) által vízzé redukálódik. A O_2^- a NO-al peroxinitritet ($ONOO^-$) képez. A hidroxilgyök ($OH\cdot$) lipidekkel reagálva lipid gyököket ($L\cdot$) hoz létre, melyek oxigénnel (O_2) lipidperoxid gyököket ($LOO\cdot$) alakítanak ki. A $LOO\cdot$ a lipidekkel reagálva újra $L\cdot$ -t hoz létre (Harris és DeNicola, 2020 után módosítva).

III. Célkitűzések

A PARP-2 enzim metabolizmusban betöltött szerepéről szeretnénk kiterjeszteni ismereteinket az egyik legfontosabb intracelluláris degradáló folyamat, az autofágia irányában. A kapcsolat felderítésének érdekében munkánk során az alábbi célokat tűztük ki:

1. A PARP-2 hiány hatására az autofágiában fellépő változások vizsgálata.
2. Az autofágia szabályozásában részt vevő energiaszenzorok aktivitás változásának tanulmányozása PARP-2 csendesítés hatására.
3. A PARP-2 hiányában fellépő megnövekedett SIRT1 aktiváció autofágiára kifejtett hatásainak vizsgálata.

A PARP-2 szerepet játszik a mitokondriális homeosztázis szabályozásában. Célul tűztük ki az erre vonatkozó ismereteink szélesítését. Ennek megfelelően a főbb céljaink a következők voltak:

1. A PARP-2 hiánya által kiváltott mitokondriális morfológiai változások vizsgálata.
2. A PARP-2 csendesítés hatására megjelenő oxidatív stressz folyamatok tanulmányozása.
3. A PARP-1 és a PARP-3 enzimek mitokondriális hatásainak vizsgálata.

IV. Anyagok és módszerek

4.1. Anyagok

Kísérleteink során a **2. táblázat**ban található anyagokat használtuk, jelölve az anyagok alkalmazott koncentrációját és az inkubáció idejét.

Anyag	Gyártó	Katalógusszám	Alkalmazott koncentráció	Inkubáció ideje
AICAR	Santa Cruz Biotechnology	sc-200659A	1 mM	24 óra
EX-527	Selleckchem	S1541	25 μ M	24 óra
GSH	Sigma-Aldrich	G4251	5 mM	48 óra
chloroquine	Sigma-Aldrich	C6628	25 μ M	2 óra
MitoTEMPO	Sigma-Aldrich	SML0737	10 μ M	48 óra
NAC	Sigma-Aldrich	A7250	5 mM	48 óra
NR	ChromaDex	-	500 μ M	24 óra
olaparib	Selleckchem	S1060	1 μ M	24 óra
PJ34	Sigma-Aldrich	P4365	3 μ M	24 óra
rapamycin	Cayman Chemical	13346	20 nM	24 óra
rezveratrol	Sigma-Aldrich	R5010	50 μ M	24 óra

2. táblázat Kísérleteink során alkalmazott anyagok

4.2. Sejttenyésztés

A C2C12 egér mioblaszt sejteket 4500 mg/l glükóz tartalmú DMEM médiumban (*Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, D6429*) tenyésztettük, melyet 10% FBS-sel, 2 mM L-glutaminnal és 1% penicillin/sztreptomicinnel egészítettünk ki.

A HepG2 humán hepatokarcinóma sejteket 1000 mg/l glükóz tartalmú DMEM médiumban (*Sigma-Aldrich, D5546*) tartottuk fenn 10% FBS, 2 mM L-glutamin és 1% penicillin/sztreptomicin jelenlétében.

A C2C12 és a HepG2 sejtvonalakban munkacsoportunk korábban elvégezte shRNS technikával a PARP-2 gén csendesítését, melyet a C2C12 sejtek esetén 2,5 μ g/ml puromycin (*Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA, A1113803*) szelekcióval tartottunk fenn (Bai és

mtsai, 2011), míg a HepG2 sejtek tenyésztése során 0,25 µg/ml puromycint alkalmaztunk (Szanto és mtsai, 2014). A csendesítés során létrehozott PARP-2 csendesített sejteket shPARP2 névvel, míg a kontroll, nem-specifikus szekvenciát tartalmazó sejteket, scPARP2-ként jelöltük. A csendesítés tartósságát adott időközönként mRNS- és fehérjeszinten ellenőriztük reverz transzkripció-kapcsolt kvantitatív PCR (RT-qPCR) és Western blot módszerekkel.

A MEF sejteket egy előző projekt keretein belül munkacsoportunk preparálta PARP-2 knockout (PARP-2^{-/-}) és vad típusú (PARP-2^{+/+}) egér embriókból (Bai és mtsai, 2007). A sejteket 4500 mg/l glükóz tartalmú DMEM médiumban tartottuk fenn, a médiumot 20% FBS-sel, 2 mM L-glutaminnal és 1% penicillin/sztreptomocinnal kiegészítve.

A sejteket a tenyésztés során 37°C-on 5% CO₂ tartalom mellett tenyésztettük sejttenyésztő inkubátorban. A különböző kísérletek során alkalmazott sejtvonalak és anyagok minden esetben az ábrafeliratokban vannak feltüntetve.

4.3. Géncsendesítés

A siRNS általi tranziens géncsendesítést a PARP-2 gén esetében a C2C12 sejteken, míg a SIRT1, a PARP-1 és a PARP-3 gének esetén a scPARP2 és shPARP2 C2C12 sejteken végeztük.

A kísérleteink során használt, a PARP-2 gént (4390771), a SIRT1 gént (4390771, *siRNS azonosító: s96766*), a PARP-1 gént (4390771), illetve a PARP-3 gént (4390771) célzó siRNS-eket, valamint a negatív kontroll siRNS-t (4390843) a *Thermo Fisher Scientific* cégtől rendeltük. A PARP-2 (*siRNS azonosító: s62056, s62057, s62058*), a PARP-1 (*siRNS azonosító: s62053, s62054, s62055*) és a PARP-3 (*siRNS azonosító: s108205, s108206, s108207*) gének csendesítése során 3 különböző szekvenciával rendelkező siRNS-t használtunk, melyeket az ábrákon #1, #2, illetve #3 névvel jelöltünk. Minden kísérlet során alkalmaztunk nem transzfektált, kontroll sejteket, illetve negatív kontroll siRNS-sel transzfektált sejteket is.

A transzfekció előtti napon egy 24 lyukú tenyésztőedénybe szélesztettük a sejteket, majd másnap 30 nM végkoncentrációjú siRNS-sel transzfektáltuk őket Lipofectamine™ RNAiMax transzfekciós reagens (*Invitrogen, Carlsbad, USA, 13778075*) segítségével. A

sejteket 48 óráig inkubáltuk a transzfekciós eleggyel. A csendesítés sikerességét mRNS- és fehérjeszinten RT-qPCR és Western blot technikával ellenőriztük.

4.4. Sejtproliferáció vizsgálata

A sejtek proliferációjának vizsgálata során a fehérjék bázikus aminosav oldalláncaihoz kötődő szulforodamin B festéssel (SRB) kolorimetriás mérést végeztünk. A sejteket 96 lyukú tenyésztőedénybe szélesztettük, majd az ábrafeliratban feltüntetett anyagokkal kezeltük. A kezelési idő letelte után először 50% TCA-val 1 órán keresztül fixáltuk, majd 0,4% szulforodamin B oldattal 10 percig inkubáltuk a sejteket. A nem-kötődött festéket 1% ecetsavval történő mosási lépések során távolítottuk el, majd a kötött festéket 10 mM Tris bázisban oldottuk fel és az abszorbanciát spektrofotométer (*Thermo Fisher Scientific*) segítségével 540 nm-en detektáltuk (Fodor és mtsai, 2016).

4.5. Sejthalál vizsgálata

Az apoptotikus és a nekrotikus sejtek elkülönítése FITC Annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit (*Invitrogen, V13242*) segítségével történt. A sejteket 6 lyukú sejttenyésztő edénybe szélesztettük a kezelés előtti napon, majd a kezelési idő letelte után centrifugával összegyűjtöttük és 5 µl FITC Annexin V–100 µg/ml propidium-jodid festékekkel jelöltük őket 15 percen keresztül. A fluoreszcenciát FACSCalibur™ áramlási citométer (*Becton Dickinson Biosciences, San Jose, USA*) segítségével detektáltuk, majd az adatokat BD CellQuest Pro™ szoftverrel (*Becton Dickinson Biosciences*) értékeltük.

4.6. Konfokális mikroszkópia

Mintáink konfokális mikroszkóppal történő elemzése során Leica TCS SP8 konfokális mikroszkópot (*Leica, Wetzlar, Németország*) használtunk LAS X szoftverrel (*Leica*). A mikroszkópos képek kiértékelését ImageJ szoftverrel (*National Institutes of Health*) végeztük. A sejtekben lévő LC3 foltok számát Yoshii és Mizushima szerint határoztuk meg (Yoshii és Mizushima, 2017). A mitokondriumok morfológiai elemzése során az ImageJ szoftver Mito-Morphology makrójával dolgoztunk, mely mérés során a sejt mitokondriális tartalmát, a

mitokondriumok területét és cirkularitását, illetve a form faktort határoztuk meg. A form faktor a mitokondriális területből és kerületből számolt mérőszám, mely legjobban jellemzi a fragmentáció mértékét (Dagda és mtsai, 2009). A kolokalizációs vizsgálatokhoz a szoftver EzColocalization plugin-jét használtuk a Pearson-féle korrelációs együtthatót alkalmazva (Stauffer és mtsai, 2018).

4.6.1. Mitokondriális hálózat tanulmányozása

A mitokondriumok vizsgálatára MitoTracker™ Red CMXRos (Invitrogen, M7512) fluoreszcens festéket alkalmaztunk, mely képes az organellumban akkumulálódni (Chazotte, 2011). A sejteket 24 lyukú tenyésztőedénybe kör alakú fedőlemezre szélesztettük, majd másnap az ábrafeliratban feltüntetett anyagokkal kezeltük vagy siRNS-ekkel transzfektáltuk. A kezelés/ transzfekció letelte után a sejteket 100 nM végkoncentrációjú MitoTracker™ Red CMXRos festékkel jelöltük 20 percen keresztül, majd a lemezeket PBS-sel mostuk és 4% paraformaldehiddel fixáltuk.

4.6.2. Savas pH-jú organellumok vizsgálata

A sejtekben található savas pH-val rendelkező organellumok (lizoszómák, autolizoszómák) tanulmányozására LysoTracker™ Deep Red (Invitrogen, L12492) fluoreszcens festéket használtunk, mely az organellumba való bekerülés után protonálódva halmozódik fel (Chikte és mtsai, 2014; Yoshii és Mizushima, 2017). A sejteket 24 lyukú tenyésztőedénybe kör alakú fedőlemezre növesztettük, majd 50 nM végkoncentrációjú LysoTracker™ Deep Red festékkel jelöltük 30 percen keresztül. A jelölési idő letelte után a sejteket mostuk PBS-sel, majd 4% paraformaldehiddel fixáltuk.

4.6.3. Immunfluoreszcencia

A sejteket 24 lyukú tenyésztőedénybe kör alakú fedőlemezre szélesztettük, majd másnap a feltüntetett anyagokkal kezeltük vagy siRNS-ekkel transzfektáltuk. A kezelés/ transzfekció letelte után a sejteket 4% paraformaldehiddel fixáltuk, majd 1% Triton X-100-PBS oldattal permeabilizáltuk. Minden lépés között a sejteket óvatosan mostuk PBS-sel. Ezután a lemezeket 1% BSA-PBS oldattal blokkoltuk 1 órán keresztül, majd egy éjszakán át

inkubáltuk a mintákat az elsődleges antitesttel. Másnap a mintákhoz fluorofórral jelölt másodlagos antitestet adtunk és DAPI (*Invitrogen, R37606*) segítségével jelöltük a sejtmagot.

Az immunfluoreszcens kísérleteink során használt elsődleges és másodlagos antitesteket a **3. táblázat** tartalmazza.

Antitest	Gyártó	Katalógusszám	Hígítás
LC3A/B Alexa Fluor 488 konjugált	Cell Signaling Technology	13082	1:50
TOMM20	Abcam	ab56783	1:200
anti-egér IgG Alexa Fluor 546 konjugált	Thermo Fisher Scientific	A-11003	1:1000

3. táblázat Immunfluoreszcens kísérleteink során használt elsődleges és másodlagos antitestek

4.7. Totál RNS izolálás és RT-qPCR

A sejtekből totál RNS-t TRIzol reagens (*Invitrogen, 15596018*) segítségével izoláltunk a gyártó utasításai szerint. RNS mintáink tisztaságát és mennyiségét NanoDrop™ 1000 spektrofotométerrel (*Thermo Fisher Scientific*) ellenőriztük.

A reverz transzkripció során 2 µg totál RNS-t használtunk és a reakciót High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (*Applied Biosystems, Foster City, USA, 4368814*) alkalmazásával hajtottuk végre.

A reverz transzkripció során nyert cDNS mintáinkat tízszeresére hígítva használtuk fel a qPCR reakcióban, mely során qPCRBIO SyGreen Mix Lo-ROX-ot (*PCR Biosystems Ltd, London, Egyesült Királyság, PB20.11-05*) használtunk. A mérést LightCycler 480 Real-Time PCR (*Roche Applied Science, Basel, Svájc*) készülékkel végeztük. A vizsgált gének expresszióját háztartási gének (36B4 és ciklofilin) expressziójának átlagához viszonyítottuk.

A primerpárok szekvenciáinak a tervezéséhez a Primer3 szoftvert (<https://primer3.ut.ee/>) használtuk, míg az ellenőrzésüket az OligoAnalyzer™ programmal (<https://eu.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>) végeztük. A primerek specificitásának ellenőrzése a BLASTN program segítségével (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) történt. A mérés során használt primerek szekvenciái a **4. táblázatban** láthatók.

Gén neve	Primerek
Cox17	5'-CGTGATGCGTGCATCATTGA-3' 5'-CATTCAAAAGTAGGCCACC-3'
Cyt C	5'-TCCATCAGGGTATCCTCTCC-3' 5'-GGAGGCAAGCATAAGACTGG-3'
Drp1	5'-TCGAGTCCCCATTCATTGCAGT-3' 5'-GAAGAAGGTCCCTGCCACTAG-3'
Fis1	5'-CTGGACTCATTGGACTGGCTGT-3' 5'-AGAGGTAGACTACAGGGGTGCA-3'
Mfn1	5'-GGTCCTGCAATCACTCTGTCCT-3' 5'-CCCATTTCACCCCTTCAGACCT-3'
Mfn2	5'-GTGATCAGGTTTCAGCGTCCTCT-3' 5'-CCACTCCTCCGACCACAAGAAT-3'
Ndufa2	5'-GCACACATTTCCCCACACTG-3' 5'-CCCAACCTGCCATTCTGAT-3'
Ndufb3	5'-TACCACAAACGCAGCAAACC-3' 5'-AAGGGACGCCATTAGAAACG-3'
Ndufb5	5'-CTTCGAACTTCTGCTCCTT-3' 5'-GGCCCTGAAAAGAAGTACG-3'
Nox4	5'-GCAGATTTACTCTGTGTGTTGCAT-3' 5'-TCCCATCTGTTTACTGAGGT-3'
Opa1	5'-ATTGTGTGCTCTCAGTCAGGCT-3' 5'-ACTTTCCCTGACGCCTAGTTC-3'
Parkin	5'-AAATGCATCTGGAGGGGACGAA-3' 5'-TAACTGGACCTCTGGCTGCTTC-3'
Parp-1	5'-GGAGCTGCTCATCTTCAACC-3' 5'-GCAGTGACATCCCAGTACA-3'
Parp-2	5'-GGAAGGCGAGTGCTAAATGAA-3' 5'-AAGGTCTTCACAGAGTCTCGATTG-3'
Parp-3	5'-CCTGCTGATAATCGGGTCAT-3' 5'-TTGTTGTTGTTGCCGATGTT-3'
Pink1	5'-GGGAAGAACAGCCTTGAACAGC-3' 5'-GCAAAGTTCAGTGTTGGCCTCA-3'
Sirt1	5'-TGTGAAGTTACTGCAGGAGTGAAA-3' 5'-GCATAGATACCGTCTCTTGATCTGAA-3'
Ciklofilin	5'-TGGAGAGCACCAAGACAGACA-3' 5'-TGCCGGAGTCGACAATGAT-3'
36B4	5'-AGATTCGGGATATGCTGTTGG-3' 5'-AAAGCCTGGAAGAAGGAGGTC-3'

4. táblázat A RT-qPCR analízishez használt primerpárok szekvenciái

4.8. Celluláris ATP koncentráció meghatározása

A celluláris ATP szint meghatározását fluorimetriás méréssel ATP Assay Kit (*Sigma-Aldrich, MAK190*) segítségével végeztük. A sejteket 6 lyukú sejttenyésztő edényben növesztettük, majd a feltüntetett anyagokkal kezeltük. A kezelési idő után a sejteket centrifugálással összegyűjtöttük, ATP Assay Buffer-ben lizáltuk és a fluoreszcenciát 96 lyukú feketefalú tenyésztőedényben detektáltuk Spark 20M fluoriméter (*Tecan Life Sciences, Männedorf, Svájc*) segítségével. A mért fluoreszcencia alapján meghatároztuk mintáink ATP tartalmát, melyet a fehérjetartalomra normalizáltunk, majd a normalizált értékeket ábrázoltuk.

4.9. SDS-PAGE és Western blot

A sejteket először PBS-el mostuk, centrifugálással összegyűjtöttük, majd lízis pufferben (50 mM Tris, pH 8, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0,5% dezoxikólsav, 0,1% SDS, 1 mM EDTA, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM NaF, 1 mM PMSF, proteáz gátló koktél) lizáltuk. Mintáink fehérjetartalmát Pierce™ BCA Protein Assay Kit (*Thermo Fisher Scientific*) alkalmazásával határoztuk meg, majd 2-merkaptóetanollal és 5xSDS mintapufferrel (310 mM Tris-HCl, pH 6,8, 50% glicerin, 10% SDS, 100 mM DTT, 0,01% brómfenolkék) 10 perc alatt 100°C-on felfőztük őket.

Fehérjemintáinkat 8% poliakrilamid gélen méret szerint elválasztottuk, majd nitrocellulóz membránra transzferáltuk. A membránokat 5% BSA-TBS_{Tween} oldattal 1 órán keresztül blokkoltuk, ezt követően az elsődleges antitesttel jelöltük egy éjszakán keresztül. Másnap a TBS_{Tween} oldattal történő mosási lépések után az elsődleges antitestre specifikus peroxidáz-konjugált másodlagos antitesttel inkubáltuk a membránokat, majd kemilumineszcens reakcióval láthatóvá tettük a sávokat ChemiDoc™ Touch rendszer (*Bio-Rad, Hercules, USA*) segítségével. A sávok intenzitását ImageJ szoftverrel határoztuk meg, majd statisztikai módszerekkel értékeltük ki.

A Western blot kísérleteink során alkalmazott elsődleges és másodlagos antitestek listáját az **5. táblázat** tartalmazza.

Antitest	Gyártó	Katalógusszám	Alkalmazott hígítás
Akt	Cell Signaling Technology	9272	1:1000
AMPK α	Cell Signaling Technology	5832	1:1000
iNOS	Novus Biologicals	NB300-605	1:1000
LC3A/B	Cell Signaling Technology	12741	1:1000
NTyr	Millipore	06-284	1:1000
OPA1	Thermo Fisher Scientific	MA5-16149	1:1000
Parkin	Thermo Fisher Scientific	PA5-13399	1:1000
PARP1	Cell Signaling Technology	9532	1:2000
PARP2	Enzo Life Sciences	ALX-210-899	1:2000
PARP3	Novus Biologicals	NBP1-31415	1:1000
PAR	Sigma-Aldrich	MABC547	1:1000
Foszfo-Akt (Ser473)	Cell Signaling Technology	4060	1:1000
Foszfo-AMPK α (Thr172)	Cell Signaling Technology	2535	1:1000
Foszfo-p70 S6 Kináz (Thr389)	Cell Signaling Technology	9205	1:1000
PINK1	Novus Biologicals	BC100-494	1:1000
SIRT1	Millipore	07-131	1:1000
S6 Kináz	Sigma-Aldrich	SAB4502691	1:1000
4HNE	Abcam	ab46545	1:1000
Anti-egér IgG HRP-konjugált	Sigma-Aldrich	A9044	1:2000
Anti-nyúl IgG HRP-konjugált	Cell Signaling Technology	7074	1:2000
Anti- β -aktin-Peroxidáz	Sigma-Aldrich	A3854	1:20000

5. táblázat Western blot kísérleteink során használt elsődleges és másodlagos antitestek

4.10. Szuperoxid-termelés mérése

A sejtek szuperoxid-termelését hidroetidin (HE) (*Sigma-Aldrich, D7008*) festéssel határoztuk meg, mely a citoszólban való oxidálódása után képes interkalálódni a sejtmagi DNS-be. A mérés előtti napon a sejteket 6 lyukú tenyésztőedénybe szélesztettük, majd a következő napon a sejteket centrifugával összegyűjtöttük és 2,5 µM hidroetidinnel jelöltük 30 percen keresztül. A fluoreszcenciát FACSCalibur™ áramlási citométerrel (*Becton Dickinson Biosciences*) detektáltuk, míg az adatokat BD CellQuest Pro™ szoftverrel (*Becton Dickinson Biosciences*) elemeztük ki (Hegedus és mtsai, 2021).

4.11. A lipidperoxidáció vizsgálata

A lipidperoxidáció mértékét a melondialdehiddel reagáló tiobarbitursav mennyiségének képződésével, illetve a 4HNE-módosított fehérjék Western blot módszerrel történő vizsgálatával határoztuk meg, hasonlóan, mint Kovács és munkatársai (Kovacs és mtsai, 2019). A TBARS méréshez a sejteket 75 cm²-es sejtenyésző flaskákba szélesztettük, majd másnap PBS-sel mostuk és centrifugálással összegyűjtöttük őket. A sejtperlethez 8,1% SDS-t, 20% ecetsavat, 0,8% tiobarbitursavat (*Sigma-Aldrich, T5500*) és desztillált vizet tartalmazó oldatot adtunk és 1 órán keresztül 95°C-on melegítettük őket. Ezután a mintákat lehűtöttük, centrifugáltuk, majd a felülúszó abszorbanciáját spektrofotométerrel (*Thermo Fisher Scientific*) 530 nm-en lemértük. A lipidperoxidáció mértékét a sejtszámra normalizáltuk és ezeket a normalizált értékeket ábrázoltuk.

4.12. Az oxigénfogyasztás meghatározása

A sejtek oxigénfogyasztását Seahorse XF96 Flux Analyzer oximéterrel (*Agilent Technologies, Santa Clara, USA*) határoztuk meg. A sejteket a próbához tervezett 96 lyukú tenyésztőedényekbe szélesztettük és a megfelelő anyagokkal kezeltük. A mérés során először az oxigénfogyasztás alapértékét rögzítettük, majd 50 µM etomoxir (*Sigma-Aldrich, E1905*) hozzáadása után a szabad zsírsav oxidációt határoztuk meg. A kapott adatokat BCA méréssel történő fehérjetartalomra normalizáltuk és ábrázoltuk.

4.13. Elektronmikroszkópia

Vizsgálataink során a scPARP2 és shPARP2 C2C12, valamint a scPARP2 és shPARP2 HepG2 sejtek ultrastruktúráját tanulmányoztuk elektronmikroszkóppal.

A sejteket először centrifugálással összegyűjtöttük, majd 3% glutáraldehiddel fixáltuk, mely 0,1 M kakodilát pufferben volt oldva és 5% szacharózt tartalmazott. Kakodilát pufferrel történő mosási lépés után a mintáinkat poszt-fixáltuk 1% ozmium-tetroxiddal, majd felszálló alkoholsorban dehidráltuk őket és a preparátumot Durcupan™ ACM műgyantába (*Sigma-Aldrich*) ágyasztuk. Ultravékony szeleteket készítettünk Leica Ultracut UCT ultramikrotóm (*Leica*) segítségével, majd a metszeteket formvar hártyával bevont mikrorostélyokra helyeztük és uranil-acetáttal, illetve Reynolds-féle ólom-citráttal jelöltük. A metszeteket JEOL 1010 transzmissziós elektronmikroszkóppal (*JEOL, Tokió, Japán*) vizsgáltuk.

Az elektronmikroszkópos képek kiértékelése során ImageJ szoftvert használtunk és minden csoportból minimum 45 sejtet elemeztünk ki.

4.14. Statisztikai analízis

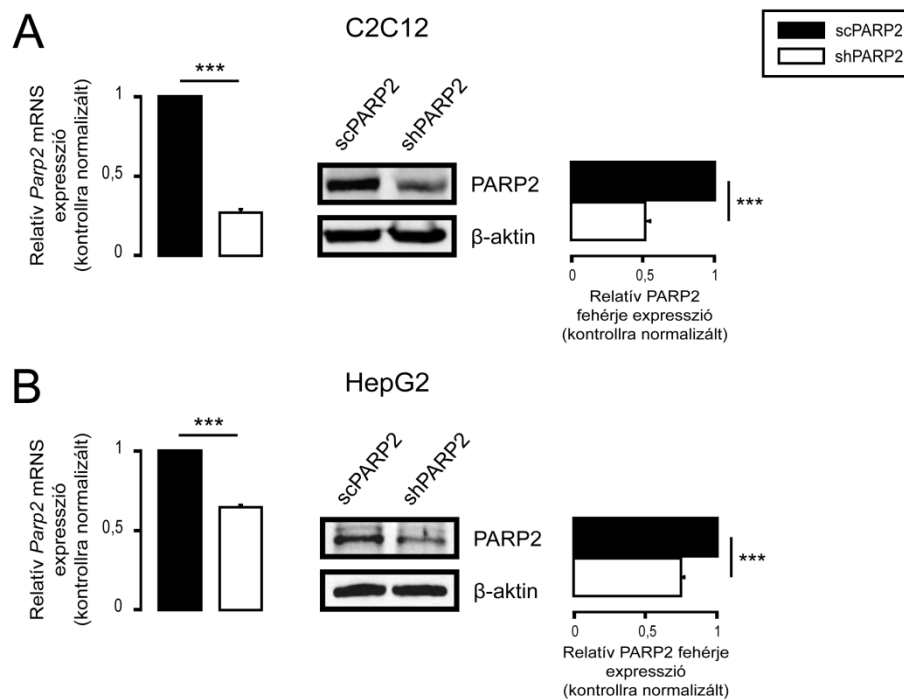
Az adatok statisztikai kiértékelése során Prism szoftvert (*GraphPad Software, San Diego, USA*) használtunk. A statisztikai analízist az adatok normalitásvizsgálatával kezdtük. Két csoport statisztikai összehasonlításánál kétmintás t-próbát alkalmaztunk. Több csoport összehasonlításánál egyutas ANOVA statisztikai tesztet használtunk, melyet az összes lehetséges kombináció összehasonlításánál Tukey-féle poszt-hoc teszt, míg egy választott csoporthoz való hasonlítás során Dunnett-féle poszt-hoc teszt követett.

Az adatokat átlag \pm SEM formájában adtuk meg. A kísérletek biológiai replikációjának számát az ábrafeliratokban n számmal jelöltük. A szignifikancia szintjét (p érték) minden esetben feltüntettük az ábrafeliratban.

V. Eredmények

5.1. A modell sejtvonalak validálása

Kísérleteink során C2C12 egér mioblaszt és HepG2 humán hepatokarcinóma sejteket használtunk, melyekben munkacsoportunk korábban elvégezte a PARP-2 gén csendesítését shRNS technikával (Bai és mtsai, 2011; Szanto és mtsai, 2014). Az így létrehozott PARP-2 csendesített sejteket shPARP2-ként, míg a nem-specifikus szekvenciát tartalmazó kontroll sejteket scPARP2-ként jelöltük. A csendesítés meglétét mRNS- és fehérjeszinten RT-qPCR és Western blot technikákkal ellenőriztük (9. ábra).



9. ábra A kísérleteink során használt modell sejtvonalak validálása

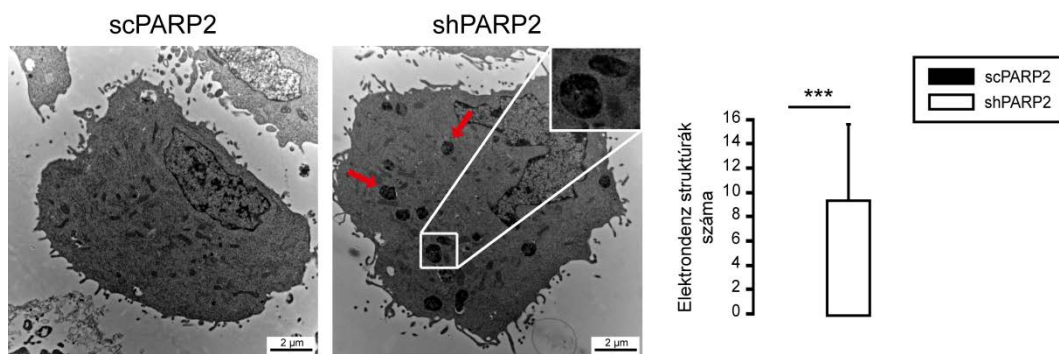
A PARP-2 mRNS- és fehérjeszintű expresszióját a scPARP2 és shPARP2 C2C12 sejtek (A), illetve a scPARP2 és shPARP2 HepG2 sejtek (B) esetén RT-qPCR ($n=3$) és Western blot ($n=3$) módszerekkel határoztuk meg. Az ábrán reprezentatív Western blot képek, illetve 3 független kísérletből származó denzitometriás kiértékelésük láthatók. Az adatok átlag \pm SEM formában vannak feltüntetve. A statisztikai szignifikanciát kétmintás t-próbával határoztuk meg. A *** statisztikai szignifikanciát jelez a scPARP2 és shPARP2 sejtek között, ahol $p < 0,001$.

5.2. A PARP-2 csendesítés gátolja az autofágiát

5.2.1. A PARP-2 csendesítés gátolja az autofágiát immortalizált mioblaszt sejtekben

Az egyik legfontosabb intracelluláris degradáló folyamat, az autofágia és a PARP-2 kapcsolata eddig felderítetlen terület, így munkánk első felében ezen kapcsolat feltérképezését tűztük ki célul.

A kontroll és PARP-2 csendesített C2C12 mioblaszt sejteket először elektronmikroszkópos technikával tanulmányoztuk, mely során a sejtek ultrastruktúráját vizsgáltuk (Eskelinen és mtsai, 2011; Yoshii és Mizushima, 2017). Az elektronmikroszkóppal készült felvételeket elemezve azt tapasztaltuk, hogy a PARP-2 csendesített sejtekben citoszólikus elektrondenz struktúrák jelennek meg, mely struktúrákat az autofágiában jártas kutatók késői autofág vezikulumoknak vélelmezték (**10. ábra**).

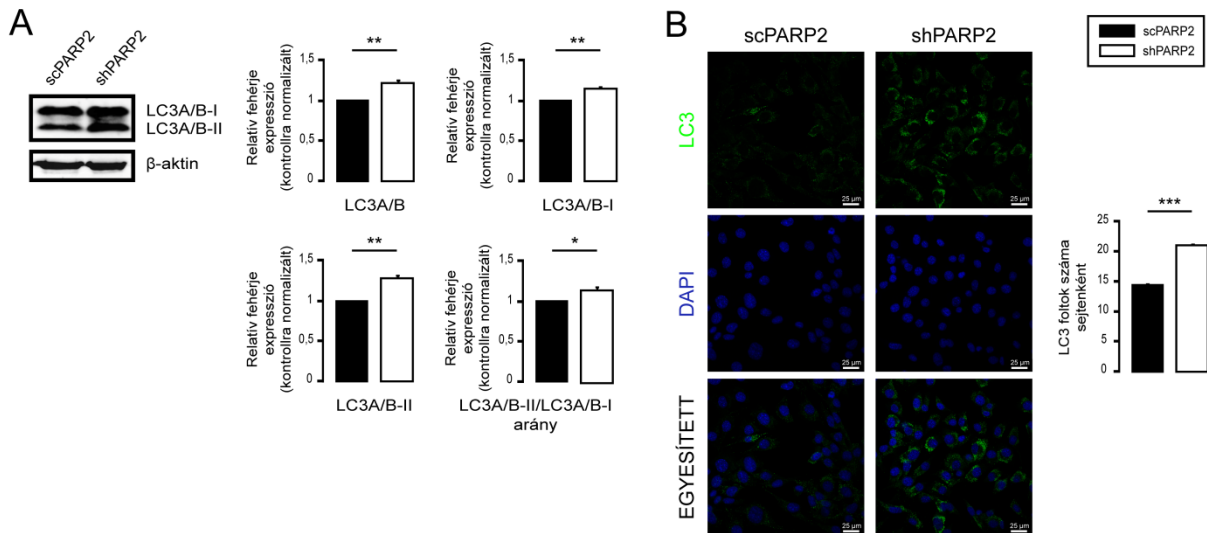


10. ábra Elektrondenz struktúrák megjelenése PARP-2 csendesített sejtekben

A scPARP2 és shPARP2 C2C12 sejteket elektronmikroszkóppal ($n=1$, vizsgált sejttség: 50/50) tanulmányoztuk. Az ábrán reprezentatív elektronmikroszkóppal készült felvételek, illetve a hozzá társuló kiértékelés látható. A piros nyilak és a kiemelt terület elektrondenz struktúrákat szemléltetnek PARP-2 csendesített sejtekben. A citoszólikus elektrondenz struktúrákat megszámoztuk, majd ábrázoltuk. Az adatok átlag \pm SD formában vannak feltüntetve. A statisztikai szignifikanciát kétmintás t-próbával határoztuk meg. A *** statisztikai szignifikanciát jelez a scPARP2 és shPARP2 C2C12 sejtek között, ahol $p < 0,001$.

Annak érdekében, hogy megerősítsük, hogy az elektronmikroszkópos felvételeken látott elektrondenz struktúrák autofág természetűek, tanulmányoztuk egy jól ismert és széles körben alkalmazott autofágia marker, a LC3 fehérje expresszióját (Klionsky és mtsai, 2016). A LC3 fehérje az ubiquitin-szerű konjugációs rendszer tagjaként hozzájárul az autofagoszóma kialakulásához, a fagofór mellett az autofagoszóma lizozómával történő fúziója után kialakuló autolizoszóma membránjának felszínén is megtalálható (Tanida és mtsai, 2008; Yoshii és Mizushima, 2017). A LC3 expresszióját először a scPARP2 és shPARP2 C2C12 sejtekben vizsgáltuk Western blot (**11. ábra A**) és immunfluoreszcens technikával (**11. ábra**

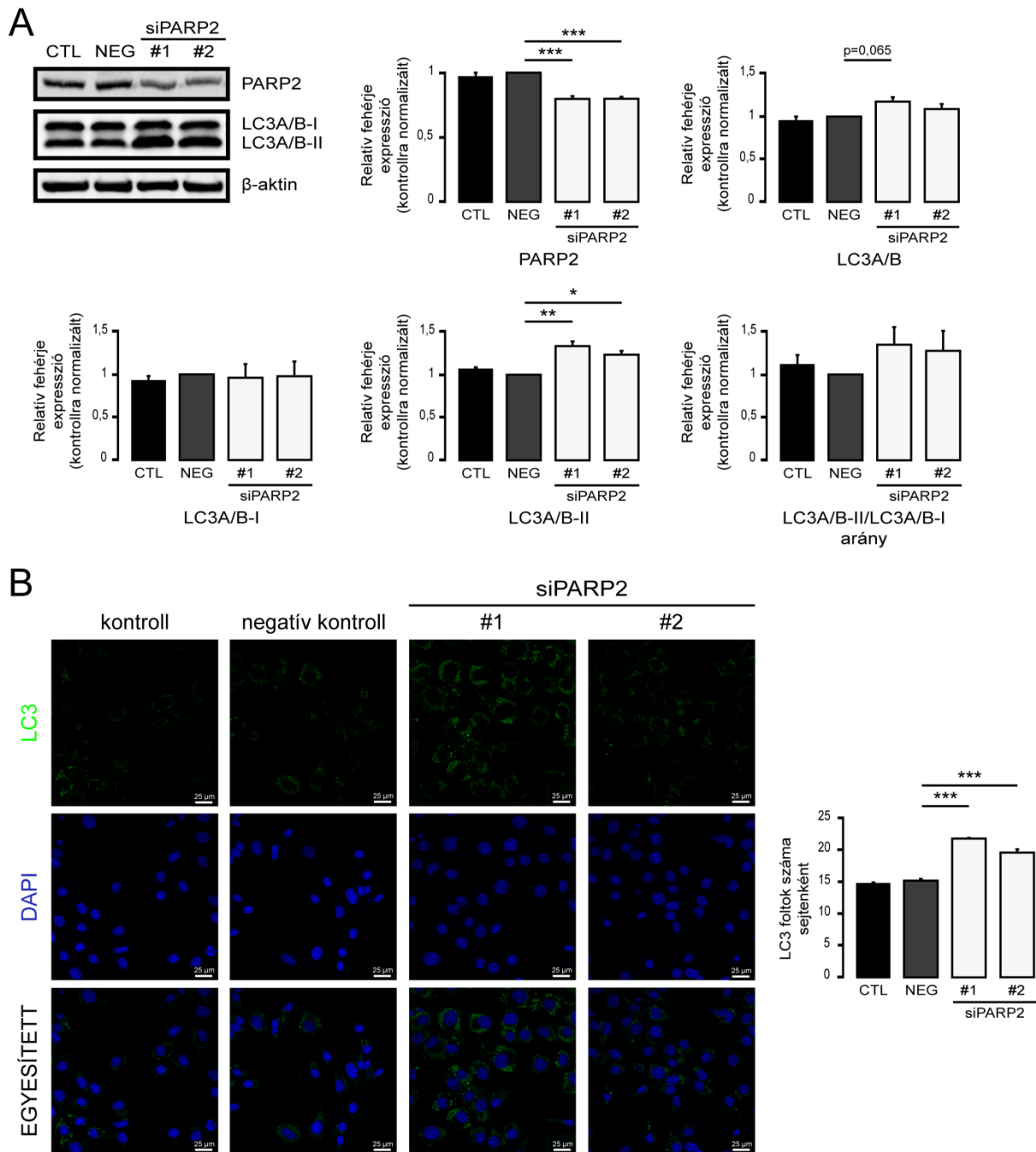
B). Fokozott LC3 expressziót detektáltunk a PARP-2 csendesített sejtekben a kontroll sejtekhez viszonyítva, emellett az immunfluoreszcens felvételeken a LC3-pozitív vezikulumok számában emelkedést tapasztaltunk. A LC3 expresszióbeli pozitív változása főként a lipidált, autofág-membrán asszociált, LC3-II formát érintette. A LC3-pozitív vezikulumok számának emelkedése az autofágia emelkedett aktivitására utal PARP-2 hiányában.



11. ábra A PARP-2 hiánya fokozza a LC3 expressziót

A LC3 fehérjeszintű expresszióját a scPARP2 és shPARP2 C2C12 sejtekben Western blot technikával ($n=3$) (A), illetve immunfluoreszcenciával ($n=3$) (B) tanulmányoztuk. A LC3-pozitív vezikulumokat Alexa Fluor 488-konjugált LC3 antitesttel, míg a sejtmagokat DAPI festéssel tettük láthatóvá. Az ábrán reprezentatív Western blot képek és konfokális mikroszkóppal készült immunfluoreszcens felvételek, illetve 3 független kísérletből származó kiértékelésük láthatók. Az adatok átlag \pm SEM formában vannak feltüntetve. A *, ** és *** statisztikai szignifikanciát jelez a scPARP2 és shPARP2 C2C12 sejtek között, ahol $p < 0,05$, $p < 0,01$, illetve $p < 0,001$.

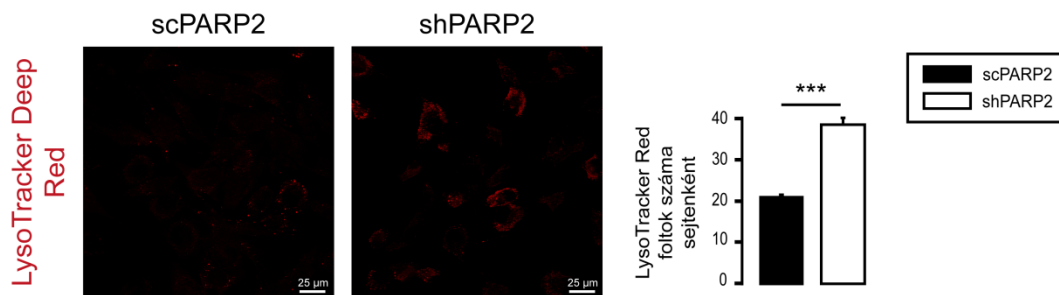
Az előző eredmények alátámasztásának céljából a LC3 expressziót olyan C2C12 sejtekben is vizsgáltuk, melyekben tranziensen csendesítettük a PARP-2 gént. Minden tranziens transzfekciót követően ellenőriztük a csendesítés sikerességét a PARP-2 fehérjeszintű expressziójának Western blot technikával történő tanulmányozásával (12. ábra A). A PARP-2 tranziensen csendesített sejtvonalban, a stabil sejtvonalhoz hasonlóan, fokozott LC3 expressziót detektáltunk Western blot módszerrel, valamint a LC3-pozitív vezikulumok számában is emelkedést tapasztaltunk az immunfluoreszcenciás kísérleteink során (12. ábra A-B).



12. ábra A PARP-2 tranzien csendesítése serkenti a LC3 expressziót

A C2C12 sejtekben a PARP-2 tranzien csendesítése során kétféle, a PARP-2 génre specifikus siRNS-t (siPARP2 #1 és #2), negatív kontroll siRNS-t (NEG) és transzfektálatlan kontroll sejteket (CTL) használtunk, majd a PARP-2 fehérjeszintű expresszióját Western blot technikával ($n=3$) (A) ellenőriztük. Ugyanezen sejtekben a LC3 fehérjeszintű expresszióját Western blot ($n=3$) segítségével (A), illetve immunfluoreszcenciával ($n=3$) (B) vizsgáltuk. A LC3-pozitív vezikulumokat Alexa Fluor 488-konjugált LC3 antitesttel, míg a sejtmagokat DAPI festéssel tettük láthatóvá. Az ábrán reprezentatív Western blot képek és konfokális mikroszkóppal készült immunfluoreszcens felvételek, illetve 3 független kísérletről származó kiértékelésük láthatók. Az adatok átlag \pm SEM formában vannak feltüntetve. A statisztikai szignifikanciát egyutas ANOVA teszttel határoztuk meg, mely során Dunnett-féle poszt-hoc tesztet alkalmaztunk. A *, ** és *** statisztikai szignifikanciát jelez a negatív kontroll és a jelölt mintacsoport között, ahol $p < 0,05$, $p < 0,01$, illetve $p < 0,001$.

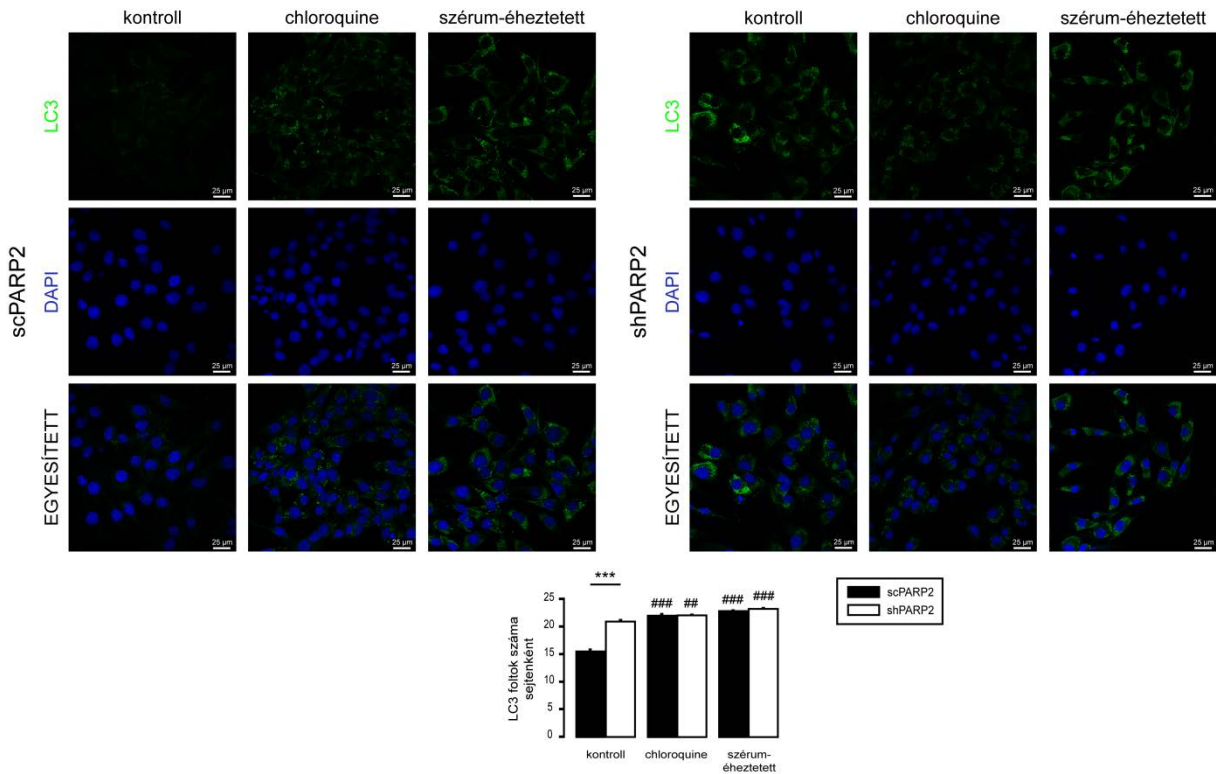
Az autofágia folyamatának konfokális mikroszkóppal történő tanulmányozásának következő lépéseként LysoTracker Deep Red fluoreszcens festékkel jelöltük a sejteket, mely festék a sejtekben található savas pH-jú organellumokban (lizoszóma, autolizoszóma) akumulálódik, így jelölve azokat (Yoshii és Mizushima, 2017). A konfokális mikroszkóppal készült felvételek kiértékelése folyamán emelkedést figyeltünk meg a LysoTracker-pozitív organellumok számában a PARP-2 csendesített sejtekben (**13. ábra**), mely a megnövekedett LC3 expresszióval összhangban ugyancsak az autofágia fokozott aktivitására utal PARP-2 hiányában.



13. ábra A PARP-2 hiány növeli a savas pH-jú organellumok számát

A savas pH-jú organellumok jelenlétét a scPARP2 és shPARP2 C2C12 sejtekben LysoTracker Deep Red fluoreszcens festékkel ($n=3$) tanulmányoztuk. Az ábrán reprezentatív konfokális mikroszkóppal készült felvételek, illetve 3 független kísérletből származó kiértékelésük láthatók. Az adatok átlag \pm SEM formában vannak feltüntetve. A statisztikai szignifikanciát kétmintás t-próbával határoztuk meg. A *** statisztikai szignifikanciát jelez a scPARP2 és shPARP2 C2C12 sejtek között, ahol $p < 0,001$.

A következő kísérletben azt tanulmányoztuk, hogy a scPARP2 és shPARP2 C2C12 sejtek hogyan reagálnak ismert, autofágiát módosítani képes anyagokkal történő kezelésre, esetleg eltérő változások tapasztalhatók-e a LC3 expressziójában a kontroll, illetve a PARP-2 csendesített sejtvonalban. A kísérlet során chloroquine-nel kezeltük, illetve szérum-éheztettük a sejteket, majd immunfluoreszcenciával vizsgáltuk a LC3-pozitív vezikulumok számának változását. Tanulmányozva a konfokális mikroszkóppal készült felvételeket megfigyeltük, hogy mind a chloroquine kezelés, mind a szérum-éheztetés fokozta a LC3 expressziót a kontroll és a PARP-2 csendesített sejtekben is. A LC3-pozitív vezikulumok száma mindkét kezelés hatására azonos szintet ért el a kontroll és a PARP-2 csendesített sejtek esetén is, a PARP-2 hiányában megfigyelhető expresszióbeli növekedés eltűnt (**14. ábra**). Ez azt sugallja, hogy a kezeletlen sejtekben zajló autofágia PARP-2 csendesítés hatására zavart szenved és elakad.



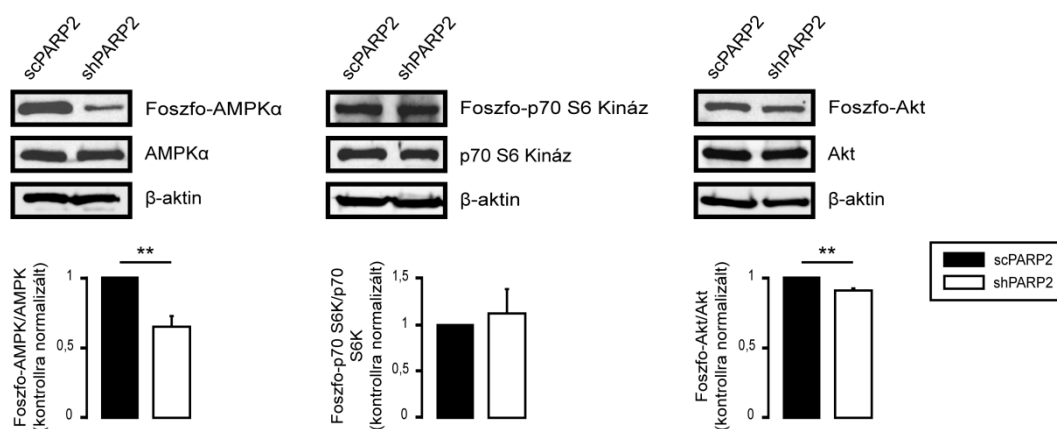
14. ábra A chloroquine kezelés és a szérum-éheztetés növeli a LC3-pozitív vezikulumok számát kontroll és PARP-2 csendesített sejtekben

A scPARP2 és shPARP2 C2C12 sejteket 2 órán keresztül 25 μ M chloroquine-nel kezeltük vagy 12 órán át szérum-éhezettük, majd a LC3 expresszióját immunfluoreszcenciával ($n=3$) vizsgáltuk. A LC3-pozitív vezikulumokat Alexa Fluor 488-konjugált LC3 antitesttel, míg a sejtmagokat DAPI festéssel tettük láthatóvá. Az ábrán reprezentatív konfokális mikroszkóppal készült felvételek, illetve 3 független kísérletből származó kiértékelésük láthatók. Az adatok átlag \pm SEM formában vannak feltüntetve. A statisztikai szignifikanciát egyutas ANOVA teszttel határoztuk meg, mely során Tukey-féle poszt-hoc tesztet alkalmaztunk. A *** statisztikai szignifikanciát jelez a scPARP2 és shPARP2 C2C12 sejtek között, ahol $p < 0,001$. A ## és ### statisztikai szignifikanciát jelöl a kontroll és a kezelt mintacsoportok között, ahol $p < 0,01$, illetve $p < 0,001$.

5.2.2. A PARP-2 hiány hatására az autofágiában fellépő zavar az AMPK gátlásától és a SIRT1 indukciójától függ

A továbbiakban azt vizsgáltuk, hogy a sejtek fő energiaszenzorai, a mTOR kináz komplexek és az AMPK, melyek a sejtek energiaellátottságát monitorozzák, hogyan változnak PARP-2 hiányában. Western blot módszerrel végzett kísérleteink alapján az AMPK expressziója nem, de foszforiláltsági állapota mérséklődött PARP-2 hiányában. Vizsgáltuk a mTORC1 és mTORC2 komplexek aktivitását az általuk szabályozott fehérjék (p70 S6 kináz és Akt) expresszióján és foszforiláltsági állapotán keresztül. A p70 S6 kináz foszforiláltságát tanulmányozva a mTORC1 aktivitásában nem detektáltunk változást a shPARP2 C2C12 sejtekben, míg az Akt kináz foszforiláltsága azt mutatta, hogy a mTORC2 komplex aktivitása

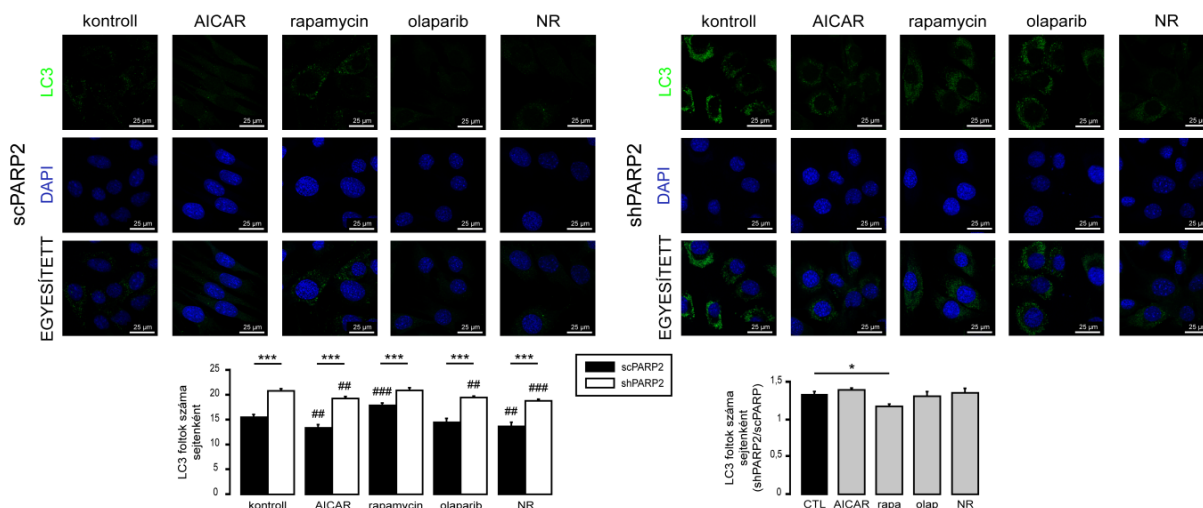
enyhén csökkent (**15. ábra**). Ezen eredmények megerősítik azon megállapításunkat, hogy PARP-2 hiányában megváltozik a sejtek energiaérzékelése, mely változás hatással lehet az autofágiára is.



15. ábra A PARP-2 hiánya módosítja a sejtek energiaérzékelését

A scPARP2 és shPARP2 C2C12 sejtekben az AMPK, a p70 S6 kináz és az Akt fehérjeszintű expresszióját és foszforiláltsági állapotát Western blot technikával ($n=3$) tanulmányoztuk. Az ábrán reprezentatív Western blot képek, illetve 3 független kísérletből származó denzitometriás kiértékelésük láthatók. Az adatok átlag \pm SEM formában vannak feltüntetve. A statisztikai szignifikanciát kétmintás t-próbával határoztuk meg. A ** statisztikai szignifikanciát jelez a scPARP2 és shPARP2 C2C12 sejtek között, ahol $p < 0,01$.

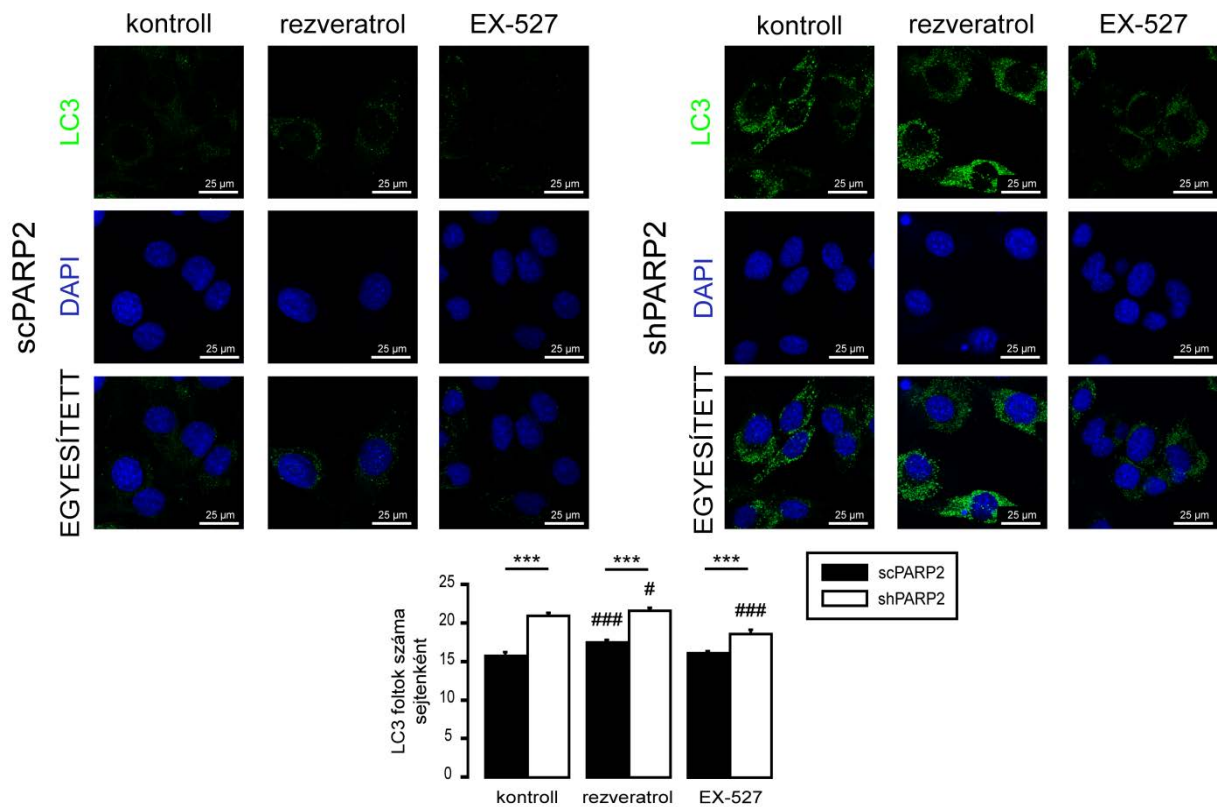
A scPARP2 és shPARP2 C2C12 sejteket az előbb említett energiaszenzorok farmakológiai modulátoraival kezelve azt tanulmányoztuk, hogy ezen modulátorok képesek-e valamilyen módon befolyásolni a PARP-2 csendesítés hatására megjelenő emelkedett LC3 expressziót. Ennek érdekében AICAR-ral, rapamycinnel, olaparibbal és NR-dal kezeltük a kontroll és a PARP-2 csendesített mioblaszt sejteket, majd vizsgáltuk a LC3 expresszió változásait. Az AICAR, mely egy AMPK aktivátor, csökkentette a LC3-pozitív vezikulumok számát a PARP-2 csendesített sejtekben a kezeletlen sejtekhez viszonyítva, míg a mTORC1 inhibitorral, rapamycinnel történő kezelés hatására a LC3 expresszióban növekedést tapasztaltunk a kontroll sejtekben, azonban a PARP-2 csendesített sejtekben megjelenő fokozott LC3 expresszióra nem volt hatással. Az olaparib, mint PARP inhibitor, és a nikotinamid-ribozid (NR), mint NAD^+ prekursor, kezelés hatására mérséklődést figyeltünk meg a LC3-pozitív vezikulumok számában, azonban a PARP-2 csendesítésben megfigyelt megnövekedett LC3 szintet az alapállapotra (kontroll, kezeletlen sejtek) egyik szer sem tudta lecsökkenteni (**16. ábra**).



16. ábra Az energiaszenzorok farmakológiai modulálása hatással van a LC3-pozitív vezikulumok számára

A scPARP2 és shPARP2 C2C12 sejteket 24 órán keresztül 1 mM AICAR-ral, 20 nM rapamycinnel (rapa), 1 µM olaparibbal (olap) vagy 500 µM nikotinamid-riboziddal (NR) kezeltük, majd a LC3 expresszióját immunfluoreszcenciával ($n=3$) vizsgáltuk. A LC3-pozitív vezikulumokat Alexa Fluor 488-konjugált LC3 antitesttel, míg a sejtmagokat DAPI festéssel tettük láthatóvá. Az ábrán reprezentatív konfokális mikroszkóppal készült felvételek, illetve 3 független kísérletből származó kiértékelésük láthatók. Az adatok átlag \pm SEM formában vannak feltüntetve. A statisztikai szignifikanciát egyutas ANOVA teszttel határoztuk meg, mely során Tukey- vagy Dunnett-féle poszt-hoc tesztet alkalmaztunk. A * és *** statisztikai szignifikanciát jelez a jelölt mintacsoportok között, ahol $p<0,05$, illetve $p<0,001$. A ## és ### statisztikai szignifikanciát jelöl a kontroll és a kezelt mintacsoportok között, ahol $p<0,01$, illetve $p<0,001$.

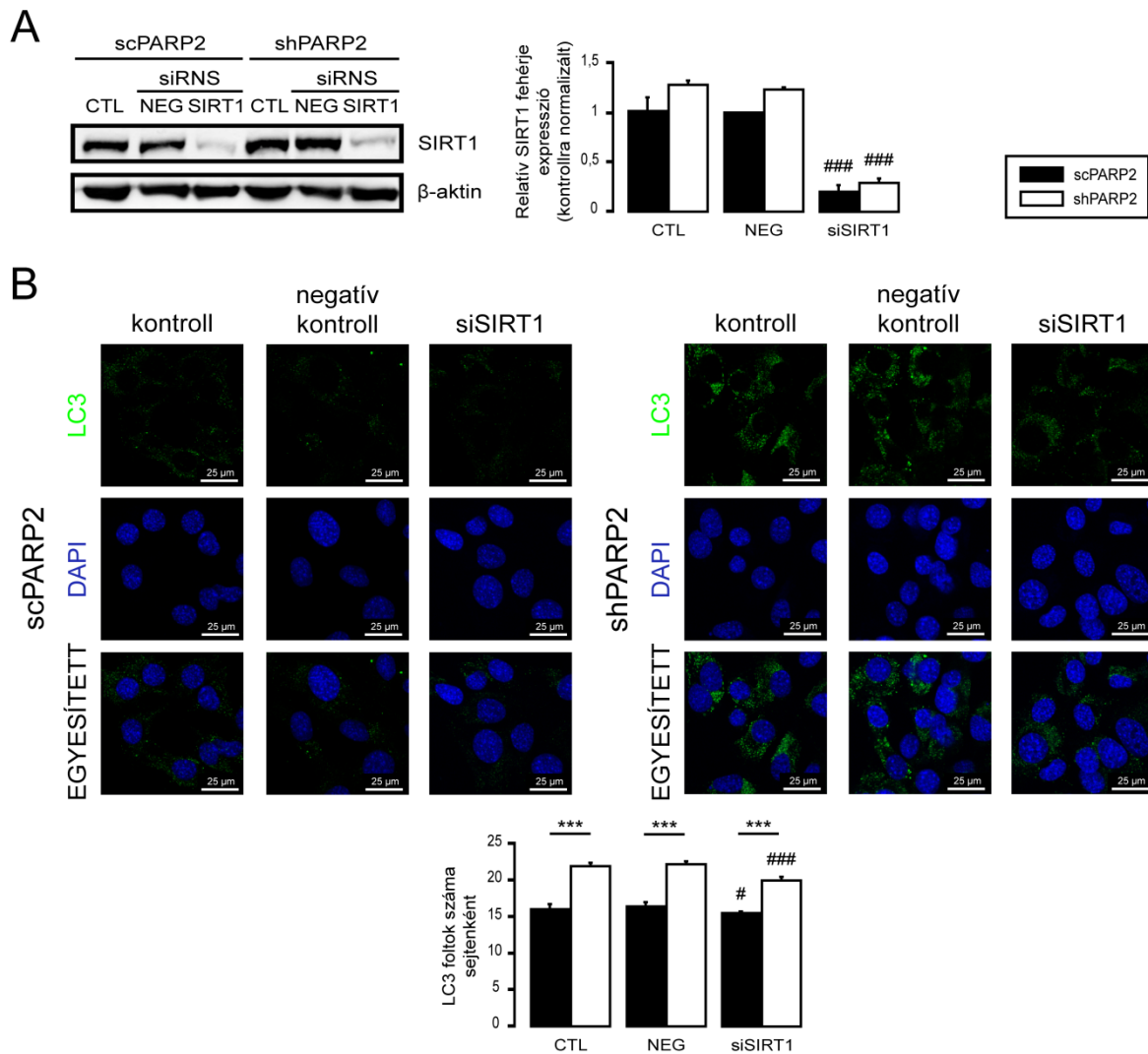
Munkacsoportunk korábban kimutatta, hogy a PARP-2 enzim a SIRT1 promóterének represszora, így PARP-2 csendesítésben emelkedett SIRT1 expresszió és aktivitás figyelhető meg (Bai és mtsai, 2011). Következő vizsgálatunk során arra kerestük a választ, hogy a PARP-2 csendesítés után megfigyelhető SIRT1 expresszió- és aktivitásbeli növekedés összefüggésben áll-e az általunk PARP-2 hiányában tapasztalt fokozott LC3 expresszióval. A SIRT1 autofágiában betöltött szerepét korábban már számos alkalommal leírták (Jang és mtsai, 2012; Ng és Tang, 2013). A SIRT1 farmakológiai aktiválására rezveratrolt, míg gátlására EX-527-et használtunk (Gertz és mtsai, 2013; Hubbard és Sinclair, 2014) és vizsgáltuk a LC3 expressziót scPARP2 és shPARP2 C2C12 sejtekben. Vizsgálataink alapján a rezveratrol mindkét sejtvonal esetében emelte, míg a SIRT1 EX-527-tel történő gátlása csökkentette a PARP-2 csendesítés során tapasztalt emelkedett LC3-pozitív vezikulumok számát (17. ábra).



17. ábra A PARP-2 hiányban megjelenő SIRT1 aktiváció az autofágia fő regulátora

A scPARP2 és shPARP2 C2C12 sejteket 24 órán keresztül 50 μM rezveratrollal vagy 25 μM EX-527-tel kezeltük, majd a LC3 expresszióját immunfluoreszcenciával ($n=3$) vizsgáltuk. A LC3-pozitív vezikulumokat Alexa Fluor 488-konjugált LC3 antitesttel, míg a sejtmagokat DAPI festéssel tettük láthatóvá. Az ábrán reprezentatív konfokális mikroszkóppal készült felvételek, illetve 3 független kísérletről származó kiértékelésük láthatók. Az adatok átlag \pm SEM formában vannak feltüntetve. A statisztikai szignifikanciát egyutas ANOVA teszttel határoztuk meg, mely során Tukey-féle poszt-hoc tesztet alkalmaztunk. A *** statisztikai szignifikanciát jelez a scPARP2 és shPARP2 C2C12 sejtek között, ahol $p < 0,001$. A # és ### statisztikai szignifikanciát jelöl a kontroll és a kezelt mintacsoportok között, ahol $p < 0,05$, illetve $p < 0,001$.

A farmakológiai gátlás során bekövetkező változások megerősítésének érdekében a SIRT1 enzimet tranziensen, siRNS-el csendesítettük scPARP2 és shPARP2 C2C12 sejtekben, melynek hatékonyságát Western blot technikával ellenőriztük (18. ábra A). A SIRT1 tranziens csendesítése után a LC3-pozitív vezikulumok számában, hasonlóan a farmakológiai gátlószernél, az EX-527-nél tapasztaltakkal, mérséklődést figyeltünk meg (18. ábra B). Ezen eredmények arra utalnak, hogy a PARP-2 csendesítés során bekövetkező megnövekedett SIRT1 aktivitás pozitívan befolyásolja az autofágiát.



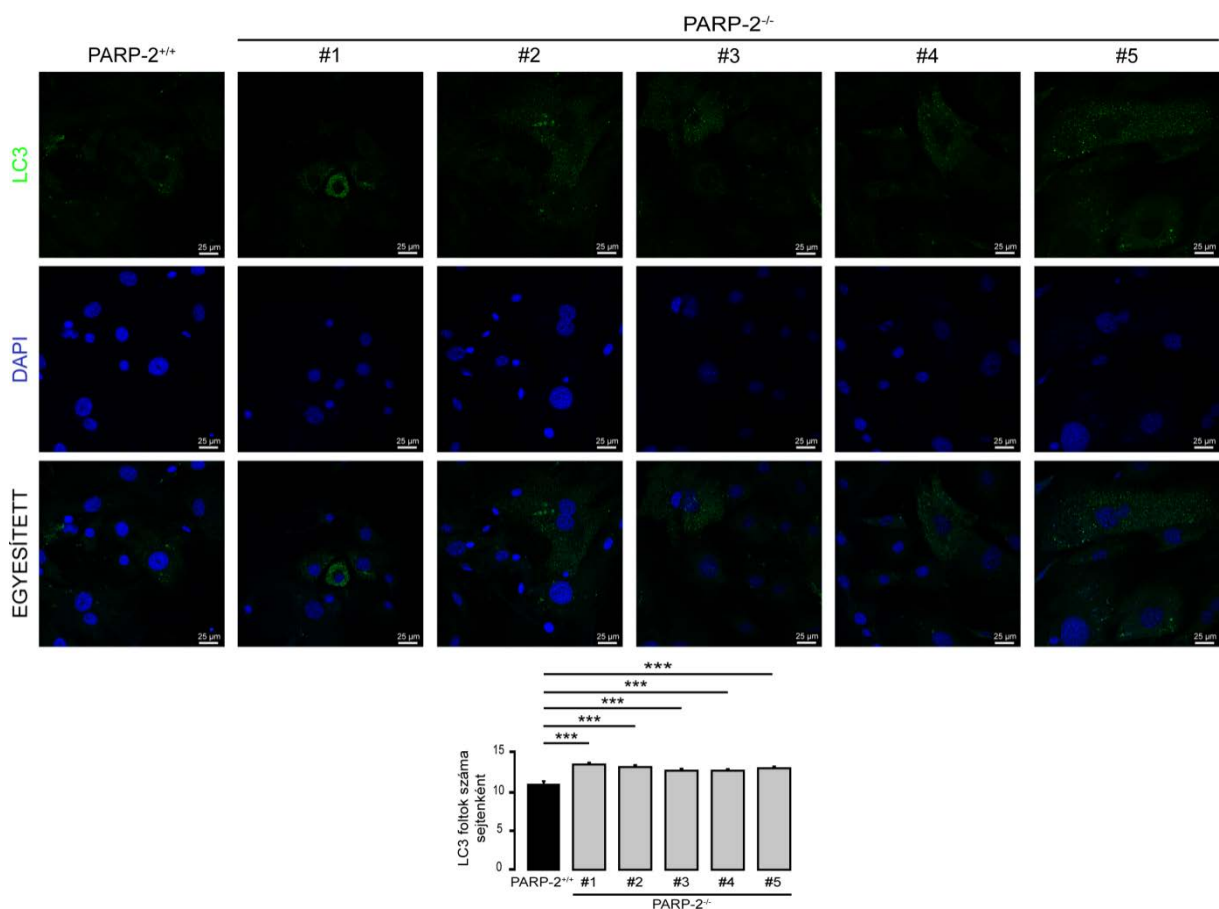
18. ábra A SIRT1 csendesítés redukálja a LC3-pozitív vezikulumok számát

(A) A scPARP2 és shPARP2 C2C12 sejtekben tranzienst transzfekcióval csendesítettük a SIRT1-et, mely során a SIRT1 génre specifikus siRNS-t (siSIRT1), negatív kontroll siRNS-t (NEG), illetve transzfektálatlan kontroll sejteket (CTL) használtunk, majd a SIRT1 fehérjeszintű expresszióját Western blot technikával ($n=3$) ellenőriztük. (B) Ugyanezen sejtekben a LC3 expresszióját immunfluoreszcenciával ($n=3$) tanulmányoztuk. A LC3-pozitív vezikulumokat Alexa Fluor 488-konjugált LC3 antitesttel, míg a sejtmagokat DAPI festéssel tettük láthatóvá. Az ábrán reprezentatív Western blot képek és konfokális mikroszkóppal készült immunfluoreszcens felvételek, illetve 3 független kísérletről származó kiértékelésük láthatók. Az adatok átlag \pm SEM formában vannak feltüntetve. A statisztikai szignifikanciát egyutas ANOVA teszttel határoztuk meg, mely során Tukey-féle poszt-hoc tesztet alkalmaztunk. A *** statisztikai szignifikanciát jelez a scPARP2 és shPARP2 C2C12 sejtek között, ahol $p < 0,001$. A # és ### statisztikai szignifikanciát jelöl a negatív kontroll és a transzfektált mintacsoport között, ahol $p < 0,05$, illetve $p < 0,001$.

5.2.3. A PARP-2 hiány növeli a LC3-pozitív vezikulumok számát primer sejtek esetén is

Előző kísérleti eredményeink igazolásának céljából egér primer MEF sejtekben is tanulmányoztuk a LC3 fehérje expresszióját immunfluoreszcens technikával. A kísérlet során

egy PARP-2^{+/+} egérből származó primer sejt vonalat hasonlítottunk össze 5 különböző PARP-2 knockout egérből (PARP-2^{-/-}) származó primer sejt vonallal (PARP2^{-/-} #1, #2, #3, #4, #5) (Bai és mtsai, 2007). A konfokális mikroszkóppal készült felvételek kiértékelése során a LC3-pozitív vezikulumok számában emelkedést mutattunk ki a PARP-2^{-/-} egerekből izolált MEF sejtekben a PARP-2^{+/+} egérből származó MEF-hez viszonyítva (**19. ábra**), mely összhangban van az immortalizált C2C12 sejtek esetén tapasztaltakkal. Ezen eredmény azt sugallja, hogy az autofágia aktivitása PARP-2 hiányában fokozódik, ugyanakkor arra is következtetni enged, hogy a LC3 expresszióbeli változása nem az immortalizáció, hanem a PARP-2 gén hiányának a következménye.

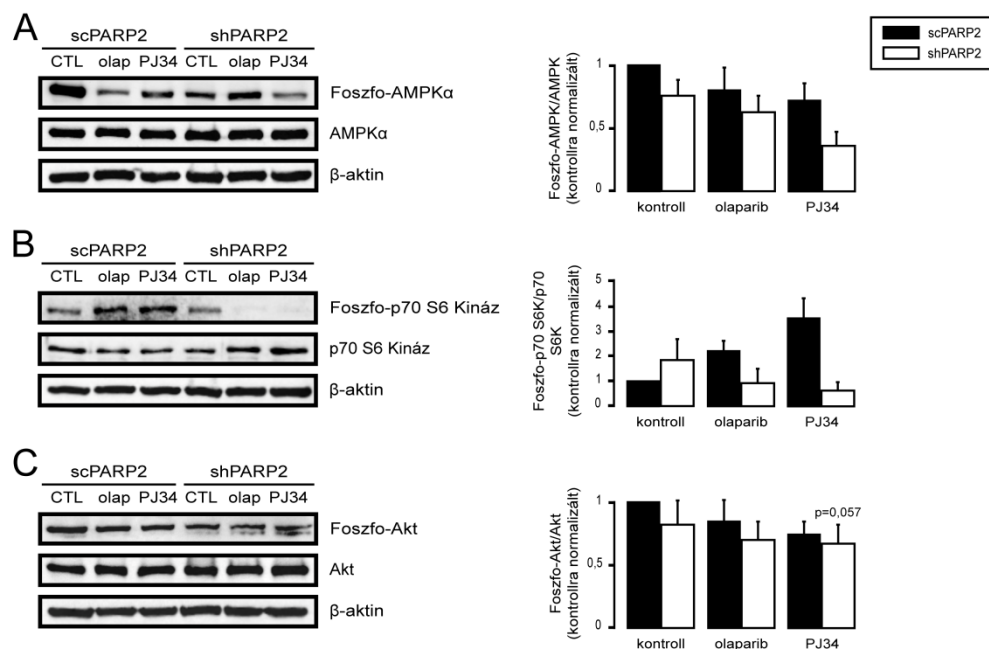


19. ábra A PARP-2 hiánya primer sejtek esetén is befolyásolja a LC3 expressziót

A primer MEF sejtekben a LC3 expresszióját immunfluoreszcenciával ($n=3$) tanulmányoztuk. A LC3-pozitív vezikulumokat Alexa Fluor 488-konjugált LC3 antitesttel, míg a sejtmagokat DAPI festéssel tettük láthatóvá. Az ábrán reprezentatív konfokális mikroszkóppal készült felvételek, illetve 3 független kísérletből származó kiértékelésük láthatók. Az adatok átlag ± SEM formában vannak feltüntetve. A statisztikai szignifikanciát egyutas ANOVA teszttel határoztuk meg, mely során Dunnett-féle poszt-hoc tesztet alkalmaztunk. A **** statisztikai szignifikanciát jelez a jelölt mintacsoportok között, ahol $p < 0,001$.

5.2.4. A PARP-2 aktivitása szerepet játszik az autofágiában

Végül arra kerestük a választ, hogy a PARP-2 farmakológiai gátlása milyen hatással van az előzőleg vizsgált energiaszenzorok expressziójára és foszforiláltsági állapotára. Ezért PARP inhibitorokkal, olaparibbal és PJ34-el kezelt scPARP2 és shPARP2 C2C12 sejtekben tanulmányoztuk a mTOR rendszer két komplexének és az AMPK-nak az aktivitását Western blot módszerrel. Fontos megemlíteni, hogy a két PARP inhibitor nem szelektív egy adott PARP enzimre, vagyis a PARP-1-et és a PARP-2-t is gátolják működésük során. A gátlószerekkel történő kezelés után az AMPK foszforilációjában csökkenést tapasztaltunk mind a kontroll, mind a PARP-2 csendesített sejtvonalonban (**20. ábra A**). A p70 S6 kináz foszforiláltságát vizsgálva a mTORC1 aktivitásában növekedést figyeltünk meg a scPARP2 C2C12 sejtekben, míg a PARP-gátlás mTORC1 aktivitásbeli csökkenést eredményezett a PARP-2 csendesített sejtekben (**20. ábra B**). Emellett a PARP aktivitás gátlása csökkentette az Akt kináz foszforiláltságát a kontroll sejtekben, azonban a PARP-2 csendesített sejtekben nem volt hatással (**20. ábra C**). Ezen eredmények megerősítették azt a hipotézisünket, hogy a PARP-2 aktivitásának csökkenése hatással van a sejtek energiaérzékelésére.



20. ábra A PARP-2 aktivitása befolyásolja a sejtek energiaérzékelését

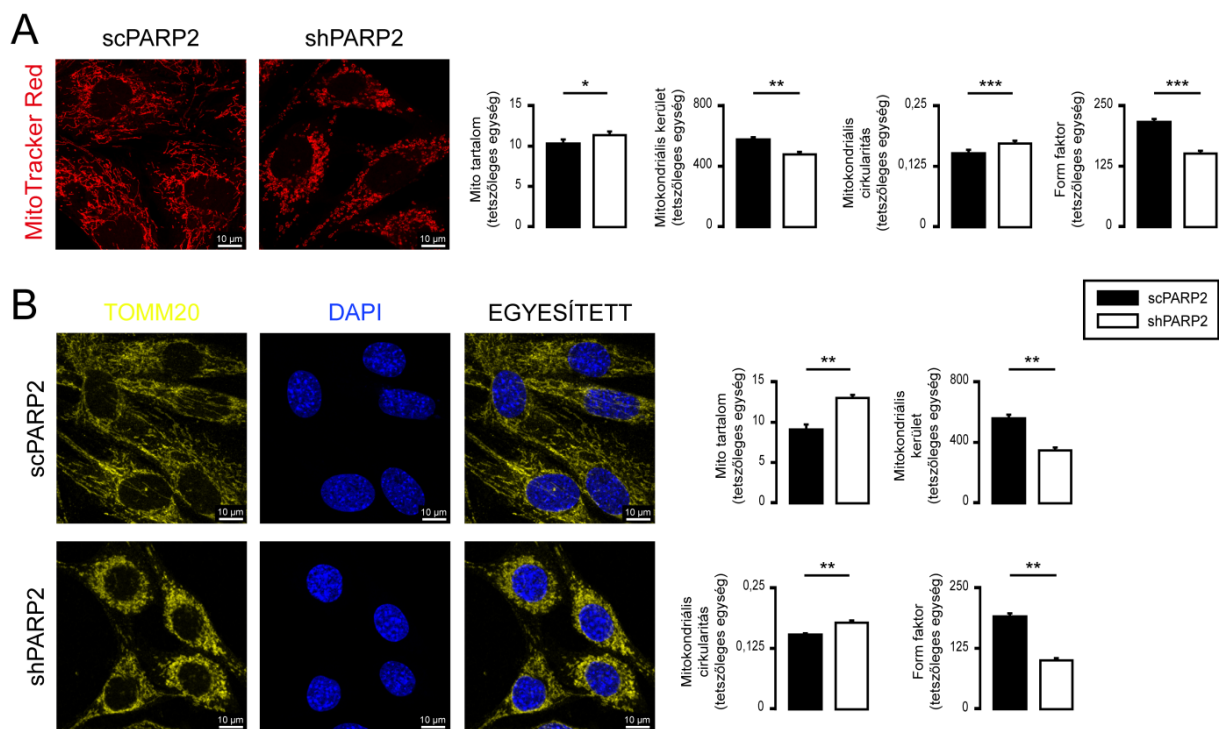
A scPARP2 és shPARP2 C2C12 sejteket 24 órán keresztül 1 μ M olaparibbal (olap) vagy 3 μ M PJ34-el kezeltük, majd az AMPK, p70 S6 kináz és az Akt fehérjeszintű expresszióját és foszforiláltsági állapotát Western blot technikával ($n=3$) tanulmányoztuk. Az ábrán reprezentatív Western blot képek, illetve 3 független kísérletről származó denzitometriás kiértékelésük láthatók. Az adatok átlag \pm SEM formában vannak feltüntetve. A statisztikai szignifikanciát egyutas ANOVA teszttel határoztuk meg, mely során Tukey-féle poszt-hoc tesztet alkalmaztunk.

5.3. A PARP-2 enzim csendesítése a mitokondriális hálózat fragmentációját okozza, illetve növeli a mitokondriális ROS-termelést

5.3.1. A PARP-2 hiányában mitokondriális fragmentáció lép fel

A PARP-2 és a mitokondrium kapcsolata szélesebb körben tanulmányozott téma és több irodalmi forrás alapján elmondható, hogy a PARP-2 szerepet játszik a mitokondriális homeosztázis szabályozásában. Munkánk során a PARP-2 és a mitokondrium kapcsolatáról az ismereteinket szeretnénk kiterjeszteni.

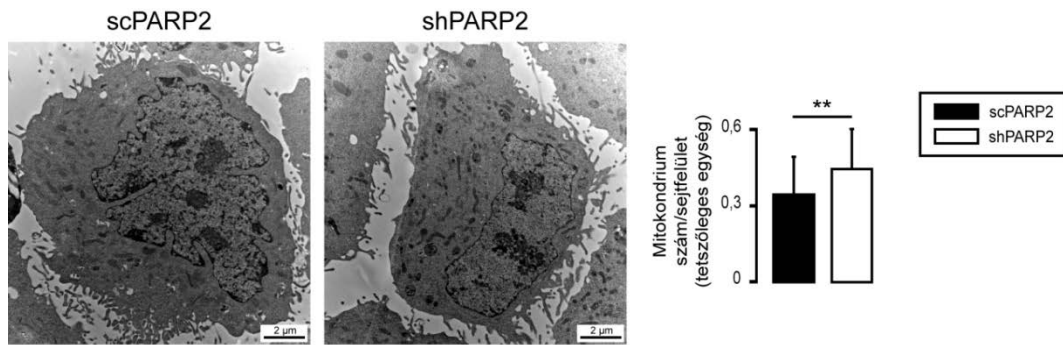
A kontroll és PARP-2 csendesített C2C12 mioblaszt sejtekben a mitokondriális struktúrát immunfluoreszcens technikával konfokális mikroszkóp segítségével tanulmányoztuk. A mitokondriumokat MitoTracker Red fluoreszcens festékekkel jelöltük (**21. ábra A**), mely az élő sejtek mitokondriumaiban akumulálódik (Chazotte, 2011). Emellett a mitokondriális morfológia konfokális mikroszkóppal történő tanulmányozásának céljából a Tomm20 fehérjét jelöltük a fehérjére specifikus antitesttel (**21. ábra B**). A Tomm20 a külső mitokondriális membránban lokalizálódó transzporter fehérje, melyet széles körben alkalmaznak mitokondriális markerként (Balaker és mtsai, 2013). A konfokális mikroszkóppal készült felvételek elemzése során mindkét jelölés alkalmával fragmentálódott mitokondriális struktúrát detektáltunk a PARP-2 csendesített sejtekben. Az ImageJ szoftver Mito-Morphology makrójával történő kiértékelés alkalmával a mitokondriális tartalomban és cirkularitásban növekedést, míg a mitokondriális kerületben és a form faktorban csökkenést tapasztaltunk PARP-2 hiányában, mely adatok szintén a mitokondriális hálózat fragmentálódására utalnak.



21. ábra A PARP-2 hiánya mitokondriális morfológiai változást indukál

A mitokondriális struktúrát a scPARP2 és shPARP2 C2C12 sejtekben MitoTracker Red fluoreszcens festékkel ($n=3$) (A) és immunfluoreszcenciával ($n=3$) (B) tanulmányoztuk. Az immunfluoreszcencia során a mitokondriumokat Tomm20 antitesttel, míg a sejtmagokat DAPI festéssel tettük láthatóvá. Az ábrán reprezentatív konfokális mikroszkóppal készült felvételek, illetve 3 független kísérletből származó kiértékelésük láthatók. A felvételek kiértékelése során az ImageJ szoftver Mito-Morphology makróját alkalmaztuk. Az adatok átlag \pm SEM formában vannak feltüntetve. A statisztikai szignifikanciát kétmintás t-próbával határoztuk meg. A *, ** és *** statisztikai szignifikanciát jelez a scPARP2 és shPARP2 C2C12 sejtek között, ahol $p<0,05$, $p<0,01$, illetve $p<0,001$.

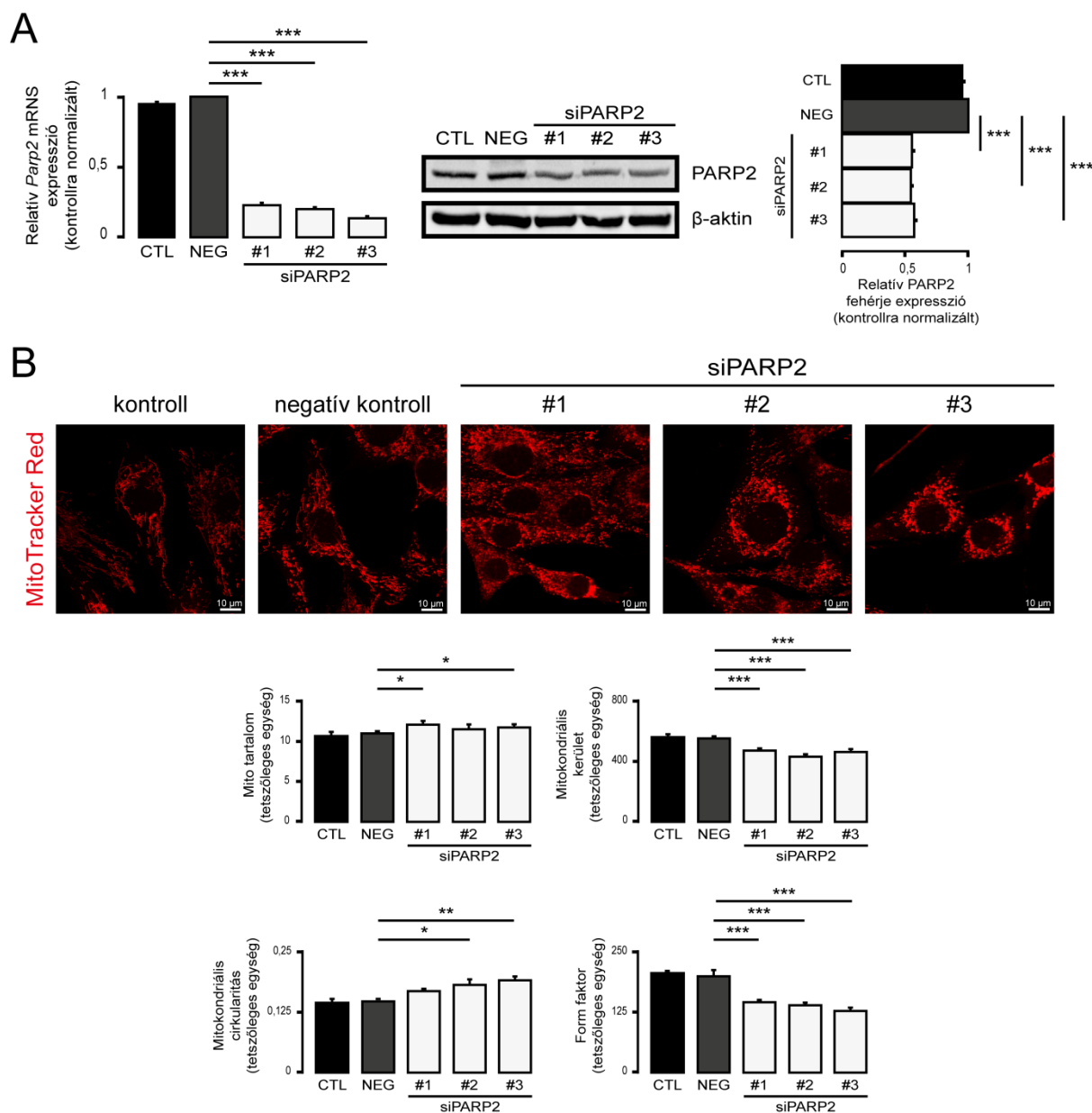
Munkánk következő lépéseként a scPARP2 és shPARP2 C2C12 sejtek ultrastruktúráját elektronmikroszkópos technikával vizsgáltuk (22. ábra). Az elektronmikroszkóppal készített felvételeket tanulmányozva PARP-2 hiányában a mitokondriális átmetszetek számában emelkedést tapasztaltunk, mely szintén arra utal, hogy PARP-2 csendesítés hatására megváltozik a mitokondriális morfológia, a hálózat töredezettebbé válik.



22. ábra A mitokondriális hálózat töredezetté válik PARP-2 hiányában

A scPARP2 és shPARP2 C2C12 sejteket elektronmikroszkóppal ($n=1$, vizsgált sejt szám: 45/45) tanulmányoztuk. Az ábrán reprezentatív elektronmikroszkóppal készült felvételek, illetve a hozzá társuló kiértékelés látható. A mitokondriumokat sejtenként megszámláltuk és a sejtfelületre normalizált adatokat ábrázoltuk. Az adatok átlag \pm SD formában vannak feltüntetve. A statisztikai szignifikanciát kétmintás t-próbával határoztuk meg. A ** statisztikai szignifikanciát jelez a scPARP2 és shPARP2 C2C12 sejtek között, ahol $p < 0,01$.

Az előző eredményeink megerősítésének céljából a mitokondriális struktúrát PARP-2 tranziensen csendesített C2C12 sejtekben is vizsgáltuk. Minden tranziens csendesítés után ellenőriztük a kísérlet sikerességét a PARP-2 mRNS- és fehérjeszintű expressziójának vizsgálatával (23. ábra A). A PARP-2 tranziensen csendesített sejt vonalakban, a stabil sejt vonalhoz hasonlóan, fragmentálódott mitokondriális hálózatot figyeltünk meg MitoTracker Red jelölést követően, mely szintén az emelkedett mitokondriális tartalom és cirkularitás, illetve a mérséklődött mitokondriális területben és form faktorban nyilvánult meg (23. ábra B).

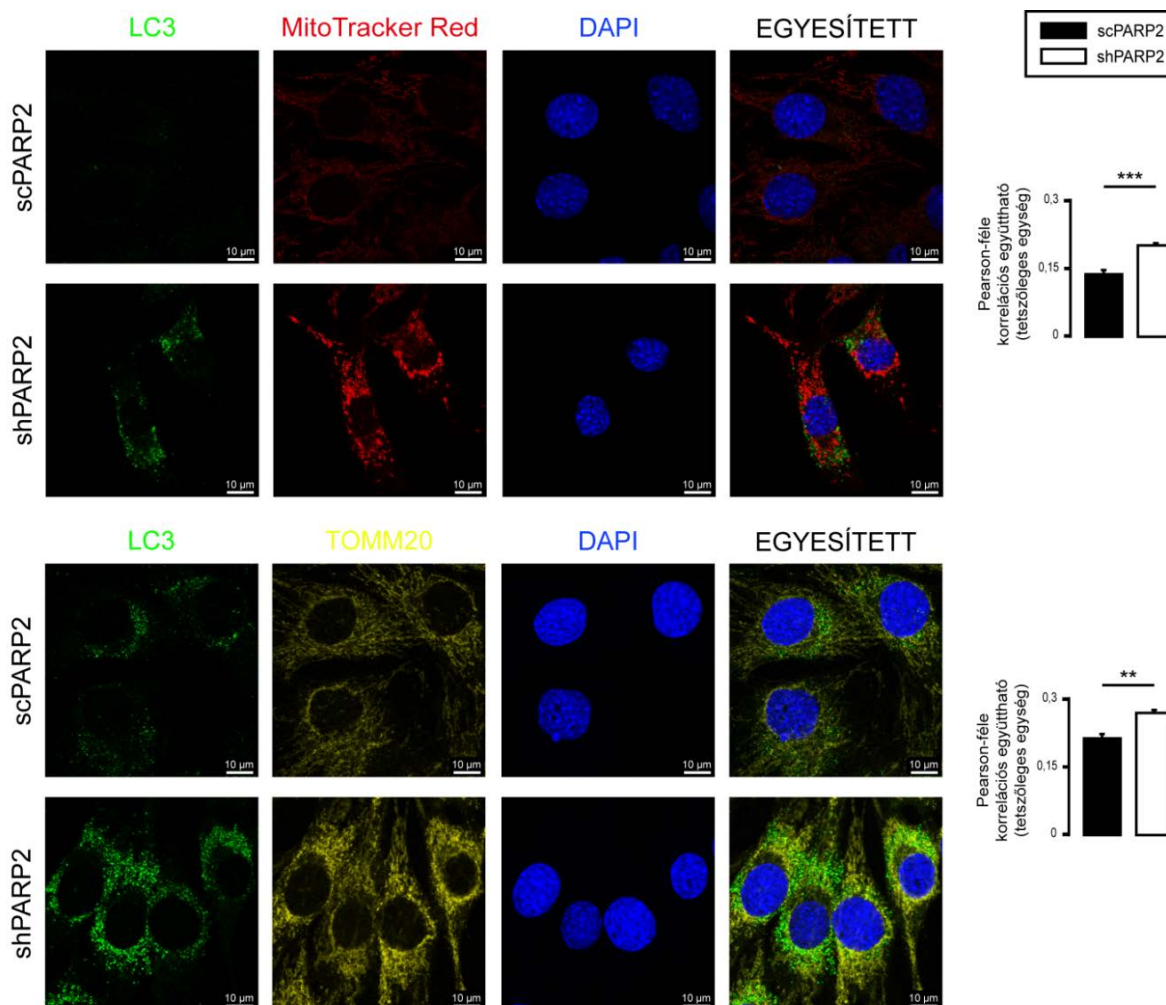


23. ábra A PARP-2 tranziens csendesítése hatással van a mitokondriális morfológiára

(A) A C2C12 sejtekben a PARP-2 tranziens csendesítése során háromféle, a PARP-2 génre specifikus siRNS-t (siPARP2 #1, #2 és #3), negatív kontroll siRNS-t (NEG) és transzfektálatlan kontroll sejteket (CTL) használtunk, majd a PARP-2 fehérje- és mRNS-szintű expresszióját RT-qPCR ($n=3$) és Western blot technikával ($n=3$) ellenőriztük. (B) Ugyanezen sejtekben a mitokondriális struktúrát MitoTracker Red fluoreszcens festékkel ($n=3$) tanulmányoztuk. Az ábrán reprezentatív Western blot képek és konfokális mikroszkóppal készült immunfluoreszcens felvételek, illetve 3 független kísérletből származó kiértékelésük láthatók. A konfokális mikroszkóppal készült felvételek kiértékelése során az ImageJ szoftver Mito-Morphology makróját alkalmaztuk. Az adatok átlag \pm SEM formában vannak feltüntetve. A statisztikai szignifikanciát egyutas ANOVA teszttel határoztuk meg, mely során Dunnett-féle poszt-hoc tesztet alkalmaztunk. A *, ** és *** statisztikai szignifikanciát jelez a negatív kontroll és a jelölt mintacsoport között, ahol $p < 0,05$, $p < 0,01$, illetve $p < 0,001$.

5.3.2. A SIRT1 aktiváció, a mitofágia, illetve a mitokondriális dinamikában bekövetkező változások nincsenek hatással a PARP-2 hiányában fellépő mitokondriális fragmentációra

A mitokondriális hálózat integritásának megváltozását számos tényező befolyásolhatja. Az előzőekben már ismertettem, hogy PARP-2 hiányában az autofágia blokkolódik. Mivel a mitokondriális struktúra szétesése a mitokondriumok szelektív lebontására, a mitofágiára is visszavezethető, így vizsgáltuk ennek a folyamatnak is az eshetőségét. A mitofágia detektálásának legegyszerűbb módja a mitokondriumok és az autofagoszómák kolokalizációjának vizsgálata immunfluoreszcens technikával, mely során az organelumokra specifikus markereket használva tanulmányozzuk a két organelum kolokalizációjának mértékét (Ding és Yin, 2012). Ennek igazolásához a scPARP2 és shPARP2 C2C12 sejtekben az előző kísérletekben jól ismertett markereket használtuk a mitokondriumok és az autofagoszómák lokalizációjának vizsgálatára: a mitokondriumokat MitoTracker Red fluoreszcens festékkel vagy Tomm20 antitesttel, míg az autofagoszómákat LC3 antitesttel jelöltük (**24. ábra**). A konfokális mikroszkóppal készült felvételek kiértékelését az ImageJ szoftver EzColocalization plugin-jével végeztük, mely elemzés alkalmával nem találtunk megnövekedett kolokalizációs szignált PARP-2 hiányában az autofagoszómák és a mitokondriumok között. Az ábrán megjelenő szignifikáns különbség a kis értékek közti különbségből adódik, nem utal mitofágiára.

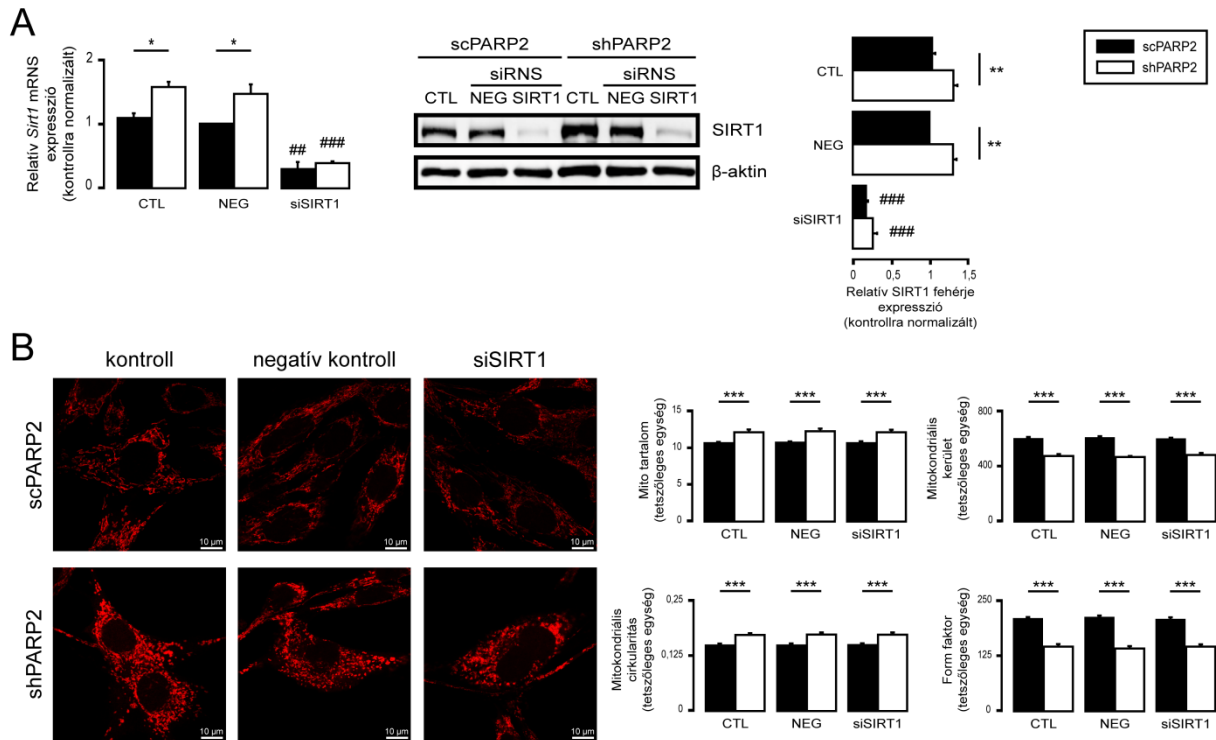


24. ábra PARP-2 hiányában nem indukálódik mitofágia

A mitofágiát a scPARP2 és shPARP2 C2C12 sejtekben immunfluoreszcenciával ($n=3$) tanulmányoztuk, mely során a mitokondriumokat MitoTracker Red fluoreszcens festékekkel (A) vagy Tomm20 antitesttel (B), a LC3-pozitív vezikulumokat Alexa Fluor 488-konjugált LC3 antitesttel, míg a sejtmagokat DAPI festéssel tettük láthatóvá. Az ábrán reprezentatív konfokális mikroszkóppal készült felvételek, illetve 3 független kísérletből származó kiértékelésük láthatók. A konfokális mikroszkóppal készült felvételek kiértékelése során az ImageJ szoftver EzColocalization plugin-jét alkalmaztuk. Az adatok átlag \pm SEM formában vannak feltüntetve. A statisztikai szignifikanciát kétmintás t-próbával határoztuk meg. A ** és *** statisztikai szignifikanciát jelez a scPARP2 és shPARP2 C2C12 sejtek között, ahol $p < 0,01$, illetve $p < 0,001$.

Számos esetben bizonyították már, hogy a SIRT1 képes befolyásolni a mitokondriális struktúrát a mitofágia szabályozásán keresztül (Jang és mtsai, 2012; Andreux és mtsai, 2013; Liu és mtsai, 2017), így következő kísérletünkben a PARP-2 hiányában fellépő emelkedett SIRT1 aktivitás hatását vizsgáltuk a mitokondriális hálózatra. A SIRT1-et tranziensen csendesítettük scPARP2 és shPARP2 C2C12 sejtekben (25. ábra A), majd a mitokondriális struktúrát MitoTracker Red fluoreszcens festékekkel vizsgáltuk (25. ábra B). A konfokális mikroszkóppal készült felvételek kiértékelése során nem tapasztaltunk változást, vagyis a

PARP-2 hiányában fellépő mitokondriális fragmentáció nem a megnövekedett SIRT1 aktivitás eredménye. A SIRT1 csendesítés nem volt hatással a mitokondriális morfológiára, illetve a PARP-2 csendesítés során megfigyelt fragmentálódott mitokondriális struktúrát a SIRT1 csendesítése nem tudta kompenzálni, a mitokondriumok nem nyerték vissza a kontroll sejtekre jellemző fuzionált fenotípusukat.

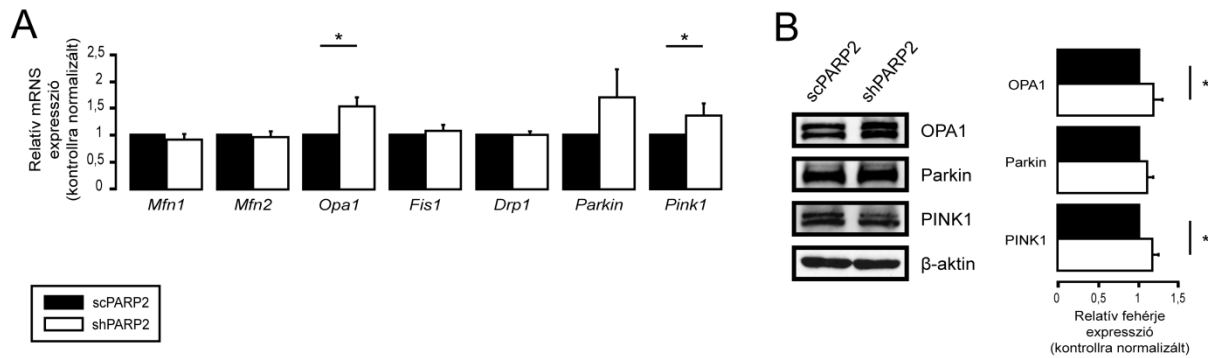


25. ábra A PARP-2 hiányában jelentkező SIRT1 aktiváció nincs összefüggésben a megjelenő mitokondriális morfológiai változással

(A) A scPARP2 és shPARP2 C2C12 sejtekben transziens transzfekcióval csendesítettük a SIRT1-et, mely során a SIRT1 génre specifikus siRNS-t (siSIRT1), negatív kontroll siRNS-t (NEG), illetve transzfektálatlan kontroll sejteket (CTL) használtunk, majd a SIRT1 fehérje- és mRNA-szintű expresszióját RT-qPCR ($n=3$) és Western blot technikával ($n=3$) határoztuk meg. (B) Ugyanezen sejtekben a mitokondriális struktúrát MitoTracker Red fluoreszcens festékkel ($n=3$) tanulmányoztuk. Az ábrán reprezentatív Western blot képek és konfokális mikroszkóppal készült immunfluoreszcens felvételek, illetve 3 független kísérletből származó kiértékelésük láthatók. A konfokális mikroszkóppal készült felvételek kiértékelése során az ImageJ szoftver Mito-Morphology makróját alkalmaztuk. Az adatok átlag \pm SEM formában vannak feltüntetve. A statisztikai szignifikanciát egyutas ANOVA teszttel határoztuk meg, mely során Tukey-féle poszt-hoc tesztet alkalmaztunk. A *, ** és *** statisztikai szignifikanciát jelez a scPARP2 és shPARP2 C2C12 sejtek között, ahol $p<0,05$, $p<0,01$, illetve $p<0,001$. A ## és ### statisztikai szignifikanciát jelöl a negatív kontroll és a transzfektált mintacsoport között, ahol $p<0,01$, illetve $p<0,001$.

A mitokondriális dinamikában, a fúzió–fisszió folyamatában szerepet játszó fehérjék expressziójának megváltozása, diszregulációja szintén magyarázatot adhat a módosult mitokondriális morfológiára. Így következő lépésként a fúzióban–fisszióban és mitofágiában

részt vevő fehérjék (Mfn1, Mfn2, Opa1, Fis1, Drp1, Parkin és Pink1) mRNS- (**26. ábra A**) és fehérjeszintű (**26. ábra B**) expresszióját tanulmányoztuk a kontroll és a PARP-2 csendesített C2C12 sejtekben. Ezen fehérjék expressziójában a PARP-2 csendesítés során nem találtunk olyan változást, mely koherens lenne a shPARP2 HepG2 sejtekben tapasztaltakkal.

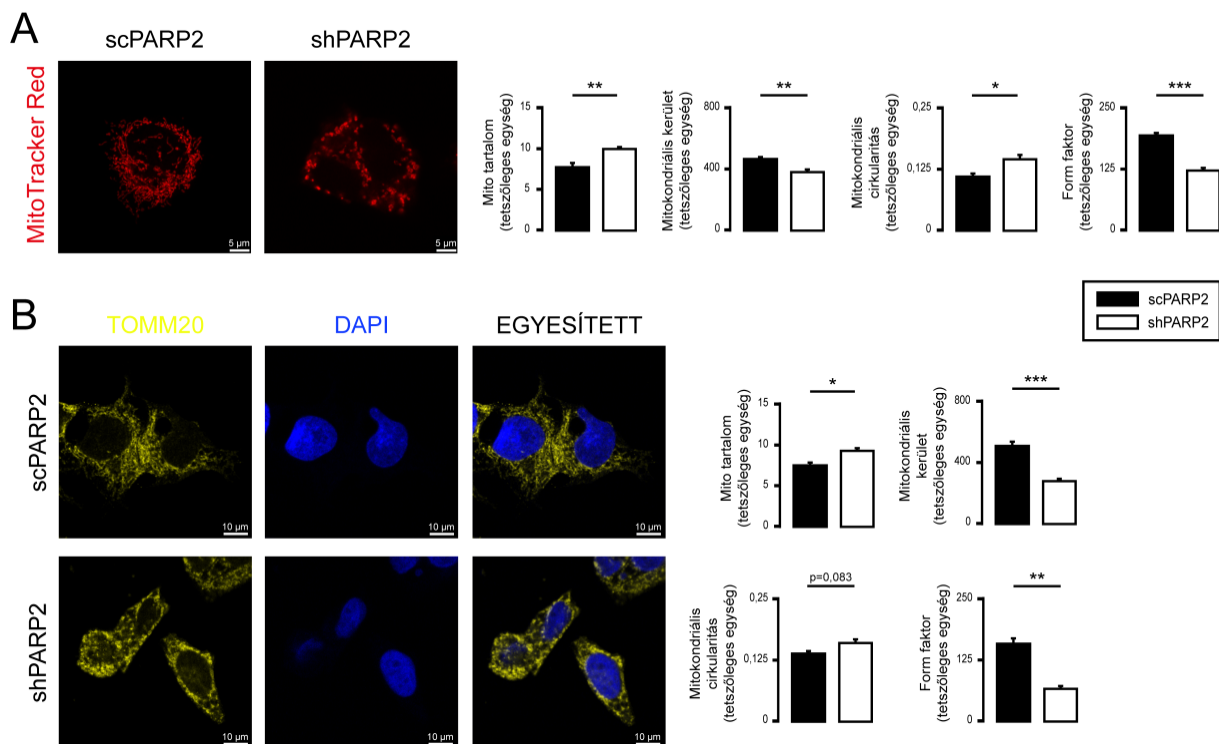


26. ábra A mitokondriális dinamikában nem történik változás PARP-2 hiányában

A mitokondriális fúzióban (Mfn1, Mfn2, Opa1), físzcióban (Fis1, Drp1) és mitofágiában (Parkin, Pink1) részt vevő fehérjék mRNS- és fehérjeszintű expresszióját a scPARP2 és shPARP2 C2C12 sejtekben RT-qPCR ($n=3$) (A) és Western blot technikával ($n=3$) (B) tanulmányoztuk. Az ábrán reprezentatív Western blot képek, illetve 3 független kísérletből származó denzitometriás kiértékelésük láthatók. Az adatok átlag \pm SEM formában vannak feltüntetve. A statisztikai szignifikanciát kétmintás t-próbával határoztuk meg. A * statisztikai szignifikanciát jelez a scPARP2 és shPARP2 C2C12 sejtek között, ahol $p < 0,05$.

5.3.3. A PARP-2 csendesítés során a mitokondriális hálózatban bekövetkező változás nem csak az immortalizált mioblaszt sejtekre jellemző

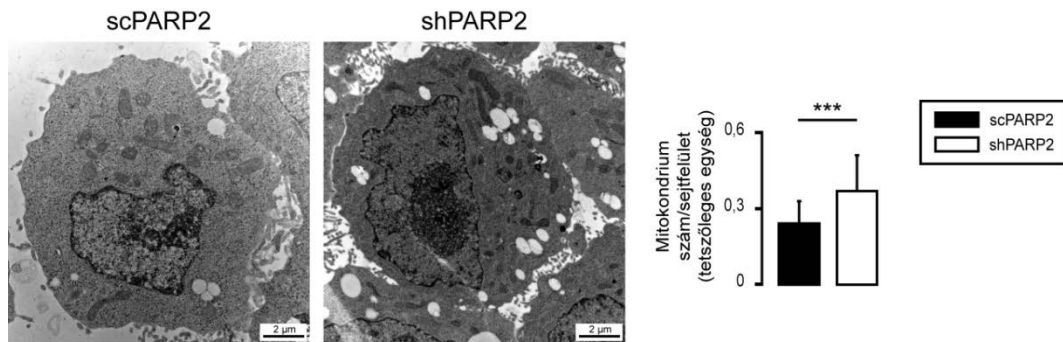
A mioblasztokon történő vizsgálatok után arra kerestük a választ, hogy a PARP-2 hiányában fellépő, a mitokondriális hálózat fragmentációjában bekövetkező változás a mioblaszt sejtekre specifikus vagy más sejt típusokban is hasonló esemény játszódik le. ScPARP2 és shPARP2 HepG2 sejtekben, a C2C12 sejtekhez hasonlóan, először MitoTracker Red fluoreszcens festékkel (**27. ábra A**), illetve Tomm20 antitesttel immunfluoreszcencia segítségével (**27. ábra B**) jelöltük a mitokondriumokat, majd a felvételeket az ImageJ szoftver Mito-Morphology makrójával értékeltük ki. A mioblaszt sejtekhez hasonlóan a PARP-2 csendesített HepG2 sejtekben is fragmentálódott mitokondriális hálózatot detektáltunk mindkét jelölés alkalmával.



27. ábra A HepG2 sejtekben megváltozik a mitokondriális morfológia a PARP-2 csendesítése során

A mitokondriális struktúrát a scPARP2 és shPARP2 HepG2 sejtekben MitoTracker Red fluoreszcens festékekkel ($n=3$) (A) és immunfluoreszcenciával ($n=3$) (B) tanulmányoztuk. Az immunfluoreszcencia során a mitokondriumokat Tomm20 antitesttel, míg a sejtmagokat DAPI festéssel tettük láthatóvá. Az ábrán reprezentatív konfokális mikroszkóppal készült felvételek, illetve 3 független kísérletből származó kiértékelésük láthatók. A konfokális mikroszkóppal készült felvételek kiértékelése során az ImageJ szoftver Mito-Morphology makróját alkalmaztuk. Az adatok átlag \pm SEM formában vannak feltüntetve. A statisztikai szignifikanciát kétmintás t-próbával határoztuk meg. A *, ** és *** statisztikai szignifikanciát jelez a scPARP2 és shPARP2 HepG2 sejtek között, ahol $p < 0,05$, $p < 0,01$, illetve $p < 0,001$.

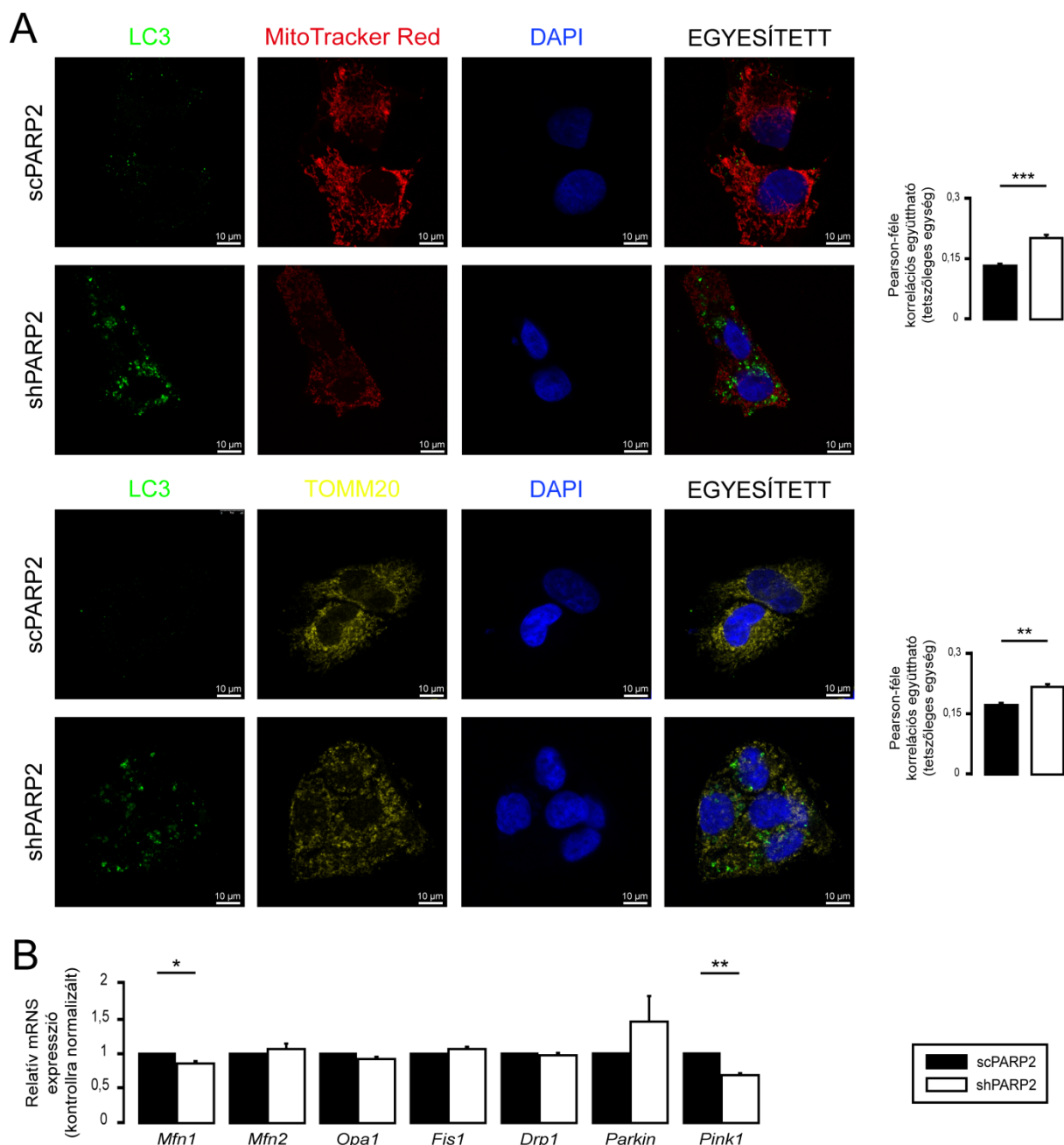
Következő kísérletünk során a scPARP2 és shPARP2 HepG2 sejtek ultrastruktúráját elektronmikroszkóppal tanulmányoztuk (**28. ábra**). Az elektronmikroszkóppal készített felvételeken PARP-2 hiányában a mitokondriális átmetszetek számában növekedést tapasztaltunk, mely szintén a mitokondriális struktúra szétesésére utal.



28. ábra HepG2 sejtekben töredezett mitokondriális hálózat detektálható PARP-2 hiányban

A scPARP2 és shPARP2 HepG2 sejteket elektronmikroszkóppal ($n=1$, vizsgált sejttség: 45/45) tanulmányoztuk. Az ábrán reprezentatív elektronmikroszkóppal készült felvételek, illetve a hozzá társuló kiértékelés látható. A mitokondriumokat sejtenként megszámláltuk és a sejtfelületre normalizált adatokat ábrázoltuk. Az adatok átlag \pm SD formában vannak feltüntetve. A statisztikai szignifikanciát kétmintás t-próbával határoztuk meg. A *** statisztikai szignifikanciát jelez a scPARP2 és shPARP2 HepG2 sejtek között, ahol $p < 0,001$.

A következő kísérletünk során arra kerestük a választ, hogy a PARP-2 csendesített HepG2 sejtekben megjelenő megváltozott mitokondriális struktúra összefüggésben van-e a mitofágiával, illetve a mitokondriális dinamika megváltozásával. Először a scPARP2 és shPARP2 HepG2 sejtekben az autofagoszóma–mitokondrium kolokalizációt kétféle mitokondriális jelöléssel konfokális mikroszkóppal (29. ábra A) vizsgáltuk, majd a mitokondrium fúziójában–fissziójában részt vevő fehérjék expresszióját (29. ábra B) tanulmányoztuk. Az immunfluoreszcens felvételek kiértékeléséhez szintén az ImageJ szoftver EzColocalization plugin-jét használtuk. Az elemzés alkalmával, a C2C12 sejtekhez hasonlóan, nem detektáltunk PARP-2 hiányában emelkedett kolokalizációs szignált az autofagoszóma és a mitokondriumok között, illetve a mitokondriális fúzió–fisszió folyamatában és mitofágiában szerepet játszó fehérjék (Mfn1, Mfn2, Opa1, Fis1, Drp1, Parkin és Pink1) mRNS-szintű expressziójában sem történtek olyan mértékű változások, melyek magyarázhatták volna a mitokondrium töredezettségét, melyet PARP-2 hiányában tapasztaltunk.

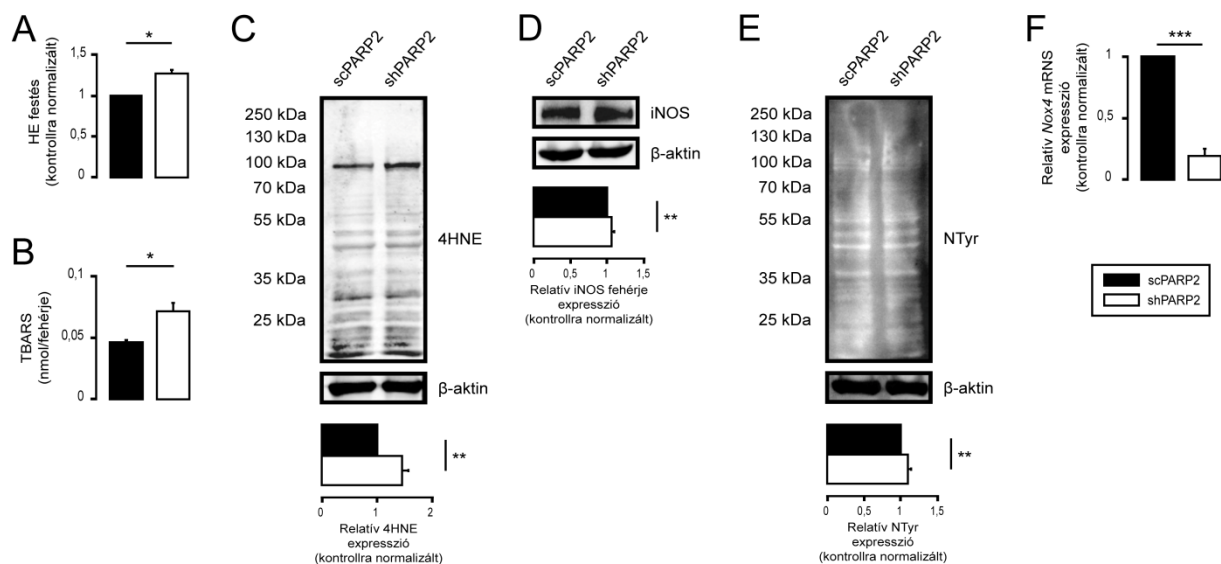


29. ábra A HepG2 sejtekben sem történik változás a mitofágiában, illetve a mitokondriális dinamikában PARP-2 csendesítés során

(A) A mitofágiát a scPARP2 és shPARP2 HepG2 sejtekben immunfluoreszcenciával ($n=3$) tanulmányoztuk, mely során a mitokondriumokat MitoTracker Red fluoreszcens festékekkel vagy Tomm20 antitesttel, a LC3-pozitív vezikulumokat Alexa Fluor 488-konjugált LC3 antitesttel, míg a sejtmagokat DAPI festéssel tettük láthatóvá. (B) Ugyanezen sejtekben a mitokondriális fúzióban (Mfn1, Mfn2, Opa1), fisszióban (Fis1, Drp1) és mitofágiában (Parkin, Pink1) részt vevő fehérjék mRNS-szintű expresszióját RT-qPCR technikával ($n=3$) tanulmányoztuk. Az ábrán reprezentatív konfokális mikroszkóppal készült felvételek, illetve 3 független kísérletből származó kiértékelésük láthatók. A konfokális mikroszkóppal készült felvételek kiértékelése során az ImageJ szoftver EzColocalization plugin-jét alkalmaztuk. Az adatok átlag \pm SEM formában vannak feltüntetve. A statisztikai szignifikanciát kétmintás t-próbával határoztuk meg. A *, ** és *** statisztikai szignifikanciát jelez a scPARP2 és shPARP2 HepG2 sejtek között, ahol $p < 0,05$, $p < 0,01$, illetve $p < 0,001$.

5.3.4. A PARP-2 hiánya oxidatív stresszt indukál

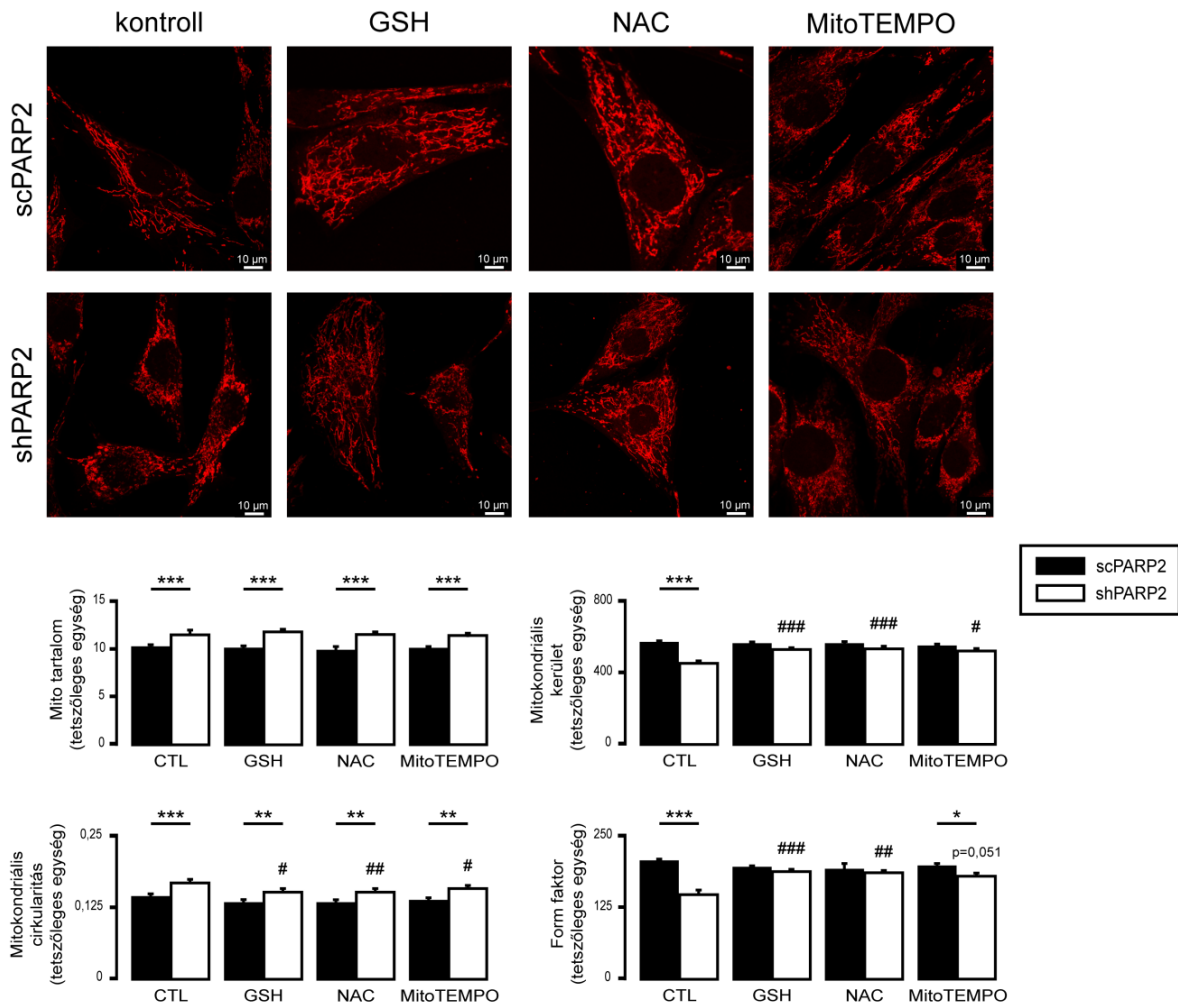
Számos esetben bizonyították már, hogy a PARP-gátlás hatására megváltozik a sejtek redox állapota (Virag és Szabo, 2002; Pacher és mtsai, 2007), ezért döntöttünk mi is amellett, hogy oxidatív és nitrozatív stressz markereket tanulmányozunk a scPARP2 és shPARP2 C2C12 sejtekben. Először hidroetidin festéssel vizsgáltuk a szuperoxid-termelést, mely emelkedést mutatott PARP-2 csendesített sejtekben (**30. ábra A**). A következő kísérletben fokozott lipidperoxidációt detektáltunk a tiobarbitursav-reaktív termékek (TBARS) meghatározásával (**30. ábra B**), illetve Western blot technikával a 4-hidroxinonenál (4HNE)-módosított fehérjék expressziójának vizsgálatával (**30. ábra C**) PARP-2 hiányában, melyek emelkedett oxidatív hatásra utalnak. A nitrozatív stressz markereként először fehérjeszinten Western blot technikával enyhén emelkedett indukálható nitrogén-monoxid szintáz (iNOS) expressziót mutattunk ki PARP-2 hiányában (**30. ábra D**), majd a nitrotirozin (NTyr) kifejeződését tanulmányoztuk Western blot módszerrel, mely során enyhe emelkedést tapasztaltunk PARP-2 csendesített sejtekben (**30. ábra E**). A Nox4, mely a NADPH-oxidáz egyik egysége, mRNS-szintű expressziójában csökkenést figyeltünk meg, melyből arra következtethetünk, hogy a fokozott ROS-termelés forrása nem a NADPH-oxidáz (**30. ábra F**). Eredményeink azt mutatják, hogy PARP-2 hiányában megváltozik a sejtek redox homeosztázisa, oxidatív stressz indukálódik.



30. ábra A PARP-2 hiánya oxidatív stresszt idéz elő

A scPARP2 és shPARP2 C2C12 sejtekben vizsgáltuk a szuperoxid-produkciót hidroetidín (HE) festéssel ($n=3$) (A), a lipidperoxidáció mértékét TBARS vizsgálattal ($n=3$) (B) és a 4-hidroxinonenál (4HNE) tanulmányozásán keresztül Western blottal ($n=3$) (C), az indukálható nitrogén-monoxid szintáz (iNOS) (D) és nitrotirozin (NTyr) expressziót (E) Western blottal ($n=3-3$), míg a NADPH-oxidáz 4 (Nox4) mRNS-szintű expresszióját RT-qPCR-el ($n=3$) (F). Az ábrán reprezentatív Western blot képek, illetve 3 független kísérletből származó denzitometriás kiértékelésük láthatók. Az adatok átlag \pm SEM formában vannak feltüntetve. A statisztikai szignifikanciát kétmintás t-próbával határoztuk meg. A *, ** és *** statisztikai szignifikanciát jelez a scPARP2 és shPARP2 C2C12 sejtek között, ahol $p<0,05$, $p<0,01$, illetve $p<0,001$.

Ezt követően azt szeretnénk volna tisztázni, hogy a PARP-2 hiányában megjelenő mitokondriális fragmentáció, illetve az emelkedett ROS-termelés összefüggésben áll-e egymással. Ennek érdekében a kontroll és PARP-2 csendesített mioblaszt sejteket általános tiol-reduktánsokkal, GSH-nal és N-acetil-L-ciszteinnel (NAC), illetve a mitokondriumot célzó antioxidánssal, MitoTEMPO-val kezeltük, majd MitoTracker Red fluoreszcens festékkel vizsgáltuk a mitokondriális morfológiában bekövetkező változásokat (**31. ábra**). A konfokális mikroszkóppal készült felvételeket az ImageJ szoftver Mito-Morphology makrójával elemeztük. A mitokondriális tartalomban, mely mitokondriális biogenezisre utal, antioxidáns-kezelés hatására sem detektáltunk változást, azonban a PARP-2 hiányában bekövetkező mitokondriális morfológiai változást mindhárom antioxidánsal történő kezelés mérsékelni tudta. A mitokondriális kerületben és form faktorban növekedést, míg a cirkularitásban csökkenést tapasztaltunk, melyek arra utalnak, hogy a PARP-2 hiány által előidézett mitokondriális fragmentáció alapja a részben mitokondriális eredetű oxidatív stressz.

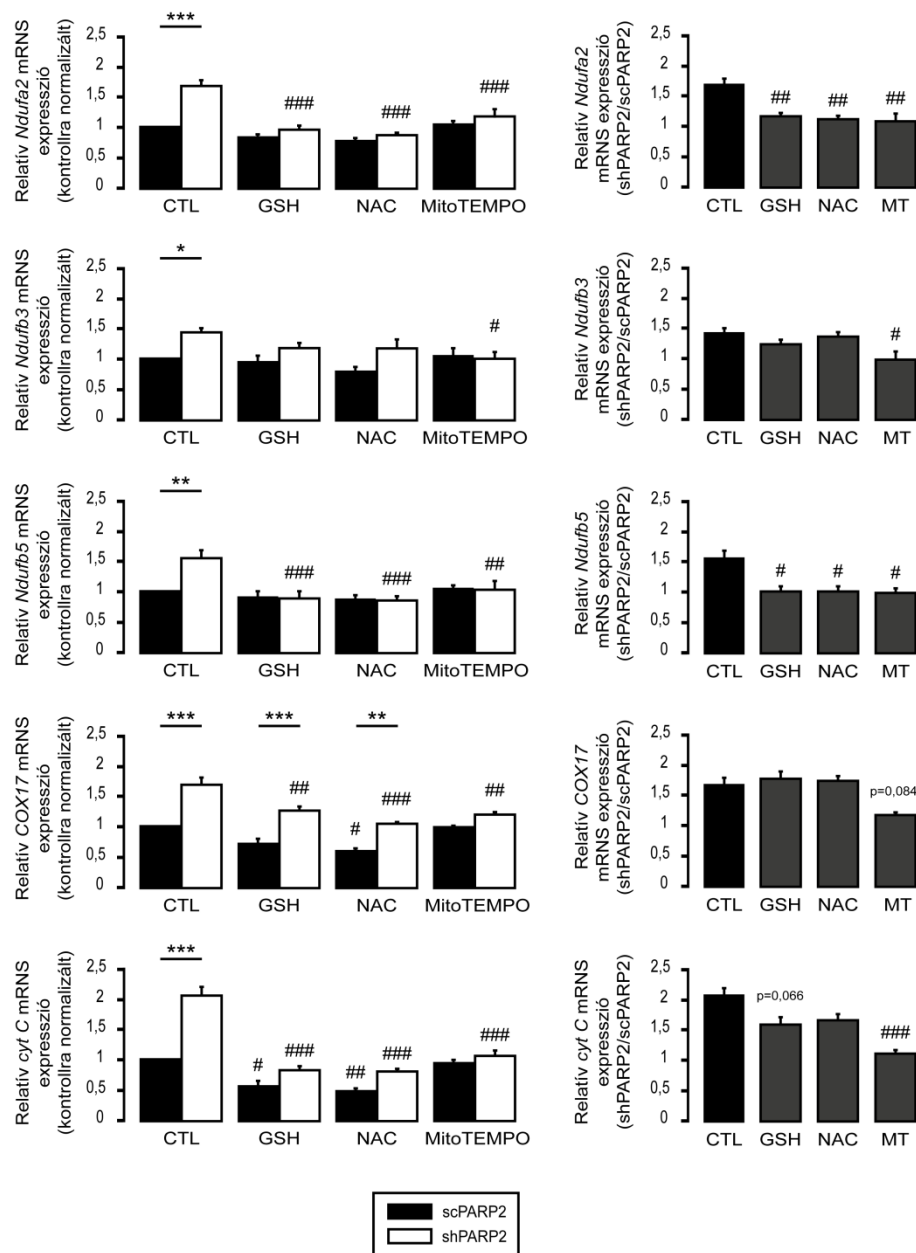


31. ábra Az antioxidánsok alkalmazása visszaállítja a PARP-2 hiányában megjelenő megváltozott mitokondriális struktúrát

A scPARP2 és shPARP2 C2C12 sejteket 48 órán keresztül 5 mM glutationnal (GSH), 5 mM N-acetil-L-ciszteinnel (NAC) vagy 10 μM MitoTEMPO-val kezeltük, majd a mitokondriális struktúrát MitoTracker Red fluoreszcens festékkel ($n=3$) tanulmányoztuk. Az ábrán reprezentatív konfokális mikroszkóppal készült felvételek, illetve 3 független kísérletből származó kiértékelésük láthatók. A felvételek kiértékelése során az ImageJ szoftver Mito-Morphology makróját alkalmaztuk. Az adatok átlag \pm SEM formában vannak feltüntetve. A statisztikai szignifikanciát egyutas ANOVA teszttel határoztuk meg, mely során Tukey-féle poszt-hoc tesztet alkalmaztunk. A *, ** és *** statisztikai szignifikanciát jelez a scPARP2 és shPARP2 C2C12 sejtek között, ahol $p<0,05$, $p<0,01$, illetve $p<0,001$. A #, ## és ### statisztikai szignifikanciát jelöl a kontroll és a kezelt mintacsoport között, ahol $p<0,05$, $p<0,01$, illetve $p<0,001$.

Következő kísérletünkben arra szerettünk volna választ kapni, hogy az előzőleg alkalmazott antioxidánsokkal történő kezelésre hogyan reagálnak a mitokondriális légzési lánc tagjai, melyekről korábban már kimutatták, hogy PARP-2 hiányában expressziójuk fokozódik (Bai és mtsai, 2011). Ezért a kontroll és PARP-2 csendesített C2C12 sejteket antioxidánsokkal kezeltük, majd RT-qPCR segítségével öt fehérje, a Ndufa2, Ndufb3, Ndufb5, COX17 és cyt C mRNS-szintű expresszióját vizsgáltuk (32. ábra). A vizsgált

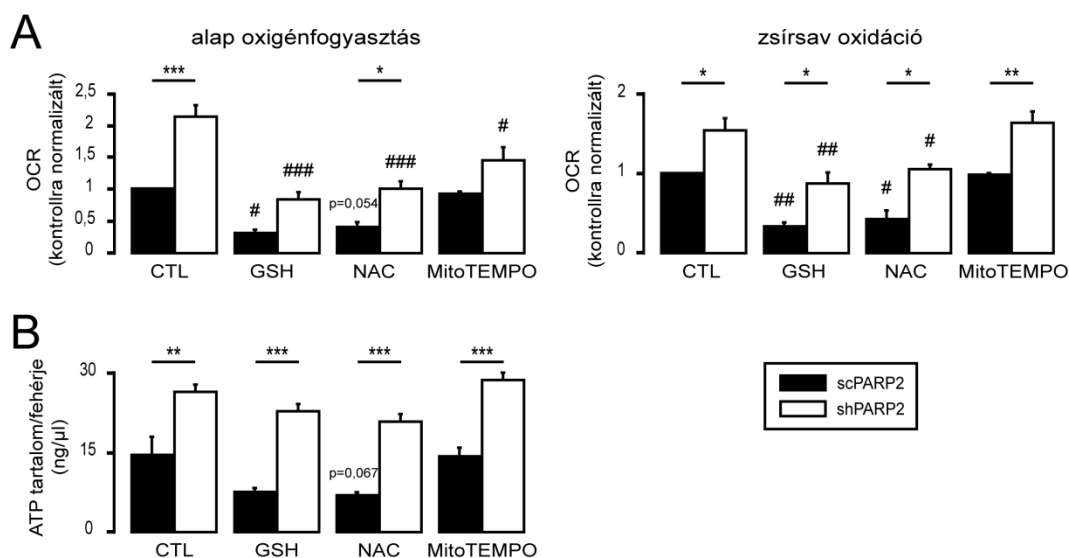
fehérjék expressziójában a kezeletlen kontroll és PARP-2 csendesített sejtekben szignifikáns különbséget figyeltünk meg, mely különbségek az antioxidánsokkal történő kezelés hatására mérséklődtek.



32. ábra Az antioxidánsok redukálják a PARP-2 csendesítés hatására megnövekedett mitokondriális gének expresszióját

A scPARP2 és shPARP2 C2C12 sejteket 48 órán keresztül 5 mM glutationnal (GSH), 5 mM N-acetil-L-ciszteinnel (NAC) vagy 10 μ M MitoTEMPO-val (MT) kezeltük, majd a feltüntetett mitokondriális gének (Ndufa2, Ndufb3, Ndufb5, COX17, cyt C) mRNS-szintű expresszióját RT-qPCR-rel ($n=3$) tanulmányoztuk. Az adatok átlag \pm SEM formában vannak feltüntetve. A statisztikai szignifikanciát egyutas ANOVA teszttel határoztuk meg, mely során Tukey- vagy Dunnett-féle poszt-hoc tesztet alkalmaztunk. A *, ** és *** statisztikai szignifikanciát jelez a scPARP2 és shPARP2 C2C12 sejtek között, ahol $p<0,05$, $p<0,01$, illetve $p<0,001$. A #, ## és ### statisztikai szignifikanciát jelöl a kontroll és a kezelt mintacsoport között, ahol $p<0,05$, $p<0,01$, illetve $p<0,001$.

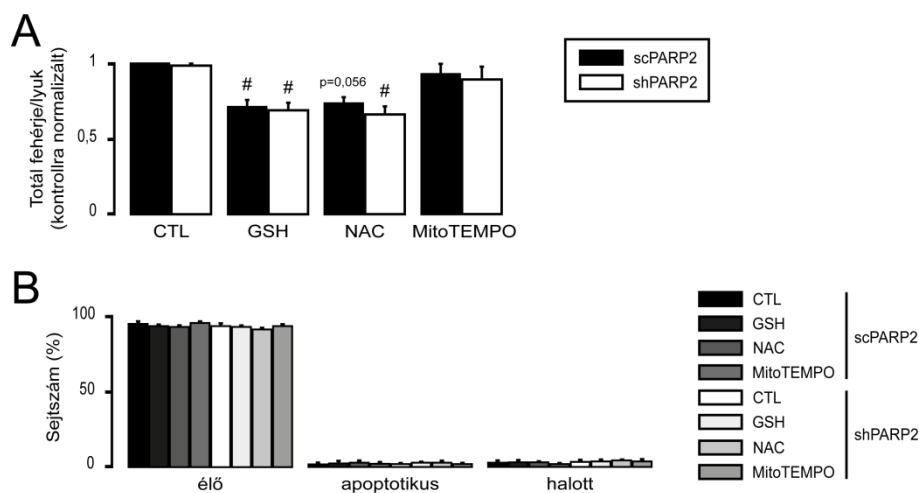
Az antioxidánsok hatását a sejtek oxigénfogyasztására, illetve a zsírsav oxidáció mértékére Seahorse oximéterrel vizsgáltuk, míg az ATP tartalmat fluoreszcens mérésel határoztuk meg. Mind az alap oxigénfogyasztásban és zsírsav oxidációban (**33. ábra A**), mind az ATP tartalomban (**33. ábra B**) csökkenést találtunk az antioxidánsokkal történő kezelést követően a kontroll és a PARP-2 csendesített C2C12 sejtekben. A PARP-2 hiányában megfigyelt fokozott oxigénfogyasztás, zsírsav oxidáció és ATP tartalom az antioxidánsokkal történő kezelést követően mérséklődött.



33. ábra Az antioxidánsok alkalmazása mérsékli a sejtek alap oxigénfogyasztását, a zsírsav oxidációt, illetve az ATP tartalmat

A scPARP2 és shPARP2 C2C12 sejteket 48 órán keresztül 5 mM glutationnal (GSH), 5 mM N-acetil-L-ciszteinnel (NAC) vagy 10 μ M MitoTEMPO-val kezeltük, majd az alap oxigénfogyasztás és a zsírsav oxidáció mértékét Seahorse mérésel ($n=3$) (A), míg az ATP tartalmat ATP Assay Kit segítségével ($n=3$) (B) határoztuk meg. Az adatok átlag \pm SEM formában vannak feltüntetve. A statisztikai szignifikanciát egyutas ANOVA teszttel határoztuk meg, mely során Tukey-féle poszt-hoc tesztet alkalmaztunk. A *, ** és *** statisztikai szignifikanciát jelez a scPARP2 és shPARP2 C2C12 sejtek között, ahol $p<0,05$, $p<0,01$, illetve $p<0,001$. A #, ## és ### statisztikai szignifikanciát jelöl a kontroll és a kezelt mintacsoport között, ahol $p<0,05$, $p<0,01$, illetve $p<0,001$.

Az antioxidánsok további hatását vizsgálva a GSH-nal, NAC-nel és MitoTEMPO-val kezelt scPARP2 és shPARP2 C2C12 sejtekben a sejtproliferációt, illetve a sejthalált tanulmányoztuk. Eredményeink alapján az antioxidánsok közül a GSH és a NAC csökkentette a sejtek proliferációs képességét, azonban nem találtunk különbséget a scPARP2 és shPARP2 sejtek között (**34. ábra A**). A MitoTEMPO nem volt hatással erre a folyamatra. Emellett sem az antioxidánsok, sem a PARP-2 csendesítés nem befolyásolta a sejthalál folyamatokat (**34. ábra B**).



34. ábra Az antioxidánsok nincsenek hatással a sejtek proliferációjára, illetve nem okoznak sejthalált

A scPARP2 és shPARP2 C2C12 sejteket 48 órán keresztül 5 mM glutationnal (GSH), 5 mM N-acetil-L-ciszteinnel (NAC) vagy 10 μ M MitoTEMPO-val kezeltük, majd a sejtproliferációt SRB méréssel ($n=3$) (A), míg az apoptotikus és nekrotikus sejtek elkülönítését FITC Annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit ($n=3$) (B) segítségével határoztuk meg. Az adatok átlag \pm SEM formában vannak feltüntetve. A statisztikai szignifikanciát egyutas ANOVA teszttel határoztuk meg, mely során Tukey-féle poszt-hoc tesztet alkalmaztunk. A # statisztikai szignifikanciát jelöl a kontroll és a kezelt mintacsoport között, ahol $p < 0,05$.

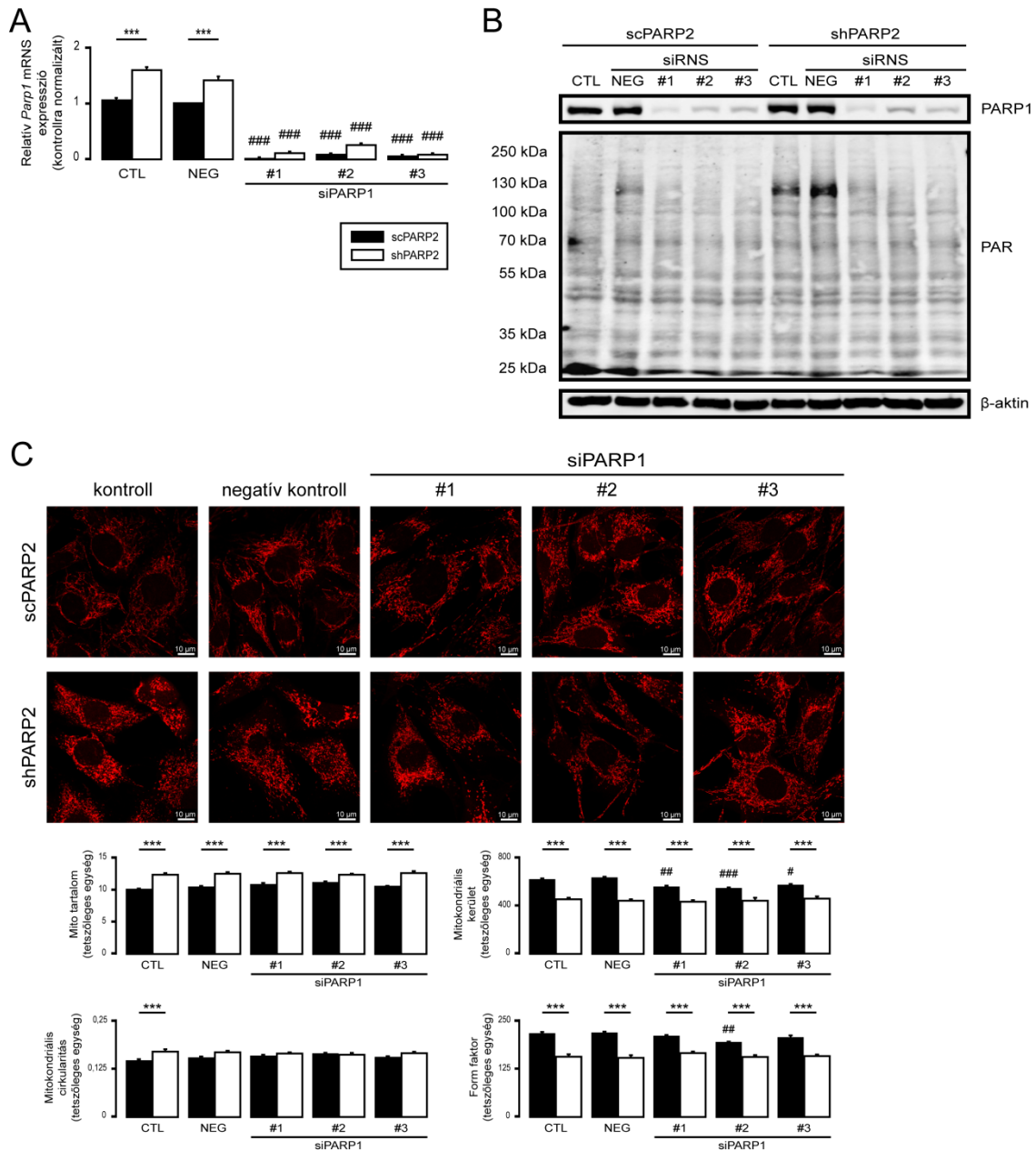
5.3.5. A PARP-1-nek és a PARP-3-nak nincs szerepe a PARP-2 hiány által előidézett megváltozott mitokondriális morfológiában

Korábbi vizsgálatok igazolták, hogy a másik két DNS hibajavításban részt vevő PARP enzim, a PARP-1 és a PARP-3 aktivitása befolyásolhatja a mitokondriális struktúrát (Mouchiroud és mtsai, 2013; Rodriguez-Vargas és mtsai, 2020). Ennek érdekében következő kísérleteinkben azt tanulmányoztuk, hogy a PARP-1 és a PARP-3 összefüggésben áll-e a PARP-2 hiányában tapasztalt mitokondriális morfológiai változással.

A PARP-1 mitokondriális struktúrára kifejtett hatását a kontroll és PARP-2 csendesített C2C12 mioblaszt sejtekben először a PARP-1 tranziens csendesítésével kezdtük. A csendesítés hatékonyságát mRNS- és fehérjeszinten RT-qPCR és Western blot módszerekkel ellenőriztük (35. ábra A-B), majd ugyanezen sejtekben vizsgáltuk a PARiláció mértékét Western blottal (35. ábra B). A PAR Western blot képen jól látható, hogy a PARP-1 gén tranziens csendesítése a PARP-1 enzim autoPARilációjának mértékét is csökkentette. Ugyanezen sejtekben tanulmányoztuk a mitokondriális morfológiát MitoTracker Red fluoreszcens festékkel (35. ábra C). A fluoreszcens felvételek kiértékelése során az ImageJ szoftver Mito-Morphology makróját használtuk, mely alkalmával a kontroll sejtekben PARP-

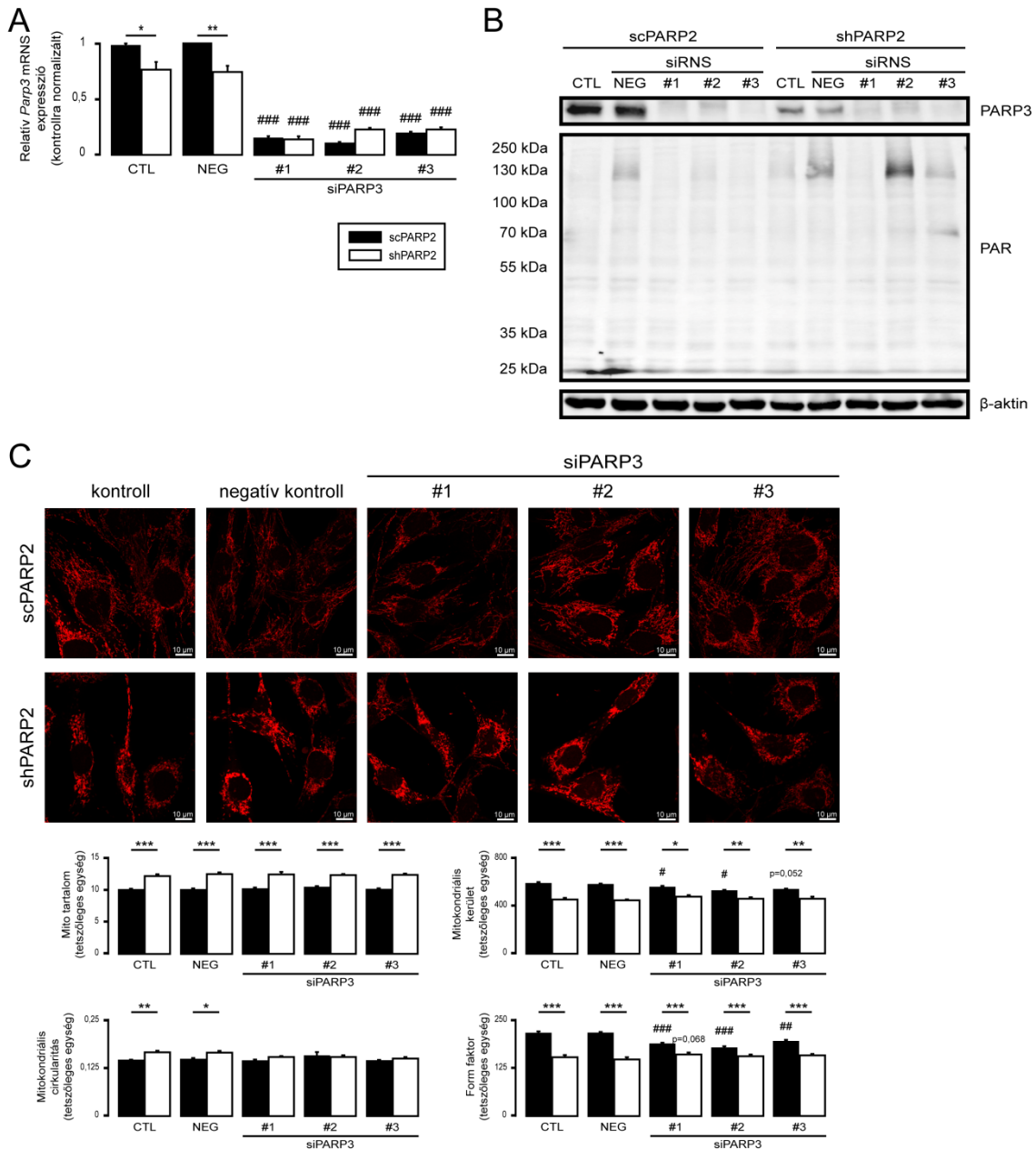
1 hiány esetén a mitokondriális struktúra enyhe fragmentálódását figyeltük meg, azonban a PARP-2 hiányban megjelenő megváltozott mitokondriális morfológiára a PARP-1 enzim csendesítése nem volt hatással.

A PARP-3 enzimet, a PARP-1-hez hasonlóan, tranziensen csendesítettük scPARP2 és shPARP2 C2C12 sejtekben, majd a csendesítés eredményességét RT-qPCR és Western blot technikákkal mRNS- és fehérjeszinten ellenőriztük (**36. ábra A-B**), illetve ugyanezen PARP-3 csendesített sejtekben vizsgáltuk a PARiláció mértékét (**36. ábra B**). Két PARP-3-at célzó siRNS esetében a PAR Western blot képen növekedést tapasztaltunk, mely fokozott PARP-1 aktivitásra utal. Ugyanezen sejtekben a mitokondriális morfológiát MitoTracker Red fluoreszcens festékkel vizsgáltuk (**36. ábra C**), majd a fluoreszcens felvételek elemzése során, a PARP-1-hez hasonlóan a kontroll sejtekben igen, míg a PARP-2 csendesített sejtekben nem tapasztaltunk változást.



35. ábra A PARP-1 csendesítés nincs hatással a PARP-2 hiányában jelentkező megváltozott mitokondriális struktúrára

(A) A scPARP2 és shPARP2 C2C12 sejtekben a PARP-1 tranziens transzfekcióval való csendesítése során háromféle, a PARP-1 géne specifikus siRNS-t (siPARP1 #1, #2 és #3), illetve negatív kontroll siRNS-t (NEG) és transzfektálatlan kontroll sejteket (CTL) használtunk, majd a PARP-1 fehérje- és mRNS-szintű expresszióját RT-qPCR ($n=3$) és Western blot technikával ($n=3$) határoztuk meg. Ugyanezen sejtekben a poli(ADP-ribozil)áció (PARiláció) mértékét Western blot módszerrel ($n=3$) (B), míg a mitokondriális struktúrát MitoTracker Red fluoreszcens festékkel ($n=3$) (C) tanulmányoztuk. Az ábrán reprezentatív Western blot képek és konfokális mikroszkóppal készült immunfluoreszcens felvételek, illetve 3 független kísérletből származó kiértékelésük láthatók. A konfokális mikroszkóppal készült felvételek kiértékelése során az ImageJ szoftver Mito-Morphology makróját alkalmaztuk. Az adatok átlag \pm SEM formában vannak feltüntetve. A statisztikai szignifikanciát egyutas ANOVA teszttel határoztuk meg, mely során Tukey-féle poszt-hoc tesztet alkalmaztunk. A *** statisztikai szignifikanciát jelez a scPARP2 és shPARP2 C2C12 sejtek között, ahol $p < 0,001$. A #, ## és ### statisztikai szignifikanciát jelöl a negatív kontroll és a transzfektált mintacsoport között, ahol $p < 0,05$, $p < 0,01$, illetve $p < 0,001$.



36. ábra A PARP-3 csendesítés nem befolyásolja a módosult mitokondriális struktúráját, mely PARP-2 hiányában jelenik meg

(A) A scPARP2 és shPARP2 C2C12 sejtekben a PARP-3 tranziens transzfekcióval való csendesítése során háromféle, a PARP-3 génre specifikus siRNS-t (siPARP3 #1, #2 és #3), illetve negatív kontroll siRNS-t (NEG) és transzfektálatlan kontroll sejteket (CTL) használtunk, majd a PARP-3 fehérje- és mRNS-szintű expresszióját RT-qPCR ($n=3$) és Western blot technikával ($n=3$) határoztuk meg. Ugyanezen sejtekben a poli(ADP-ribozil)áció (PARiláció) mértékét Western blot módszerrel ($n=3$) (B), míg a mitokondriális struktúráját MitoTracker Red fluoreszcens festékkel ($n=3$) (C) tanulmányoztuk. Az ábrán reprezentatív Western blot képek és konfokális mikroszkóppal készült immunfluoreszcens felvételek, illetve 3 független kísérletből származó kiértékelésük láthatók. A konfokális mikroszkóppal készült felvételek kiértékelése során az ImageJ szoftver Mito-Morphology makróját alkalmaztuk. Az adatok átlag \pm SEM formában vannak feltüntetve. A statisztikai szignifikanciát egyutas ANOVA teszttel határoztuk meg, mely során Tukey-féle poszt-hoc tesztet alkalmaztunk. A *, ** és *** statisztikai szignifikanciát jelez a scPARP2 és shPARP2 C2C12 sejtek között, ahol $p<0,05$, $p<0,01$, illetve $p<0,001$. A #, ## és ### statisztikai szignifikanciát jelöl a negatív kontroll és a transzfektált mintacsoport között, ahol $p<0,05$, $p<0,01$, illetve $p<0,001$.

VI. Megbeszélés

A PARP-2 enzim biológiai szerepét eredetileg a DNS hibajavításra szűkítették (Ame és mtsai, 1999), azonban az enzim felfedezése óta eltelt több mint 20 évben számos más metabolikus folyamatban is igazolták jelenlétét: a spermatogenezisben (Dantzer és mtsai, 2006; Quenet és mtsai, 2009), a T-sejtek érése során (Yelamos és mtsai, 2006), az erythropoiesis-ben (Farres és mtsai, 2013; Farres és mtsai, 2015), a lipid metabolizmusban (Bai és mtsai, 2007; Marton és mtsai, 2018), a koleszterol homeosztázisban (Szanto és mtsai, 2014), illetve a tüdő morfogenezisében (Maeda és mtsai, 2006). Értekezésem fő célja a PARP-2 alapvető fiziológiai folyamatokban, az autofágiában és a mitokondriális minőségkontrollban betöltött szerepének vizsgálata volt.

6.1. A PARP-2 deplécióna esetén az autofágia zavart szenved

Az autofágia minden eukarióta sejtre jellemző intracelluláris lebontó folyamat, melynek fő feladata a citoprotekció, mely során a sejt a saját anyagait eliminálja, a feleslegessé vált vagy funkciójukat veszített organelleket vagy makromolekulákat bontja le. Mindemellett az intracelluláris patogének elleni védelemben is fontos szerepet tölt be az autofágia (Wileman, 2013). A folyamat fő szabályozói a sejtek energiaszenzorai, az AMPK és a mTOR kináz komplexek. Minden sejtben folyamatosan jelen van az autofágia, melynek zavara patofiziológias állapotok kialakulásához vezethet (Ravikumar és mtsai, 2004; Nixon és mtsai, 2005; Komatsu és mtsai, 2006; Martinez-Vicente és mtsai, 2008; Mizushima és mtsai, 2008; Cheung és Ip, 2009). A PARP enzimcsalád tagjai közül a PARP-1 (Munoz-Gamez és mtsai, 2009; Zhou és mtsai, 2013; Rodriguez-Vargas és mtsai, 2016) és a PARP-10 (Kleine és mtsai, 2012) enzimeket korábban már azonosították az autofágia folyamatában, azonban a PARP-2 autofágiában betöltött szerepét ez idáig még nem írták le.

Az autofágiát olyan egér eredetű mioblaszt sejtekben tanulmányoztuk, melyben munkacsoportunk egy korábbi kísérletsorozat alkalmával már elvégezte a PARP-2 csendesítését shRNA technikával (Bai és mtsai, 2011). Kísérleti eredményeink azt mutatják, hogy a PARP-2 csendesítés növeli az autofág természetű vezikulumok számát, mely a PARP-2 hiányában tapasztalható fokozott LC3 expresszióban nyilvánult meg. Ezen eredményt a PARP-2 siRNA technikával történő akut csendesítése alkalmával is megerősítettük. Következő kísérletünk alkalmával arra kerestük a választ, hogy az autofágia folyamatát

módosítani képes anyagokkal történő kezelésre hogyan reagál a kontroll és a PARP-2 csendesített sejtvonal, esetleg eltérő változások tapasztalhatók-e a két sejtvonalban. A chloroquine, mint autofágia inhibitor a lizoszómális pH neutralizálásával gátolja a lizoszómális degradáció folyamatát (Fedorko, 1967; Amaravadi és mtsai, 2007), míg a szérum-éheztetés a mTOR komplex szabályozásán keresztül indítja be a folyamatot (Jung és mtsai, 2009; Chen és Klionsky, 2011). A chloroquine kezelés, illetve a szérum-éheztetés hatására is fokozott LC3 expressziót detektáltunk a kontroll és a PARP-2 csendesített sejtvonalban, azonban a PARP-2 hiányában megfigyelhető két sejtvonal közti LC3-szignál különbség eltűnt, az LC3 expresszió mindkét kezelés hatására azonos szintet ért el, mely arra utal, hogy a PARP-2 enzim hiánya elsősorban az alap autofágia aktivitását gátolja. Irodalmi adatok utalnak arra, hogy a szérum-depléción csökken a PARP-2 expresszió. Sun és munkatársai kimutatták, hogy a szérum-éhezés során a PARP-2 mRNS-szintű expressziója nem változik meg, hanem a PARP-2 proteoszómális degradációja gyorsul fel (Sun és mtsai, 2019).

Kutatási eredményeink alapján megállapítható, hogy a PARP-2 depléción átrendezi a sejtek energiaérzékelési rendszerét: az AMPK és a mTORC2 aktivitásában csökkenést tapasztaltunk PARP-2 hiányában. Az AMPK szerepe ismert az autofágia folyamatában, irodalmi ismereteink szerint az AMPK az autofágia induktora (Hardie, 2007; Zhou és mtsai, 2013; Rodriguez-Vargas és mtsai, 2016). Eredményeink azonban arra utalnak, hogy az AMPK aktiválása AICAR-ral részlegesen blokkolja a PARP-2 csendesítése során bekövetkező megnövekedett autofágia aktivitást, mely azt sugallja, hogy a PARP-2 csendesítés során fellépő AMPK aktivitás csökkenés hozzájárul az autofágia aktivitásának megnövekedéséhez. Míg a mTORC1 aktivitását nem befolyásolja a PARP-2 hiánya, a mTORC2 aktivitásában enyhe csökkenést tapasztaltunk PARP-2 csendesített sejtekben. Korábban már azonosították az autofágia mTORC1-független és mTORC2-függő formáját is, mely esetben az Akt foszforilációja a mTORC2 által nem változtatja meg a mTORC1 aktivitását (Lampada és mtsai, 2017). Azonban a PARP-2 enzim és a mTOR komplex tagjai közti kapcsolatot eddig még nem azonosították. Jelenleg is folynak kutatásaink, mely a PARP-2 és a mTOR komplexek közti kölcsönhatást vizsgálja. Előzetes eredményeink alapján megállapítható, hogy a mTORC2 csökkent aktivitása a komplexben található Rictor fehérje csökkent expressziójára vezethető vissza, melyről emellett korábban már kimutatták, hogy PARilálható (Isabelle és mtsai, 2012).

Az autofágia szabályozása komplex folyamat, melyben a fő regulátorokon, a mTOR komplexeken és az AMPK-n kívül, a SIRT1-nek is szerepe van. Korábban már megfigyelték, hogy a SIRT1 aktiváció autofágiát indukál a LC3-I–LC3-II konverzió és a fokozott autofagoszóma képzés által (Lee és mtsai, 2008). A SIRT1 direkt és indirekt módon is befolyásolhatja az autofágiát. Egyrészt direkten képes kölcsönhatásba lépni és deacetilálni az autofágia mechanizmusában részt vevő kulcsfehérjéket, az Atg5-öt, az Atg7-et és az Atg8-at (Lee és mtsai, 2008), másrészt indirekt módon a FOXO transzkripciós faktorok deacetilálása révén szabályozza az autofágia mechanizmusát. A SIRT1 által deacetilált FOXO1 a Rab7 transzkripciójának indukálásával az autofagoszóma formálását serkenti, míg a deacetilált FOXO3 a Bnip3 és NIX receptorok transzkripciójának serkentésével okoz autofágiát (Kroemer és mtsai, 2010). A SIRT1 aktivációja miatt indukálódó autofágia kardioprotektív (Gottlieb és Mentzer, 2010) és neuroprotektív hatású (Marino és mtsai, 2011). Eredményeink alapján a PARP-2 depléciónak során bekövetkező autofágia indukció a SIRT1 PARP-2 hiányában megjelenő fokozott aktivációjával is összefüggésben van. A PARP-2 csendesítés növeli a SIRT1 aktivitást, mivel a PARP-2 a SIRT1 promóterének represszora, így a PARP-2 deplécióna esetén fokozott SIRT1 expresszió és aktivitás figyelhető meg (Bai és mtsai, 2011). 3-MA-val gátolva az autofágiát a SIRT1 expressziója csökken, azonban a rezveratrol SIRT1-függő módon autofágiát indukál (Morselli és mtsai, 2011). Fontos megemlíteni, hogy a rezveratrol SIRT1- és mTOR-független módon az autofágia gátlását okozhatja a S6 kináz direkt gátlásán keresztül (Armour és mtsai, 2009). Emellett az intracelluláris NAD^+ koncentrációnak is hatása van az autofágia folyamatára a SIRT1 és a PARP-1 enzimek aktivitásának befolyásolása révén, mivel mindkét enzim aktivitását szabályozza a NAD^+ koncentráció (Hippkiss, 2009; Zhang és mtsai, 2016). Kísérleteink során NR-dal, egy NAD^+ prekuzorral kezelve a sejteket megállapítottuk, hogy a NAD^+ szint emelése képes megfordítani a PARP-2 csendesítés során kialakuló LC3-pozitív vezikulum akkumulációt. A SIRT1 farmakológiai gátlása és génszintű csendesítése is, az irodalmi adatokkal összhangban (Ng és Tang, 2013), csökkentette az autofág vezikulumok számát.

Eredményeink alapján megállapítható, hogy a PARP-2 gén csendesítése fokozza a LC3-pozitív autofág vezikulumok számát a sejt energiaszenzorainak, az AMPK és a mTORC2 aktivitásának csökkentése, illetve a SIRT1 aktivitásának emelése által. A PARP-2 hiánya átrendezi a sejtek energiaérzékelését, mely hatására a bazális autofágia zavart szenved és elakad (**37. ábra**).

6.2. A PARP-2 hiánya mitokondriális fragmentációt okoz és oxidatív stresszt indukál

Kutatásunk második részeként a PARP-2 és a mitokondrium kapcsolatát tanulmányoztuk. A PARP-2 és a mitokondrium kapcsolatát korábban már számos esetben azonosították (Bai és mtsai, 2011; Szanto és mtsai, 2012; Mohamed és mtsai, 2014), azonban kutatásunk során a kapcsolatukról ismereteinket szeretnénk bővíteni. A PARP-2 hiányában megjelenő mitokondriális biogenezis folyamatában a fokozott SIRT1 aktivációnak van szerepe (Bai és mtsai, 2011). Oxidatív fenotípus detektálható PARP-2 depletált egerek vázizmában és májában, emellett emelkedett mitokondriális tartalom és mtDNS mennyiség is észlelhető PARP-2 knockout egerekben (Bai és mtsai, 2011; Szanto és mtsai, 2012; Mohamed és mtsai, 2014).

A mitokondriális struktúrát először egér eredetű C2C12 sejteken tanulmányoztuk, mely sejtekben a PARP-2 shRNS technikával volt csendesítve (Bai és mtsai, 2011), majd a kapott eredményeinket PARP-2 csendesített humán HepG2 sejteken, illetve a PARP-2 akut csendesítése alkalmával is megerősítettük. Eredményeink szerint a PARP-2 csendesítése megváltoztatja a mitokondriális hálózatot, a struktúra töredezettségét okozza. Emellett a PARP-2 depléció alkalmával a mitokondriális tartalomban is növekedést tapasztaltunk, mely a korábbi kutatási eredményekkel korrelál (Bai és mtsai, 2011; Mohamed és mtsai, 2014) és mitokondriális biogenezisre utal. A másik major PARP enzimről, a PARP-1-ről korábban már igazolták, hogy hatással van a mitokondriális hálózat integritására (Fang és mtsai, 2014).

Sokféle párhuzamos útvonal okozhatja a mitokondriális hálózat fragmentációját, többek között a mitokondriumok organellum-szelektív lebontása, a mitofágia (Rodriguez-Enriquez és mtsai, 2006), a mitokondriális fúzió–fisszió folyamatának helytelen működése, a folyamatban részt vevő fehérjék expresszióbeli változása vagy teljes hiánya (Scott és Youle, 2010; Westermann, 2010; van der Blik és mtsai, 2013), illetve a SIRT1 aktiváció (Jang és mtsai, 2012; Andreux és mtsai, 2013; Liu és mtsai, 2017). Irodalmi adatok szerint a PARP-1 gátlása mitofágiát okozhat, mivel a PARP-1 hiperaktivációja miatt csökken az intracelluláris NAD^+ koncentráció és következményesen a SIRT1 aktivitás, mely fokozza a Pink1 aktivációját és mitokondriális hiperpolarizációt okoz (Fang és mtsai, 2014). A SIRT1 hatással van a mitokondriális hálózatra, mivel a SIRT1 fokozott aktivitása a mitokondriális tartalom növekedését okozza, illetve a mitokondriális hálózat fragmentálódik (Jang és mtsai, 2012). Kísérleti eredményeink szerint azonban a PARP-2 csendesítés hatására bekövetkező SIRT1 aktiváció nem az oka a mitokondriális hálózat megváltozásának. Ezen kívül PARP-2

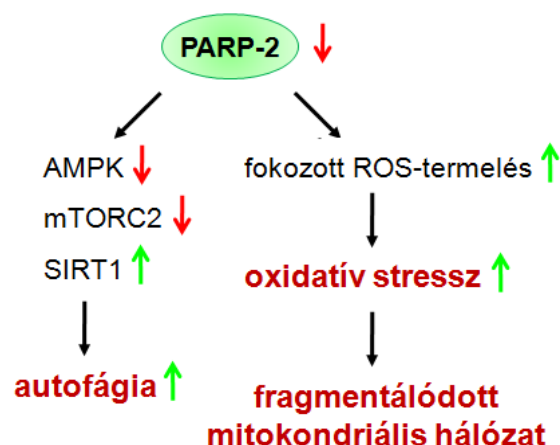
hiányában a mitokondriális dinamika folyamatában sem figyeltünk meg olyan változásokat, melyek a mitokondriális hálózat szétesését magyarázták volna és mind a C2C12, mind a HepG2 sejtvonalban hasonló módon változtak volna, illetve a mitofágia aktivitásában sem mutattunk ki fokozódást. Eredményeink azt sugallják, hogy a PARP-2 hiányában megváltozott mitokondriális hálózatért egyik vizsgált folyamat sem felelős.

Következő kísérletünk során a PARP-2 csendesítés hatására oxidatív stresszt figyeltünk meg. Irodalmi adatok utalnak arra, hogy a PARP genetikai vagy farmakológiai gátlása megváltoztathatja a sejtek redox állapotát (Virag és Szabo, 2002; Pacher és mtsai, 2007). Kísérleteink során a PARP-2 depléciója esetén az oxidatív stressz markerekben, többek között a hidroetidín festés által detektált szuperoxid-termelésben, illetve a 4HNE-módosított fehérjék expressziójában és a TBARS mérés során a tiobarbitursav-reaktív termékek képződésében a lipidperoxidációban emelkedést tapasztaltunk, melyek a PARP-2 hiányában megjelenő fokozott oxidatív stresszre utalnak. Általános tiol-reduktánsokkal, GSH-nal és NAC-nel, valamint a mitokondriumot célzó antioxidánsokkal, a MitoTEMPO-val történő kezelés után megállapítottuk, hogy az antioxidánsok nem befolyásolják a PARP-2 hiányában tapasztalható mitokondriális biogenezist, a mitokondriális tartalmat nem változtatják meg, azonban a PARP-2 hiányában tapasztalt megváltozott mitokondriális hálózatra hatással vannak. A PARP-2 hiányában megfigyelhető fragmentálódott mitokondriális struktúrát az antioxidánsokkal történő kezelés helyreállítja, a kontroll sejtekre jellemző fenotípus, hálózatos mitokondriális struktúra jelenik meg. Korábban számos esetben bizonyították már, hogy a fokozott ROS-termelés a mitokondriumok fragmentációját okozza. A mitokondriális dinamikában bekövetkező változások szorosan kapcsolódnak a sejtek redox homeosztázisához (Jezek és mtsai, 2018; Chelombitko és mtsai, 2020). A MitoTEMPO-ról korábban már kimutatták, hogy hatással van a mitokondrium morfológiájára (Hegedus és mtsai, 2021). A PARP-2 csendesítés a mitokondriális légzési lánc egyes tagjainak, mint a Ndufa2, a Ndufb3, a Ndufb5, a COX17 és a cyt C mRNS-szintű expresszióját növeli (Bai és mtsai, 2011). Kísérleti eredményeink szerint a PARP-2 hiányában tapasztalható fokozott expressziójukat az alkalmazott antioxidánsok képesek voltak csökkenteni. Emellett az antioxidánsokkal történő kezelést követően csökkent a sejtek oxigénfogyasztása, a zsírsav oxidáció és következményesen a sejtek ATP tartalma is a kontroll és a PARP-2 csendesített sejtekben is, azonban a kezeletlen kontroll és a PARP-2 sejtek közti különbségek nem változtak. Az antioxidánsok közül a GSH és a NAC, az irodalommal korrelálva (Kusano és mtsai, 2000), csökkentette a sejtek proliferációs képességét, azonban a kontroll és a PARP-2

csendesített sejtek egyformán reagáltak az antioxidáns kezelést követően, nem volt a két sejtvonal között különbség. Emellett kimutattuk, hogy sem az antioxidáns kezelés, sem a PARP-2 csendesítés nincs hatással a spontán sejthalálra. Ezen eredmények arra utalnak, hogy a PARP-2 hiányában tapasztalható emelkedett ROS-termelés forrása részben a mitokondrium és a mitokondriális struktúra fragmentálódását a fokozott ROS-termelés által kiváltott oxidatív stressz okozza.

A PARP enzimes család két tagjáról, a PARP-1-ről és a PARP-3-ról korábban már kimutatták, hogy képesek befolyásolni a mitokondriális morfológiát (Mouchiroud és mtsai, 2013; Rodriguez-Vargas és mtsai, 2020). A PARP-1 farmakológiai gátlása a mitokondriális fúzió folyamatában részt vevő Opa1 fehérje expresszióját mRNS-szinten csökkenti, így töredezettségre jellemzi az olaparibbal kezelt sejtek mitokondriumait (Mouchiroud és mtsai, 2013). A PARP-3 gátlását emelkedett ROS-termeléssel is összefüggésbe hozták, melynek fő származási helye a mitokondriális NADPH-oxidáz (Rodriguez-Vargas és mtsai, 2020). Vizsgálataink szerint azonban a PARP-1 vagy a PARP-3 csendesítése nem okoz morfológiai változásokat a mitokondriális struktúrában, vagyis a PARP-2 csendesített sejtekben megfigyelhető töredezettségre egyik enzim csendesítése sem volt hatással.

Ezen eredmények alapján arra következtethetünk, hogy a PARP-2 enzim hiánya a mitokondriális hálózat fragmentálódását okozza, illetve fokozott ROS-termeléssel jár, mely oxidatív stresszt indukál. PARP-2 hiányában megváltozik a sejtek oxidatív állapota, mely mitokondriális biogenezissel jár és az oxidatív stressz kialakulása a mitokondriális struktúra töredezettségét okozza (37. ábra).



37. ábra A PARP-2 hiányában tapasztalható változások

PARP-2 hiány esetén a sejtek energiaérzékelése zavart szenved, mely a csökkent AMPK és mTORC2, valamint a fokozott SIRT1 aktivitásában nyilvánul meg, melyek az autofágia indukcióját okozzák. Emellett a PARP-2 enzim hiánya megnövekedett ROS-termeléssel jár, mely oxidatív stresszt okoz a sejtekben és a PARP-2 hiányában tapasztalható fragmentálódott mitokondriális hálózatért felelős.

VII. Összefoglalás

A PARP-2 enzim a PARP enzimcsalád tagjaként fehérjék poszttranszlációs módosítását végzi. Irodalmi ismereteink szerint számos metabolikus folyamat szabályozásában vesz részt a PARP-2 enzim. Munkánk során a PARP-2 és az autofágia kapcsolatát, illetve a PARP-2 mitokondriális homeosztázisban betöltött szerepét vizsgáltuk.

Eredményeink alapján a PARP-2 csendesítése során a bazális autofágia zavart szenved, elakad és LC3-pozitív vezikulumok halmozódnak fel a sejtben. A PARP-2 hiánya átrendezi a sejtek energiahomeosztázisát, mivel a PARP-2 hiányában fellépő autofágia zavara az AMPK és a mTORC2 csökkent, valamint a SIRT1 fokozott aktivitására vezethető vissza. A sejtek energiaérzékelésének megváltozása hatással van a PARP-2 hiányában megfigyelhető autofágia zavarral. Az AMPK AICAR-ral történő farmakológiai gátlása, illetve a SIRT1 farmakológiai vagy genetikai csendesítése, valamint a NAD⁺ prekursor, a NR, hatására csökkent LC3 expresszió jelenik meg, vagyis a PARP-2 hiányában fellépő fokozott LC3-pozitív vezikulum akkumulációt ezen vegyületek mérsékelni képesek.

Kimutattuk, hogy a PARP-2 csendesítése a mitokondriális hálózat fragmentációját okozza, emellett a PARP-2 hiányában mitokondriális biogenezist detektáltunk. Sokféle párhuzamos útvonal okozhatja a mitokondriális hálózat integritásának megváltozását, többek között a mitofágia, a mitokondriális dinamikában részt vevő fehérjék megváltozott expressziója vagy diszregulációja, illetve a SIRT1 aktivációja. Kísérleteink során azonban egyik folyamatban sem találtunk olyan változást, mely a PARP-2 hiányában jelentkező mitokondriális struktúrabeli változást indokolhatná. A PARP-1 vagy a PARP-3 csendesítése sem okoz morfológiai változásokat a mitokondriális struktúrában, vagyis a PARP-2 csendesített sejtekben megfigyelhető töredezettségre egyik enzim csendesítése sem volt hatással. A PARP-2 hiányában az oxidatív stressz markerek kifejeződésében emelkedést tapasztaltunk. Általános tiol-reduktánsokkal, GSH-nal és NAC-nel, valamint a mitokondriumot célzó antioxidánsokkal, a MitoTEMPO-val kezelve a sejteket a mitokondriális tartalomban nem tapasztaltunk változást, azonban a PARP-2 hiányában fellépő mitokondriális struktúrában bekövetkező fragmentálódást vissza tudták fordítani. Ezen eredményekből arra következtetünk, hogy a PARP-2 hiányában megjelenő megváltozott mitokondriális fenotípus az oxidatív stressz markerek emelkedésével állnak kapcsolatban, vagyis a fokozott ROS-produkció okozza a mitokondriális struktúra töredezettségét.

VIII. Summary

PARP-2, a member of the PARP family, performs the post-translational modification of proteins. Based on the literature, PARP-2 enzyme is involved in the regulation of several metabolic processes. In our work, we investigated the relationship between PARP-2 and autophagy and the role of PARP-2 in mitochondrial homeostasis.

In the absence of PARP-2, basal autophagy is disrupted and the number of LC3-positive vesicles increases in cells. The silencing of PARP-2 rearranged the energy homeostasis of cells, disrupting autophagy. The disruption of autophagy is due to decreased activity of AMPK and mTORC2 and increased activity of SIRT1. The altered energy homeostasis affects autophagy. Pharmacological inhibition of AMPK by AICAR and pharmacological or genetic silencing of SIRT1, and NR as NAD⁺ precursor, reduced the expression of LC3, these compounds are able to reduce the increased accumulation of LC3-positive vesicle in the absence of PARP-2.

Subsequently, we showed that silencing of PARP-2 causes fragmentation of the mitochondrial network and the induction of mitochondrial biogenesis. There are several pathways that can cause changes in integrity of the mitochondrial network, among others, mitophagy, altered expression or dysregulation of the mitochondrial fusion–fission machinery, and activation of SIRT1. However, in our experiments, we did not find any major change in these processes that would justify changes in the mitochondrial structure in the absence of PARP-2. Silencing of PARP-1 or PARP-3 did not cause morphological changes in mitochondrial structure, the fragmentation observed in PARP-2 silenced cells was not affected by silencing of either enzyme. Upon the silencing of PARP-2, the expression of oxidative stress markers as superoxide production, expression of 4HNE-modified proteins or formation of thiobarbituric acid-reactive products increased. Treatment of cells with thiol reductants, GSH and NAC, and the mitochondrial-targeted antioxidant, MitoTEMPO, did not change the mitochondrial content, but reverted mitochondrial fragmentation. We conclude that the altered mitochondrial phenotype that appears in the absence of PARP-2 is associated with increased level of the oxidative stress causing the fragmentation of the mitochondrial structure.

IX. Irodalomjegyzék

Adams, J., Chen, Z. P., Van Denderen, B. J., Morton, C. J., Parker, M. W., Witters, L. A., Stapleton, D., Kemp, B. E. (2004). "Intrasteric control of AMPK via the gamma1 subunit AMP allosteric regulatory site." Protein Sci **13**(1): 155-165.

Alavi, M. V., Bette, S., Schimpf, S., Schuettauf, F., Schraermeyer, U., Wehrl, H. F., Ruttiger, L., Beck, S. C., Tonagel, F., Pichler, B. J., Knipper, M., Peters, T., Laufs, J., Wissinger, B. (2007). "A splice site mutation in the murine *Opal* gene features pathology of autosomal dominant optic atrophy." Brain **130**(Pt 4): 1029-1042.

Alers, S., Loffler, A. S., Wesselborg, S., Stork, B. (2012). "Role of AMPK-mTOR-Ulk1/2 in the regulation of autophagy: cross talk, shortcuts, and feedbacks." Mol Cell Biol **32**(1): 2-11.

Althaus, F. R., Richter, C. (1987). "ADP-ribosylation of proteins. Enzymology and biological significance." Mol Biol Biochem Biophys **37**: 1-237.

Alvarez-Gonzalez, R., Jacobson, M. K. (1987). "Characterization of polymers of adenosine diphosphate ribose generated in vitro and in vivo." Biochemistry **26**(11): 3218-3224.

Amaravadi, R. K., Yu, D., Lum, J. J., Bui, T., Christophorou, M. A., Evan, G. I., Thomas-Tikhonenko, A., Thompson, C. B. (2007). "Autophagy inhibition enhances therapy-induced apoptosis in a Myc-induced model of lymphoma." J Clin Invest **117**(2): 326-336.

Ame, J. C., Rolli, V., Schreiber, V., Niedergang, C., Apiou, F., Decker, P., Muller, S., Hoger, T., Menissier-de Murcia, J., de Murcia, G. (1999). "PARP-2, A novel mammalian DNA damage-dependent poly(ADP-ribose) polymerase." J Biol Chem **274**(25): 17860-17868.

Ame, J. C., Spenlehauer, C., de Murcia, G. (2004). "The PARP superfamily." Bioessays **26**(8): 882-893.

Anderson, S., Bankier, A. T., Barrell, B. G., de Bruijn, M. H., Coulson, A. R., Drouin, J., Eperon, I. C., Nierlich D. P., Roe, B. A., Sanger, F., Schreier, P. H., Smith, A. J., Staden, R., Young, I. G. (1981). "Sequence and organization of the human mitochondrial genome." Nature **290**(5806): 457-65.

Andreux, P. A., Houtkooper, R. H., Auwerx, J. (2013). "Pharmacological approaches to restore mitochondrial function." Nat Rev Drug Discov **12**(6): 465-483.

Armour, S. M., Baur, J. A., Hsieh, S. N., Land-Bracha, A., Thomas, S. M., Sinclair, D. A. (2009). "Inhibition of mammalian S6 kinase by resveratrol suppresses autophagy." Aging (Albany NY) **1**(6): 515-528.

Ashrafi, G., Schwarz, T. L. (2013). "The pathways of mitophagy for quality control and clearance of mitochondria." Cell Death Differ **20**(1): 31-42.

Augustin, A., Spenlehauer, C., Dumond, H., Menissier-de Murcia, J., Piel, M., Schmit, A. C., Apiou, F., Vonesch, J. L., Kock, M., Bornens, M., de Murcia, G. (2003). "PARP-3 localizes preferentially to the daughter centriole and interferes with the G1/S cell cycle progression." J Cell Sci **116**(8): 1551-62.

- Bai, P. (2015). "Biology of Poly(ADP-Ribose) Polymerases: The Factotums of Cell Maintenance." Mol Cell **58**(6): 947-958.
- Bai, P., Canto, C., Brunyanszki, A., Huber, A., Szanto, M., Cen, Y., Yamamoto, H., Houten, S. M., Kiss, B., Oudart, H., Gergely, P., Menissier-de Murcia, J., Schreiber, V., Sauve, A. A., Auwerx, J. (2011). "PARP-2 regulates SIRT1 expression and whole-body energy expenditure." Cell Metab **13**(4): 450-460.
- Bai, P., Houten, S. M., Huber, A., Schreiber, V., Watanabe, M., Kiss, B., de Murcia, G., Auwerx, J., Menissier-de Murcia, J. (2007). "Poly(ADP-ribose) polymerase-2 [corrected] controls adipocyte differentiation and adipose tissue function through the regulation of the activity of the retinoid X receptor/peroxisome proliferator-activated receptor-gamma [corrected] heterodimer." J Biol Chem **282**(52): 37738-37746.
- Bai, P., Nagy, L., Fodor, T., Liaudet, L., Pacher, P. (2015). "Poly(ADP-ribose) polymerases as modulators of mitochondrial activity." Trends Endocrinol Metab **26**(2): 75-83.
- Balaker, A. E., Ishiyama, P., Lopez, I. A., Ishiyama, G., Ishiyama, A. (2013). "Immunocytochemical localization of the translocase of the outer mitochondrial membrane (Tom20) in the human cochlea." Anat Rec (Hoboken) **296**(2): 326-332.
- Banasik, M., Komura, H., Shimoyama, M., Ueda, K. (1992). "Specific inhibitors of poly(ADP-ribose) synthetase and mono(ADP-ribosyl)transferase." J Biol Chem **267**(3): 1569-1575.
- Banerjee, R., Beal, M. F., Thomas, B. (2010). "Autophagy in neurodegenerative disorders: pathogenic roles and therapeutic implications." Trends Neurosci **33**(12): 541-549.
- Beau, I., Esclatine, A., Codogno, P. (2008). "Lost to translation: when autophagy targets mature ribosomes." Trends Cell Biol **18**(7): 311-314.
- Bertholet, A. M., Delerue, T., Millet, A. M., Moulis, M. F., David, C., Daloyau, M., Arnaune-Pelloquin, L., Davezac, N., Mils, V., Miquel, M. C., Rojo, M., Belenguer, P. (2016). "Mitochondrial fusion/fission dynamics in neurodegeneration and neuronal plasticity." Neurobiol Dis **90**: 3-19.
- Blander, G., Guarente, L. (2004). "The Sir2 family of protein deacetylases." Annu Rev Biochem **73**: 417-435.
- Boehler, C., Dantzer, F. (2011). "PARP-3, a DNA-dependent PARP with emerging roles in double-strand break repair and mitotic progression." Cell Cycle **10**(7): 1023-1024.
- Cai, Q., Jeong, Y. Y. (2020). "Mitophagy in Alzheimer's Disease and Other Age-Related Neurodegenerative Diseases." Cells **9**(1).
- Canto, C., Auwerx, J. (2012). "Targeting sirtuin 1 to improve metabolism: all you need is NAD(+)." Pharmacol Rev **64**(1): 166-187.
- Cebollero, E., Reggiori, F., Kraft, C. (2012). "Reticulophagy and ribophagy: regulated degradation of protein production factories." Int J Cell Biol **2012**: 182834.

- Chambon, P., Weill, J. D., Mandel, P. (1963). "Nicotinamide mononucleotide activation of new DNA-dependent polyadenylic acid synthesizing nuclear enzyme." Biochem Biophys Res Commun **11**: 39-43.
- Chazotte, B. (2011). "Labeling mitochondria with MitoTracker dyes." Cold Spring Harb Protoc **2011**(8): 990-992.
- Chelombitko, M. A., Chernyak, B. V., Fedorov, A. V., Zinovkin, R. A., Razin, E., Paruchuru, L. B. (2020). "The role played by mitochondria in FcεRI-dependent mast cell activation." Front Immunol **11**: 584210.
- Chen, H., Detmer, S. A., Ewald, A. J., Griffin, E. E., Fraser, S. E., Chan, D. C. (2003). "Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development." J Cell Biol **160**(2): 189-200.
- Chen, Y., Klionsky, D. J. (2011). "The regulation of autophagy - unanswered questions." J Cell Sci **124**(Pt 2): 161-170.
- Cheung, Z. H., Ip, N. Y. (2009). "The emerging role of autophagy in Parkinson's disease." Mol Brain **2**: 29.
- Chikte, S., Panchal, N., Warnes, G. (2014). "Use of LysoTracker dyes: a flow cytometric study of autophagy." Cytometry A **85**(2): 169-178.
- Chiong, M., Cartes-Saavedra, B., Norambuena-Soto, I., Mondaca-Ruff, D., Morales, P. E., Garcia-Miguel, M., Mellado, R. (2014). "Mitochondrial metabolism and the control of vascular smooth muscle cell proliferation." Front Cell Dev Biol **2**: 72.
- Cuervo, A. M. (2011). "Chaperone-mediated autophagy: Dice's 'wild' idea about lysosomal selectivity." Nat Rev Mol Cell Biol **12**(8): 535-541.
- Curtin, N. J., Szabo, C. (2013). "Therapeutic applications of PARP inhibitors: anticancer therapy and beyond." Mol Aspects Med **34**(6): 1217-1256.
- Dagda, R. K., Cherra, S. J., 3rd, Kulich, S. M., Tandon, A., Park, D., Chu, C. T. (2009). "Loss of PINK1 function promotes mitophagy through effects on oxidative stress and mitochondrial fission." J Biol Chem **284**(20): 13843-13855.
- Daniels, C. M., Ong, S. E., Leung, A. K. (2015). "The Promise of Proteomics for the Study of ADP-Ribosylation." Mol Cell **58**(6): 911-924.
- Dantzer, F., Giraud-Panis, M. J., Jaco, I., Ame, J. C., Schultz, I., Blasco, M., Koering, C. E., Gilson, E., Menissier-de Murcia, J., de Murcia, G., Schreiber, V. (2004). "Functional interaction between poly(ADP-Ribose) polymerase 2 (PARP-2) and TRF2: PARP activity negatively regulates TRF2." Mol Cell Biol **24**(4): 1595-1607.
- Dantzer, F., Mark, M., Quenet, D., Scherthan, H., Huber, A., Liebe, B., Monaco, L., Chicheportiche, A., Sassone-Corsi, P., de Murcia, G., Menissier-de Murcia, J. (2006). "Poly(ADP-ribose) polymerase-2 contributes to the fidelity of male meiosis I and spermiogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(40): 14854-14859.

- Dantzer, F., Santoro, R. (2013). "The expanding role of PARPs in the establishment and maintenance of heterochromatin." FEBS J **280**(15): 3508-3518.
- Davies, V. J., Hollins, A. J., Piechota, M. J., Yip, W., Davies, J. R., White, K. E., Nicols, P. P., Boulton, M. E., Votruba, M. (2007). "Opal deficiency in a mouse model of autosomal dominant optic atrophy impairs mitochondrial morphology, optic nerve structure and visual function." Hum Mol Genet **16**(11): 1307-1318.
- De Duve, C. (1964). "From Cytases to Lysosomes." Fed Proc **23**: 1045-1049.
- De Duve, C., Pressman, B. C., Gianetto, R., Wattiaux, R., Appelmans, F. (1955). "Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue." Biochem J **60**(4): 604-617.
- De Duve, C., Wattiaux, R. (1966). "Functions of lysosomes." Annu Rev Physiol **28**: 435-492.
- Ding, W. X., Yin, X. M. (2012). "Mitophagy: mechanisms, pathophysiological roles, and analysis." Biol Chem **393**(7): 547-564.
- Dodd, K. M., Yang, J., Shen, M. H., Sampson, J. R., Tee, A. R. (2015). "mTORC1 drives HIF-1alpha and VEGF-A signalling via multiple mechanisms involving 4E-BP1, S6K1 and STAT3." Oncogene **34**(17): 2239-2250.
- Dunn, W. A., Jr., Cregg, J. M., Kiel, J. A., van der Klei, I. J., Oku, M., Sakai, Y., Sibirny, A. A., Stasyk, O. V., Veenhuis, M. (2005). "Pexophagy: the selective autophagy of peroxisomes." Autophagy **1**(2): 75-83.
- Ellenrieder, L., Martensson, C. U., Becker, T. (2015). "Biogenesis of mitochondrial outer membrane proteins, problems and diseases." Biol Chem **396**(11): 1199-213.
- Eskelinen, E. L., Reggiori, F., Baba, M., Kovacs, A. L., Seglen, P. O. (2011). "Seeing is believing: the impact of electron microscopy on autophagy research." Autophagy **7**(9): 935-956.
- Fang, E. F., Scheibye-Knudsen, M., Brace, L. E., Kassahun, H., SenGupta, T., Nilsen, H., Mitchell, J. R., Croteau, D. L., Bohr, V. A. (2014). "Defective mitophagy in XPA via PARP-1 hyperactivation and NAD(+)/SIRT1 reduction." Cell **157**(4): 882-896.
- Farres, J., Llacuna, L., Martin-Caballero, J., Martinez, C., Lozano, J. J., Ampurdanes, C., Lopez-Contreras, A. J., Florensa, L., Navarro, J., Ottina, E., Dantzer, F., Schreiber, V., Villunger, A., Fernandez-Capetillo, O., Yelamos, J. (2015). "PARP-2 sustains erythropoiesis in mice by limiting replicative stress in erythroid progenitors." Cell Death Differ **22**(7): 1144-1157.
- Farres, J., Martin-Caballero, J., Martinez, C., Lozano, J. J., Llacuna, L., Ampurdanes, C., Ruiz-Herguido, C., Dantzer, F., Schreiber, V., Villunger, A., Bigas, A., Yelamos, J. (2013). "Parp-2 is required to maintain hematopoiesis following sublethal gamma-irradiation in mice." Blood **122**(1): 44-54.
- Fedorko, M. (1967). "Effect of chloroquine on morphology of cytoplasmic granules in maturing human leukocytes--an ultrastructural study." J Clin Invest **46**(12): 1932-1942.

- Feng, Y., He, D., Yao, Z., Klionsky, D. J. (2014). "The machinery of macroautophagy." Cell Res **24**(1): 24-41.
- Filliol, A., Piquet-Pellorce, C., Dion, S., Genet, V., Lucas-Clerc, C., Dantzer, F., Samson, M. (2017). "PARP2 deficiency affects invariant-NKT-cell maturation and protects mice from concanavalin A-induced liver injury." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **313**(5): G399-G409.
- Fodor, T., Szanto, M., Abdul-Rahman, O., Nagy, L., Der, A., Kiss, B., Bai, P. (2016). "Combined Treatment of MCF-7 Cells with AICAR and Methotrexate, Arrests Cell Cycle and Reverses Warburg Metabolism through AMP-Activated Protein Kinase (AMPK) and FOXO1." PLoS One **11**(2): e0150232.
- Frias, M. A., Thoreen, C. C., Jaffe, J. D., Schroder, W., Sculley, T., Carr, S. A., Sabatini, D. M. (2006). "mSin1 is necessary for Akt/PKB phosphorylation, and its isoforms define three distinct mTORC2s." Curr Biol **16**(18): 1865-1870.
- Funderburk, S. F., Marcellino, B. K., Yue, Z. (2010). "Cell "self-eating" (autophagy) mechanism in Alzheimer's disease." Mt Sinai J Med **77**(1): 59-68.
- Galvez, A. S., Brunskill, E. W., Marreez, Y., Benner, B. J., Regula, K. M., Kirschenbaum, L. A., Dorn, G. W., 2nd (2006). "Distinct pathways regulate proapoptotic Nix and BNip3 in cardiac stress." J Biol Chem **281**(3): 1442-1448.
- Ge, Y., Shi, X., Boopathy, S., McDonald, J., Smith, A. W., Chao, L. H. (2020). "Two forms of Opal cooperate to complete fusion of the mitochondrial inner-membrane." Elife **9**.
- Gertz, M., Fischer, F., Nguyen, G. T., Lakshminarasimhan, M., Schutkowski, M., Weyand, M., Steegborn, C. (2013). "Ex-527 inhibits Sirtuins by exploiting their unique NAD+-dependent deacetylation mechanism." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(30): E2772-2781.
- Glick, D., Barth, S., Macleod, K. F. (2010). "Autophagy: cellular and molecular mechanisms." J Pathol **221**(1): 3-12.
- Gomez-Pinillos, A., Ferrari, A. C. (2012). "mTOR signaling pathway and mTOR inhibitors in cancer therapy." Hematol Oncol Clin North Am **26**(3): 483-505, vii.
- Gottlieb, R. A., Mentzer, R. M. (2010). "Autophagy during cardiac stress: joys and frustrations of autophagy." Annu Rev Physiol **72**: 45-59.
- Green, D. R., Van Houten, B. (2011). "SnapShot: Mitochondrial quality control." Cell **147**(4): 950, 950 e951.
- Griffin, R. J., Pemberton, L. C., Rhodes, D., Bleasdale, C., Bowman, K., Calvert, A. H., Curtin, N. J., Durkacz, B. W., Newell, D. R., Porteous, J. K., et al. (1995). "Novel potent inhibitors of the DNA repair enzyme poly(ADP-ribose)polymerase (PARP)." Anticancer Drug Des **10**(6): 507-514.
- Guertin, D. A., Sabatini, D. M. (2007). "Defining the role of mTOR in cancer." Cancer Cell **12**(1): 9-22.

- Gupte, R., Liu, Z., Kraus, W. L. (2017). "PARPs and ADP-ribosylation: recent advances linking molecular functions to biological outcomes." Genes Dev **31**(2): 101-126.
- Haenni, S. S., Altmeyer, M., Hassa, P. O., Valovka, T., Fey, M., Hottiger, M. O. (2008). "Importin alpha binding and nuclear localization of PARP-2 is dependent on lysine 36, which is located within a predicted classical NLS." BMC Cell Biol **9**: 39.
- Haenni, S. S., Hassa, P. O., Altmeyer, M., Fey, M., Imhof, R., Hottiger, M. O. (2008). "Identification of lysines 36 and 37 of PARP-2 as targets for acetylation and auto-ADP-ribosylation." Int J Biochem Cell Biol **40**(10): 2274-2283.
- Halse, R., Fryer, L. G., McCormack, J. G., Carling, D., Yeaman, S. J. (2003). "Regulation of glycogen synthase by glucose and glycogen: a possible role for AMP-activated protein kinase." Diabetes **52**(1): 9-15.
- Hanzlikova, H., Gittens, W., Krejcikova, K., Zeng, Z., Caldecott, K. W. (2017). "Overlapping roles for PARP1 and PARP2 in the recruitment of endogenous XRCC1 and PNKP into oxidized chromatin." Nucleic Acids Res **45**(5): 2546-2557.
- Hardie, D. G. (2007). "AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(10): 774-785.
- Hare, S. H., Harvey, A. J. (2017). "mTOR function and therapeutic targeting in breast cancer." Am J Cancer Res **7**(3): 383-404.
- Harris, I. S., DeNicola, G. M. (2020). "The Complex Interplay between Antioxidants and ROS in Cancer." Trends Cell Biol **30**(6): 440-451.
- Hassa, P. O., Haenni, S. S., Elser, M., Hottiger, M. O. (2006). "Nuclear ADP-ribosylation reactions in mammalian cells: where are we today and where are we going?" Microbiol Mol Biol Rev **70**(3): 789-829.
- Hayashi, K., Tanaka, M., Shimada, T., Miwa, M., Sugimura, T. (1983). "Size and shape of poly(ADP-ribose): examination by gel filtration, gel electrophoresis and electron microscopy." Biochem Biophys Res Commun **112**(1): 102-107.
- He, C., Klionsky, D. J. (2009). "Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy." Annu Rev Genet **43**: 67-93.
- Hegedus, C., Juhasz, T., Fidrus, E., Janka, E. A., Juhasz, G., Boros, G., Paragh, G., Uray, K., Emri, G., Remenyik, E., Bai, P. (2021). "Cyclobutane pyrimidine dimers from UVB exposure induce a hypermetabolic state in keratinocytes via mitochondrial oxidative stress." Redox Biol **38**: 101808.
- Heitman, J., Movva, N. R., Hall, M. N. (1991). "Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast." Science **253**(5022): 905-909.
- Hipkiss, A. R. (2009). "NAD⁺ availability and proteotoxicity." Neuromolecular Med **11**(2): 97-100.

- Hosokawa, N., Hara, T., Kaizuka, T., Kishi, C., Takamura, A., Miura, Y., Iemura, S., Natsume, T., Takehana, K., Yamada, N., Guan, J. L., Oshiro, N., Mizushima, N. (2009). "Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy." Mol Biol Cell **20**(7): 1981-1991.
- Hottiger, M. O., Hassa, P. O., Luscher, B., Schuler, H., Koch-Nolte, F. (2010). "Toward a unified nomenclature for mammalian ADP-ribosyltransferases." Trends Biochem Sci **35**(4): 208-219.
- Houtkooper, R. H., Pirinen, E., Auwerx, J. (2012). "Sirtuins as regulators of metabolism and healthspan." Nat Rev Mol Cell Biol **13**(4): 225-238.
- Hoyer-Hansen, M., Jaattela, M. (2007). "AMP-activated protein kinase: a universal regulator of autophagy?" Autophagy **3**(4): 381-383.
- Hubbard, B. P., Sinclair, D. A. (2014). "Small molecule SIRT1 activators for the treatment of aging and age-related diseases." Trends Pharmacol Sci **35**(3): 146-154.
- Huber, A., Bai, P., de Murcia, J. M., de Murcia, G. (2004). "PARP-1, PARP-2 and ATM in the DNA damage response: functional synergy in mouse development." DNA Repair (Amst) **3**(8-9): 1103-1108.
- Isabelle, M., Gagne, J. P., Gallouzi, I. E., Poirier, G. G. (2012). "Quantitative proteomics and dynamic imaging reveal that G3BP-mediated stress granule assembly is poly(ADP-ribose)-dependent following exposure to MNNG-induced DNA alkylation." J Cell Sci **125**(Pt 19): 4555-4566.
- Isabelle, M., Moreel, X., Gagne, J. P., Rouleau, M., Ethier, C., Gagne, P., Hendzel, M. J., Poirier, G. G. (2010). "Investigation of PARP-1, PARP-2, and PARG interactomes by affinity-purification mass spectrometry." Proteome Sci **8**: 22.
- Jang, S. Y., Kang, H. T., Hwang, E. S. (2012). "Nicotinamide-induced mitophagy: event mediated by high NAD⁺/NADH ratio and SIRT1 protein activation." J Biol Chem **287**(23): 19304-19314.
- Jezek, J., Cooper, K. F., Strich, R. (2018). "Reactive Oxygen Species and Mitochondrial Dynamics: The Yin and Yang of Mitochondrial Dysfunction and Cancer Progression." Antioxidants (Basel) **7**(1): 13.
- Jiang, P., Mizushima, N. (2014). "Autophagy and human diseases." Cell Res **24**(1): 69-79.
- Johansson, M. (1999). "A human poly(ADP-ribose) polymerase gene family (ADPRTL): cDNA cloning of two novel poly(ADP-ribose) polymerase homologues." Genomics **57**(3): 442-445.
- Jung, C. H., Jun, C. B., Ro, S. H., Kim, Y. M., Otto, N. M., Cao, J., Kundu, M., Kim, D. H. (2009). "ULK1-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery." Mol Biol Cell **20**(7): 1992-2003.
- Jung, C. H., Ro, S. H., Cao, J., Otto, N. M., Kim, D. H. (2010). "mTOR regulation of autophagy." FEBS Lett **584**(7): 1287-1295.

Kawaichi, M., Oka, J., Zhang, J., Ueda, K., Hayaishi, O. (1983). "Properties of poly(ADP-ribose) synthetase and ADP-ribosyl histone splitting enzyme." Princess Takamatsu Symp **13**: 121-128.

Kitada, T., Asakawa, S., Hattori, N., Matsumine, H., Yamamura, Y., Minoshima, S., Yokochi, M., Mizuno, Y., Shimizu, N. (1998). "Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism." Nature **392**(6676): 605-608.

Kleine, H., Herrmann, A., Lamark, T., Forst, A. H., Verheugd, P., Luscher-Firzloff, J., Lippok, B., Feijs, K. L., Herzog, N., Kremmer, E., Johansen, T., Muller-Newen, G., Luscher, B. (2012). "Dynamic subcellular localization of the mono-ADP-ribosyltransferase ARTD10 and interaction with the ubiquitin receptor p62." Cell Commun Signal **10**(1): 28.

Klionsky, D. J. (2005). "Autophagy." Curr Biol **15**(8): R282-283.

Klionsky, D. J., Abdelmohsen, K., Abe, A., Abedin, M. J., Abeliovich, H., Acevedo Arozena, A., Adachi, H., Adams, C. M., Adams, P. D., Adeli, K., Adhietty, P. J., Adler, S. G., Agam, G., Agarwal, R., Aghi, M. K., Agnello, M., Agostinis, P., Aguilar, P. V., Aguirre-Ghiso, J., Airolidi, E. M., et al. (2016). "Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition)." Autophagy **12**(1): 1-222.

Klionsky, D. J., Cregg, J. M., Dunn, W. A., Jr., Emr, S. D., Sakai, Y., Sandoval, I. V., Sibirny, A., Subramani, S., Thumm, M., Veenhuis, M., Ohsumi, Y. (2003). "A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes." Dev Cell **5**(4): 539-545.

Kofler, J., Otsuka, T., Zhang, Z., Noppens, R., Grafe, M. R., Koh, D. W., Dawson, V. L., de Murcia, J. M., Hurn, P. D., Traystman, R. J. (2006). "Differential effect of PARP-2 deletion on brain injury after focal and global cerebral ischemia." J Cereb Blood Flow Metab **26**(1): 135-141.

Komatsu, M., Waguri, S., Chiba, T., Murata, S., Iwata, J., Tanida, I., Ueno, T., Koike, M., Uchiyama, Y., Kominami, E., Tanaka, K. (2006). "Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice." Nature **441**(7095): 880-884.

Koshiba, T., Detmer, S. A., Kaiser, J. T., Chen, H., McCaffery, J. M., Chan, D. C. (2004). "Structural basis of mitochondrial tethering by mitofusin complexes." Science **305**(5685): 858-862.

Kovacs, T., Miko, E., Vida, A., Sebo, E., Toth, J., Csonka, T., Boratko, A., Ujlaki, G., Lente, G., Kovacs, P., Toth, D., Arkosy, P., Kiss, B., Mehes, G., Goedert, J. J., Bai, P. (2019). "Cadaverine, a metabolite of the microbiome, reduces breast cancer aggressiveness through trace amino acid receptors." Sci Rep **9**(1): 1300.

Kroemer, G., Marino, G., Levine, B. (2010). "Autophagy and the integrated stress response." Mol Cell **40**(2): 280-93.

Kudchodkar, S. B., Levine, B. (2009). "Viruses and autophagy." Rev Med Virol **19**(6): 359-378.

Kurnit, K. C., Coleman, R. L., Westin, S. N. (2018). "Using PARP Inhibitors in the Treatment of Patients With Ovarian Cancer." Curr Treat Options Oncol **19**(12): 1.

- Kurth-Kraczek, E. J., Hirshman, M. F., Goodyear, L. J., Winder, W. W. (1999). "5' AMP-activated protein kinase activation causes GLUT4 translocation in skeletal muscle." Diabetes **48**(8): 1667-1671.
- Kusano, C., Takao, S., Noma, H., Yoh, H., Aikou, T., Okumura, H., Akiyama, S., Kawamura, M., Makino, M., Baba, M. (2000). "N-acetyl cysteine inhibits cell cycle progression in pancreatic carcinoma cells." Hum Cell **13**(4): 213-20.
- Kutuzov, M. M., Khodyreva, S. N., Ilina, E. S., Sukhanova, M. V., Ame, J. C., Lavrik, O. I. (2015). "Interaction of PARP-2 with AP site containing DNA." Biochimie **112**: 10-19.
- Lackner, L. L., Nunnari, J. M. (2009). "The molecular mechanism and cellular functions of mitochondrial division." Biochim Biophys Acta **1792**(12): 1138-1144.
- Lagouge, M., Argmann, C., Gerhart-Hines, Z., Meziane, H., Lerin, C., Daussin, F., Messadeq, N., Milne, J., Lambert, P., Elliott, P., Geny, B., Laakso, M., Puigserver, P., Auwerx, J. (2006). "Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha." Cell **127**(6): 1109-1122.
- Lamb, C. A., Yoshimori, T., Tooze, S. A. (2013). "The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex." Nat Rev Mol Cell Biol **14**(12): 759-774.
- Lampada, A., O'Prey, J., Szabadkai, G., Ryan, K. M., Hochhauser, D., Salomoni, P. (2017). "mTORC1-independent autophagy regulates receptor tyrosine kinase phosphorylation in colorectal cancer cells via an mTORC2-mediated mechanism." Cell Death Differ **24**(6): 1045-1062.
- Lee, I. H., Cao, L., Mostoslavsky, R., Lombard, D. B., Liu, J., Bruns, N. E., Tsokos, M., Alt, F. W., Finkel, T. (2008). "A role for the NAD-dependent deacetylase Sirt1 in the regulation of autophagy." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(9): 3374-3379.
- Leger, K., Bar, D., Savic, N., Santoro, R., Hottiger, M. O. (2014). "ARTD2 activity is stimulated by RNA." Nucleic Acids Res **42**(8): 5072-5082.
- Levine, B., Mizushima, N., Virgin, H. W. (2011). "Autophagy in immunity and inflammation." Nature **469**(7330): 323-335.
- Levine, B., Yuan, J. (2005). "Autophagy in cell death: an innocent convict?" J Clin Invest **115**(10): 2679-2688.
- Li, X., Klaus, J. A., Zhang, J., Xu, Z., Kibler, K. K., Andrabi, S. A., Rao, K., Yang, Z. J., Dawson, T. M., Dawson, V. L., Koehler, R. C. (2010). "Contributions of poly(ADP-ribose) polymerase-1 and -2 to nuclear translocation of apoptosis-inducing factor and injury from focal cerebral ischemia." J Neurochem **113**(4): 1012-1022.
- Liu, G., Park, S. H., Imbesi, M., Nathan, W. J., Zou, X., Zhu, Y., Jiang, H., Parisiadou, L., Gius, D. (2017). "Loss of NAD-Dependent Protein Deacetylase Sirtuin-2 Alters Mitochondrial Protein Acetylation and Dysregulates Mitophagy." Antioxid Redox Signal **26**(15): 849-863.

- Liu, L., Feng, D., Chen, G., Chen, M., Zheng, Q., Song, P., Ma, Q., Zhu, C., Wang, R., Qi, W., Huang, L., Xue, P., Li, B., Wang, X., Jin, H., Wang, J., Yang, F., Liu, P., Zhu, Y., Sui, S., Chen, Q. (2012). "Mitochondrial outer-membrane protein FUNDC1 mediates hypoxia-induced mitophagy in mammalian cells." Nat Cell Biol **14**(2): 177-185.
- Liu, T., Zhang, J., Li, K., Deng, L., Wang, H. (2020). "Combination of an Autophagy Inducer and an Autophagy Inhibitor: A Smarter Strategy Emerging in Cancer Therapy." Front Pharmacol **11**: 408.
- Lu, J., Holmgren, A. (2014). "The thioredoxin antioxidant system." Free Radic Biol Med **66**: 75-87.
- Luscher, B., Ahel, I., Altmeyer, M., Ashworth, A., Bai, P., Chang, P., Cohen, M., Corda, D., Dantzer, F., Daugherty, M., Dawson, T., Dawson, V., Deindl, S., Fehr, A., Feijs, K., Filippov, D., Gagne, J. P., Grimaldi, G., Guettler, S., Hoch, N., et al. (2021). "ADP-ribosyltransferases, an update on function and nomenclature." FEBS J
- MacVicar, T., Langer, T. (2016). "OPA1 processing in cell death and disease - the long and short of it." J Cell Sci **129**(12): 2297-2306.
- Maeda, Y., Hunter, T. C., Loudy, D. E., Dave, V., Schreiber, V., Whitsett, J. A. (2006). "PARP-2 interacts with TTF-1 and regulates expression of surfactant protein-B." J Biol Chem **281**(14): 9600-9606.
- Magnuson, B., Ekim, B., Fingar, D. C. (2012). "Regulation and function of ribosomal protein S6 kinase (S6K) within mTOR signalling networks." Biochem J **441**(1): 1-21.
- Malanga, M., Althaus, F. R. (2004). "Poly(ADP-ribose) reactivates stalled DNA topoisomerase I and Induces DNA strand break resealing." J Biol Chem **279**(7): 5244-5248.
- Margis, R., Dunand, C., Teixeira, F. K., Margis-Pinheiro, M. (2008). "Glutathione peroxidase family - an evolutionary overview." FEBS J **275**(15): 3959-3970.
- Marino, G., Morselli, E., Bennetzen, M. V., Eisenberg, T., Megalou, E., Schroeder, S., Cabrera, S., Benit, P., Rustin, P., Criollo, A., Kepp, O., Galluzzi, L., Shen, S., Malik, S. A., Maiuri, M. C., Horio, Y., Lopez-Otin, C., Andersen, J. S., Tavernarakis, N., Madeo, F., Kroemer, G. (2011). "Longevity-relevant regulation of autophagy at the level of the acetylproteome." Autophagy **7**(6): 647-649.
- Marino, G., Salvador-Montoliu, N., Fueyo, A., Knecht, E., Mizushima, N., Lopez-Otin, C. (2007). "Tissue-specific autophagy alterations and increased tumorigenesis in mice deficient in Atg4C/autophagin-3." J Biol Chem **282**(25): 18573-18583.
- Martinez-Vicente, M., Tallozy, Z., Kaushik, S., Massey, A. C., Mazzulli, J., Mosharov, E. V., Hodara, R., Fredenburg, R., Wu, D. C., Follenzi, A., Dauer, W., Przedborski, S., Ischiropoulos, H., Lansbury, P. T., Sulzer, D., Cuervo, A. M. (2008). "Dopamine-modified alpha-synuclein blocks chaperone-mediated autophagy." J Clin Invest **118**(2): 777-788.
- Marton, J., Peter, M., Balogh, G., Bodi, B., Vida, A., Szanto, M., Bojesuk, D., Janko, L., Bhattoa, H. P., Gombos, I., Uray, K., Horvath, I., Torok, Z., Balint, B. L., Papp, Z., Vigh, L., Bai, P. (2018). "Poly(ADP-ribose) polymerase-2 is a lipid-modulated modulator of muscular lipid homeostasis." Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids **1863**(11): 1399-1412.

- Massey, A., Kiffin, R., Cuervo, A. M. (2004). "Pathophysiology of chaperone-mediated autophagy." *Int J Biochem Cell Biol* **36**(12): 2420-2434.
- Melendez, A., Neufeld, T. P. (2008). "The cell biology of autophagy in metazoans: a developing story." *Development* **135**(14): 2347-2360.
- Menissier de Murcia, J., Ricoul, M., Tartier, L., Niedergang, C., Huber, A., Dantzer, F., Schreiber, V., Ame, J. C., Dierich, A., LeMeur, M., Sabatier, L., Chambon, P., de Murcia, G. (2003). "Functional interaction between PARP-1 and PARP-2 in chromosome stability and embryonic development in mouse." *EMBO J* **22**(9): 2255-2263.
- Meyer-Ficca, M. L., Lonchar, J. D., Ihara, M., Meistrich, M. L., Austin, C. A., Meyer, R. G. (2011). "Poly(ADP-ribose) polymerases PARP1 and PARP2 modulate topoisomerase II beta (TOP2B) function during chromatin condensation in mouse spermiogenesis." *Biol Reprod* **84**(5): 900-909.
- Mishra, P., Carelli, V., Manfredi, G., Chan, D. C. (2014). "Proteolytic cleavage of Opa1 stimulates mitochondrial inner membrane fusion and couples fusion to oxidative phosphorylation." *Cell Metab* **19**(4): 630-641.
- Mizushima, N. (2007). "Autophagy: process and function." *Genes Dev* **21**(22): 2861-2873.
- Mizushima, N., Hara, T. (2006). "Intracellular quality control by autophagy: how does autophagy prevent neurodegeneration?" *Autophagy* **2**(4): 302-304.
- Mizushima, N., Komatsu, M. (2011). "Autophagy: renovation of cells and tissues." *Cell* **147**(4): 728-741.
- Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A. M., Klionsky, D. J. (2008). "Autophagy fights disease through cellular self-digestion." *Nature* **451**(7182): 1069-1075.
- Mohamed, J. S., Hajira, A., Pardo, P. S., Boriek, A. M. (2014). "MicroRNA-149 inhibits PARP-2 and promotes mitochondrial biogenesis via SIRT-1/PGC-1alpha network in skeletal muscle." *Diabetes* **63**(5): 1546-1559.
- Morselli, E., Marino, G., Bennetzen, M. V., Eisenberg, T., Megalou, E., Schroeder, S., Cabrera, S., Benit, P., Rustin, P., Criollo, A., Kepp, O., Galluzzi, L., Shen, S., Malik, S. A., Maiuri, M. C., Horio, Y., Lopez-Otin, C., Andersen, J. S., Tavernarakis, N., Madeo, F., Kroemer, G. (2011). "Spermidine and resveratrol induce autophagy by distinct pathways converging on the acetylproteome." *J Cell Biol* **192**(4): 615-629.
- Mouchiroud, L., Houtkooper, R. H., Moullan, N., Katsyuba, E., Ryu, D., Canto, C., Mottis, A., Jo, Y. S., Viswanathan, M., Schoonjans, K., Guarente, L., Auwerx, J. (2013). "The NAD(+)/Sirtuin Pathway Modulates Longevity through Activation of Mitochondrial UPR and FOXO Signaling." *Cell* **154**(2): 430-441.
- Mozdy, A. D., McCaffery, J. M., Shaw, J. M. (2000). "Dnm1p GTPase-mediated mitochondrial fission is a multi-step process requiring the novel integral membrane component Fis1p." *J Cell Biol* **151**(2): 367-380.

- Munoz-Gamez, J. A., Rodriguez-Vargas, J. M., Quiles-Perez, R., Aguilar-Quesada, R., Martin-Oliva, D., de Murcia, G., Menissier de Murcia, J., Almendros, A., Ruiz de Almodovar, M., Oliver, F. J. (2009). "PARP-1 is involved in autophagy induced by DNA damage." Autophagy **5**(1): 61-74.
- Nemoto, S., Fergusson, M. M., Finkel, T. (2005). "SIRT1 functionally interacts with the metabolic regulator and transcriptional coactivator PGC-1{alpha}." J Biol Chem **280**(16): 16456-16460.
- Ng, F., Tang, B. L. (2013). "Sirtuins' modulation of autophagy." J Cell Physiol **228**(12): 2262-2270.
- Ni, H. M., Williams, J. A., Ding, W. X. (2015). "Mitochondrial dynamics and mitochondrial quality control." Redox Biol **4**: 6-13.
- Nixon, R. A., Wegiel, J., Kumar, A., Yu, W. H., Peterhoff, C., Cataldo, A., Cuervo, A. M. (2005). "Extensive involvement of autophagy in Alzheimer disease: an immuno-electron microscopy study." J Neuropathol Exp Neurol **64**(2): 113-122.
- Oka, S., Kato, J., Moss, J. (2006). "Identification and characterization of a mammalian 39-kDa poly(ADP-ribose) glycohydrolase." J Biol Chem **281**(2): 705-713.
- Oliver, A. W., Ame, J. C., Roe, S. M., Good, V., de Murcia, G., Pearl, L. H. (2004). "Crystal structure of the catalytic fragment of murine poly(ADP-ribose) polymerase-2." Nucleic Acids Res **32**(2): 456-464.
- Pacher, P., Beckman, J. S., Liaudet, L. (2007). "Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease." Physiol Rev **87**(1): 315-424.
- Parkhitko, A. A., Favorova, O. O., Henske, E. P. (2013). "Autophagy: mechanisms, regulation, and its role in tumorigenesis." Biochemistry (Mosc) **78**(4): 355-367.
- Parsons, M. J., Green, D. R. (2010). "Mitochondria in cell death." Essays Biochem **47**: 99-114.
- Pickles, S., Vigie, P., Youle, R. J. (2018). "Mitophagy and Quality Control Mechanisms in Mitochondrial Maintenance." Curr Biol **28**(4): R170-R185.
- Purnell, M. R., Whish, W. J. (1980). "Novel inhibitors of poly(ADP-ribose) synthetase." Biochem J **185**(3): 775-777.
- Qu, X., Yu, J., Bhagat, G., Furuya, N., Hibshoosh, H., Troxel, A., Rosen, J., Eskelinen, E. L., Mizushima, N., Ohsumi, Y., Cattoretti, G., Levine, B. (2003). "Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene." J Clin Invest **112**(12): 1809-1820.
- Quenet, D., El Ramy, R., Schreiber, V., Dantzer, F. (2009). "The role of poly(ADP-ribosylation) in epigenetic events." Int J Biochem Cell Biol **41**(1): 60-65.
- Quenet, D., Gasser, V., Fouillen, L., Cammas, F., Sanglier-Cianferani, S., Losson, R., Dantzer, F. (2008). "The histone subcode: poly(ADP-ribose) polymerase-1 (Parp-1) and Parp-2 control cell differentiation by regulating the transcriptional intermediary factor TIF1beta and the heterochromatin protein HP1alpha." FASEB J **22**(11): 3853-3865.

- Quenet, D., Mark, M., Govin, J., van Dorsselaar, A., Schreiber, V., Khochbin, S., Dantzer, F. (2009). "Parp2 is required for the differentiation of post-meiotic germ cells: identification of a spermatid-specific complex containing Parp1, Parp2, TP2 and HSPA2." Exp Cell Res **315**(16): 2824-2834.
- Ravikumar, B., Vacher, C., Berger, Z., Davies, J. E., Luo, S., Oroz, L. G., Scaravilli, F., Easton, D. F., Duden, R., O'Kane, C. J., Rubinsztein, D. C. (2004). "Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease." Nat Genet **36**(6): 585-595.
- Rodgers, J. T., Lerin, C., Haas, W., Gygi, S. P., Spiegelman, B. M., Puigserver, P. (2005). "Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1." Nature **434**(7029): 113-118.
- Rodriguez-Enriquez, S., Kim, I., Currin, R. T., Lemasters, J. J. (2006). "Tracker dyes to probe mitochondrial autophagy (mitophagy) in rat hepatocytes." Autophagy **2**(1): 39-46.
- Rodriguez-Vargas, J. M., Martin-Hernandez, K., Wang, W., Kunath, N., Suganthan, R., Ame, J. C., Oliver, F. J., Ye, J., Bjoras, M., Dantzer, F. (2020). "Parp3 promotes astrocytic differentiation through a tight regulation of Nox4-induced ROS and mTorc2 activation." Cell Death Dis **11**(11): 954.
- Rodriguez-Vargas, J. M., Oliver-Pozo, F. J., Dantzer, F. (2019). "PARP1 and Poly(ADP-ribose) Signaling during Autophagy in Response to Nutrient Deprivation." Oxid Med Cell Longev **2019**: 2641712.
- Rodriguez-Vargas, J. M., Rodriguez, M. I., Majuelos-Melguizo, J., Garcia-Diaz, A., Gonzalez-Flores, A., Lopez-Rivas, A., Virag, L., Illuzzi, G., Schreiber, V., Dantzer, F., Oliver, F. J. (2016). "Autophagy requires poly(adp-ribose)ation-dependent AMPK nuclear export." Cell Death Differ **23**(12): 2007-2018.
- Sanderson, D. J., Cohen, M. S. (2020). "Mechanisms governing PARP expression, localization, and activity in cells." Crit Rev Biochem Mol Biol **55**(6): 541-554.
- Santel, A., Fuller, M. T. (2001). "Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin." J Cell Sci **114**(Pt 5): 867-874.
- Saxena, A., Wong, L. H., Kalitsis, P., Earle, E., Shaffer, L. G., Choo, K. H. (2002). "Poly(ADP-ribose) polymerase 2 localizes to mammalian active centromeres and interacts with PARP-1, Cenpa, Cenpb and Bub3, but not Cenpc." Hum Mol Genet **11**(19): 2319-2329.
- Schmidt, O., Pfanner, N., Meisinger, C. (2010). "Mitochondrial protein import: from proteomics to functional mechanisms." Nat Rev Mol Cell Biol **11**(9): 655-667.
- Schreiber, V., Ame, J. C., Dolle, P., Schultz, I., Rinaldi, B., Fraulob, V., Menissier-de Murcia, J., de Murcia, G. (2002). "Poly(ADP-ribose) polymerase-2 (PARP-2) is required for efficient base excision DNA repair in association with PARP-1 and XRCC1." J Biol Chem **277**(25): 23028-23036.
- Schreiber, V., Dantzer, F., Ame, J. C., de Murcia, G. (2006). "Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule." Nat Rev Mol Cell Biol **7**(7): 517-528.

- Schweers, R. L., Zhang, J., Randall, M. S., Loyd, M. R., Li, W., Dorsey, F. C., Kundu, M., Opferman, J. T., Cleveland, J. L., Miller, J. L., Ney, P. A. (2007). "NIX is required for programmed mitochondrial clearance during reticulocyte maturation." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(49): 19500-19505.
- Scott, I., Youle, R. J. (2010). "Mitochondrial fission and fusion." Essays Biochem **47**: 85-98.
- Sekine, S., Youle, R. J. (2018). "PINK1 import regulation; a fine system to convey mitochondrial stress to the cytosol." BMC Biol **16**(1): 2.
- Shieh, W. M., Ame, J. C., Wilson, M. V., Wang, Z. Q., Koh, D. W., Jacobson, M. K., Jacobson, E. L. (1998). "Poly(ADP-ribose) polymerase null mouse cells synthesize ADP-ribose polymers." J Biol Chem **273**(46): 30069-30072.
- Sigorski, D., Izycka-Swieszewska, E., Bodnar, L. (2020). "Poly(ADP-Ribose) Polymerase Inhibitors in Prostate Cancer: Molecular Mechanisms, and Preclinical and Clinical Data." Target Oncol **15**(6): 709-722.
- Singh, R., Cuervo, A. M. (2011). "Autophagy in the cellular energetic balance." Cell Metab **13**(5): 495-504.
- Sridharan, S., Jain, K., Basu, A. (2011). "Regulation of autophagy by kinases." Cancers (Basel) **3**(2): 2630-2654.
- Stauffer, W., Sheng, H., Lim, H. N. (2018). "EzColocalization: An ImageJ plugin for visualizing and measuring colocalization in cells and organisms." Sci Rep **8**(1): 15764.
- Straub, S. P., Stiller, S. B., Wiedemann, N., Pfanner, N. (2016). "Dynamic organization of the mitochondrial protein import machinery." Biol Chem **397**(11): 1097-1114.
- Sun, Q., Gatie, M. I., Kelly, G. M. (2019). "Serum-dependent and -independent regulation of PARP2." Biochem Cell Biol **97**(5): 600-611.
- Szanto, M., Brunyanszki, A., Kiss, B., Nagy, L., Gergely, P., Virag, L., Bai, P. (2012). "Poly(ADP-ribose) polymerase-2: emerging transcriptional roles of a DNA-repair protein." Cell Mol Life Sci **69**(24): 4079-4092.
- Szanto, M., Brunyanszki, A., Marton, J., Vamosi, G., Nagy, L., Fodor, T., Kiss, B., Virag, L., Gergely, P., Bai, P. (2014). "Deletion of PARP-2 induces hepatic cholesterol accumulation and decrease in HDL levels." Biochim Biophys Acta **1842**(4): 594-602.
- Szanto, M., Rutkai, I., Hegedus, C., Czikora, A., Rozsahegyi, M., Kiss, B., Virag, L., Gergely, P., Toth, A., Bai, P. (2011). "Poly(ADP-ribose) polymerase-2 depletion reduces doxorubicin-induced damage through SIRT1 induction." Cardiovasc Res **92**(3): 430-438.
- Tanida, I., Ueno, T., Kominami, E. (2008). "LC3 and Autophagy." Methods Mol Biol **445**: 77-88.
- Tilokani, L., Nagashima, S., Paupe, V., Prudent, J. (2018). "Mitochondrial dynamics: overview of molecular mechanisms." Essays Biochem **62**(3): 341-360.

- Tooze, S. A., Yoshimori, T. (2010). "The origin of the autophagosomal membrane." Nat Cell Biol **12**(9): 831-835.
- Tsukada, M., Ohsumi, Y. (1993). "Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*." FEBS Lett **333**(1-2): 169-174.
- Valero, T. (2014). "Mitochondrial biogenesis: pharmacological approaches." Curr Pharm Des **20**(35): 5507-5509.
- van der Blik, A. M., Shen, Q., Kawajiri, S. (2013). "Mechanisms of mitochondrial fission and fusion." Cold Spring Harb Perspect Biol **5**(6).
- Vaziri, H., Dessain, S. K., Ng Eaton, E., Imai, S. I., Frye, R. A., Pandita, T. K., Guarente, L., Weinberg, R. A. (2001). "hSIR2(SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase." Cell **107**(2): 149-159.
- Vega, R. B., Huss, J. M., Kelly, D. P. (2000). "The coactivator PGC-1 cooperates with peroxisome proliferator-activated receptor alpha in transcriptional control of nuclear genes encoding mitochondrial fatty acid oxidation enzymes." Mol Cell Biol **20**(5): 1868-1876.
- Virag, L., Szabo, C. (2002). "The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors." Pharmacol Rev **54**(3): 375-429.
- Vyas, S., Chesarone-Cataldo, M., Todorova, T., Huang, Y. H., Chang, P. (2013). "A systematic analysis of the PARP protein family identifies new functions critical for cell physiology." Nat Commun **4**: 2240.
- Wang, C. W., Klionsky, D. J. (2003). "The molecular mechanism of autophagy." Mol Med **9**(3-4): 65-76.
- Westermann, B. (2010). "Mitochondrial fusion and fission in cell life and death." Nat Rev Mol Cell Biol **11**(12): 872-884.
- Wileman, T. (2013). "Autophagy as a defence against intracellular pathogens." Essays Biochem **55**: 153-63.
- Winder, W. W., Hardie, D. G. (1999). "AMP-activated protein kinase, a metabolic master switch: possible roles in type 2 diabetes." Am J Physiol **277**(1): E1-10.
- Yelamos, J., Monreal, Y., Saenz, L., Aguado, E., Schreiber, V., Mota, R., Fuente, T., Minguela, A., Parrilla, P., de Murcia, G., Almarza, E., Aparicio, P., Menissier-de Murcia, J. (2006). "PARP-2 deficiency affects the survival of CD4+CD8+ double-positive thymocytes." EMBO J **25**(18): 4350-4360.
- Yelamos, J., Schreiber, V., Dantzer, F. (2008). "Toward specific functions of poly(ADP-ribose) polymerase-2." Trends Mol Med **14**(4): 169-178.
- Yoshii, S. R., Mizushima, N. (2017). "Monitoring and Measuring Autophagy." Int J Mol Sci **18**(9).
- Zhang, D. X., Zhang, J. P., Hu, J. Y., Huang, Y. S. (2016). "The potential regulatory roles of NAD(+) and its metabolism in autophagy." Metabolism **65**(4): 454-62.

Zhang, L., Zou, J., Chai, E., Qi, Y., Zhang, Y. (2014). "Alpha-lipoic acid attenuates cardiac hypertrophy via downregulation of PARP-2 and subsequent activation of SIRT-1." Eur J Pharmacol **744**: 203-210.

Zheng, G. D., Hu, P. J., Chao, Y. X., Zhou, Y., Yang, X. J., Chen, B. Z., Yu, X. Y., Cai, Y. (2019). "Nobiletin induces growth inhibition and apoptosis in human nasopharyngeal carcinoma C666-1 cells through regulating PARP-2/SIRT1/AMPK signaling pathway." Food Sci Nutr **7**(3): 1104-1112.

Zhou, J., Ng, S., Huang, Q., Wu, Y. T., Li, Z., Yao, S. Q., Shen, H. M. (2013). "AMPK mediates a pro-survival autophagy downstream of PARP-1 activation in response to DNA alkylating agents." FEBS Lett **587**(2): 170-177.

X. Tárgyszavak

AMPK

Autofágia

LC3

Mitokondriális biogenezis

Mitokondriális fragmentáció

Mitokondriális morfológia

mTOR

Oxidatív stressz

Poli(ADP-ribóz) polimeráz-2

SIRT1

AMPK

Autophagy

LC3

Mitochondrial biogenesis

Mitochondrial fragmentation

Mitochondrial morphology

mTOR

Oxidative stress

Poly(ADP-ribose) polymerase-2

SIRT1

Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőmnek, Prof. Dr. Bay Péternek a munkám során biztosított szakmai iránymutatásáért és támogatásáért. Hálával tartozom, hogy lehetővé tette számomra, hogy a munkacsoportjának tagjaként kiemelkedő munkafeltételek mellett készíthettem el doktori disszertációm.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Virág Lászlónak, az Orvosi Vegytani Intézet igazgatójának, hogy az intézetben végezhettem el kutatómunkámat.

Szeretnék köszönetet mondani munkacsoportunk minden korábbi és jelenlegi tagjának, hogy technikai tanácsokkal segítették munkámat. Külön szeretném köszönetemet kifejezni Dr. Máténé Dr. Sári Zsanettnek és Antal Dórának, akik nemcsak munkatársként, hanem barátként is segítették mindennapjaimat.

A technikai segítségért szeretnék köszönetet mondani Gelenczei-Finta László és Bancsi László technikusoknak.

Hálával tartozom Kis Nikoletta Grétának és Prof. Dr. Antal Miklósnak az elektronmikroszkópos vizsgálatok elkészítéséért. Köszönetet mondok Prof. Dr. Juhász Gábornak az autofágia kutatása során nyújtott technikai tanácsaiért és segítségéért. Köszönettel tartozom Prof. Dr. Vígh Lászlónak és Dr. Horváth Ibolyának a mtUPR kutatás során nyújtott segítségükért. Köszönetemet fejezem ki Dr. Bálint Bálint Lászlónak és Laczik Miklósnak a bioinformatikai elemzések során nyújtott segítségért. Köszönetemet szeretném kifejezni Dr. Karen Uraynak publikációnk angol nyelvű lektorálásáért.

Legnagyobb köszönetemet és hálámat családomnak és férjemnek szeretném kifejezni, akik nemcsak bátorítottak és biztattak, hanem támaszt nyújtottak és támogattak a PhD képzés éve alatt.

A tanulmány alapjául szolgáló kutatást az Innovációs és Technológiai Minisztérium által meghirdetett Tématerületi Kiválósági Program (TKP2020-IKA-04) támogatta. A disszertáció elkészítését a GINOP-2.3.2-15-2016-00006 számú projekt támogatta. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Regionális Fejlesztési Alap társfinanszírozásával valósult meg.



Nyilvántartási szám: DEENK/459/2021.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Jankó Laura
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10069221

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Jankó, L.**, Kovács, T., Laczik, M., Sári, Z., Ujlaki, G., Kis, G., Horváth, I., Antal, M., Vigh, L., Bálint, B. L., Uray, K., Bai, P.: Silencing of Poly(ADP-Ribose) Polymerase-2 Induces Mitochondrial Reactive Species Production and Mitochondrial Fragmentation.
Cells. 10 (6), 1-23, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/cells10061387>
IF: 6.6 (2020)
2. **Jankó, L.**, Sári, Z., Kovács, T., Kis, G., Szántó, M., Antal, M., Juhász, A. G., Bai, P.: Silencing of PARP2 blocks autophagic degradation.
Cells. 9 (2), 1-21, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/cells9020380>
IF: 6.6

További közlemények

3. Sári, Z., Mikó, E., Kovács, T., **Jankó, L.**, Csonka, T., Lente, G., Sebő, É., Tóth, J., Tóth, D., Árkosy, P., Boratkó, A., Ujlaki, G., Török, M., Kovács, I., Szabó, J., Kiss, B., Méhes, G., Goedert, J. J., Bai, P.: Indolepropionic Acid, a Metabolite of the Microbiome, Has Cytostatic Properties in Breast Cancer by Activating AHR and PXR Receptors and Inducing Oxidative Stress.
Cancers (Basel). 12 (9), 1-27, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/cancers12092411>
IF: 6.639
4. Sári, Z., Mikó, E., Kovács, T., Boratkó, A., Ujlaki, G., **Jankó, L.**, Kiss, B. K., Uray, K., Bai, P.: Indoxylsulfate, a Metabolite of the Microbiome, Has Cytostatic Effects in Breast Cancer via Activation of AHR and PXR Receptors and Induction of Oxidative Stress.
Cancers (Basel). 12 (10), 1-23, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/cancers12102915>
IF: 6.639





5. Hegedűs, C., Boros, G., Fidrus, E., Kis, G., Antal, M., Juhász, T., Janka, E. A., **Jankó, L.**, Paragh, G. J., Emri, G., Bai, P., Remenyik, É.: PARP1 Inhibition Augments UVB-Mediated Mitochondrial Changes-Implications for UV-Induced DNA Repair and Photocarcinogenesis. *Cancers (Basel)*. 12 (1), 1-29, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/cancers12010005>
IF: 6.639
6. Kovács, P., Csonka, T., Kovács, T., Sári, Z., Ujlaki, G., Sipos, A., Karányi, Z., Szeőcs, D., Hegedűs, C., Uray, K., **Jankó, L.**, Kiss, M., Kiss, B. K., Laoui, D., Virág, L., Méhes, G., Bai, P., Mikó, E.: Lithocholic acid, a metabolite of the microbiome, increases oxidative stress in breast cancer. *Cancers (Basel)*. 11, 1-31, 2019.
IF: 6.126
7. Márton, J., Péter, M., Balogh, G., Bódi, B., Vida, A., Szántó, M., Bojcsuk, D., **Jankó, L.**, Bhattoa, H. P., Gombos, I., Uray, K., Horváth, I., Török, Z., Bálint, B. L., Papp, Z., Víg, L., Bai, P.: Poly(ADP-ribose) polymerase-2 is a lipid-modulated modulator of muscular lipid homeostasis. *Biochim. Biophys. Acta. Mol. Cell Biol. Lipids*. 1863 (11), 1399-1412, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbalip.2018.07.013>
IF: 4.402

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 43,645

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapján szolgáló közleményekre):
13,2**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2021.10.08.



Függelék

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények különnyomata.