

**Doktori (PhD) értekezés tézisei**

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

Jankó Laura

Témavezető: Dr. Bay Péter



**DEBRECENI EGYETEM**  
Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

Debrecen, 2021

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

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében  
az Elméleti Orvostudományok tudományágban

Írta: Jankó Laura, okleveles molekuláris biológus

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Orvostudomány doktori iskolája  
(Jelátviteli folyamatok sejt- és molekuláris biológiája programja) keretében

Témavezető: Prof. Dr. Bay Péter

Az értekezés bírálói:

Dr. Mádi András, PhD  
Dr. Pankotai Tibor, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Csernoch László, az MTA doktora  
tagok: Dr. Balla András, PhD  
Dr. Kristóf Endre Károly, PhD  
Dr. Mádi András, PhD  
Dr. Pankotai Tibor, PhD

Az értekezés védésének (online formátumban) időpontja: 2022. január 25. 13:00 óra

A nyilvánosságot online módon biztosítjuk. Amennyiben részt kíván venni, úgy jelezze a [janko.laura@med.unideb.hu](mailto:janko.laura@med.unideb.hu) e-mail címre küldött üzenetben a vitát megelőző munkanap (2022. január 24.) 16 óráig. A határidő lejártát követően technikai okok miatt már nincs lehetőség a védéshez kapcsolódni.

## Bevezetés

A PARP enzimes család minden tagjára jellemző egy katalitikus aktivitással rendelkező domén, mely a szubsztrátként használt  $\text{NAD}^+$ -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 poszttranszlációs módosítás. A fehérjecs család egyik tagja a PARP-2 enzim, mely a sejtbeli PARP aktivitás 10-15%-áért felelős. A PARP-2 enzimet először a DNS hibajavításban azonosították, azonban azóta már számos fiziológias és patofiziológias folyamatban leírták szerepét, mint génexpressziós szabályozó mechanizmusok, mitokondriális folyamatok szabályozása, a lipid metabolizmus, a sejtek oxidatív károsodásra adott válasza, a spermatogenezis, a T-sejtek érése illetve bizonyos immunfolyamatok.

### 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 önmérsztő folyamat, mely során a sejt a saját makromolekuláit vagy organellumait a lizoszómális lebontó rendszer segítségével degradálja. Mindemellett a patogének elleni védelemben is szerepe van az autofágiának. A lizoszómális hidrolázok általi degradáció után a keletkező monomerek a megfelelő transzporterjeik segítségével a citoszólba kerülnek. Az autofágiával történő elimináció fő szabályozói a sejtek energiaszintjének szenzorai, a mTOR komplexek és az AMPK. Normál tápanyagellátottság mellett az mTORC1 gátolja az autofágia kezdeti lépését, míg tápanyag-depléciónál esetén indukálódik az autofágia. Az AMPK mTORC1-függő és -független módon is képes szabályozni az autofágiát. ATP depléciónál esetén az AMPK gátolja a mTORC1 aktivitását és indukálódik az autofágia. Azonban az ATP koncentrációjának növekedése gátolja az AMPK aktivitását. Az autofágia szigorúan szabályozott folyamat, az optimális szintjének alul- vagy túlműködése is sejthalálhoz vezethet. Számos patofiziológias folyamatban mutatták ki az autofágia szerepét vagy diszregulációját, például neurodegeneratív betegségek, illetve a tumorigenezis során.

A mai napig a PARP enzimes család 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. A PARP-10 enzimet a p62 interakciós partnereként írták le, melynek az autofagoszómális fehérjedegradációban van szerepe, azonban az autofágia szabályozásában betöltött szerepe eddig tisztázatlan.

### **A PARP-2 szerepe a mitokondriális biogenezisben**

A mitokondriumok az eukarióta sejtek energiatermelő központjainak tekinthető organellek, melyek változatos alakot, méretet, mennyiséget mutathatnak a sejtek típusától, illetve differenciáltsági állapotától függően. A mitokondrium egyik fő feladatának az oxidatív foszforiláció során termelődő ATP szintézis tekinthető, így konvencionálisan a sejtek energiatermelő központjának is nevezhető. 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 mitokondriális mátrixban számos esszenciális bioszintetikus útvonal lokalizálódik, így a mitokondriumok hibátlan funkciója az eukarióta sejtek hatékony működéséhez is nélkülözhetetlenek. A mitokondriális minőségkontroll több szinten megvalósuló jól szabályozott folyamatokból áll. A mitokondriális dinamika, a mitofágia, a mitokondriális ROS-termelés, illetve a mtUPR során bekövetkező negatív változások patofiziológias folyamatok kialakulásához vezethetnek, mint a kardiomiopátia, a diabetes mellitus, neurodegeneráció vagy az arteriosclerosis.

A PARP-2 enzim és a mitokondrium kapcsolatát számos esetben azonosították már. A PARP-2 depléción 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.

## 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.

## Anyagok és módszerek

### Anyagok

A kísérleteink során használt GSH-t, chloroquine-t, MitoTEMPO-t, NAC-t, PJ34-et és rezveratrolt a Sigma-Aldrich-től szereztük be. Az EX-527 és az olaparib a Selleckchem-től, az AICAR a Santa Cruz Biotechnology-től, a NR a ChromaDex-től, míg a rapamycin a Cayman Chemical-től származott.

### Sejttenyésztés

A C2C12 mioblaszt sejteket 4500 mg/l glükóz tartalmú DMEM médiumban, míg a HepG2 hepatokarcinóma sejteket 1000 mg/l glükóz tartalmú DMEM médiumban 37°C-on 5% CO<sub>2</sub> tartalom mellett tenyésztettük, melyet 10% FBS-sel, 2 mM L-glutaminnal és 1% penicillin/sztreptomocinnel egészítettünk ki. A C2C12 és a HepG2 sejtvonalakban munkacsoportunk korábban elvégezte shRNS technikával a PARP-2 gén csendesítését, melyet puromycin szelekcióval tartottunk fenn. A csendesítés során létrehozott PARP-2 csendesített sejteket shPARP2 névvel, míg a kontroll, nem-specifikus szekvenciát tartalmazó sejteket, scPARP2-ként jelöltük.

A MEF sejteket egy előző projekt keretein belül munkacsoportunk preparálta PARP-2 knockout (PARP-2<sup>-/-</sup>) és vad típusú (PARP-2<sup>+/+</sup>) egér embriókból, melyeket 4500 mg/l glükóz tartalmú DMEM médiumban tartottuk fenn, a médiumot 20% FBS-sel, 2 mM L-glutaminnal és 1% penicillin/sztreptomocinnel kiegészítve.

### 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 PARP-2, a PARP-1 és a PARP-3 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 sejteket 30 nM végkoncentrációjú siRNS-sel transzfektáltuk Lipofectamine™ RNAiMax transzfekciós reagens segítségével, majd 48 óráig inkubáltuk őket a

transzfekeiós eleggyel. A csendesítés sikerességét mRNS- és fehérjeszinten RT-qPCR és Western blot technikával ellenőriztük.

### **Sejtproliferaáció vizsgálata**

A sejtek proliferációjának vizsgálata során a fehérjék bázikus aminosav oldalláncaihoz kötődő szulforodamin B festéssel (SRB) kolorimetriás mérést végeztünk. A sejteket 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 segítségével 540 nm-en detektáltuk.

### **Sejthalál vizsgálata**

Az apoptotikus és a nekrotikus sejtek elkülönítése FITC Annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit segítségével történt. A sejteket centrifugával összegyűjtöttük és 5 µl FITC Annexin V–100 µg/ml propidium-jodid festékekkel jelöltük őket 15 percen keresztül. A fluoreszcenciát FACSCalibur™ áramlási citométer segítségével detektáltuk, majd az adatokat BD CellQuest Pro™ szoftverrel értékeltük.

### **Konfokális mikroszkópia**

Mintáink konfokális mikroszkóppal történő elemzése során Leica TCS SP8 konfokális mikroszkópot használtunk LAS X szoftverrel. A mikroszkópos képek kiértékelését ImageJ szoftverrel végeztük. A mitokondriumok morfológiai elemzése során az ImageJ szoftver Mito-Morphology makrójával dolgoztunk, mely mérés során a sejt mitokondriális tartalmát, a mitokondriumok kerületét és cirkularitását, illetve a form faktort határoztuk meg. A form faktor a mitokondriális területből és kerületből számolt mérőszám, mely legjobban jellemzi a fragmentáció mértékét. A kolokalizációs vizsgálatokhoz a szoftver EzColocalization plugin-jét használtuk a Pearson-féle korrelációs együtthatót alkalmazva.

### *Mitokondriális hálózat tanulmányozása*

A mitokondriumok vizsgálatára MitoTracker™ Red CMXRos fluoreszcens festéket alkalmaztunk, mely képes az organellumban akkumulálódni. A sejteket kör alakú fedőlemezre szélesztettük, majd 100 nM végkoncentrációjú MitoTracker™ Red CMXRos festékkel jelöltük 20 percen keresztül, ezután a lemezeket PBS-sel mostuk és 4% paraformaldehiddel fixáltuk.

### *Savas pH-jú organellumok vizsgálata*

A sejtekben található savas pH-val rendelkező organellumok (lizoszómák, autolizoszómák) tanulmányozására LysoTracker™ Deep Red fluoreszcens festéket használtunk, mely az organellumba való bekerülés után protonálódva halmozódik fel. A sejteket 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.

### *Immunfluoreszcencia*

A sejteket kör alakú fedőlemezre szélesztettük, majd 4% paraformaldehiddel fixáltuk és 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 segítségével jelöltük a sejtmagot.

### **Totál RNS izolálás és RT-qPCR**

A sejtekből totál RNS-t TRIzol reagens segítségével izoláltunk a gyártó utasításai szerint. RNS mintáink tisztaságát és mennyiségét NanoDrop™ 1000 spektrofotométerrel ellenőriztük.

A reverz transzkripció során 2 µg totál RNS-t használtunk és a reakciót High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit alkalmazásával hajtottuk végre.

A reverz transzkripció során nyert cDNS mintáinkat tízszerezésre hígítva használtuk fel a qPCR reakcióban, mely során qPCRBIO SyGreen Mix Lo-ROX-ot

használtunk. A mérést LightCycler 480 Real-Time PCR készülékkel végeztük. A vizsgált gének expresszióját háztartási gének (36B4 és ciklofilin) expressziójának átlagához viszonyítottuk.

### **Celluláris ATP koncentráció meghatározása**

A celluláris ATP szint meghatározását fluorimetriás mérésrel ATP Assay Kit segítségével végeztük. A sejteket centrifugálással összegyűjtöttük, ATP Assay Buffer-ben lizáltuk és a fluoreszcenciát 96 lyukú feketefalú tenyésztőedényben detektáltuk Spark 20M fluoriméter segítségével. A mért fluoreszcencia alapján meghatároztuk mintáink ATP tartalmát, melyet a fehérjetartalomra normalizáltunk, majd a normalizált értékeket ábrázoltuk.

### **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 Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 mM NaF, 1 mM PMSF, proteáz gátló koktél) lizáltuk. Mintáink fehérjetartalmát Pierce™ BCA Protein Assay Kit 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<sub>Tween</sub> oldattal 1 órán keresztül blokkoltuk, ezt követően az elsődleges antitesttel jelöltük egy éjszakán keresztül. Másnap a TBS<sub>Tween</sub> 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 segítségével. A sávok intenzitását ImageJ szoftverrel határoztuk meg, majd statisztikai módszerekkel értékeltük ki.

## **Szuperoxid-termelés mérése**

A sejtek szuperoxid-termelését hidroetidin (HE) festéssel határoztuk meg, mely a citoszólban való oxidálódása után képes interkalálódni a sejtmagi DNS-be. A sejteket centrifugával összegyűjtöttük és 2,5  $\mu\text{M}$  hidroetidinnel jelöltük 30 percen keresztül. A fluoreszcenciát FACSCalibur™ áramlási citométerrel detektáltuk, míg az adatokat BD CellQuest Pro™ szoftverrel elemeztük ki.

## **A lipidperoxidáció vizsgálata**

A lipidperoxidáció mértékét a melondialdehiddel reagáló tiobarbitursav mennyiségének képződésével, illetve a 4HNE-módosított fehérjék Western blot módszerrel történő vizsgálatával határoztuk meg. A sejteket PBS-sel mostuk és centrifugálással összegyűjtöttük őket. A sejtellethez 8,1% SDS-t, 20% ecetsavat, 0,8% tiobarbitursavat és desztillált vizet tartalmazó oldatot adtunk és 1 órán keresztül 95°C-on melegítettük őket. Ezután a mintákat lehűtöttük, centrifugáltuk, majd a felülülő abszorbanciáját spektrofotométerrel 530 nm-en lemértük. A lipidperoxidáció mértékét a sejtszámra normalizáltuk és ezeket a normalizált értékeket ábrázoltuk.

## **Az oxigénfogyasztás meghatározása**

A sejtek oxigénfogyasztását Seahorse XF96 Flux Analyzer oximéterrel határoztuk meg. A sejteket a próbához tervezett 96 lyukú tenyésztőedényekbe szélesztettük. A mérés során először az oxigénfogyasztás alaplértékét rögzítettük, majd 50  $\mu\text{M}$  etomoxir hozzáadása után a szabad zsírsav oxidációt határoztuk meg. A kapott adatokat BCA méréssel történő fehérjetartalomra normalizáltuk és ábrázoltuk.

## **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 ágyaztuk. Ultravékony szeleteket készítettünk Leica Ultracut UCT ultramikrotóm segítségével, majd a metszeteket formvar hártyával bevont mikrorostélyokra helyeztük és uranil-acetáttal, illetve Reynolds-féle ólom-citráttal jelöltük. A metszeteket JEOL 1010 transzmissziós elektronmikroszkóppal vizsgáltuk.

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

### **Statisztikai analízis**

Az adatok statisztikai kiértékelése során Prism szoftvert 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.

## Eredmények

### A PARP-2 csendesítés gátolja az autofágiát

*A PARP-2 csendesítés gátolja az autofágiát immortalizált mioblaszt sejtekben*

A kontroll és PARP-2 csendesített C2C12 mioblaszt sejteket először elektronmikroszkópos technikával tanulmányoztuk. Az elektronmikroszkóppal készült felvételeket elemezve azt tapasztaltuk, hogy a PARP-2 csendesített sejtekben citoszólikus elektronenz struktúrák jelennek meg, melyek késői autofág vezikulumoknak tűntek. Annak érdekében, hogy megerősítsük, hogy az elektronmikroszkópos felvételeken látott elektronenz struktúrák autofág természetűek, tanulmányoztuk egy jól ismert és széles körben alkalmazott autofágia marker, a LC3 fehérje expresszióját. A LC3 expresszióját először a scPARP2 és shPARP2 C2C12 sejtekben vizsgáltuk Western blot és immunfluoreszcens technikával. Fokozott LC3 expressziót detektáltunk a PARP-2 csendesített sejtekben a kontroll sejtekhez viszonyítva, 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 fehérje foltokban történő megjelenése az autofágia emelkedett aktivitására utal PARP-2 hiányában. Az előző eredmények alátámasztásának céljából a LC3 expressziót olyan C2C12 sejtekben is vizsgáltuk, melyekben tranziensen csendesítettük a PARP-2 gént. A PARP-2 tranziensen csendesített sejtvonalban, a stabil sejtvonalhoz hasonlóan, fokozott LC3 expressziót detektáltunk.

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) akkumulálódik, így jelölve azokat. A konfokális mikroszkóppal készült felvételek kiértékelése során emelkedést figyeltünk meg a LysoTracker-pozitív organellumok számában a PARP-2 csendesített sejtekben, mely ugyancsak fokozott autofág aktivitásra utal.

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. 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. Ez azt sugallja, hogy a kezeletlen sejtekben zajló autofágia PARP-2 csendesítés hatására zavart szenved és elakad.

*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. Megvizsgáltuk 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. Ezen eredmények megerősítik azon megállapításunkat, hogy PARP-2 hiányában megváltozik a sejtek energiaérzékelése.

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. 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. Az olaparib, mint PARP inhibitor, és a nikotinamid-ribozid (NR), mint NAD<sup>+</sup> 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.

Következő vizsgálatunk során arra kerestük a választ, hogy a PARP-2 csendesítése 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. A SIRT1 farmakológiai aktiválására rezveratrolt, míg gátlására EX-527-et használtunk és vizsgáltuk a LC3 expressziót scPARP2 és shPARP2 C2C12 sejtekben. Vizsgálataink alapján a rezveratrol mindkét sejtvonal esetében emelte a LC3 expressziót, míg a SIRT1 EX-527-tel történő gátlása csökkentette a PARP-2 csendesítés során tapasztalt emelkedett LC3-pozitív vezikulumok számát.

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

*A PARP-2 hiány növeli a LC3-pozitív vezikulumok számát nem-transzformált 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<sup>+/+</sup> egérből származó primer sejtvonalat hasonlítottunk össze 5 különböző PARP-2 knockout egérből (PARP-2<sup>-/-</sup>) származó primer sejtvonallal. A konfokális mikroszkópos felvételek kiértékelése során a LC3-pozitív vezikulumok számában emelkedést mutattunk ki a PARP-2<sup>-/-</sup> egerekből izolált MEF sejtekben a PARP-2<sup>+/+</sup> egérből származó MEF-hez viszonyítva, mely összhangban van az immortalizált C2C12 sejtek esetén tapasztaltakkal. Ezen eredmény azt sugallja, hogy az autofág aktivitás 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.

### *A PARP-2 aktivitása szerepet játszik az autofágiában*

PARP inhibitorokkal, olaparibbal és PJ34-el kezelt scPARP2 és shPARP2 C2C12 sejtekben tanulmányoztuk a mTOR rendszer két komplexének és az AMPK-nak az aktivitását. A gátlószerekkel történő kezelés után az AMPK foszforilációjában csökkenést tapasztaltunk mind a kontroll, mind a PARP-2 csendesített sejtvonalonban. 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. Emellett a PARP aktivitás gátlása csökkentette az Akt kináz foszforiláltságát a kontroll sejtekben, azonban a PARP-2 csendesített sejtekben nem volt hatással. Ezen eredmények megerősítették azt a hipotézisünket, hogy a PARP-2 aktivitásának csökkenése hatással van a sejt energiaérzékelésére.

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

#### *A PARP-2 hiányában mitokondriális fragmentáció lép fel*

A kontroll és PARP-2 csendesített C2C12 mioblaszt sejtekben a mitokondriális struktúrát immunfluoreszcens technikával tanulmányoztuk. A mitokondriumokat MitoTracker Red fluoreszcens festékkel jelöltük, mely az élő sejtek mitokondriumaiban akumulálódik. Emellett a mitokondriális morfológia konfokális mikroszkóppal történő tanulmányozásának céljából a Tomm20 fehérjét jelöltük a fehérjére specifikus antitesttel. 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 cirkularításban növekedést, míg a mitokondriális kerületben és a form faktorban csökkenést tapasztaltunk PARP-2 hiányában, mely adatok szintén a mitokondriális hálózat fragmentálódására utalnak.

Munkánk következő lépéseként a scPARP2 és shPARP2 C2C12 sejteket elektronmikroszkópos technikával vizsgáltuk. PARP-2 hiányában a mitokondriális átmetszetek számában emelkedést tapasztaltunk, mely szintén a mitokondriális morfológia megváltozására, a hálózat töredezettségére utal.

Az előző eredményeink megerősítésének céljából a mitokondriális struktúrát PARP-2 tranziensen csendesített C2C12 sejtekben is vizsgáltuk. A tranziensen transzfektált sejtvonalakban fragmentálódott mitokondriális hálózatot figyeltünk meg MitoTracker Red jelölést követően, mely a stabil sejtvonalhoz hasonlóan, az emelkedett mitokondriális tartalomban és cirkularitásban, illetve a mérséklődött mitokondriális kerületben és form faktorban nyilvánult meg.

*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. Mivel a mitokondriális struktúra szétesése a mitokondriumok szelektív lebontására, a mitofágiára is visszavezethető, így vizsgáltuk ennek a folyamatnak is az eshetőségét. Ennek igazolásához a scPARP2 és shPARP2 C2C12 sejtekben, az előző kísérletekben jól ismertetett markereket használtuk a mitokondriumok és az autofagoszómák lokalizációjának vizsgálatára: a mitokondriumokat MitoTracker Red fluoreszcens festékkel vagy Tomm20 antitesttel, míg az autofagoszómákat LC3 antitesttel jelöltük. 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.

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, majd a mitokondriális struktúrát MitoTracker Red fluoreszcens festékkel vizsgáltuk. 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 fuzionált fenotípusukat.

Következő lépésként a fúzióban–fisszióban és mitofágiában részt vevő fehérjék (Mfn1, Mfn2, Opa1, Fis1, Drp1, Parkin és Pink1) mRNS- és fehérjeszintű 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.

*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 sejtípusokban is hasonló esemény játszódik le. ScPARP2 és shPARP2 HepG2 sejtekben, a C2C12 sejtekhez hasonlóan, először MitoTracker Red fluoreszcens festékkel, illetve Tomm20 antitesttel jelöltük a mitokondriumokat. A mioblaszt sejtekhez hasonlóan a PARP-2 csendesített HepG2 sejtekben is fragmentálódott mitokondriális hálózatot detektáltunk mindkét jelölés alkalmával.

Következő kísérletünk során a scPARP2 és shPARP2 HepG2 sejteket elektronmikroszkóppal tanulmányoztuk. Az elektronmikroszkóppal készített felvételeken PARP-2 hiányában a mitokondriális átmetszetek számában növekedést tapasztaltunk, mely szintén a mitokondriális struktúra szétesésére utal.

A következő kísérletünk során arra kerestük a választ, hogy a PARP-2 csendesített HepG2 sejtekben megjelenő megváltozott mitokondriális struktúra összefüggésben áll-e a mitofágiával, illetve a mitokondriális dinamika megváltozásával. Először a scPARP2 és shPARP2 HepG2 sejtekben az autofagoszóma–mitokondrium kolokalizációt kétféle mitokondriális jelöléssel konfokális mikroszkóppal, majd a mitokondrium fúziójában–fissziójában részt vevő fehérjék expresszióját tanulmányoztuk. Az elemzés alkalmával, a C2C12 sejtekhez hasonlóan, nem detektáltunk 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) expressziójában sem történtek olyan mértékű változások,

melyek magyarázhatták volna a mitokondrium töredezettségét, melyet PARP-2 hiányában tapasztaltunk.

#### *A PARP-2 hiánya oxidatív stresszt indukál*

Számos esetben bizonyították már, hogy a PARP-gátlás hatására megváltozik a sejtek redox állapota, 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, majd fokozott lipidperoxidációt detektáltunk a tiobarbitursav-reaktív termékek meghatározásával, illetve Western blot technikával a 4HNE-módosított fehérjék expressziójának vizsgálatával PARP-2 hiányában, melyek emelkedett oxidatív hatásra utalnak. A nitrozatív stressz markereként először fehérjeszinten Western blot technikával enyhén emelkedett iNOS expressziót mutattunk ki, majd a NTyr expresszióját tanulmányoztuk Western blot módszerével, mely során enyhe emelkedést tapasztaltunk PARP-2 hiányában. A Nox4 mRNS-szintű expressziójában csökkenést figyeltünk meg, melyből arra következtethetünk, hogy a fokozott ROS-termelés forrása nem a NADPH-oxidáz. Eredményeink azt mutatják, hogy PARP-2 hiányában megváltozik a sejtek redox homeosztázisa, oxidatív stressz indukálódik.

Ezt követően azt szerettük 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 NAC-nel, illetve MitoTEMPO-val kezeltük, majd MitoTracker Red fluoreszcens festékkel vizsgáltuk a mitokondriális morfológiában bekövetkező változásokat. 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 cirkularításban csökkenést tapasztaltunk, melyek arra utalnak, hogy a PARP-2 hiány által előidézett mitokondriális fragmentáció alapja a részben mitokondriális eredetű oxidatív stressz.

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

Az antioxidánsok hatását a sejtek oxigénfogyasztására, illetve a zsírsav oxidáció mértékére Seahorse oximéterrel vizsgáltuk, míg az ATP tartalmat fluoreszcens méréssel határoztuk meg. Mind az alap oxigénfogyasztásban és zsírsav oxidációban, mind az ATP tartalomban csökkenést találtunk a kontroll és a PARP-2 csendesített C2C12 sejtek esetén. A PARP-2 hiányában megfigyelt fokozott oxigénfogyasztás, zsírsav oxidáció és ATP tartalom az antioxidánsokkal történő kezelést követően csökkent.

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. A MitoTEMPO nem volt hatással erre a folyamatra. Emellett sem az antioxidánsok, sem a PARP-2 csendesítés nem befolyásolta a sejthalál folyamatokat.

*A PARP-1-nek és a PARP-3-nak nincs szerepe a PARP-2 hiány által előidézett megváltozott mitokondriális morfológiára*

Korábbi vizsgálatok igazolták, hogy a másik két DNS hibajavításban részt vevő PARP enzim, a PARP-1 és a PARP-3 aktivitása hatással van a mitokondriális struktúrára. Ennek érdekében következő kísérleteinkben azt tanulmányoztuk, hogy a PARP-1 és a PARP-3 összefüggésben van-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

kezdtek. A PAR Western blot képen jól látható, hogy a PARP-1 gén transziens csendesítése a PARP-1 enzim autoPARilációjának mértékét is csökkentette. Ugyanezen sejtekben tanulmányoztuk a mitokondriális morfológiát MitoTracker Red fluoreszcens festékkel. A fluoreszcens felvételek kiértékelése során 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, transziensen csendesítettük scPARP2 és shPARP2 C2C12 sejtekben, majd vizsgáltuk a PARiláció mértékét. 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, majd a fluoreszcens felvételek elemzése során, a PARP-1-hez hasonlóan, nem tapasztaltunk változást sem a kontroll, sem a PARP-2 csendesített sejtekben.

## Megbeszélés

### A PARP-2 depléciója 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 organellumokat vagy makromolekulákat bontja le. Mindemellett az intracelluláris patogének elleni védelemben is fontos szerepet tölt be az autofágia. A folyamat fő szabályozói a sejtek energiaszenzorai, az AMPK és a mTOR kináz komplexek. Minden sejtben folyamatosan jelen van az autofágia, melynek zavara patofiziológiás állapotok kialakulásához vezethet. A PARP-1 és a PARP-10 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 shRNS technikával. 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 siRNS 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 sejtvonalon, esetleg eltérő változások tapasztalhatók-e a két sejtvonalonban. A chloroquine, mint autofágia inhibitor a lizoszómális pH neutralizálásával gátolja a lizoszómális degradáció folyamatát, míg a szérum-éheztetés a mTOR komplex szabályozásán keresztül indítja be az autofágiát. A chloroquine kezelés, illetve a szérum-éheztetés hatására fokozott LC3 expressziót detektáltunk a kontroll és a PARP-2 csendesített sejtvonalonban is, azonban a PARP-2 hiányában megfigyelhető két sejtvonalon közötti LC3-szignál különbség mindkét kezelés hatására mérséklődött, mely arra utal, hogy a PARP-2 enzim hiánya elsősorban az alap autofág aktivitást gátolja. Irodalmi adatok utalnak arra, hogy a szérum-depléció csökkenti a PARP-2 expressziót. Korábban kimutatták, hogy a szérum-éhezés során a PARP-2 mRNS-szintű expressziója nem változik meg, hanem a PARP-2 proteoszómális degradációja gyorsul fel.

Kutatási eredményeink alapján megállapítható, hogy a PARP-2 depléciója 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. Eredményeink azonban arra utalnak, hogy az AMPK aktiválása AICAR-ral részlegesen blokkolja a PARP-2 gátlása után bekövetkező megnövekedett autofág 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. 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.

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. A SIRT1 direkt és indirekt módon is befolyásolhatja az autofágiát. Egyrészt közvetlenül képes kölcsönhatásba lépni és deacetilálni az autofágia mechanizmusában részt vevő kulcsfehérjéket, az Atg5-öt, Atg7-et és az Atg8-at, másrészt indirekt módon a FOXO transzkripció 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. A SIRT1 aktivációja miatt indukálódó autofágia kardioprotektív és neuroprotektív hatású. Eredményeink alapján a PARP-2 depléció során bekövetkező autofágia indukció a SIRT1 PARP-2 hiányában megjelenő fokozott aktivitásával is összefüggésben van. A PARP-2 csendesítése növeli a SIRT1 aktivitást, mivel a PARP-2 a SIRT1 promóterének

represszora, így a PARP-2 depléciónak esetén fokozott SIRT1 expresszió és aktivitás figyelhető meg. 3-MA-val gátolva az autofágiát a SIRT1 expressziója csökken, azonban a rezveratrol SIRT1-függő módon autofágiát indukál. Fontos megemlíteni, hogy a rezveratrol SIRT1- és mTOR-független módon az autofágia gátlását okozhatja a S6 kináz direkt gátlásán keresztül. Emellett az intracelluláris NAD<sup>+</sup> koncentrációnak is hatása van az autofágia folyamatára a SIRT1 és a PARP-1 enzimek aktivitásának befolyásolása révén, mivel mindkét enzim aktivitását szabályozza a NAD<sup>+</sup> koncentráció. Kísérleteink során NR-dal, egy NAD<sup>+</sup> prekuzorral kezelve a sejteket megállapítottuk, hogy a NAD<sup>+</sup> 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, 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-nak és a mTORC2-nek, illetve a SIRT1 modulálása által.

### **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, azonban kutatásunk során a kapcsolatukról ismereteinket szerettük volna bővíteni. A PARP-2 hiányában megjelenő mitokondriális biogenezis folyamatában a fokozott SIRT1 aktivációnak is szerepe van. Oxidatív fenotípus detektálható PARP-2 depletált egerek vázizmában és májában, emellett megnövekedett mitokondriális tartalom és mtDNS mennyiség is észlelhető PARP-2 knockout egerekben.

A mitokondriális struktúrát először egér eredetű C2C12 sejteken tanulmányoztuk, mely sejtekben a PARP-2 shRNS technikával volt csendesítve, 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 depléciónak alkalmával a mitokondriális tartalomban növekedést tapasztaltunk, mely a korábbi kutatási eredményekkel korrelál és mitokondriális

biogenezisre utal. A másik major PARP enzimről, a PARP-1-ről korábban már igazolták, hogy hatással van a mitokondriális hálózat integritására.

Sokféle párhuzamos útvonal okozhatja a mitokondriális hálózat fragmentációját, többek között a mitokondriumok organellum-szelektív lebontása, a mitofágia, a mitokondriális fúzió–fisszió folyamatának helytelen működése, a folyamatban részt vevő fehérjék expresszióbeli változása vagy teljes hiánya, illetve a SIRT1 aktiváció. Irodalmi adatok szerint a PARP-1 gátlása mitofágiát okozhat, mivel a PARP-1 hiperaktivációja miatt csökken az intracelluláris NAD<sup>+</sup> koncentráció és következményesen a SIRT1 aktivitás, mely fokozza a Pink1 aktivációját és mitokondriális hiperpolarizációt okoz. A SIRT1 hatással van a mitokondriális hálózatra, mivel a SIRT1 fokozott aktivitása a mitokondriális tartalom növekedését okozza, illetve a mitokondriális hálózat fragmentálódik. Kísérleti eredményeink szerint azonban a PARP-2 csendesítés hatására bekövetkező SIRT1 aktiváció nem az oka a mitokondriális hálózat megváltozásának. Ezen kívül a mitokondriális dinamika folyamatában sem figyeltünk meg olyan változásokat, melyek a mitokondriális hálózat szétesését magyarázták volna és mind a C2C12, mind a HepG2 sejtvonalban hasonlóan 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. Kísérleteink során a PARP-2 depléciója esetén az oxidatív stressz markerekben, többek között a hidroetidin 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 antioxidánssal, 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. A MitoTEMPO-ról korábban már kimutatták, hogy hatással van a mitokondrium morfológiájára. 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. 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, 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 enzimcsalád két tagjáról, a PARP-1-ről és a PARP-3-ról korábban már kimutatták, hogy képesek befolyásolni a mitokondriális morfológiát. A PARP-1 farmakológiai gátlása a mitokondriális fúzió folyamatában részt vevő Opa1 fehérje expresszióját mRNS-szinten csökkenti, így töredezettségre jellemző hálózat jellemzi az olaparibbal kezelt sejtek mitokondriumait. A PARP-3 gátlását emelkedett ROS-termeléssel is összefüggésbe hozták, melynek fő származási helye a mitokondriális NADPH-oxidáz. 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.

## 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<sup>+</sup> 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 antioxidánsal, 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.

# Publikációs jegyzék



**DEBRECENI  
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM  
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400  
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikacio@lib.unideb.hu

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., Soežcs, 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., Vígh, 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.

