

**Doktori (PhD) értekezés tézisei**

**Az UVB-indukált akut DNS károsodás szerepe a mitokondriumok működésének szabályozásában**

Hegedűs Csaba

Témavezető: Prof. Remenyik Éva



DEBRECENI EGYETEM  
Egészségtudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2021

**Az UVB-indukált akut DNS károsodás szerepe a mitokondriumok működésének szabályozásában**

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében  
az Egészségtudományok tudományágban\*

Írta: Hegedűs Csaba okleveles molekuláris biológus

Készült a Debreceni Egyetem Egészségtudományok doktori iskolája  
(Megelőző Orvostan és Népegészségtan programja) keretében

Témavezető: Prof. Remenyik Éva

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Balázs Margit, az MTA doktora  
tagok: Prof. Bíró Tamás, az MTA doktora  
Dr. Kinyó Ágnes, PhD

A doktori szigorlat időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK  
2021. július 2. 11:00 online

Az értekezés bírálói:

Prof. Gyulai Rolland, az MTA doktora  
Dr. Mádi András, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Balázs Margit, az MTA doktora  
tagok: Prof. Gyulai Rolland, az MTA doktora  
Dr. Mádi András, PhD  
Prof. Bíró Tamás, az MTA doktora  
Dr. Kinyó Ágnes, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK  
2021. július 2. 13:00.

A nyilvánosságot online módon biztosítjuk. Amennyiben az online vitán részt kívánnak venni, a részvételi szándékát a [hegeduscaba88@gmail.com](mailto:hegeduscaba88@gmail.com) e-mail címen 2021. július 1. 12:00 óráig jelezheti. Az eseményhez válaszevélben küldött linken keresztül lehet csatlakozni. A határidő lejártát követően technikai okok miatt már nincs lehetőség a védéshez kapcsolódni.

## 1. BEVEZETÉS

A Föld felszínét elérő UV tartományból az UVB rendelkezik a legnagyobb DNS károsító hatással, mely főleg ciklobután pirimidin dimerek (CPD) kialakulását okozza. Ezeknek a fototermékeknek a javítását emlős sejtekben a komplex, ugyanakkor lassú nukleotid excíziós rendszer (NER) végzi. Alacsonyabb rendszertani osztályokban általánosságban megfigyelhető egy sokkal hatékonyabb javító mechanizmus, a fotoreaktiváció, mely a fotoliáz enzim segítségével, a fény energiájának a felhasználásával javítja rendkívül gyorsan ezeket a fotoléziókat, ugyanakkor ez a repair útvonal eltűnt az evolúció során a méhlepényes emlősökből. A DNS károsodásra adott válasz magában foglalja olyan szignalizációs útvonalak aktiválódását, mely többek között a DNS hibajavítást, a redox homeosztázist, a károsodott celluláris komponensek lebontását, a metabolikus változásokat és a mitokondriumok működését szabályozzák. Emellett az UVB-indukált reaktív szabadgyökök (ROS) is több (patho)fiziológiás folyamat szabályozói. Habár az UVB szerepe az apoptózis, a gyulladás és a karcinogenezis elindításában jól karakterizált, keveset tudunk a sejtek metabolizmusára, valamint mitokondriális aktivitására kifejtett hatásáról. Az UVB-indukált akut DNS károsodás és a mitokondriumok funkcionális állapota közötti, úgynevezett anterográd szignaling közvetítésében kiemelt szerepet játszhat a DNS károsodásra aktiválódó poli(ADP-ribóz) polimeráz 1 fehérje (PARP1), mely a DNS repair és a genomintegritás fenntartása mellett számos mechanizmus révén szabályozza a mitokondriumok működését.

### 1.1. Az UV sugárzás

Hullámhossztulajdonságuk és eltérő biológiai hatásuk alapján az UV sugarak 3 különböző osztályba sorolhatók: UVA (315–400 nm), UVB (280–315 nm) és UVC (100–280 nm). A legkisebb hullámhosszúságú UVC sugárzást az ózonréteg teljes mértékben kiszűri, így bőrünket nem éri el. Míg az UVB sugárzás bőrünk felső rétegét, az epidermiszt, így főleg a keratinocitákat érinti, az UVA sugárzás energiáját az epidermisz mellett a dermisz is abszorbeálja. Az egyes UV spektrumok biológiai hatásmechanizmusukban is eltérnek egymástól. Az UVC sugárzás rendelkezik a legnagyobb genotoxikus hatással, mely ciklobután pirimidin dimerek (CPD), egyszálú és duplaszálú DNS lánctörések kialakulásában nyilvánul meg. Az UVB az UVC-hez hasonlóan direkt módon károsítja a DNS-t, de leginkább egy DNS szálon belüli kovalens keresztkötések, így CPD-k, (6-4) fototermékek, valamint utóbbiak fotoizomerizációjával kialakuló Dewar izomerek megjelenését okozza. Az UVA sugárzás főleg reaktív oxigén gyökök (ROS) indukcióján keresztül oxidatív károsodást okoz, mely lipid peroxidációhoz, protein oxidációhoz, gyulladáscsökkentő citokinek felszabadulásához, egyszálú DNS

törések és 7,8-dihidro-8-oxoguanin (8-OH-dG) léziók kialakulásához vezet. Az UV sugárzás rendkívül sokféle biológiai hatást képes kiváltani. Az akut hatások közé tartozik a D vitamin szintézis, az apoptotikus keratinociták (sunburn sejtek), a metabolikus változások megjelenése, melyek klinikailag eritéma, esetenként hólyagképződés, majd hiperpigmentáció, hiperalgézia formájában jelenik meg. Napok múlva hiperkeratózis, epidermális hiperplázia jön létre. Az UV immunszuppresszió mind akut, mind krónikus esetben kialakul. Hosszú távú hatásnak tekintjük a bőröregedést és a karcinogenezist. Mivel a sztratoszférikus ózonréteg az UVC sugárzást teljesen, az UVB-t pedig 90-95%-ban kiszűri, a Föld felszínét elérő napfény ultraibolya tartományának 90-95%-át az UVA, a maradék 5-10%-ot az UVB teszi ki. Ennek ellenére az UV spektrum legtöbb biológiai hatásának közvetítéséért mégis az UVB-t tartják felelősnek. Az UVB-indukált fotoléziók C>T és CC>TT tranzícióhoz, UVB-re jellemző szignatúra mutációk megjelenéséhez vezet. Ilyen mutációk figyelhetők meg keratinocita eredetű bőrdaganatokban (bazálsejtes karcinóma (BCC) és laphámsejtes karcinóma (SCC)), valamint hámdaganat-megelőző léziókban (szoláris keratózis), sőt krónikus fénykárosodott bőrben is.

## **1.2. A nukleotid excíziós repair (NER)**

A NER, mely prokariótákban és eukariótákban az UVB-okozta fototermékek eltávolítását végzi, igen komplex: több mint 30 fehérjéből áll. A DNS károsodás felismerésében mutatott különbségek alapján megkülönböztetünk globál genom repairt (GG-NER) és transzkripció-kapcsolt (TC-NER) javító mechanizmust. A GG-NER a heterokromatikus régiók javítását végzi, aktivációját a DDB2 fehérje indítja. Ezzel szemben a TC-NER számára az indító szignál a károsodás helyén megakadó RNS polimeráz II jelenti, így az aktívan átíródó DNS szakaszokon végzi a hibajavítást. Az ezt követő lépések mindkét útvonal esetében hasonlóan zajlanak. Miután a DNS-kötő fehérjék felismerték a károsodás által okozott DNS konformációváltozást, helikázok szétnyitják a DNS-t a lézió körül. Ezt követi a DNS károsodás megerősítése után az incízió, majd a léziót tartalmazó kb. 24-32 nukleotidnyi szakasz eltávolítása. Az így kialakuló rést DNS polimerázok töltik ki, majd a láncvégeket DNS ligázok egyesítik. A NER működését szabályzó fehérjék genetikai defektusai ritka, ugyanakkor igen súlyos betegségek, Xeroderma Pigmentosum (XP), Cockayne szindróma (CS), valamint trichotiodisztrófia (TTD) kialakulását okozza.

## **1.3. A Fotoreaktiváció**

Szerte az élővilágban a baktériumoktól egészen a méhlepényes emlősökig megfigyelhető a NER mellett egy másik javító mechanizmus is, az úgynevezett fotoreaktiváció az UVB-okozta

fototermékek eltávolítására. A fotoreaktivációt a DNS fotoliázok katalizálják, melyeket szubsztrátspecifitásuk alapján CPD-specifikus, ill. (6-4) fototermék-specifikus fotoliázoknak nevezünk. Mindkét fotoliáz 55 kDa körüli vízoldható monomer flavoprotein, mely proszтетikus csoportként redukált FADH<sup>-</sup>-ot, fénygyűjtő antennaként pedig metiltetrahidrofolátot (MTHF) vagy 8-hidroxi-7,8-dimetil-deazariboflavint (8-HDF) ritkábban pedig pterint tartalmaz. 300–500 nm fényexpozíciót követően a fénygyűjtő antennák által abszorbeált energia FRET mechanizmussal a redukált FADH<sup>-</sup>-nak adódik át. A gerjesztett FADH<sup>-\*</sup> egy elektront továbbít a CPD-nek, melynek hatására a két bázist összekötő kovalens kötés felszakad, az elektron pedig visszakerül FADH<sup>o</sup>-ra, mellyel az aktív FADH<sup>-</sup> regenerálódik.

#### **1.4. A reaktív oxigéngyökök szerepe**

A reaktív oxigén szabadgyökök a sejtek fiziológias működésének melléktermékei. Számos szubcelluláris kompartmentben keletkezhetnek különböző enzimek aktivitásának köszönhetően, így a mitokondriális működés is hozzájárul a szabadgyökök képződéséhez. Ugyanakkor az exogén környezeti hatások, így többek között az UV sugárzás is jelentős ROS-termelő tényező. Mivel a szabadgyökök másodlagos messengerként fontos szerepet játszanak számos szignalizációs útvonal szabályozásában, ezért a sejtek a pro- és antioxidáns egyensúly fenntartására törekednek. Az epidermisz számos kromofórral rendelkezik, melyek az UV által abszorbeált energiát biomolekuláknak vagy közvetlenül a molekuláris oxigénnek átadva szabadgyökök kialakulását okozza. A bőr többféle, az antioxidáns védelemben fontos szerepet játszó enzimet és antioxidánst tartalmaz, melyek nélkülözhetetlenek a ROS káros hatásainak kivédésében. Ha az antioxidáns védelem hiánya és/vagy a túlzott mértékű ROS termelés miatt az egyensúly megbomlik, oxidatív stressz jön létre. Ugyanakkor a redukáló ekvivalensek szintjének emelkedése vagy az antioxidáns rendszerek túlzott mértékű aktivációja kimerítheti a sejtek szabadgyök poolját és úgynevezett anti-oxidatív vagy reduktív stressz jön létre, mely paradox módon feedback regulációval az oxidatív stresszhez hasonló fenotípusbeli változásokat hozhat létre.

#### **1.5. A mitokondriális dinamika és minőségellenőrzés**

A mitokondriumok rendkívül dinamikus organelumok, melyek formájuk és méretük szabályozásának érdekében koordinált hasadási és fúziós eseményeken mennek keresztül, melyeket összefoglalóan „mitokondriális dinamikának” nevezünk. A mitokondriális dinamikában bekövetkezett változások a mitokondriumok működésének optimális fenntartását, a tápanyagellátottság szabályozását, valamint a sejt metabolikus szükségletéhez való

finomhangolását szolgálják. A mitokondriális fragmentáció gyakran összefügg a mitokondriális funkció romlásával, mivel ez a morfológiai állapot figyelhető meg döntően súlyos stresszhatás és apoptózis során. A mitokondriális fúzió lehetővé teszi a mitokondriális mátrix komponensek hálózaton belüli eloszlását, elősegíti a mitokondriumok közötti komplementációt és homogenitást, emeli a mitokondriális aktivitást, védelmet nyújt az autofágiával szemben és általában a sejtek túlélésében játszik szerepet. A mitokondriális dinamika fő közvetítői, a mitokondriális fúziót irányító mitofuzin 1 (Mfn1), mitofuzin 2 (Mfn2) és optikus atrófia 1 (OPA1), valamint a fissziót támogató dinamin-kapcsolt protein 1 (Drp1) mind a guanozin-trifoszfátok (GTPázok) családjának tagjai. A mitokondriumok minőségellenőrzésének szabályozásában kulcsszerepet játszik a mitokondriális biogenezis és a mitokondriális szelektív autofágia (mitofágia), melyek a sejtek metabolikus állapotának, külső és belső stresszhatásoknak megfelelően összehangoltan szabályozzák a sejtek mitokondriális tartalmát. A fissziós és fúziós gépezet komponenseit kódoló gének mutációi, a mitokondriális proliferáció és lebontási folyamatok közötti egyensúlyhiány, a mitokondriális minőségellenőrzés deregulációja súlyos betegségek többek között daganatos, neurodegeneratív betegségek és metabolikus szindrómák kialakulását okozzák.

## **1.6. Az autofágia**

Az autofágia egy katabolikus folyamat, mely a károsodott citoplazmatikus komponensek, kóros fehérjeaggregátumok, az öreg vagy sérült organellek lizoszómális lebontása révén elengedhetetlen a sejtek homeosztázisának fenntartásához. Emlős sejtekben az autofágia három fő típusát különböztetjük meg: makroautofágia, mikroautofágia és chaperone-közvetített autofágia. Az autofágia lehet nem szelektív vagy szelektív. A nem szelektív makroautofágia véletlenszerűen bekebelez bármilyen károsodott citoplazmatikus komponenseket. A szelektív autofágia a károsodott organellek specifikus degradációját szolgálja. Az autofágia tápanyaghiány, külső vagy belső stresszhatásokra az intracelluláris komponensek lebontásával és újrahasznosításával egyrészt új építőelemeket generál az anabolikus folyamatokhoz, másrészt energiát biztosít lebontó útvonalak működéséhez, így központi szerepet tölt be a szén- és nitrogénanyagcsere szabályozásában, valamint metabolikus plaszticitást biztosít a sejteknek.

## **1.7. A mitokondriális metabolizmus szabályozása**

A mitokondrium legismertebb szerepe a különböző szubsztrátok (cukrok, aminosavak zsírsavak) oxidációján keresztül az adenosin-trifoszfát (ATP), mint fő energiahordozó előállításában. A légzési lánc öt komplexből áll: az I-es (NADH ubikinon-oxidoreduktáz), a II-es

(szukcinát-ubikinon-oxidoreduktáz), a III-as (ubikinol-citokróom c-reduktáz), a IV-es (citokróom-c-oxidáz) és az V-komplexekből ( $F_0F_1$  ATP-szintetáz). Az elektronok a légzési láncon keresztül az I-es komplextől a IV-es felé áramlanak, melynek során proton pumpálódik a mitokondriális mátrixból az intermembrán térbe. A belső membrán két oldala között kialakult protongradiens hatására a protonok visszaáramlanak az V-ös komplexen keresztül, és a felszabaduló energia segítségével ATP keletkezik ADP-ből és anorganikus foszfátból ( $P_i$ ). A mitokondriális metabolizmust számos fehérje direkt és indirekt módon egyaránt szabályozza, melyek közül a Sirtuin 1 (SIRT1), Ataxia teleangiektázia mutált (ATM), AMP-aktivált protein-kináz (AMPK) és p53 a mitokondriális biogenezist és az oxidatív anyagcserét támogatják, valamint gátolják az anabolikus folyamatok aktiválódását. Számos szubsztátjaiknak mitokondriális transzlokációját indukálják, illetve mitokondriumokkal való asszociációjukról is beszámolnak. A sejtek tápanyagérzékelő rendszerei közül a protein kináz B (AKT) és az mTOR útvonal a sejtek növekedéshez és proliferációjához szükséges anabolikus folyamatokat szabályozzák. Ugyanakkor pozitívan regulálják a mitokondriális biogenezist és az oxidatív anyagcserét. A celluláris  $NAD^+$  készlet szabályozásában kulcsszerepet tölt be a katalitikus aktivitásukhoz  $NAD^+$ -ot használó PARP1, melynek tartós aktivációját általában a mitokondriumok funkcionális romlásával hozzák összefüggésbe többek között Cockayne-szindrómában, Xeroderma Pigmentosumban és Ataxia Teleangiektáziában. Ugyanakkor egyes közlemények beszámolnak arról, hogy egy átmeneti PARP1 aktiváció után a  $NAD^+$  szint gyorsan helyreállhat, és nem következik be mitokondriális diszfunkció, sőt a PARP1-indukált  $NAD^+$ -depléció a metabolikus egyensúlyt az oxidatív foszforiláció irányába tolja el, mely elengedhetetlen a károsodott sejtek túléléséhez. Az egyes metabolikus fehérjék egymás aktivitását pozitív vagy negatív irányban egyaránt képesek befolyásolni, így a mitokondriális energiatermelésre eltérő hatást gyakorolnak.

## 2. CÉLKITŰZÉSEK

Az ultraibolya fény számos biológiai hatással rendelkezik, melyek hozzájárulnak a napfényexpozíciót követő akut és krónikus molekuláris és celluláris változások elindításához. Az akut bőrgyulladás, a keratinocita eredetű daganatmegelőző léziók, bőrdaganatok, az immunszuppresszió és a bőröregeedés kialakulásának hátterében többek között az UVB sugárzás DNS károsító hatása bizonyított. Egyre több irodalmi adat számol be a sejtmag és a mitokondriumok közötti anterográd/retrográd szignalingról, így valószínű, hogy az UVB- okozta akut DNS károsodás a mitokondriumok morfológiai és funkcionális változásait indítja el. Ebben a folyamatban játszhat fontos szerepet a PARP szupercsalád legkarakterizáltabb tagja, a PARP1. Munkánk első felében humán eredetű HaCaT keratinocitákon fiziológiailag is releváns dózisu UVB irradiációt követően vizsgáltuk a PARP1 fehérje szerepét az UVB-indukált DNS repair, mitokondriális biogenezis, mitokondriális morfológia és metabolizmus, valamint az autofágia szabályozásában. Ezenkívül célul tűztük ki az UVB és PARP1 gátlás által kiváltott metabolikus változások hátterében álló útvonalak azonosítását.

Az UVB sugárzás által létrehozott fototermékek közül a legdominánsabban jelenlévő lézió a ciklobután pirimidin dimer. A CPD-k javítását emlős sejtekben az igen komplex, ugyanakkor lassú nukleotid excíziós rendszer végzi. Alacsonyabb rendszertani kategóriákban általánosságban elterjedt egy másik javító mechanizmus is, az úgynevezett fotoreaktiváció, mely a fotoliáz enzim segítségével a fény energiájának felhasználásával javítja rendkívül gyorsan a két pirimidin bázis közötti kovalens kötést. Habár a CPD-k szerepe a sunburn sejtek kialakulásában, a gyulladási folyamatok, a fotoaging és a karcinogenezis elindításában jól karakterizált, keveset tudunk ezeknek a fototermékeknek a szerepéről a mitokondriális funkció és a metabolikus folyamatok szabályozásában. *In vitro* szintetizált N1-metil-pszepseuduridin módosított CPD-specifikus fotoliáz enzimet kódoló mRNS-t keratinocitákba juttatva lehetővé vált az UVB-indukált CPD-függő folyamatok feltérképezése. Munkánk második felében célul tűztük ki a CPD-k, valamint a reaktív oxigén gyökök szerepének vizsgálatát a DNS károsodás, a mitokondriális morfológia és funkció, a lipid csepp biogenezis, az autofágia, a differenciáció és a mitokondriális szubsztrát hasznosítás szabályozásában.

### **3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK**

#### **3.1. Sejtkultúra**

A HaCaT keratinocitákat és CHO-K1 sejteket high-glucose DMEM médiumban tenyésztettük, melyet 10 %-os FBS és 0,5%-os antibiotikum-antimikotikum oldattal egészítettünk ki. A primer keratinocitákat (NHEK) 60  $\mu$ M-os kalcium tartalmú Epilife médiumban tenyésztettük, melyet HKGS koktéllal és 0,5%-os antibiotikum-antimikotikum oldattal egészítettünk ki. A sejteket T75-ös flaskában, 37 °C-on, 5%-os CO<sub>2</sub> tenzió mellett tartottuk fenn.

#### **3.2. UVB irradiáció és sejtkelés**

A sejteket 1x-es tripszin-EDTA oldattal gyűjtöttük be, majd 12, 24 vagy 96 lyukú sejtenyésztő edénybe osztottuk szét. Az UVB besugárzáshoz eltávolítottuk a tápoldatot, 2x mostuk a sejteket előmelegített DPBS-sel, majd 400, 300 vagy 30  $\mu$ l DPBS-ben 20 vagy 40 mJ/cm<sup>2</sup> UVB dózissal sugaraztuk be őket a sejtenyésztő edény nagyságától függően, amelyhez két széles spektrumú UVB csövet (TL-20W/12 RS; Philips, Eindhoven, Hollandia) használtunk. A kontroll sejteket alumínium fóliával takartuk le. Az UVB besugárzást követően a DPBS-t komplett médiumra cseréltük le, majd további 24 órán át inkubátorban tartottuk a sejteket. Az alkalmazott UVB dózis nagyságát minden esetben UVX digitális radiométerrel ellenőriztük.

#### **3.3. CPD-specifikus fotoliáz mRNS transzfekció és fotoreaktiváció**

Az *in vitro* szintetizált CPD-specifikus fotoliáz enzimet kódoló mRNS-t kollaborációs partnerünk Prof. Karikó Katalin és Dr. Boros Gábor (BioNTech RNA pharmaceuticals GmbH, BioNTech AG) állították elő linearizált plazmiddal (pTEV-CPD-PL-A101) a Potorous tridactylus CPD-specifikus fotoliáz enzimjét kódoló génjéből. Az mRNS tisztaságát agaróz gélelektroforézissel ellenőrizték. A keratinociták fotoliáz mRNS transzfekcióját 24 lyukú plate-en 400  $\mu$ L szérum és antibiotikum mentes Epilife médiumban végeztük, melyet 500 ng-nak megfelelő mikroliternyi CPD-specifikus fotoliáz enzimet kódoló mRNS-sel, 1  $\mu$ L Lipofectamine Plus-szal és 2  $\mu$ L Lipofectamine LTX reagenssel egészítettünk ki. A komplexet 2 órán keresztül hagytuk állni a sejteken. Az UVB irradiációt 300  $\mu$ L DPBS-ben végeztük. A fotoreaktivációt ugyanebben az oldatban végeztük két fénycsővel (Sylvania Standard F18W/54-765 Daylight 6500K) 30 percig. A kontroll sejteket ebben az esetben is alumínium fóliával takartuk le. A sejteket komplett DMEM-ben vagy Epilife-ban további 24 órán át tartottuk az inkubátorban.

### **3.4. Géncsendesítés**

A PARP1 fehérjére specifikus On-target plus SMARTpool PARP1 siRNS-t a Dharmacon Research, Inc. cégtől vásároltuk. A kísérlethez nem-specifikus siRNS-t használtunk kontrollként. A sejteket antibiotikum-mentes, 10 %-os FBS tartalmú DMEM-ben tenyésztettük. A DharmaFECT transzfekciós reagens és siRNS mixet 20 percig inkubáltuk, majd a sejtekre mértük 50 nM siRNS végkoncentrációban. 48 óra múlva a sejteket besugaraztuk és komplett DMEM-ben további 24 óráig inkubáltuk őket.

### **3.5. Sejt életképesség**

A sejtek életképességének meghatározását Dead Cell Apoptosis Kit-tel végeztük a gyártó leírása szerint. A festett sejteket áramlási citometriával, FACSCalibur készüléken analizáltuk. Az adatgyűjtéshez és kiértékeléshez CellQuest pro szoftver 5.2 és Flowjo Single Cell Analysis v10.0.7 szoftvert használtunk.

### **3.6. Sejtproliferáció**

A sejtek proliferációját klonogén assay-vel határoztuk meg. A sejteket UVB irradiációt követően 1x-es tripszin-EDTA oldattal gyűjtöttük be, majd 100 mm-es Petri csészébe raktuk szét egyenlő sejt számban ( $5 \times 10^4$  sejt/edény). 10 nappal később a keratinocitákat DPBS-sel mostuk, 100%-os metanollal fixáltuk és May-Grünwald-Giemsa oldattal festettük.

### **3.7. Sejtciklus analízis**

Az egyes sejtciklus fázisok meghatározásához a sejteket tripszinezttük, 10 percig 96%-os jéghideg etanollal fixáltuk, majd szintén 10 percig 0,1%-os Triton X-100 oldattal permeabilizáltuk. A kétszer 1x-es DPBS-sel történő mosás után a sejteket 0,5 mg/mL RNáz tartalmú DPBS oldatban inkubáltuk 1 órán át 37 °C-on. A sejtek DNS tartalmának jelöléséhez propidium jodidot használtunk 20 µg/mL végkoncentrációban. A minták DNS tartalmának meghatározását áramlási citométerrel végeztük.

### **3.8. Hipoxantin-guanin foszforiboziltranszferáz (HPRT) mutációs assay**

A CHO sejteket egy hétig hipoxantin–aminopterin–timidin (HAT) médiumban tartottuk. A sejteket UVB irradiációt követően heti háromszori passzálással további egy héten át komplett DMEM-ben növesztettük, majd  $5 \times 10^4$  sejt számban 100 mm-es Petri csészében 5 µg/mL 6-tioguanin (6-TG) tartalmú szelekciós médiumban további 10 napig növesztettük őket. A sejtek

fixálását, permeabilizálását és festését a sejtproliferációnál leírt klonogén assay-hez hasonlóan végeztük.

### **3.9. CPD-specifikus enzimhez kapcsolt immunszorbens assay (ELISA)**

A keratinocitákból DNS-t izoláltunk Purelink Genomic DNA Mini Kit-tel a gyártó leírását követve. A DNS-t 100 °C-on 10 percig denaturáltuk, majd jégen állni hagytuk 15 percig. Az előzőleg 0.003%-os protamin szulfáttal bevont 96 lyukú plate 1-1 well-jébe 15 ng-nyi DNS került, melyet egy éjszakán át 37 °C-on beszárítottunk. A plate-et háromszor mostuk 0,05%-os Tween-20 tartalmú PBS-sel (PBST), és 2%-os FBS blokkoló pufferben 37 °C-on 30 percig inkubáltuk. Anti-CPD (klón: TDM2) egér ellenes antitesttel 1:1000 hígításban inkubáltuk a mintákat 37 °C-on további 30 percig. A PBST-vel történő mosási lépések után 1:3000 hígításban torma peroxidáz-konjugált egér ellenes IgG másodlagos antitest került a well-ekbe, melyet a 37°C-on 30 percig történő inkubálás után PBST-vel mostunk, majd citrát-foszfát tartalmú ekvilibráló pufferre (51,4 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 24,3 mM citromsav monohidrát, pH 5.0) cseréltünk. A puffert eltávolítottuk, majd 0,0063%-os H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> és 0,04% o-feniléndiamin tartalmú citrát-foszfát szubsztrát oldatot tettünk a mintákra. 30 perc után a színreakciót 2 M-os H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (VWR) oldattal állítottuk le, az abszorbanciát 492 nm-es hullámhosszon ELISA microplate olvasóval határoztuk meg.

### **3.10. Valós idejű kvantitatív PCR**

A totál RNS izolálását guanidín izotiocianát-fenol-kloroformos extrakcióval végeztük. Az RNS minták koncentrációját és tisztaságát NanoDrop spektrofotométerrel ellenőriztük. A mintákból DNáz I kezeléssel eltávolítottuk a genomi DNS szennyeződést. A reverz transzkripciót a gyártó leírásának megfelelően High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit felhasználásával végeztük. A PCR terméket a SYBR green festék fluoreszcencia intenzitásának növekedésével követtük nyomon 384 well optikai plate-en, Lightcycler 480 II típusú készüléken. A génexpressziót  $2^{-\Delta CT}$  módszerrel határoztuk meg. A kapott értékeket a szukcinát dehidrogenáz (SDHA) és a foszfoglicerát kináz (PGK1) háztartási génekre normalizáltuk.

### **3.11. Western blot**

A sejteket 1x-es tripszin-EDTA oldattal begyűjtöttük, majd 4 °C-on, 1500 rpm-en 5 percig tartó centrifugálást követően 1:1000 proteáz inhibitor koktél tartalmú RIPA pufferben jégen lizáltuk. Centrifugálás után a felülúszóból meghatároztuk a minták fehérje tartalmát BCA assay-vel. A lizátumot 5x-ös loading pufferben 10 percen át 100 °C-on forraltuk. A mintákat SDS-

poliakrilamid gélbe vittük fel. A fehérjéket nitrocellulóz membránra blottoltuk át, majd a membránt 5%-os BSA- tartalmazó TBST-ben (0,05% Tween 20-at tartalmazó TBS puffer) blokkoltuk. Az elsődleges antitestet 4 °C-on egy éjszakán át hagytuk a membránokon. A mosási lépéseket követően torma peroxidáz-konjugált egér, illetve nyúl ellenes IgG másodlagos antitesttel inkubáltuk a membránokat szobahőmérsékleten egy órán át. A vizsgálni kívánt fehérjéket a Pierce ECL Western Blotting Substrate vagy SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate előhívó folyadékkal tettük láthatóvá. A sávokat a nyílt forráskódú ImageJ v1.52a szoftverrel denzitometráltuk. Az általunk használt normalizáló fehérje a  $\beta$ -aktin volt.

### **3.12. Elektron mikroszkópia**

A keratinocitákat tripszinezéssel begyűjtöttük, DPBS-sel mostuk, 1500 rpm-en centrifugáltuk, majd a pelletet 3% glutáraldehid és 5% szacharózt tartalmazó 0,1 M-os kakodilát pufferben fixáltuk 2 órán keresztül. Ezután a sejteket ozmifikáltuk 1% ozmium tetroxidban ( $\text{OsO}_4$ ), majd felszálló alkoholsorban dehidratáltuk. Durcupan araldit kezeléssel beágyaztuk a mintákat, majd kapszulázást követően ultravékony metszeteket készítettünk Leica EM UC7 ultramikrotómmal. A standard kontrasztot uranil-acetát és Reynolds-féle ólom citrát oldattal végeztük. A nagy felbontású transzmissziós elektronmikroszkópiás (TEM) képeket Jeol JEM 1010 elektron mikroszkóppal és a hozzá tartozó szoftverrel készítettük.

### **3.13. Konfokális mikroszkópia**

A sejteket üveglemezre növesztettük, majd az alábbi reagensekkel festettük 37 °C-on 30 percig a detektálni kívánt celluláris kompartmentől függően. A mitokondriális hálózat vizualizációjához 100 nM Mitotracker Red CMXRos-t, a lipid cseppek detektálásához 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Bodipy 493/503-t vagy 1 mL DPBS-ben 30  $\mu\text{L}$  Adipored-et használtunk. A mintákat kétszer mostuk DPBS-sel; 3,7%-os paraformaldehid oldattal szobahőn 20 percig fixáltuk, 0,2% Triton X-100 oldattal permeabilizáltuk, 1 órán át 1 %-os BSA oldattal blokkoltuk, majd egy éjszakán át 4 °C-on a primer antitesttel inkubáltuk nedves kamrában. Az autofagoszómákat 1:50 hígításban Alexa Fluor 488-konjugált LC3A/B antitesttel, a Keratin 1 (K1) fehérjét 1:750 hígításban nyúlban termelt Keratin 1 antitesttel tettük láthatóvá. Másnap a mintákat DPBS-sel mostuk, majd a K1 expressziónál Alexa Fluor 488-konjugált nyúl ellenes másodlagos IgG antitesttel inkubáltuk egy órán át szobahőn. DAPI-t tartalmazó mounting médiummal fedtük a mintákat majd 60x-os olajimmerziós objektívval Olympus FV3000 mikroszkóppal képeket készítettünk.

### **3.14. Mitokondriális tömeg mérése**

100 nM Mitotracker Green-nel inkubáltuk a mintákat 37 °C-on 30 percig. A sejteket kétszer mostuk DPBS-sel, tripszinezéssel begyűjtöttük és azonnal jégre helyeztük. A Mitotracker Green intenzitását áramlási citometriával határoztuk meg.

### **3.15. Mitokondriális membránpotenciál vizsgálata**

A mitokondriális membránpotenciál meghatározásához 3,3'-dihexiloxakarbocianin jodidot [DiOC<sub>6</sub>(3)] vagy 100 nM Mitotracker Red CMXRos-t használtunk. A mintákat 37 °C-on 30 percig inkubáltuk a festékekkel. A sejteket kétszer mostuk DPBS-sel, 1x-es tripszin-EDTA oldattal begyűjtöttük és azonnal jégre helyeztük. A Mitotracker Red CMXRos intenzitását áramlási citometriával határoztuk meg.

### **3.16. Reaktív oxigén szabadgyökök (ROS) detektálása**

A reaktív oxigén gyökök meghatározását az előző két módszerhez hasonlóan végeztük. Az itt alkalmazott ROS detektálására alkalmas festéket, a dihidroetidiumot 10 µM végkoncentrációban használtuk és a fluoreszcenciát áramlási citometriával mértük.

### **3.17. Mitokondriális reaktív oxigén szabadgyökök (mtROS) detektálása**

1 µM MitoSOX Red-del inkubáltuk a mintákat 37 °C-on 10 percig. A sejteket kétszer mostuk DPBS-sel, tripszinezéssel begyűjtöttük és azonnal jégre helyeztük. A MitoSOX Red fluoreszcencia intenzitását áramlási citometriával mértük.

### **3.18. Mitokondriális DNS izolálás**

A sejteket tripszinezéssel begyűjtöttük, mostuk DPBS-sel, majd 1500 rpm-en centrifugáltuk. A pelletből a Mitochondrial DNA Isolation Kit-tel a gyártó leírásának megfelelően mitokondriális DNS-t izoláltunk.

### **3.19. Citrát-szintáz (CS) aktivitás vizsgálata**

A sejtek CS aktivitását Citrate Synthase Assay Kit segítségével a gyártó protokollját követve határoztuk meg. Az optikai denzitásbeli (OD) változásokat 412 nm-es hullámhosszon az ELISA mikroplate olvasó kinetikai programjának használatával állapítottuk meg. A kapott OD értékeket a sejtek összfehérje tartalmára normalizáltuk.

### **3.20. Mitokondriális szubsztrát preferencia vizsgálata Seahorse XF Mito Fuel Flex Test Kit-tel**

Egy órával a mérés indítása előtt a sejtekről a komplett DMEM-et 1 mM nátrium-piruvát, 2 mM L-glutamin és 10 mM D-glukóz tartalmú puffermentes, úgynevezett unbuffered DMEM-re cseréltük és CO<sub>2</sub>-mentes inkubátorban egy órán keresztül ekvibráltuk őket. BPTES, Etomoxir és UK-5099 inhibitorokkal mértük a glutamin, a zsírsavak és a piruvát mitokondriális oxidációját az XF96 Extracellular Flux Analyzer készülékkel mért oxigén fogyasztási értékek alapján.

### **3.21. Glikolízis és oxidatív foszforiláció vizsgálata**

Egy órával az assay indítása előtt a sejtekről a komplett DMEM-et 10 mM glukóz tartalmú puffermentes DMEM-re cseréltük és CO<sub>2</sub>-mentes inkubátorban tartottuk őket egy órán keresztül. Négy alpmérés után, oligomicin, FCCP és antimicin A került befecskendezésre. Az oxigénfogyasztási (OCR) értékek az oxidatív foszforilációt, az extracelluláris acidifikációs ráta (ECAR) a glikolízis aktivitását tükrözik. Minden OCR és ECAR értéket a sejtek összfehérje tartalmára normalizáltuk.

### **3.22. Endogén és exogén zsírsav oxidáció meghatározása**

Közvetlen az UVB besugárzást követően a sejteket 23 órán szubsztrát-csökkentett médiumban tartottuk. 45 perccel az assay-t megelőzően a szubsztrát limitált médiumot úgynevezett fatty acid oxidation (FAO) médiumra cseréltük. 135 µL FAO assay médium került minden well-be és a plate-et egy órán át CO<sub>2</sub>-mentes inkubátorban tartottuk. Az endogén és exogén zsírsav oxidáció elkülönítése céljából 30 µL XF Palmitate-BSA FAO Substrate vagy BSA, valamint Vehicle vagy 40 µM Etomoxir került az adott mintákra. A négy alpmérés után, oligomicin, FCCP és antimicin A került befecskendezésre. Minden OCR értéket a sejtek összfehérje tartalmára normalizáltunk.

### **3.23. ATP szint mérés**

A sejteket PBS-sel mostuk és 1500 rpm-en centrifugáltuk. A felülúszó leszívása után a pellet teljes ATP tartalmát az ATP Colorimetric/Fluorometric Assay-vel végeztük a gyártó leírása szerint. A kapott OD értékeket a sejtek totál fehérje tartalmára normalizáltuk.

### **3.24. NAD<sup>+</sup> tartalom meghatározása**

A sejteket PBS-sel mostuk és 1500 rpm-en centrifugáltuk. A keratinociták NAD<sup>+</sup> tartalmának meghatározását NAD/NADH Quantitation Colorimetric Kit-tel végeztük a gyártó leírását követve. A kapott OD adatokat a sejtek összfehérje tartalmára normalizáltuk.

### **3.25. Statisztikai analízis**

A populáció eloszlását Kolmogorov–Smirnov teszttel állapítottuk meg. Amennyiben a populáció nem normál eloszlást mutatott, az értékeket logaritmikusan vagy Box-Cox módszerrel transzformáltuk. Chi<sup>2</sup> vagy Fisher-féle egzakt teszttel határoztuk meg az egyes mitokondriális morfológiai altípusok gyakoriságát. A többféle kezelés közötti szignifikáns eltérések meghatározását ANOVA módszerrel végeztük, melyet Sidak's vagy Dunnett's-féle post-hoc analízissel egészítettünk ki. Minden adatot átlag ± az átlag standard hibájaként (SEM) ábrázoltunk. Az eredményeket  $p < 0.05$  tekintettük szignifikánsnak.

## 4. EREDMÉNYEK ÉS DISSZKUSSZIÓ

Munkánk során az UVB-okozta DNS károsodás és a sejtek megváltozott metabolizmusa közötti kapcsolat feltérképezését tűztük ki célul. Különböző tanulmányokból ismert, hogy a folyamatosan fennálló DNS károsító tényezők, valamint a DNS repair defektusa a sejtek mitokondriális funkcióromlását okozta. Ilyen bioenergetikai romlás figyelhető meg olyan genetikai betegségekben (Ataxia-teleangiectázia, Xeroderma Pigmentosum, Cockayne szindróma), ahol károsodott valamelyik, a DNS hibajavítás szempontjából esszenciális gén. Habár az UV tartomány UVB komponensének szerepe jól karakterizált a DNS károsodás, az apoptózis, a fotoaging, valamint a karcinogenezis szabályozásában, kevés adat áll rendelkezésre, hogy az UVB miként befolyásolhatja a mitokondriumok működését. A mitokondriumom morfológiai és funkcionális változásainak követése kutatási témám központi eleme volt a DNS repair hatékonyságának módosításával. Egy fiziológias folyamat szabályozásának, jelen esetben az UVB stresszválasznak és a mitokondriális szignalizációnak feltárására a leíró jellegű vizsgálat nem mindig alkalmas, ezzel szemben, ha a folyamatot biológiailag releváns behatások modellezésével vizsgáljuk, nagyon értékes információkat nyerhetünk, és jobban megismerhetjük a valós működést. Ehhez olyan kémiai ágenszt (veliparib) használtunk, mely a DNS hibajavításban fontos szerepet játszó PARP1 fehérjét gátolja, és melyet az FDA (Food and Drug Administration) jóváhagyott különböző szolid tumorok kezelésében. A PARP1 fehérje gátlásától tehát az UVB-okozta DNS károsodás fokozódását vártuk. A DNS károsodás csökkentése kutatásunk másik fontos eleme volt. Ehhez olyan *in vitro* szintetizált, a Potorous tridactylus fotoliáz enzimét kódoló mRNS-t juttattunk a sejtekbe, mely fehérjévé transzlálódva az UVB által létrehozott dominánsan jelenlévő ciklobután pirimidin dimer fototermékeket rendkívül gyorsan ki tudja javítani. A fotoliáz overexpressziójára azért volt szükség, mert az enzim eltűnt az evolúció során a méhlepényes emlősökből, így az emberből is. Habár a két vizsgált körülmény természetesen nem egyszerűen egymás ellentettje, ebben a két modellrendszerben a DNS hibajavítás pozitív vagy negatív irányban történő befolyásolásával az UVB-indukált DNS károsodás szerepét tudtuk vizsgálni a mitokondriumok funkcionális állapotának szabályozásában fiziológiailag is releváns sejtípusban és UVB dózist követően.

### 4.1. DNS károsodás

UVB irradiációt követően dóziszfüggő módon a poli(ADP-ribóz) polimer rendkívül gyors akkumulációját figyeltük meg. A PARP szupercsalád tagjai közül a PARP1 fehérje rendelkezik a legjelentősebb poli(ADP-ribóz) polimeráz aktivitással, 85-90%-ban járul hozzá a sejtek teljes

PARilációs szignáljának kialakításához, éppen ezért az UVB-okozta PAR formációban is a PARP1-t tekintjük a legfontosabb mediátornak. Az ABT-888 (veliparib) igen hatékonyan gátolta a PARP1 aktiválódását UVB irradiációt követően is. A PARiláció hiánya a CPD-k eltávolításának hatékonyságát szignifikánsan csökkentette. A NER defektusával egy időben fokozott G<sub>2</sub>/M sejtciklus blokkot tapasztaltunk PARP gátló mellett, mely tipikus példája az akut DNS károsodásnak. Ezeknek az adatoknak a tükrében nem meglepő, hogy a PARP1 gátlása UVB besugárzást követően szignifikánsan csökkentette a sejtek proliferációját és viabilitását. Eredményeink összhangban állnak az irodalmi adatokkal és klinikai tapasztalatokkal, melynek során megfigyelték, hogy különböző PARP inhibitorok (rucaparib, olaparib, stenoparib, niraparib) alkalmazása fotoszenzitív reakciót vált ki. Az UVB-re keletkező domináns fotoléziók, a CPD-k mellett megfigyelhetők az úgynevezett (6-4) fototermékek felhalmozódása is, melyek javítása a CPD-kkel szemben gyorsan megtörténik. Emiatt az UVB-okozta DNS károsodás közvetítésében a CPD-eket tekintjük a legfontosabb lézióknak, a CPD-függő hatások experimentális igazolása azonban mégis nehézkes és kevés irodalmi adat áll rendelkezésre. Az általunk felállított egyedi kísérleti rendszerben ezeket a CPD-függő hatásokat tudtuk vizsgálni a CPD-specifikus fotoliáz overexpressziójával. Amennyiben az enzimet a látható fény energiájával aktiváltuk, rendkívül gyorsan eltávolította a CPD-eket a magi és a mitokondriális genomból egyaránt. Az UVB-indukált sejtciklus blokk, a keratinociták proliferációjának és életképességének csökkenése teljesen gátolható volt a fotoliáz aktivációjával, mely a CPD-k kulcsszerepét hangsúlyozza az UVB-okozta DNS károsodás közvetítésében. Ebben a kísérleti rendszerben tehát a PARP1 gátlástól jelentősen eltérő hatásokat figyeltünk meg az UVB-okozta DNS károsodás kimenetelének szempontjából.

#### **4.2. NAD<sup>+</sup> depléción és a NAD<sup>+</sup>-fogyasztó enzimek aktivációja**

A PARP1 az egyik legkorábban aktiválódó DNS károsodásban szerepet játszó fehérje, mely központi szereppel bír többek között a sejtek NAD<sup>+</sup> készletének szabályozásában. Igen agresszív NAD<sup>+</sup>-fogyasztó, egyes közlemények szerint 50-80%-ban a PARP1 fehérje felelős a sejtek teljes NAD<sup>+</sup> depléciójáért. Nem meglepő tehát, hogy UVB hatására a NAD<sup>+</sup> szint szignifikáns csökkenését tapasztaltuk, még órákkal a lezajlott PARP aktivációt követően is. A PARP gátló alkalmazása robosztus módon emelte a sejtek NAD<sup>+</sup> tartalmát. Hasonló változást tapasztaltunk a fotoliáz aktivációja során, az UVB NAD<sup>+</sup>-depletáló hatása teljesen elmaradt. Meglepő módon, a CPD-k eltávolítása csak részlegesen csökkentette a PARP aktivációt, így felmerül a (6-4) fototermékek PARilációt szabályzó szerepe, illetve egy másik enzimes család, a Sirtuinok, mint potenciális NAD<sup>+</sup>-fogyasztók aktiválódása UVB irradiációt követően. A Sirtuin

család valamennyi tagja (SIRT1-7) UVB hatására CPD-függő módon fokozott expressziót mutatott, mely magyarázatot szolgáltat, miért kerülhető el a CPD-k eltávolítását követően a keratinociták NAD<sup>+</sup>-depléciója csak részlegesen csökkent PARP1 aktivitás mellett is. A Sirtuinok eltérő szubcelluláris lokalizációval számos folyamat, többek között a metabolizmus és a DNS repair szabályozásában vesznek részt. Eredményeink azt mutatják, hogy a PARP1 mellett a SIRT-ek is részt vehetnek a NAD<sup>+</sup> szint szabályozásában UVB irradiációt követően, valamint kölcsönható partnereikkel együtt aktívan segíthetik a DNS károsodás felismerését és a DNS hibajavítás koordinálását.

### **4.3. Mitokondriális fúzió**

A mitokondriumok morfológiája dinamikusan változik endogén és exogén környezeti szignáloknak, valamint a sejtek metabolikus igényeinek megfelelően. A mitokondriumok alakja két egymás ellen ható folyamat, a fúzió és a fisszió arányától függően a kerekded, egymástól jól elszeparált formáktól az egészen elongált, spagetti-szerű, hálózatosan kapcsolódó struktúráig terjedhet. Emellett a sejtek mitokondriális tartalmát a szintézis (mitokondriális biogenezis) és a lebontás (mitofágia) is szigorúan szabályozza, mellyel a mitokondriumok minőségellenőrzése is megtörténik. Eredményeink azt mutatják, hogy az UVB irradiáció, valamint a PARP gátlás hatására emelkedik a mitokondriumok száma, összterülete, tömege, MTCO1 fehérjéjének mennyisége, valamint több, a mitokondriális biogenezist irányító transzkripciós faktor génextpressziós emelkedését is detektáltuk. DNS károsodás hiányában (fotoliáz aktiváció) az UVB-indukált mitokondriális biogenezisre utaló változásokat nem tapasztaltunk. Hasonló emelkedett mitokondriális biogenezist, valamint biogenezishez köthető funkcióváltozást figyeltek meg hidrogén peroxid és etopozid kezelést, ionizáló, valamint UVC sugárzást követően, mely az akut DNS károsodás mitokondriális biogenezist fokozó hatását támasztja alá. A mitokondriális biogenezissel szinkron módon a mitokondriális hálózat fúzióját tapasztaltuk UVB irradiációt követően, mely még prominensebb volt a PARP1 gátlása mellett. Amennyiben a fotoliáz enzimmel eltávolítottuk a CPD-eket, úgy a mitokondriális morfológiai változások is elmaradtak. Irodalmi adatok azt mutatják, hogy a mitokondriális dinamikában bekövetkezett változások a DNS károsodástól és a sejtípustól egyaránt függ. Hasonló mitokondriális fúziót figyeltek meg cikloheximid, aktinomicin D, valamint UVC irradiációt követően, melyet a szakirodalom egy protektív válasz részeként úgynevezett stressz-indukált mitokondriális hiperfúzióként (SIMH) említ. Az UVB-okozta mitokondriális fúziót és biogenezist mi is protektív mechanizmusként értelmezzük. A fúzió elősegíti két vagy több károsodott mitokondrium között a DNS és a metabolitok (ADP, NADH, FADH<sub>2</sub>) cseréjét,

mellyel a keratinociták oxidatív foszforilációjukat fenntartani, DNS károsodásukat pedig enyhíteni próbálják. Ezt támasztja alá, hogy ezek a változások dóziszfüggő módon az UVB-irradiált keratinocitákban voltak megfigyelhetőek. A PARP1 gátlása fokozta, a fotoliáz enzim csökkentette az UVB hatására keletkező CPD szintet, így a mitokondriális fúzió és biogenezis akut DNS károsodástól való függését igazoltuk.

#### **4.4. Celluláris és mitokondriális metabolizmus**

A DNS károsodás több szempontból is szoros összefüggést mutat a mitokondriumok aktivitásával, a sejtek metabolikus állapotával. Számos olyan fehérjét írtak le, melyek a DNS károsodás felismerésében vagy a DNS repair szabályozásában vesznek részt, és direkt vagy indirekt módon celluláris és az egész organizmus szintjén a mitokondriális energiatermelést szabályozzák. Ilyen fehérjék csökkent vagy hibás működését figyelték meg többek között Werner szindrómában (WS), Ataxia Teleangiectáziában (AT), Hutchinson–Gilford progériában (HGPS) és Cockayne szindrómában (CS). Közös tulajdonságuk ezeknek a betegségeknek, hogy valamelyik, a DNS károsodásra adott válaszban szerepet játszó fehérje elégtelen működése miatt alakulnak ki. NER-deficienciát, így fokozott DNS károsodást modellező CSA<sup>-/-</sup>, XPA<sup>-/-</sup> mutáns egerekben UVC irradiációt követően a PARP1, az AMPK és a NAD<sup>+</sup> központi szerepét figyelték meg a DNS károsodás okozta mitokondriális változások közvetítésében. Az UVC-okozta akut DNS károsodáshoz hasonlóan mitokondriális membránhiperpolarizációt, a glikolízis, a citrátkör, az oxidatív foszforiláció, valamint a zsírsav oxidáció emelkedését detektáltuk UVB irradiációt követően. Western blottal, valamint az adott fehérje gátlásával igazoltuk az ATM, AMPK, p53, AKT és mTOR útvonalak aktiválódását az OXPHOS, valamint a CPT1A, HADHA, ACADM fehérjék szerepét a béta oxidáció szabályozásában. Az általunk tapasztalt változások jelentős részét a PARP1 gátlása fokozta, a CPD-k eltávolítása pedig szignifikánsan csökkentette, mely az UVB-okozta DNS károsodás mitokondriális metabolizmust moduláló szerepét bizonyítja. Habár a krónikusan fennálló DNS károsodás vagy a DNS repairben bekövetkezett defektus az energia homeosztázis csökkenéséhez, permanens mitokondriális diszfunkcióhoz vezet, az akut, tolerálható DNS károsodás a mitokondriumok metabolizmusának fokozódását eredményezi, mely a nukleotid excíziós repair energiaigényét fedezi. Számos a NER-ben kulcsszerepet betöltő fehérje a DNS károsodás felismeréséhez és a DNS lézióhoz való kötődéséhez ATP-t igényel. Ily módon az UVB-okozta mitokondriális funkcióemelkedés a sejtek szempontjából egy adaptív, anti-apoptotikus válasz része. Erre utal, hogy a mitokondriális biogenezis vagy az oxidatív foszforilációban szerepet játszó fehérjék gátlása a sejtek életképességének a csökkenését okozta

UVB irradiációt követően. Ezek az adatok azt mutatják, hogy az ATM/ATR, az AMPK, a p53, az AKT és az mTOR szignalizációs útvonalak CPD-függő aktiválódása fokozhatják a nukleotid excíziós repair hatékonyságát. Habár a fokozott mitokondriális metabolizmussal összhangban UVB irradiációt követően CPD-függő módon emelkedett a sejtek piruvát, zsírsav és glutamin oxidációtól való függése, ezt az emelkedett szubsztrát preferenciát nem követte a rendelkezésre álló teljes készlet növekedése, vagyis a keratinociták nem tudnak hatékonyan váltani alternatív energiaforrásként a három metabolikus szubsztrát között UVB irradiációt követően. Ezek a változások teljesen elmaradtak a CPD-k eltávolítását követően. Ez arra utal, hogy az UVB- okozta DNS károsodás kijavításához mindhárom szubsztrátra szükség van. Ezt támasztja alá, hogy a glutamát esszenciális aminosavként nélkülözhetetlen a nukleotid bioszintézishez, így a DNS hibajavításhoz. Tanulmányok arról is beszámolnak, hogy a zsírsav szintézis a PARP1 fehérjén keresztül, a béta oxidáció, valamint az oxidatív foszforiláció redukáló ekvivalensek biztosításával segítik a DNS repair-t. Végül megfigyelték, hogy a piruvát szupplementáció csökkenti a DNS károsodást; a piruvát metabolizmusban részt vevő piruvát kináz 2 (PKM2) magi transzlokációja pedig elősegíti a homológ rekombináció stimulálása révén DNS léziók kijavítását H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> és UVB irradiációt követően. Összességében tehát az akut DNS károsodás szubsztrát preferenciát moduláló hatását, valamint mitokondriális aktivitást fokozó szerepét igazoltuk, melyek reciprok módon képesek visszahatni és elősegíteni a DNS hibajavítást.

#### **4.5. Autofágia és lipofágia**

Jól ismert a DNS károsodás autofágiát indukáló hatása, melynek során a károsodott sejtalkotók, makromolekulák lizozómákban történő lebontásával és újrahasznosításával a sejtek bioenergetikai igényüket fedezik. UVB irradiációt követően a CPD szint növekedésével párhuzamosan az LC3<sup>+</sup> vezikulumok (autofagoszómák) számában is emelkedését tapasztaltunk. A PARP1 gátlása fokozta, a fotoliáz fotoreaktivációja megszüntette az UVB-indukált autofágiát, mely a CPD-k autofágiát szabályozó szerepére utal. Irodalmi adatok arról is beszámolnak, hogy az autofágia pozitív szerepet tölt be a globál genom NER elindításában, vagyis a CPD-k az autofágia indukcióján keresztül saját maguk javítást is elősegítik. A mitokondriumok szelektív degradációjára szolgáló mitofágia csak minimális emelkedést mutatott UVB besugárzás után, mely azzal magyarázható, hogy mitokondriális fúziót és membránhiperpolarizációt detektáltunk UVB irradiációt követően, vagyis nem következett be mitokondriális funkcióromlás, ami a szignált biztosítja a PINK1 és PARKIN fehérjék számára a mitofágia elindításához. Meglepő módon az autofágia indukciójával párhuzamosan, CPD-függő módon a lipid cseppek számában is emelkedést tapasztaltunk. Habár a DNS károsodás-

okozta lipid csepp biogenezis szerepe kevésbé ismert, az autofagoszóma-lipid csepp kolokalizációt figyelembe véve úgy gondoljuk, hogy a lipid cseppek autofágiával történő degradációja (lipofágia) szabad zsírsavakat szolgáltat a mitokondriális béta oxidációhoz. Emellett az intracelluláris membránnal körülvett organellek újrahasznosítása során felszabaduló szabad zsírsavtartalom lipid vezikulumokba csomagolódik, amennyiben a mitokondriális béta oxidációban nem kerül felhasználásra. A sejtek megnövekedett szubsztrát igényüket, fokozott mitokondriális aktivitásukat a károsodott szubcelluláris elemek autofágia útján történő újrahasznosításával is tudják fedezni. Ezt támasztja alá, hogy az ATM, AMPK, p53, PI3K1 és mTOR útvonalak gátlása az általános autofágia markerként használt LC3A/B valamint a mitofágia-specifikus PARKIN fehérje kifejeződését csökkentette, vagyis az autofágia/mitofágia hiánya a mitokondriális minőség-ellenőrzés romlását, szubsztráthiány miatt a mitokondriumok aktivitásának csökkenését okozta. Az autofágia mitokondriális metabolizmust fokozó szerepét támasztja alá emellett, hogy amennyiben klorokvinnal - mely közismert oxidatív metabolizmust csökkentő hatással rendelkezik - gátoltuk az autofagoszóma és a lizoszóma fúzióját, szignifikánsan növekedett a lipid cseppek és az autofagoszóma száma, mely a zsírsavak csökkent mitokondriális transzportjára utal. Mindazonáltal figyelembe kell vennünk, hogy az autofágia is energiaigényes folyamat, melynek fenntartásához megfelelő ATP szint szükséges, így az autofágia-OXPHOS reciprok regulációját sem zárhatjuk ki. Meglepő módon a mitokondriumok és a lipid cseppek között nem tapasztaltunk kolokalizációt, mely arra utal, hogy a lipid cseppekből a citoplazmatikus lipázok hatására felszabaduló szabad zsírsavak mitokondriumokba való direkt transzportja zajlik, ami jóval hatékonyabb a lipid csepp-mitokondrium közvetlen kapcsolathoz képest. Ezek alapján elmondható, hogy az UVB-indukált autofágia kulcsfontosságú a sejtek mitokondriális aktivitásának szabályozásában. Emellett a lipid cseppek pufferrendszerként működve központi szerepet töltenek be a mitokondriális metabolizmus szabályozásában, amikből a különböző stresszhatásokra felszabaduló zsírsavak a mitokondriumokba transzlokálódva energiát biztosítanak a béta oxidációhoz.

#### **4.6. Keratinocita differenciáció**

A keratinociták differenciációja a programozott sejthalál egyik speciális formája, melynek során az extracelluláris magas  $Ca^{2+}$ -gradiens elősegíti a differenciáció specifikus markerek, így a keratinok (KRT), filaggrin (FLG), lorikrin (LOR) és az involukrin (INV) megjelenését. A keratinociták differenciációja során a lipid cseppek felhalmozódása figyelhető meg, mely a bőr homeosztázisának, barrier funkciójának fenntartását szolgálja. A differenciációban

bekövetkezett zavarok többek között az atópiás dermatitisz kialakulását iniciálhatja, illetve a pszoriázis patomechanizmusában is szerepet játszik. UVB irradiációt követően CPD-függő módon a K1, mint korai differenciációs marker expressziójának a növekedését tapasztaltuk. Bizonyítottuk a K1 és a lipid cseppek parallel módon mitokondriális aktivitástól függő regulációját. Minden olyan inhibitor, mely a mitokondriumok fokozott oxidatív foszforilációja, valamint szubsztráthasznosítása ellen hat párhuzamosan csökkenti a lipid cseppek mennyiségét és a K1 fehérje kifejeződését. Eredményeink összhangban állnak a szakirodalmi publikációkkal, melyekben bizonyították, hogy a magas  $Ca^{2+}$  koncentráció a PI3K1/AKT, valamint az mTOR útvonalakon keresztül a keratinociták differenciációját segíti elő. Emellett a mitokondriumok  $Ca^{2+}$  felvétele a piruvát-, izocitrát-, és az oxoglutarát dehidrogenáz enzimek (citrátkör) aktiválásával - így a mitokondriumok energiatermelését fokozva - elősegíti a keratinociták differenciációját. Az UVB besugárzás hatására tapasztalt lipid metabolizmusban bekövetkezett változások szintén a keratinociták differenciációjára hatnak. Korábban már igazolták a foszfatidilglicerol (PG) és a diacilglicerol (DAG) differenciációt indukáló szerepét. Habár az UVB-indukált keratinocita differenciáció szerepe egyelőre vitatott, irodalmi adatokkal összhangban úgy gondoljuk, hogy az UVB által kiváltott adaptív válasz részeként a sejtek túlélését, a szöveti homeosztázis és integritás fenntartását szolgálja.

#### **4.7. Reaktív oxigén gyökök**

A reaktív oxigén szabadgyökök központi szerepet játszanak a sejtek élettani folyamatainak szabályozásában. A peroxiszmák fokozott működése, különböző oxidázok aktivitása, átmeneti fémionok, az endoplazmatikus retikulumban zajló protein folding, valamint a timidin és poliaminok metabolizmusa mind hozzájárul a szabadgyökök képződéséhez. Mindazonáltal a legjelentősebb ROS forrásnak fokozott oxidatív foszforilációjuk révén a mitokondriumokat tekintik. 24 órával az UVB irradiációt követően a sejtek teljes és mitokondriális ROS termelésének az emelkedését detektáltuk, mely meglepő módon a fotoliáz enzim aktivációjával a gyökfogókhoz hasonlóan gátolható volt. A specifikus mitokondriális gyöktermelést gátló MitoTEMPO az általános ROS scavengerekhez hasonlóan szignifikánsan csökkentette a CPD-függő útvonalak aktiválódását. Így többek között csökkent a sejtek glikolízise, oxidatív foszforilációja, mitokondriális és lipid csepp biogenezeise, az autofágia, valamint a keratinociták differenciációja, mely arra utal, hogy a mitokondriális ROS-nak igen jelentős szerepe van ezeknek a változásoknak a közvetítésében UVB irradiációt követően. Habár egyes közlemények beszámolnak az antioxidánsok CPD képződést csökkentő hatásáról, mi ilyen jellegű változást egyik gyökfogó esetében sem tudtunk kimutatni. Ezeket az eredményeket

figyelembe véve úgy gondoljuk, hogy a CPD-k a mitokondriumok aktivitását fokozva másodlagos mitokondriális gyöktermeléshez vezetnek, mely több mitokondriális és extramitokondriális útvonalat képes szabályozni ROS-függő módon.

#### **4.8. Mutagenezis**

A PARP inhibitor, veliparib mellett egy fokozott fotoszenzitív válasz volt megfigyelhető UVB irradációt követően, mégis meglepő módon a PARiláció hiánya az UVB-indukált mutációs ráta jelentős csökkenését okozta, melynek magyarázatára a PARP1 fehérje számos DNS hibajavítási útvonalat (NER, BER, HR stb.) szabályzó mechanizmusa miatt egyértelmű választ nem tudunk adni. Mindazonáltal ez az eredmény összhangban áll a klinikai tapasztalatokkal, vagyis fokozott karcinogenezisre való hajlamot a veliparib hosszútávú alkalmazása során sem figyeltek meg. A mitokondriumok szerepe a karcinogenezis elindításában nem egyértelmű. A konvencionális nézet régebben az volt, hogy a rákos sejtekben a mtDNS kópiaszámának csökkenése, megváltozott szekvenciája, a mitokondriumok funkciójának romlása figyelhető meg, mely a sejtek energiatermelését az anaerob glikolízis felé tolja el. Egyre több közlemény azonban a fokozott mitokondriális biogenezist és aktivitást potenciális mutagenezist közvetítő szignálként írja le, melynek során az emelkedett mitokondriális aktivitást mutató rákos sejtek rezisztensebbek a pro-apoptotikus szignálokkal, így a kemoterápiás szerekkel szemben. A megnövekedett UVB-indukált mutációs ráta a fotoliáz enzim fotoreaktivációjával gátolható volt, mely a CPD-k kulcsszerepére utal a karcinogenezis elindításában. Az autofágia, valamint egyes szubsztrátok mitokondriális transzportjának gátlása a CPD-k eltávolításához hasonlóan jelentősen csökkentette az UVB-indukált mutagenezist. Az autofágia indukciója, valamint a piruvát, zsírsavak és a glutamin mitokondriális oxidációja CPD-függést mutatott korábbi kísérleteinkben, ezért valószínűsíthető, hogy a mitokondriális aktivitás növekedése, a károsodott celluláris elemek újrahasonosítása építőköveket biztosít a sejtek túléléséhez. Ezek az adatok arra utalnak, hogy habár a fokozott mitokondriális aktivitás az oxidatív foszforiláció, a zsírsavak béta oxidációja, valamint a glutaminolízis indukcióján keresztül támogatja a DNS repair, az autofágiával koordináltan elősegíthetik a potenciálisan mutációt hordozó sejtek túlélését is. Ezek az útvonalak tehát terápiás célpontként is relevánsak lehetnek az UVB-indukált mutagenezisben.

## 5. ÖSSZEFOGLALÁS

Munkánk során igazoltuk UVB-indukált akut DNS károsodás és a mitokondriumok megváltozott morfológiája, valamint metabolizmusa közötti kapcsolatot. A PARP1 fehérje gátlása a DNS károsodás fokozásával növelte, a fotoliáz enzim fotoreaktivációja a CPD léziók eltávolításán keresztül gátolta az UVB-indukált mitokondriális biogenezist, fúziót és metabolizmust. A megnövekedett oxidatív foszforilációval és zsírsav oxidációval párhuzamosan, a piruvát, a zsírsavak, valamint a glutamin, mint fő mitokondriális szubsztrátok CPD-függő hasznosítását írtuk le UVB után. Azonosítottuk a CPD-függő ATM, AMPK, p53, PI3K1/AKT és mTOR útvonalak aktivációjának a szerepét az autofágia, a lipid csepp biogenezis, a keratinocita differenciáció és mitokondriumok aktivitásának szabályozásában. Igazultuk az autofágia és a mitokondriumok közötti aktív szignalingot, melyben az autofágia indukciója a mitokondriális oxidatív foszforilációt szabályozhatja. Leírtuk, hogy a sejtek emelkedett mitokondriális aktivitása elősegíti az UVB-irradiált keratinociták túlélését. Az autofágia egyik speciális formájának, az úgynevezett lipofágiának az aktiválódását és annak mitokondriális metabolizmust szabályzó szerepét mutattuk ki UVB besugárzás után. Az UVB-indukált lipid csepp biogenezissel párhuzamosan fokozott keratinocita differenciációt tapasztaltunk, melyek erőteljes függést mutatnak a sejtek mitokondriális aktivitásától. Igazoltuk az UVB celluláris NAD<sup>+</sup>-depletáló hatását, melynek háttérében a PARP1 aktivációja és a Sirtuinok fokozott expressziója áll. Beszámoltunk több olyan mitokondriális útvonal aktiválódásáról, melyek a DNS hibák javítását támogatják, ugyanakkor elősegíthetik a mutációt hordozó sejtek túlélését is. Végül igazoltuk, hogy több mitokondriális és extramitokondriális változás közvetítésében kiemelt szerepe van a CPDk-nek, valamint a CPD-indukált másodlagos mitokondriális ROS termelésnek. Az UVB-vel kapcsolatos eddigi publikációkban nagyrészt a DNS károsodásra és karcinogenezisre fókuszáltak, és figyelmen kívül hagyták a metabolikus változásokat, olyan potenciális eseményeket, melyek az UVB hosszútávú hatásainak megjelenéséhez vezethetnek. Ráadásul a sejtmag és a mitokondriumok közötti jelátviteli útvonalak aktiválódása teljesen feltérképezetlen terület maradt a fotobiológiában. Eredményeink azonban a DNS repair hatékonyságának módosításával új megvilágításba helyezik a fiziológiailag releváns dózisú UVB irradiációt követő akut DNS károsodás, azon belül is a CPD-k szerepét a mitokondriumok működésének szabályozásában. Az ilyen egyedi jellegű módszertani megközelítéssel eredményeink újszerűek a fotobiológiában: a fotoliáz enzim bőrbe való bejuttatása, antioxidánsok alkalmazása, egyes metabolikus útvonalak gátlása terápiás potenciállal rendelkezhet az UVB-okozta hatások kivédésében.

## 6. PUBLIKÁCIÓS LISTA



**DEBRECENI  
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM  
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

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

Nyilvántartási szám: DEENK/69/2021.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Hegedűs Csaba  
Doktori Iskola: Egészségtudományok Doktori Iskola

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Hegedűs, C.**, Juhász, T., Fidrus, E., Janka, E. A., Juhász, G., Boros, G., Paragh, G. J., Uray, K., Emri, G., Remenyik, É., Bai, P.: Cyclobutane pyrimidine dimers from UVB exposure induce a hypermetabolic state in keratinocytes via mitochondrial oxidative stress. *Redox Biol.* 38, 1-17, 2021.  
IF: 9.986 (2019)
2. **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: 6.126 (2019)

### További közlemények

3. Fidrus, E., **Hegedűs, C.**, Janka, E. A., Paragh, G., Emri, G., Remenyik, É.: Inhibitors of Nucleotide Excision Repair Decrease UVB-Induced Mutagenesis - an In Vitro Study. *Int. J. Mol. Sci.* 22 (4), 1638-, 2021.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms22041638>  
IF: 4.556 (2019)
4. Fidrus, E., Ujhelyi, Z., Fehér, P., **Hegedűs, C.**, Janka, E. A., Paragh, G. J., Vasas, G., **Bácskay, I.**, Remenyik, É.: Silymarin: friend or foe of UV exposed keratinocytes? *Molecules*. 24 (9), 1-12, 2019.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules24091652>  
IF: 3.267





5. Emri, G., Paragh, G. J., Tószaki, Á., Janka, E. A., Kollár, S., **Hegedűs, C.**, Gellén, E., Horkay, I., Koncz, G., Remenyik, É.: Ultraviolet radiation-mediated development of cutaneous melanoma: an update.  
*J. Photochem. Photobiol. B-Biol.* 185, 169-175, 2018.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.06.005>  
IF: 4.067
6. Gellén, E., Szima, G. Z., Rácz, A., Szödényi, A., **Hegedűs, C.**, Horkay, I.: Multiplex actinicus keratosisok kezelése.  
*Bőrgyógyász. Venerol. Szle.* 93 (3), 94-101, 2017.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.7188/bvsz.2017.93.3.2>
7. Boros, G., Karikó, K., Muramatsu, H., Mikó, E., Emri, E., **Hegedűs, C.**, Emri, G., Remenyik, É.: Transfection of Human Keratinocytes with Nucleoside-Modified mRNA Encoding CPD-Photolyase to Repair DNA Damage.  
In: Synthetic mRNA. Ed.: Rhoads, Robert E, Springer Science and Business Media, New York, 219-228, 2016.
8. Emri, E., Mikó, E., Bai, P., Boros, G., Nagy, G., Rózsa, D., Juhász, T., **Hegedűs, C.**, Horkay, I., Remenyik, É., Emri, G.: Effects of non-toxic zinc exposure on human epidermal keratinocytes.  
*Metallomics.* 7 (3), 499-507, 2015.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1039/C4MT00287C>  
IF: 3.54
9. Emri, G., Emri, E., Beke, L., Boros, G., **Hegedűs, C.**, Janka, E. A., Gellén, E., Méhes, G., Remenyik, É.: Immunohistochemical detection of metallothionein.  
*J. Metal. Nanotech.* 3, 33-42, 2015.
10. Emri, G., Emri, E., Boros, G., **Hegedűs, C.**, Janka, E. A., Gellén, E., Remenyik, É.: Skin carcinogenesis: the pathogenetic and therapeutic role of zinc.  
*J. Metal. Nanotech.* 2, 19-26, 2015.

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 31,542**

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapján szolgáló közleményekre):  
16,112**

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, 2021.03.01.



## 7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném megköszönni témavezetőmnek Dr. Remenyik Éva Professzornőnek a PhD munkám finanszírozását, szakmai támogatását és kutatói pályám egyengetését.

Hálával adózom Dr. Emri Gabriella tanárnőnek a publikációk és a disszertáció megírása során nyújtott segítségéért és támogatásáért.

Külön köszönettel tartozom az Orvosi Vegytani Intézetből Dr. Bay Péter Professor Úrnak, akihez mindig fordulhattam szakmai kérdésekkel, kiemelkedő szerep volt a publikációk megírásában, a kísérlettervezésben, a koncepció felállításában, és aki lehetővé tette számomra a metabolikus vizsgálatok elvégzését.

Köszönöm Dr. Karikó Katalin Professzornőnek és Dr. Boros Gábornak, hogy nagylelkűen rendelkezésünkre bocsájtották az *in vitro* szintetizált fotoliáz mRNS-t.

Hálás vagyok az Anatómiai Intézetből Dr. Juhász Tamás Adjunktus Úrnak, Kis Nikoletta Grétának és Dr. Antal Miklós Professor Úrnak a konfokális és elektronmikroszkópiás képek elkészítésért.

Szeretném kifejezni hálámat kollégáimnak, Dr. Janka Eszternek, Dr. Miskeiné Dr. Kapitány Anikónak, Dr. Dajnoki Zsoltnak, Fidrus Eszternek, Toka-Farkas Tündének, Dr. Kovács Dórának és a Bőrgyógyászati Tanszék többi munkatársának, akikhez mindig fordulhattam szakmai és baráti tanácsokért egyaránt.

Hálával tartozom családomnak és barátaimnak támogatásukért és türelmükért.

Munkámat támogatta a TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0031 és a Magyar Nemzeti Kutatási Alap (NKFIH K105872, NKFIH K120206). A disszertáció elkészítését a GINOP-2.3.2-15-2016-00005 számú projekt támogatta. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Regionális Fejlesztési Alap társfinanszírozásával valósult meg.