

**EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS**

**Hegedűs Csaba**

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

**DEBRECENI EGYETEM**

**EGÉSZSÉGTUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA**

**Debrecen, 2021**

**EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS**

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

**Hegedűs Csaba**

**Témavezető: Dr. Remenyik Éva**



**DEBRECENI EGYETEM**

**EGÉSZSÉGTUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA**

**Debrecen, 2021**

# 1. TARTALOMJEGYZÉK

1. Tartalomjegyzék .....	2
2. Rövidítések jegyzéke .....	5
3. Bevezetés .....	11
4. Irodalmi áttekintés .....	12
4.1. Az UV sugárzás .....	12
4.2. Az UVB-indukált fototermekek javítása .....	14
Nukleotid excíziós repair (NER). .....	14
Fotoreaktiváció. ....	15
4.3. A reaktív oxigén gyökök (ROS) szerepe .....	17
4.4. A mitokondriális dinamika és minőségellenőrzés .....	18
4.5. Az autofágia.....	20
4.6. A mitokondriális metabolizmus szabályozása.....	22
ATM.....	23
AMPK. ....	23
p53.....	24
PI3K1/AKT/mTOR útvonal.....	24
A PARP1-NAD-SIRT1 tengely. ....	25
5. Célkitűzések.....	28
6. Anyagok és módszerek .....	29
6.1. Sejtkultúra.....	29
6.2. UVB irradiáció és sejtkelés.....	29
6.3. CPD-specifikus fotoliáz mRNS transzfekció és fotoreaktiváció.....	30
6.4. Géncsendesítés.....	31
6.5. Sejtviabilitás .....	32
6.6. Sejtproliferáció .....	32
6.7. Sejtciklus analízis .....	32
6.8. Hipoxantin-guanin foszforiboziltranszferáz (HPRT) mutációs assay .....	32
6.9. CPD-specifikus enzimhez kapcsolt immunsorbens assay (ELISA) .....	33
6.10. Valós idejű kvantitatív RT-PCR.....	33
6.11. Western blot.....	34
6.12. Elektron mikroszkópia.....	36
6.13. Konfokális mikroszkópia.....	36

6.14. Mitokondriális tömeg mérése .....	37
6.15. Mitokondriális membránpotenciál vizsgálata.....	37
6.16. Reaktív oxigén szabadgyökök (ROS) detektálása.....	37
6.17. Mitokondriális reaktív oxigén szabadgyökök (mtROS) detektálása .....	37
6.18. Mitokondriális DNS izolálás .....	38
6.19. Citrát-szintáz (CS) aktivitás vizsgálata.....	38
6.20. Mitokondriális szubsztrát preferencia vizsgálata Seahorse XF Mito Fuel Flex Test Kit-tel.....	38
6.21. Glikolízis és oxidatív foszforiláció vizsgálata.....	39
6.22. Endogén és exogén zsírsav oxidáció meghatározása .....	40
6.23. ATP szint mérés.....	40
6.24. NAD <sup>+</sup> tartalom meghatározása .....	40
6.25. Statisztikai analízis .....	41
7. Eredmények .....	42
7.1. A Poli(ADP-ribóz) polimeráz 1 (PARP1) gátlása fokozza az UVB-indukált DNS károsodást .....	42
7.2. A PARP1 gátlása fokozza az UVB-okozta mitokondriális biogenezist.....	44
7.3. A PARP1 gátlása fokozza az UVB-indukált mitokondriális fúziót .....	46
7.4. A PARP1 gátlása fokozza az UVB-okozta mitokondriális metabolizmust.....	49
7.5. Az anti-apoptotikus hatású oxidatív foszforiláció ATM, AMPK, p53, PI3K1 és mTOR-függő módon szabályozódik UVB után.....	52
7.6. Az UVB-indukált autofágia ATM, AMPK, p53, PI3K1 és mTOR-függő módon szabályozódik .....	54
7.7. A PARP1 csendesítése hasonló fenotípusbeli változásokat okoz, mint az ABT-888 kezelés .....	56
7.8. A fotoliáz aktivációja gátolja az UVB-okozta DNS károsodást és visszaállítja a sejtek életképességét.....	58
7.9. A CPD-k eltávolítása megakadályozza az UVB hatására indukálódó NAD <sup>+</sup> -fogyasztó enzimek aktivációját .....	60
7.10. Az UVB-indukált mitokondriális fúzió CPD-függő módon szabályozódik.....	62
7.11. A CPD-k eliminációja csökkenti az UVB-okozta mitokondriális hipermetabolizmust .....	64
7.12. A fotoliáz enzim fotoreaktivációja gátolja az OXPHOS aktivitását szabályzó enzimek foszforilációját UVB irradiáció után .....	66
7.13. A CPD-k módosítják a keratinociták szubsztrát oxidációs profilját.....	68
7.14. Az UVB lipofágiát indukál CPD-függő módon .....	71
7.15. Az UVB besugárzásra keletkező lipid cseppek nem mutatnak kolokalizációt a mitokondriumokkal .....	73

7.16. A CPD-vezérelt útvonalak ROS-függő módon szabályozódnak.....	74
7.17. A keratinocita differenciáció és a lipid cseppek felhalmozódása CPD-, ROS-, és mitokondriális aktivitás függően változik .....	76
7.18. A mitokondriális aktivitás CPD- és autofágia-függő módon központi szerepet játszik az UVB-indukált karcinogenezis elindításában.....	79
7.19. Az UVB-okozta CPD- és ROS-függő hatások keratinocita-specifikusak.....	80
8. Megbeszélés.....	83
9. Összefoglalás .....	93
10. Summary .....	94
11. Referenciák.....	95
12. Tárgyszavak .....	112
13. Keywords .....	112
14. Köszönetnyilvánítás .....	113
15. Publikációs lista.....	114
16. Függelék.....	116

## 2. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

2-DG	2-deoxi-D-glükóz
6-TG	6-tioguanin
8-HDF	8-hidroxi-7,8-didemetil-deazariboflavin
8-OH-dG	7,8-dihidro-8-oxoguanin
ABCA1/2	ATP-kötő kazetta, A alcsalád 1/2
ACADM	acil-CoA dehidrogenáz
ACC1/2	acetyl-CoA-karboxiláz 1/2
Ac-CoA	acetyl-koenzim A
ACLY	ATP-citrát liáz
ADP	adenozin-difoszfát
AhR	aryl-hidrokarbon receptor
AIF	apoptózis indukáló faktor
AK	aktinikus keratózis
AKT	protein kináz B
ALC1	kromodomén-helikáz-DNS-kötő fehérje 1-szerű
ALDOA	aldoláz A
AMPK	AMP-aktivált protein kináz
ANOVA	egyszempontos varianciánálizissel
AT	Ataxia Teleangiectázia
Atg9	autofágia-rokon fehérje 9
ATGL	adipocita triglicerid lipáz
ATM	ataxia teleangiectázia mutált
ATP	adenozin-trifoszfát
BCA	bikininilin–dikarbonsav assay
BCC	bazálsejtes karcinóma
BER	bázis excíziós repair
BRCA1/2	breast cancer type 2 susceptibility protein 1/2
BSA	borjú szérum albumin
CaCl <sub>2</sub>	kalcium-klorid
CAV	kaveolin 1
CEL	karboxil-észter lipáz

CHO-K1	kínai hörcsög ovárium sejtvonal
CMA	chaperone-közvetített autofágia
COFS	cerebro-okulo-facioskeletal szindróma
CPD	ciklobután pirimidin dimer
CPT1	karnitin palmitoil-transzferáz 1
CQ	klorokvin
CREB	cAMP válaszadó elem-kötő fehérje
CROT	peroxisomális karnitin O-oktanoiltranszferáz
CRY	kriptokróm
CS	Cockayne szindróma
CSA/B	Cockayne szindróma A/B
DDB1/2	DNS károsodás-kötő fehérje 2
DiOC <sub>6</sub> (3)	3,3'-dihexiloxakarbocianin jodid
DMEM	Dulbecco's modified eagle media
DPBS	foszfátpufferelt sóoldat
Drp1	dinamin-kapcsolt protein 1
ECAR	extracelluláris acidifikációs ráta
EGF	epidermális növekedési faktor
EGFR	epidermális növekedési faktor receptor
ELISA	enzimhez kapcsolt immunszorbens assay
ERCC1	excision repair cross-complementation group 1
ERK1/2	extracelluláris szignál által regulált kináz 1/2
ERR $\alpha/\beta/\gamma$	ösztrogén receptor $\alpha/\beta/\gamma$
FAD	flavin-adenin-dinukleotid
FAO	béta oxidáció
FBS	fötális borjú szérum
FDXR	ferredoxin reduktáz
FGF	fibroblaszt növekedési faktor
Fis1	mitokondriális fissziós fehérje 1
FLG	filaggrin
FOXO1	forkhead box fehérje O1
FRET	fluoreszcencia rezonancia energiatranszfer
GAMT	guanidinoacetát-metiltranszferáz

GAPDH	glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz
GG-NER	globál genom nukleotid excíziós repair
GLS	glutamináz
GLUT1/4/12	glükóztranszporter 1/4/12
GSH	L-glutation
GSSG	glutation-diszulfid
GYS1/2	glikogén-szintáz 1/2
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	kénsav
HADHA	hidroxiacil-CoA dehidrogenáz
HAT	hipoxantin–aminopterin–timidin
HEPES	2-[4-(2-Hidroxietyl)-1-piperazinil]-etánszulfonsav
HGPS	Hutchinson–Gilford progéria
HIF1 $\alpha$	hipoxia indukálta faktor 1
HK1/2	hexokináz 1/2
HMGCLL1	3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA liáz
HMGCR	3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reduktáz
HPRT	hipoxantin-guanin foszforiboziltranszferáz
HR	homológ rekombináció
HSC70	hősokkfehérje 70
IGF	inzulinszerű növekedési faktor
IGF1R	inzulinszerű növekedési faktor-1 receptor
IgG	immunglobulin G
IL-1 $\beta$ /6	interleukin-1 $\beta$ /6
INV	involukrin
JNK	c-Jun N-terminális kináz
K1	keratin 1
KGFR	keratinocita növekedési faktor
KRT	keratin
LAMP2	lizoszóma-kapcsolt membránprotein 2
LC3A/B	mikrotubulus-asszociált könnyű lánc fehérje 3 A/B
LD	lipid csepp
LDHA	laktát dehidrogenáz A
LKB1	liver kinase B1

LOR	lorikrin
LPIN1	lipin 1
MCD	malonil-CoA-dekarboxiláz
Mff	mitokondriális fissziós faktor
Mfn1/2	mitofuzin 1/2
MgCl <sub>2</sub>	magnézium-klorid
Mid49/51	mitochondrial dynamics protein of 49 kDa/51 kDa
Miro	mitokondriális Ró GTPáz
MMP-1/3/9	mátrix metalloproteináz-1/3/9
MPC	mitokondriális piruvát karrier
Mre11	meiotikus rekombinációs 11 homológ
MTCO1	mitokondriális citokróm C oxidáz I
mtDNS	mitokondriális DNS
MTHF	metiltetrahidrofolát
mtHSP60/70	mitokondriális hősokkfehérje 60/70
mTOR	mammalian target of rapamycin
mtROS	mitokondriális reaktív oxigén szabadgyök
NAC	N-acetil-L-cisztein
NAD	nikotinamid-adenin-dinukleotid
NADP	nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	nátrium-hidrogén-foszfát
NER	nukleotid excíziós repair
NF-κB	nukleáris faktor-κB
NHEK	normál humán epidermális keratinocita
NPC1L1	Niemann-Pick C1-szerű 1
NRF1/2	magi respirációs faktor 1/2
OCR	oxigénfogyasztási ráta
OPA1	optikus atrófia 1
OsO <sub>4</sub>	ozmium tetroxid
OXPHOS	oxidatív foszforiláció
p38	p38 mitogén-aktivált protein kináz
p53	tumor protein p53
p62	szekvesztoszóma-1

P70S6K1	p70 riboszómális S6 kináz
PAR	poli(ADP-ribóz) polimer
PARKIN	Parkinson juvenile disease protein 2
PARP1/2	poli(ADP-ribóz) polimeráz 1/2
PBST	Tween-20 tartalmú foszfátpufferelt sóoldat
PCNA	proliferációs sejt nukleáris antigén
PDGFR	vérlemezke eredetű növekedési faktor receptor
PDHA1	piruvát dehidrogenáz A1
PDHK1	piruvát dehidrogenáz kináz izoenzim 1
PDT	fotodinámiás terápia
PFK2	foszfofruktokináz-2
PGC-1 $\alpha/\beta$	peroxiszóma proliferátor aktivált receptor gamma koaktivátor-1 $\alpha/\beta$
PGK1	foszfoglicerát kináz 1
PGM1	foszfoglüko-mutáz
PHR	fotoreaktiváció
PI	propídium-jodid
PI3K1	foszfatidilinozitol 3-kináz 1
PIKK	foszfatidilinozitol 3-kináz-rokon kináz
PINK1	PTEN-indukálta putatív kináz 1
PLTP	foszfolipid transzfer fehérje
PPAR $\alpha/\beta/\gamma/\delta$	peroxiszóma proliferátor aktivált receptor $\alpha/\beta/\gamma/\delta$
PPP	pentóz-foszfát út
RAD51	DNS rekombinációs/repair protein Rad51
RFC	replikációs faktor C
ROS	reaktív oxigén szabadgyök
RPA	replikációs protein A
SCC	laphámsejtes karcinóma
SCO2	synthesis of cytochrome C oxidase 2
SDHA	szukcinát dehidrogenáz A alegység
SDS	nátrium-dodecil-szulfát
SEM	átlag standard hibája
SHH	sonic hedgehog
SIMH	stressz-indukált mitokondriális hiperfúzió

SIRT	sirtuin
SREBP1	szterol szabályozó elemet kötő fehérje 1
TBST	Tween-20 tartalmú trisz-pufferelt sóoldat
TCA	citrát ciklus
TC-NER	transzkripció-kapcsolt nukleotid excíziós repair
TFAM	mitokondriális transzkripció faktor A
TIM23	translocase of inner mitochondrial membrane 23
TNF- $\alpha$	tumor nekrosis faktor $\alpha$
TOM20	translocase of outer mitochondrial membrane 20
TTD	Trichotiodisztrófia
VDAC1	feszültségfüggő anion csatorna 1
WS	Werner szindróma
XP	Xeroderma Pigmentosum
XPA/B/C/D/E/F/G	Xeroderma Pigmentosum, complementation group A/B/C/D/E/F/G
YY1	Yin Yang 1

### 3. BEVEZETÉS

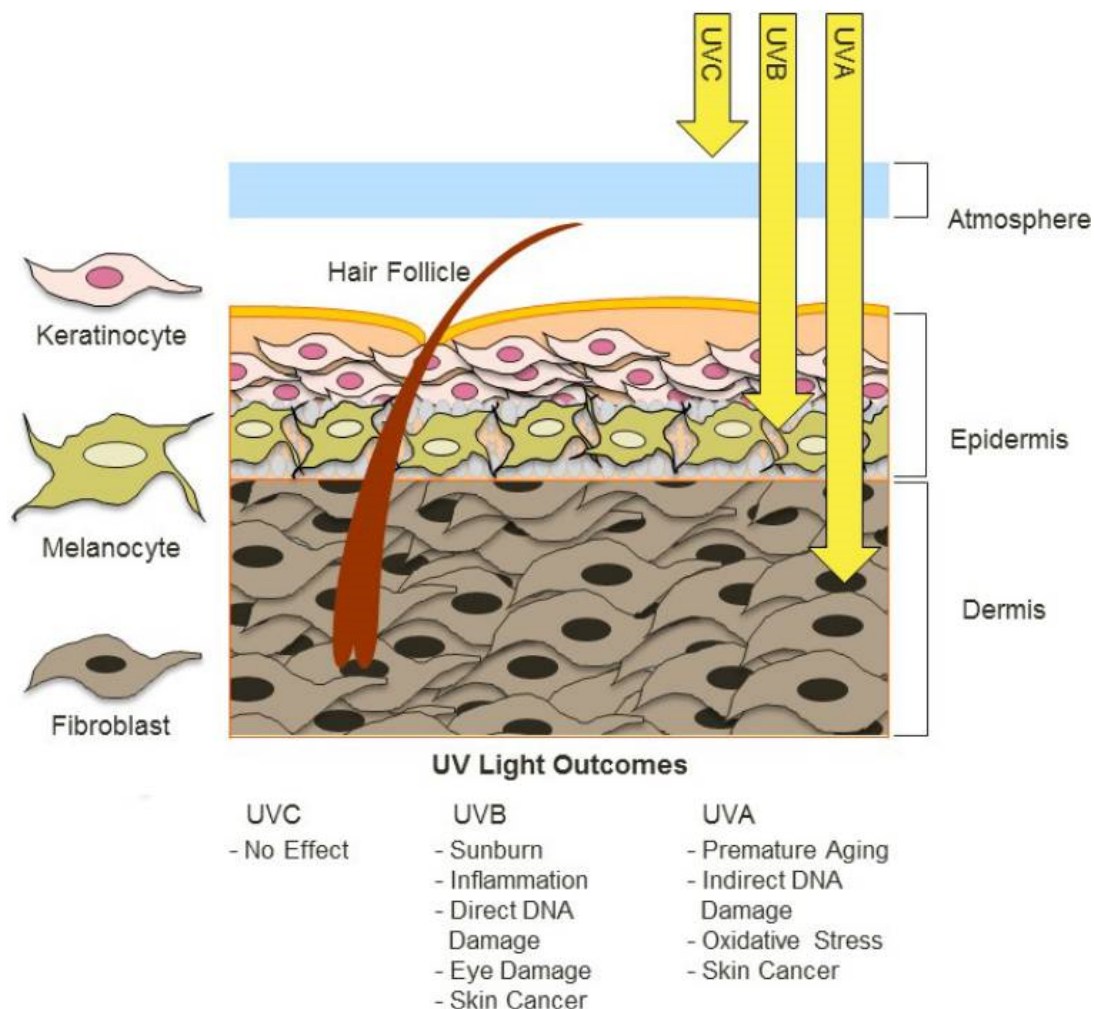
A Föld felszínét elérő UV tartományból az UVB rendelkezik a legnagyobb DNS károsító hatással, mely alapvetően befolyásolja bőrünk sejtélettani folyamatait. A DNS károsodásra adott válasz magában foglalja olyan szignalizációs útvonalak aktiválódását, mely többek között a DNS hibajavítást, a redox homeosztázist, a károsodott celluláris komponensek lebontását, a metabolikus változásokat és a mitokondriumok működését szabályozzák. Habár az UVB szerepe az apoptózis, a gyulladás és a karcinogenezis elindításában jól karakterizált, keveset tudunk a sejtek metabolizmusára, valamint mitokondriális aktivitására kifejtett hatásáról. Emellett az akut DNS károsodás és a mitokondriumok funkcionális állapota közötti, úgynevezett anterográd szignaling is feltérképezetlen terület maradt a fotobiológiában. Az UVB-indukált DNS károsodás közvetítésében kiemelt szerepe van a ciklobután pirimidin dimereknek (CPD), melyek az UVB sugárzás hatására keletkező domináns fotoléziók. Javításukat emlős sejtekben a komplex, ugyanakkor lassú nukleotid excíziós repair (NER) végzi, mely több mint 30 fehérje összehangolt működését igényli. Alacsonyabb rendszertani osztályokban általánosságban megfigyelhető egy sokkal hatékonyabb javító mechanizmus, a fotoreaktiváció, mely mindössze egyetlen fehérje, a fotoliáz enzim segítségével javítja rendkívül gyorsan a CPD-ket, ugyanakkor ez a repair útvonal eltűnt az evolúció során a méhlepényes emlősökből. Az UVB-okozta mitokondriális változások közvetítésében szintén fontos szerepet játszhat a DNS károsodásra legkorábban aktiválódó poli(ADP-ribóz) polimeráz 1 fehérje (PARP1), mely a DNS repair és a genomintegritás fenntartása mellett számos direkt és indirekt mechanizmus révén szabályozza a mitokondriumok működését. Kísérleteink megvalósításához HaCaT keratinocitákat használtunk, melyet munkánk első felében a kemoterápiás szerként is használt PARP1 inhibitorral, a veliparibbal kezeltünk. Irodalmi adatok alapján a PARP1 gátlástól az UVB-indukált DNS károsodás emelkedését vártuk. Ezzel szemben a CPD-specifikus fotoliáz enzimet kódoló mRNS transzfekcióval a CPD-függő hatásokat, valamint a DNS károsodás csökkenését vártuk UVB irradiációt követően. E két modellrendszerben tehát a DNS károsodás mértékének ellentétes irányú befolyásolásával tudtuk vizsgálni a sejtmag és a mitokondriumok között megvalósuló, a sejtek metabolikus állapotát és mitokondriális működését szabályzó celluláris folyamatokat.

## 4. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

### 4.1. Az UV sugárzás

Testünk legnagyobb szerve, a bőr gyakran ki van téve környezeti ártalmaknak, így az UV sugárzás káros hatásainak is. 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) [1, 2]. Az UV sugárzás biológiai hatása nagyban függ a sugárzás energiatartalmától, hullámhosszától, valamint a szövetek abszorpciós tulajdonságaitól. A legkisebb hullámhosszúságú, éppen ezért legnagyobb energiájú UVC sugárzást az ózonréteg teljes mértékben kiszűri, így bőrünket nem éri el [3]. 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, így a keratinocitákra, a fibroblasztokra és a melanocitákra egyaránt hatással van [2]. 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 [4]. 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) fototermekek, valamint utóbbiak fotoizomerizációjával kialakuló Dewar izomerek megjelenését okozza [5]. A leggyakrabban előforduló UVC és UVB-okozta lézió a T<math>\diamond</math>T, T<math>\diamond</math>C kötések, emellett ritkábban megfigyelhető a T(6-4)C; C<math>\diamond</math>T, C<math>\diamond</math>C, T(6-4)T bázisok közötti kovalens keresztkötések kialakulása [5-7]. Az UVA sugárzás főleg reaktív oxigén gyökök (ROS) indukcióján keresztül oxidatív károsodást okoz, mely lipid peroxidációhoz, protein oxidációhoz, gyulladással kapcsolatos citokinek felszabadulásához, egyszálú DNS törések és 7,8-dihidro-8-oxoguanin (8-OH-dG) léziók kialakulásához vezet [5, 8, 9]. Természetesen az egyes UV spektrumok biológiai hatásai közötti átmenet folytonos, így az UVB is rendelkezik ROS induktor hatással, valamint az UVA is képes kisebb mértékben UVB-re jellemző fototermekek létrehozására. Az UV sugárzás rendkívül sokféle biológiai hatást képes kiváltani. Az akut hatások közé tartozik a D vitamin szintézis [10], az apoptotikus keratinociták (sunburn sejtek) [11], a metabolikus változások [12] megjelenése, melyek klinikailag eritéma [13], esetenként hólyagképződés, majd hiperpigmentáció [14, 15], gyulladás [16], és hiperalgézia [17] formájában jelennek meg. Napok múlva hiperkeratózis [18], epidermális hiperplázia [18] jön létre. Az immunszuppresszió [19] mind akut, mind krónikus esetben kialakul. Hosszú távú hatásnak tekintjük a bőröregedést [20] és a karcinogenezist [21]. 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 [2]. Ennek ellenére az UV spektrum legtöbb biológiai hatásának közvetítéséért mégis az UVB-t tartják felelősnek. Ez többek között azzal magyarázható, hogy UVA csak kis mértékben okoz direkt DNS károsodást [CPD és (6-4) fototermékek], valamint az UVA által generált (6-4) fototermékeket és oxidatív DNS léziókat a nukleotid excíziós repair (NER) és a bázis excíziós repair (BER) nagy hatékonysággal, pár óra alatt javítja [22, 23]. Ezzel szemben az UVB-indukált CPD-k teljes eltávolításához 48 óra szükséges [23, 24]. Az ilyen ki nem javított léziók C>T és CC>TT tranzícióhoz, UVB-re jellemző szignatúra mutációk megjelenéséhez vezet [25]. Ilyen mutációk figyelhetők meg keratinocita eredetű bőrdaganatokban [bazálsejtes karcinómában (BCC) és laphámsejtes karcinómában (SCC)], valamint hámdaganat-megelőző léziókban (szoláris keratózis) és krónikus fénykárosodott bőrben [25]. Az UVB-okozta fototermékek eltávolítása, a DNS hibajavító útvonalak megfelelő működése tehát esszenciális a genomi integritás megőrzése és a bőrdaganatok kialakulásának megelőzése szempontjából.

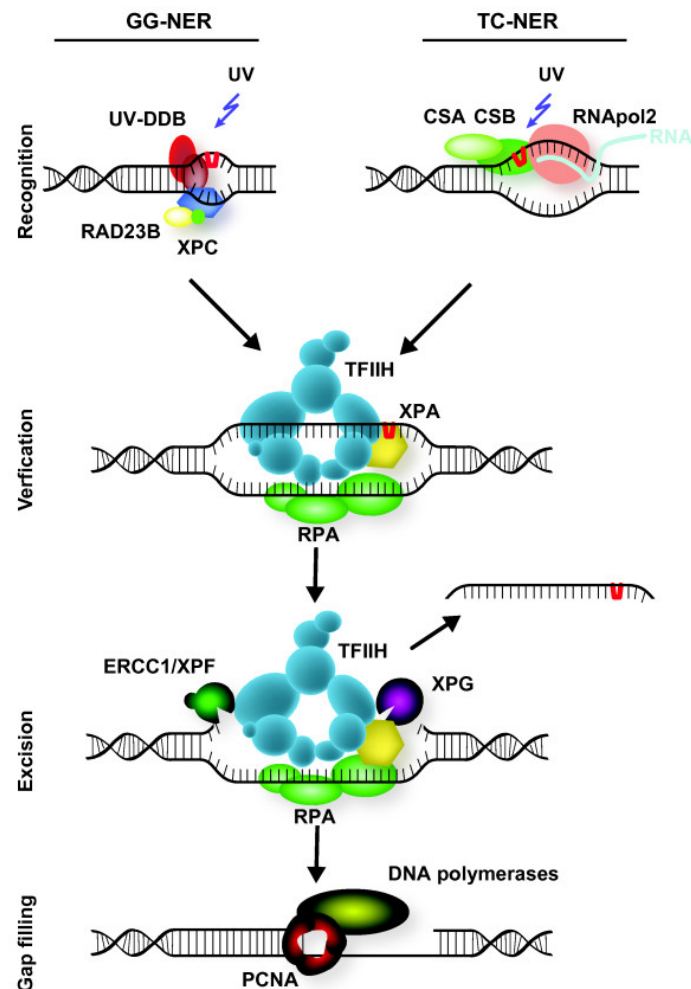


1. ábra. Az UV sugárzás hatásai (Alexandra Amaro-Ortiz et al. Molecules, 2014) [26]

## 4.2. Az UVB-indukált fototermékek javítása

**Nukleotid excíziós repair (NER).** Az UVB-okozta fototermékek eltávolítását prokariótákban és eukariótákban az igen komplex, több mint 30 fehérjéből álló, ugyanakkor lassú nukleotid excíziós rendszer végzi. A NER az UVB-re specifikus fototermékek mellett a benzo[a]pirén diol epoxid, a különböző aromás aminok, nitrozaminok, bizonyos oxidatív endogén léziók (ciklopurinok) vagy kemoterápiás kezelés hatására megjelenő DNS termékek javítását is végzi, így valószínű, hogy NER elindulását olyan DNS módosulások idézik elő, melyek termodinamikailag destabilizálják a DNS duplexet [27-30]. A NER működését és szabályzását több közleményben is igen jól összefoglalták [30, 31]. 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, mely ubikvitinálással poszttranszlációsán módosítja és a károsodás helyére irányítja az XPC-Rad23 fehérje komplexet. Ezzel szemben a TC-NER számára az indító szignál a károsodás helyén megakadó RNS polimeráz II jelenti, mely további hibajavító fehérjék (CSA, CSB) kötődését eredményezi, így a TC-NER az aktívan átíró 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, az XPB és XPD DNS helikázokat tartalmazó TFIIH transzkripció faktor az XPC fehérjéhez kötődik, és a helikázok szétnyitják a DNS-t a lézió körül. Ezt követi a DNS károsodás megerősítése után az incízió, azaz a léziót tartalmazó DNS-lánc bemetszése, melynek során XPA, RPA és XPG fehérjék kötődnek a DNS-hez. Az RPA fehérje stabilizálja az egyszálú DNS-t és elősegíti az ERCC1-XPF és XPG endonukleázok károsodott szakaszhoz való kötődését és a léziót tartalmazó kb. 24-32 nukleotidnyi szakasz eltávolítását. Az így kialakuló rést a sejtek proliferációs státuszától függően DNS polimerázok (PCNA, az RFC, a DNS Polimeráz  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\kappa$ ) töltik ki az ERCC1-XPF által létrehozott a 3'-OH csoportot primerként felhasználva, majd a láncvégeket a DNS ligáz 1 vagy az XRCC1-DNS ligáz 3 egyesíti. A NER működését szabályzó fehérjék genetikai defektusai ritka, ugyanakkor igen súlyos betegségek kialakulását okozza. A GG-NER-ben érintett XPC és XPE gének mutációja a Xeroderma Pigmentosum (XP) betegséget okozza, mely csak enyhe fényérzékenységgel jár, ugyanakkor ezerszer nagyobb a tumorok kialakulásának valószínűsége [32]. A központi NER-ben szerepet játszó XP fehérjék, pl. XPA defektusai már komolyabb tüneteket okoznak, mivel egyaránt érinti a GG-, és a TC-NER-t is. Ezt a fajta Xeroderma Pigmentosum-ot De Sanctis-Cacchione szindrómaként is említik, melyben az extrém fényérzékenység mellett neurodegeneratív

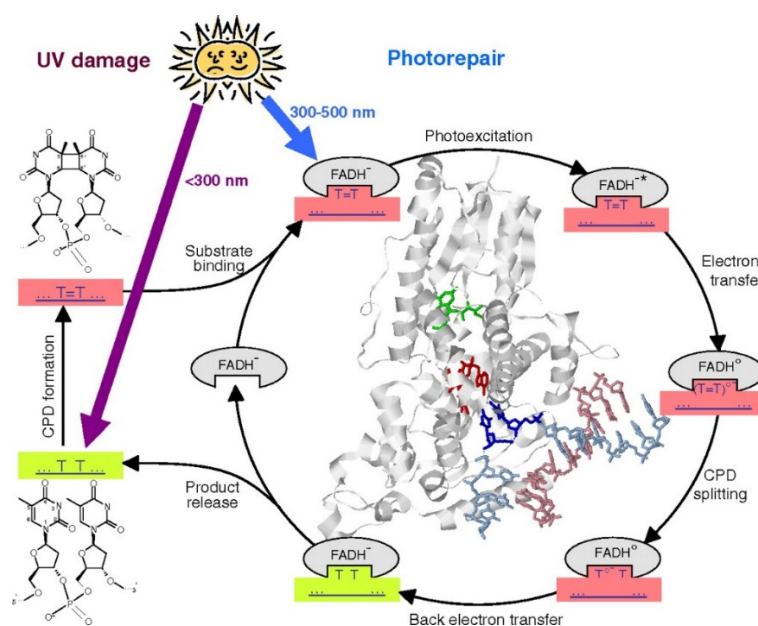
tünetek is megfigyelhetők [32]. A TC-NER működésének hibája többszervi elégtelenséget, fejlődési rendellenességet, úgynevezett progeroid szindrómák kialakulását okozza. Ide tartozik a súlyos, leggyakrabban a CSB gén mutációja miatt kialakuló neurodegeneratív Cockayne szindróma és a még súlyosabb cerebro-okulo-facioskeletal szindróma (COFS) [32]. A TFIIH transzkripció faktor XPD, XPB vagy TTDA alegységében bekövetkezett mutáció a trichotiodisztrófia nevű betegséget okozza, mely klinikai tekintetben pár egyedi tünetet leszámítva a Cockayne szindrómához hasonlít [32].



2. ábra. A nukleotid excíziós repair (Lans et al. *Epigenetics & Chromatin* 2012) [33]

**Fotoreaktiváció.** A méhlepényes emlősök kivételével szinte az élővilágban megfigyelhető a NER mellett egy másik javító mechanizmus is, az úgynevezett fotoreaktiváció az UVB-ozta fototermékek eltávolítására. A fotoreaktivációt a DNS fotoliázok katalizálják, melyeket szubsztrátspecifitásuk alapján CPD-specifikus, ill. (6-4) fototermék-specifikus fotoliázoknak nevezünk [34]. 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-didemetil-deazariboflavint (8-HDF) ritkábban pedig pterint tartalmaz [34, 35]. 300–500 nm fényexpozíciót követően a fénygyűjtő antennák által abszorbeált energia FRET mechanizmussal a redukált FADH-nak adódik át. A gerjesztett FADH<sup>\*</sup> egy elektront továbbít a CPD-nek, melynek hatására a két bázist összekötő kovalens kötés felszakad. Végül az elektron visszakerül FADH<sup>o</sup>-ra, mellyel az aktív FADH<sup>\*</sup> regenerálódik, tehát összességében egy ciklikus elektrontranszfer játszódik le [34, 36, 37]. A (6-4) fototermékek eltávolítása is hasonlóan történik, itt azonban a fotoliáz első körben a (6-4) lézióból egy oxetán intermediert hoz létre, mely szerkezetileg a ciklobután gyűrűhöz hasonlít [38, 39]. A kereskedelmi forgalomban többféle fotoliáz fehérjét tartalmazó készítmény kapható [40]. Ezek közül az Eryfotona AK-NMSC készítménnyel kapcsolatban van a legtöbb klinikai adat, mely az *Aspergillus nidulans*ból származó fotoliáz fehérjét tartalmazza. Az Eryfotona-val kezelt csoportban csökkent az eritéma, a hámlás, és a pigmentáció [41]. A krémmel végzett kezelést követően az aktinikus keratózisban (AK) szenvedő betegek 50%-ánál beszámoltak az epidermális atypia megszűnéséről, valamint csökkent Ki67 és PCNA pozitivitásról [41]. A készítmény 12 hónapos alkalmazása során megfigyelték az AK-ok, a bazál- és a laphámsejtes karcinómák 65, 56 és 100%-os csökkenését Xeroderma Pigmentosumban szenvedő betegeknél [42]. Emellett az Eryfotona más napvédő krémmel szemben javította a klinikai eredményeket fotodinámiás terápiát (PDT) követően [43]. Habár a fotoliázok eltűntek a méhlepényes emlősejtből az evolúció során, a velük nagyfokú szekvencia hasonlóságot mutató a kék fényt érzékelő receptor gének, a kriptokrómok (CRY) emberben is megtalálhatóak, azonban itt nem a DNS hibajavításában, hanem a cirkadián ritmust szabályozzák [44, 45].

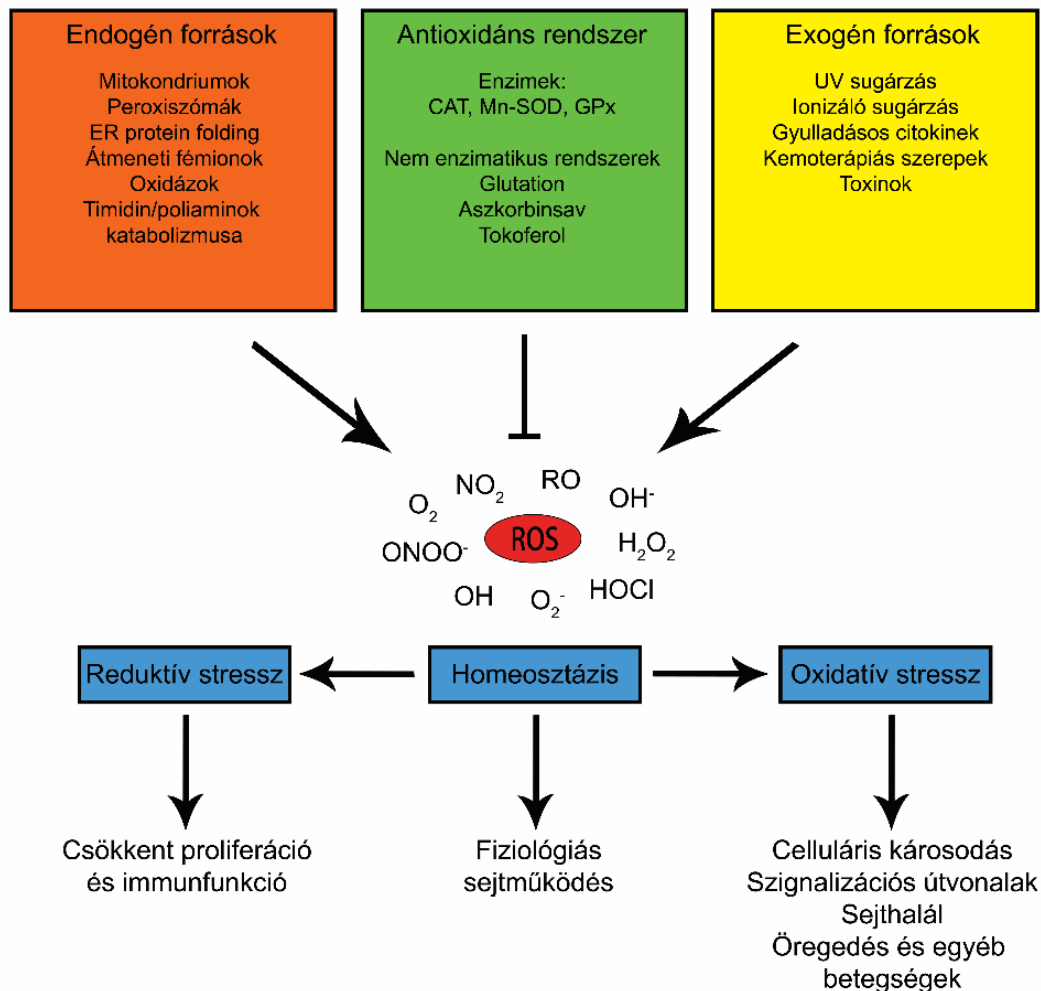


3. ábra. A fotoreaktiváció (Viruthachalam Thiagarajan et al. PNAS, 2011) [37]

### 4.3. A reaktív oxigén gyökök (ROS) szerepe

A reaktív oxigén szabadgyökök a sejtek fiziológiás működésének melléktermékei. Számos szubcelluláris kompartmentben keletkezhetnek különböző enzimek aktivitásának köszönhetően, így a mitokondriumok és peroxisómák fokozott működése, a különböző oxidázok aktivitása, átmeneti fémionok, az endoplazmatikus retikulumban zajló protein folding, a timidin és poliaminok metabolizmusa mind hozzájárulnak a szabadgyökök képződéséhez [46]. Ugyanakkor az exogén környezeti hatások, így többek között az UV sugárzás is jelentős ROS-termelő tényező [47, 48]. A szabadgyök megnevezés egy általános gyűjtőnév, mely magában foglalja a szuperoxid, a hidroxil, a peroxil, az alkoxil, a hidroperoxil gyököket és a nem gyökszármazékokat (hidrogén peroxid, hipoklórossav, ózon, szinglet oxigén, peroxinitrit) is [49]. Utóbbiakat nagy reaktivitásuk miatt soroljuk a szabadgyökökhöz. Mivel a szabadgyökök másodlagos messengerként fontos szerepet játszanak számos szignalizációs útvonal, így a sejtproliferáció, keratinocita differenciáció, a dermális angiogenezis, a sebgyógyulás, az apoptózis, az autofágia, a gyulladás, az öregedés, valamint a repair szabályozásában, ezért a sejtek a pro- és antioxidáns egyensúly fenntartására törekednek [50-52]. Az epidermisz számos kromofórral (purin és pirimidin bázisok a nukleinsavakban, fehérjék aromás aminosavai, urokánsav, melanin, kinonok, flavinok, 7-dehidrokoleszterol, porfirinek stb.) rendelkezik [53, 54], melyek az UV által abszorbeált energiát biomolekuláknak (lipidek, fehérjék, nukleinsavak) vagy közvetlenül a molekuláris oxigénnek átadva szabadgyökök kialakulását okozza. A bőr többféle, az antioxidáns védelemben fontos szerepet játszó enzimet (kataláz, szuperoxid dizmutáz, glutation peroxidáz), valamint antioxidánst (aszorbinsav,  $\alpha$ -tokoferol, glutation, karotinoidok) tartalmaz, melyek nélkülözhetetlenek a ROS káros hatásainak kivédésében [51]. Ha az antioxidáns védelem hiánya és/vagy a túlzott mértékű ROS termelés miatt az egyensúly megbomlik, oxidatív stressz jön létre. Megfigyelték, hogy az UVB hatására keletkező szabadgyökök növekedési faktorok, citokin receptorok (EGFR, KGFR, PDGFR, AhR, IGF1R) transzkripció faktorok (NF- $\kappa$ B, NRF2) gyulladásos citokinek (IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ), mátrix metalloproteázok (MMP-1, -3 és -9), a sonic hedgehog (SHH), MAP kinázok (p38, ERK1/2, JNK) és a NADPH oxidázok aktivációján keresztül a keratinociták apoptózisát, a bőr gyulladását, öregedését, barrier funkciójának károsodását és malignus transzformációját okozza [46, 51, 55-59]. Ugyanakkor a redukáló ekvivalensek szintjének emelkedése (GSH/GSSG és/vagy NAD/NADH<sup>+</sup> többlet) vagy az antioxidáns rendszerek túlzott mértékű aktivációja kimerítheti a sejtek szabadgyök poolját és úgynevezett anti-oxidatív vagy redukzív stressz jön létre [60]. A redukzív stressz paradox módon feedback

regulációval az oxidatív stresszhez hasonló fenotípusbeli változásokat hozhat létre gátolva a sejtek normális működését [60]. Éppen ezért fontos a sejtek ROS pool-jának fiziológias szinten tartása.



4. ábra. A reaktív oxigén gyökök (T. Finkel és N. J. Holbrook, Nature, 2000 alapján módosítva) [61]

#### 4.4. A mitokondriális dinamika és minőségellenőrzés

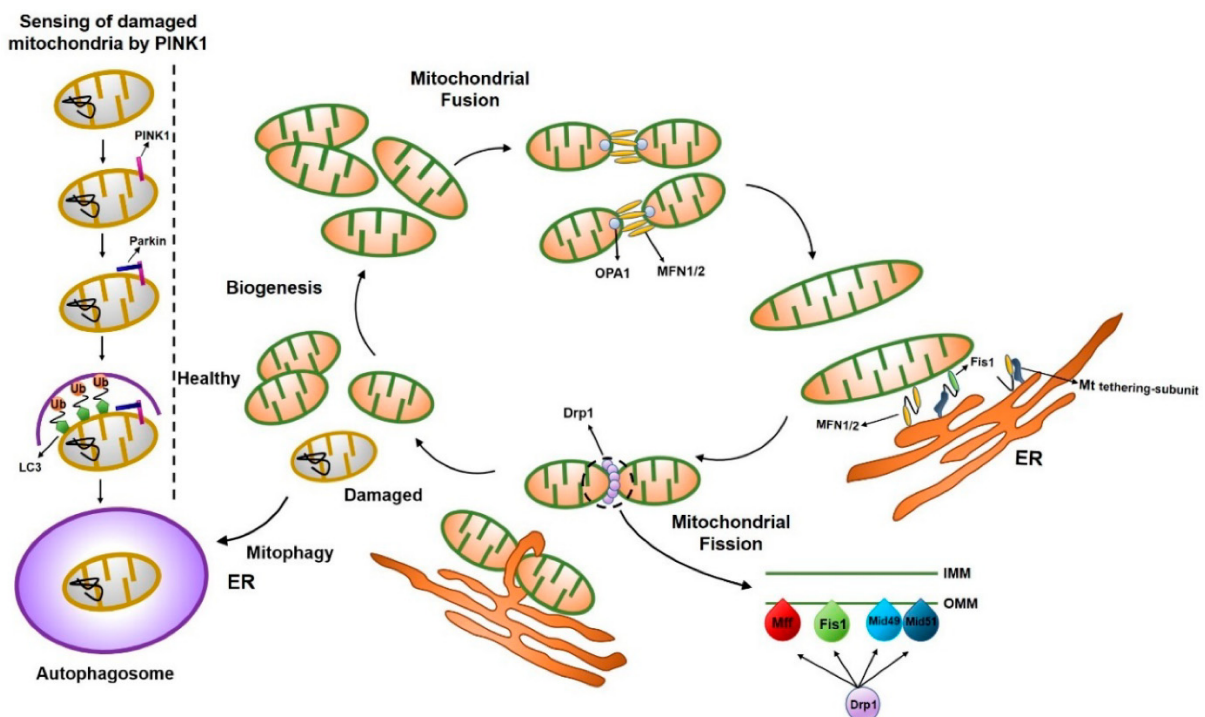
A mitokondriumok rendkívül dinamikus organellek, melyek formájuk és méretük szabályozásának érdekében koordinált hasadási és fúziós eseményeken mennek keresztül, melyeket összefoglalóan „mitokondriális dinamikának” nevezünk. A mitokondriális dinamikában bekövetkezett változások a mitokondriumok működésének optimális fenntartását, a tápanyag-ellátottság szabályozását, valamint a sejt metabolikus szükségletéhez való finomhangolását szolgálják [62, 63]. Az adaptív mitokondriális dinamika elengedhetetlen része több, sejtszintű folyamat így a mitózis, a tápanyagérzékelés, az ATP-termelés, a mitofágia és az apoptózis szabályozásában [64]. A mitokondriális fragmentáció gyakran összefügg a mitokondriális funkció romlásával, mivel ez a morfológiai állapot figyelhető meg döntően

súlyos stresszhatás és apoptózis során [62, 64]. Bizonyos helyzetekben azonban a mitokondriális hálózat teljes fragmentációjára van szükség. Ilyen mitokondriális hasadás játszik szerepet a sejtosztódásban, a posztmitotikus sejtek, például neuronok és kardiomiociták differenciálódásában, a mitofágia elindításában (eritrociták érése) és a sejthalál útvonalak szabályozásában [64]. A mitokondriális fúzió lehetővé teszi a mitokondriális mátrix komponensek hálózaton belüli eloszlását, elősegíti a mitokondriumok közötti komplementációt és homogenitást [64]. A fúzió emeli a mitokondriális aktivitást, védelmet nyújt az autofágiával szemben és általában a sejtek túlélésében játszik szerepet [65].

A mitokondriális dinamika fő közvetítői, a mitofuzin 1 (Mfn1), a mitofuzin 2 (Mfn2), az optikus atrófia 1 (OPA1) és a dinamin-kapcsolt protein 1 (Drp1) mind a guanozin-trifoszfátázok (GTPázok) családjának tagjai [66]. A Drp1 szinte teljes egészében citoszolikus fehérje, azonban hasadást indukáló hatásra a mitokondriális külső membránban helyet foglaló Drp1 receptor fehérjékhez (MFF, Fis1, Mid49, Mid51) kötődve oligomerizálódik és egy hurkot képezve kettéosztja a mitokondriumot [64, 66, 67]. Az Mfn1 és Mfn2 a külső mitokondriális membránban foglalnak helyet N- és C-terminális végükkel a citoszól felé nézve, míg az OPA1 a belső mitokondriális membránban lokalizálódik. A mitokondriális fúzió globálisan három különböző lépésből áll: 1. a két mitokondrium pozícionálása, valamint a két külső membrán dokkolása. 2. a külső membránok fúziója az Mfn1 és Mfn2 által katalizált konformációs változásban. 3. az OPA1 által katalizált belső membránok fúziója [66, 67].

A mitokondriumok minőségellenőrzésének szabályozásában kulcsszerepet játszik a mitokondriális biogenezis és a mitokondriális szelektív autofágia (mitofágia) [68-70]. E két ellentétes útvonal a sejtek metabolikus állapotának, külső és belső stresszhatásoknak megfelelően összehangoltan szabályozzák a sejtek mitokondriális tartalmát. A mitokondriális biogenezis egy összetett, többlépcsős folyamat, amely magában foglalja a mitokondriális DNS (mtDNS) replikációját, a magi és mtDNS által kódolt gének transzkripcióját és transzlációját, az újonnan szintetizált fehérjék, lipidek és egyéb nukleáris termékek mitokondriális importját [71, 72]. A mitokondriális biogenezis szabályozásában számos transzkripciós faktor vesz részt az intra- és extracelluláris szignáloknak (tápanyagok elérhetősége, növekedési faktorok, hormonok, toxinok, hőmérséklet- és oxigéningadozások, egyéb stresszhatások) megfelelően [68]. A mitokondriális biogenezis fő szabályozója a peroxiszóma proliferátor  $\gamma$  koaktivátor  $1\alpha$  (PGC- $1\alpha$ ) számos más mitokondriális biogenezisben részt vevő transzkripciós faktor (NRF1/2, ERR $\alpha$ ,  $-\beta$  és  $-\gamma$ , PPAR $\alpha$ ,  $-\beta$ ,  $-\gamma$  és  $\delta$ ) kölcsönható partnere [73, 74]. Mivel a diszfunkcionális mitokondriumok károsak a sejtek homeosztázisára, többféle mitokondriális minőségellenőrző

és lebontó mechanizmus alakult ki a károsodott mitokondriumok eltávolításra, melyek közül az egyik legkarakterizáltabb folyamat a mitofágia. A mitofágia által végzett minőségellenőrzés első lépése a károsodott mitokondriumok felismerése, melyek alacsony mitokondriális membránpotenciálja lehetővé teszi felszínükön a PTEN-indukálta putatív kináz 1 (PINK1) fehérje felhalmozódását [64, 75]. A PINK1 kináz aktivitásával a citoszolikus Parkin (Parkinson juvenile disease protein 2) mitokondriális transzlokációját és aktivációját okozza, mely a mitofágia elindításában kulcsszerepet játszó külső mitokondriális membrán fehérjéket (p62, Nix, Miro, Mitofuzinok, stb.) ubikvitinál [64, 75]. 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 [67].

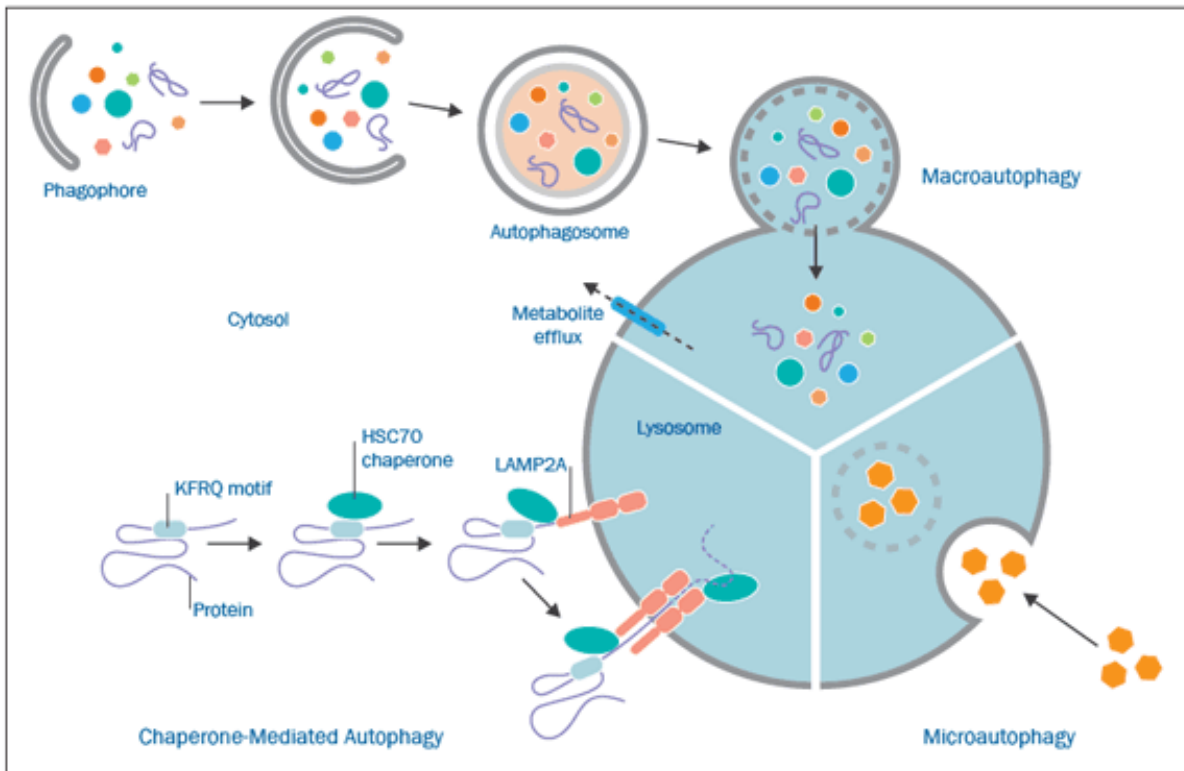


5. ábra. A mitokondriális dinamika (Bong Jong Seo et al. *Int. J. Mol. Sci.* 2018) [76]

#### 4.5. Az autofágia

Az autofágia egy katabolikus folyamat, mely a károsodott citoplazmatikus komponensek, kóros fehérjeaggregátumok, az öreg vagy sérült organelumok lizoszómális lebontása révén elengedhetetlen a sejtek homeosztázisának fenntartásához. Emlős sejtekben az autofágia három fő típusát különböztetjük meg: makroautofágia, mikroautofágia és chaperone-közvetített autofágia (CMA) [77, 78]. A makroautofágia, vagyis a klasszikus autofágia jellemzője a kettős

membránnal határolt vezikulák (autofagoszómák) képződése, amelyek a degradációra szánt szubsztrátokat tartalmazzák, lizoszómákkal való fúziójuk pedig elősegíti a károsodott komponensek lebontását [78, 79]. A mikroautofágia során a lizoszómák közvetlenül kebelezik be és emésztik meg a kisebb méretű citoszolikus szubsztrátokat, míg a CMA során a degradációra szánt célfehérjéket a HSC70 hősokkfehérje a lizoszómális membránban helyet foglaló LAMP2A fehérjével koordináltan juttatja át a lizoszómális lumenbe [78, 79]. Az autofágia lehet nem szelektív vagy szelektív [80]. A nem szelektív makroautofágia véletlenszerűen bekebelez bármilyen károsodott citoplazmatikus komponenseket [80]. A szelektív autofágia a károsodott organellek specifikus degradációját szolgálja, így megkülönböztetünk többek között a mitofágiát, pexofágiát, retikulofágiát, ribofágiát, lizofágiát, nukleofágiát, glikofágiát és lipofágiát a lebontott organellek fajtájától függően [77, 81, 82]. 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 [78, 80, 83]. Az autofágia a makromolekulák újrahasznosításával aminosavakat, zsírsavakat és cukrokat biztosít a mitokondriális metabolizmushoz így központi szerepet tölt be a szén- és nitrogén anyagcsere szabályozásában [77, 83]. A szénhidrátok cukrokká történő lebontása a glikolízist, a citrát ciklust (TCA) és az oxidatív foszforilációt (OXPHOS); a fehérjék degradációja a citrát ciklust; a lipidek zsírsavakká történő lebontása is a citrát ciklust, valamint a béta oxidációt (FAO) táplálja, így az autofágia metabolikus plaszticitást biztosít a sejteknek [77, 78, 83]. Ez különösen igaz a daganatos sejtekre, ahol az autofágia a mitokondriális aktivitás szabályozásával elősegíti a tumor sejtek adaptációját és túlélését [83].



6. ábra. Az autofágia típusai (Forrás: <https://www.novusbio.com/research-areas/autophagy>)

#### 4.6. A mitokondriális metabolizmus szabályozása

A mitokondrium legismertebb szerepe a különböző szubsztrátok (cukrok, aminosavak zsírsavak) oxidációján keresztül az adenzin-trifoszfát (ATP), mint fő energiahordozó előállításában. A glükóz és a zsírsavak oxidációja acetyl-CoA-t hoz létre, mely a citromsav ciklusban elektron donor molekulák, nikotinamid-adenin-dinukleotid (NADH) és flavin-adenin-dinukleotid (FADH<sub>2</sub>) előállításához használódik fel [84]. Emellett az aminosavak acetyl-CoA, alfa-ketoglutarát, szukcinil-CoA, fumarát és oxalacetát formájában több ponton is be tudnak lépni a citrát ciklusba [84]. A légzési lánc öt komplexből áll: az I-es (NADH ubikinon-oxidoreduktáz), a II-es (szukcinát-ubikinon-oxidoreduktáz), a III-as (ubikinol-citokrom c-reduktáz), a IV-es (citokrom-c-oxidáz) és az V-komplexből (F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> ATP-szintetáz), melyek mind a mitokondriális belső membránban helyezkednek el [85]. 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 [84]. A légzési lánc tagjai közül az I-es, a III-as és a IV-es komplex rendelkezik protonpumpa aktivitással [85]. 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 (Pi). A mitokondriális légzés sebessége az [ATP]/[ADP] [Pi] arányában kifejezett

foszforilációs potenciáltól függ [86]. Fokozott energiaigény esetén, amikor a foszforilációs potenciál csökken és több ADP áll rendelkezésre, a légzési sebesség megnő, ami megnövekedett ATP-szintézishez vezet. A mitokondriális oxidatív metabolizmust számos fehérje direkt és indirekt módon egyaránt szabályozza, melyek közül a disszertációban többször megjelenő poli(ADP-ribóz) polimeráz 1 (PARP1), Sirtuin 1 (SIRT1), Ataxia teleangiectázia mutált (ATM), AMP-aktivált protein kináz (AMPK), p53, protein kináz B (AKT) és mammalian target of rapamycin (mTOR) fehérjék szerepét ismertetem röviden.

**ATM.** Az ATM egy kb. 350 kDa-os szerin/treonin protein kináz, amely a foszfatidil-inozitol-3-kináz-rokon kinázok (PIKK) konzervált szupercsaládjába tartozik [87]. Az ATM stresszhatásokra (DNS törés, ROS) [88] a szénhidrát metabolizmust a glikolízis és a pentóz-foszfát (PPP) útvonal irányába tereli [87, 89, 90]. Mitokondriális működést szabályzó szerepének vizsgálata során kimutatták, hogy az ATM az LKB1/AMPK útvonalon keresztül [91, 92] a mitokondriális biogenezist és oxidatív foszforilációt irányító NRF1 [93], PGC1a és PGC1b [91] transzkripciós faktorokat aktiválja és gátolja az anabolikus folyamatokat támogató mTOR komplexet [87, 94]. Több munkacsoport igazolta, hogy ATM hiányos sejtek csökkent oxidatív metabolizmust folytatnak [88, 93, 95], melynek hátterében a citrát ciklusban és az oxidatív foszforilációban részt vevő enzimek és intermedierek (PDHA1, PFKP, CS, OXPHOS komplexek, malát, citrát, fumarát, alfa-ketoglutarát, NAD<sup>+</sup>) [93, 95-98] csökkent szintjét/aktivitását igazolták. Az ATM szerepét a sejtek homeosztázisában tovább bővíti, hogy számos szubsztrátjának (Mre11, CREB, p53, BRCA1, mTOR) mitokondriális transzlokációját indukálja [99-106], illetve magi lokalizációján túl peroxisómákkal [107, 108] és mitokondriumokkal [95] való asszociációjáról is beszámolnak, így központi szerepet tölt be a sejtek metabolizmusának szabályozásában.

**AMPK.** Az AMPK egy heterotrimer komplex, mely a katalitikus  $\alpha$  alegységből és a szabályzó  $\beta$  és  $\gamma$  alegységből áll [109]. Tápanyaghiány, azaz az ATP/ADP vagy ATP/AMP arányának csökkenése az AMPK allosztérikus aktivációját okozza, melyek a sejtek anyagcseréjét a fokozott katabolizmus és a csökkent anabolizmus irányába tolja el [109]. A lipid- és szterolszintézisben részt vevő (ACC1, ACC2, HMGCR, SREBP1) [109-112], valamint a glikogénszintézist katalizáló (GYS1, GYS2) [109, 113] enzimek foszforilálásával gátolja a lipid és glikogén szintézist. Az AMPK az ATP-fogyasztó mTOR útvonal aktivációja ellen hat, így a sejtek proliferációjának és fehérje szintézisének csökkenéséhez vezet [109, 114]. Az ATP raktárok feltöltése érdekében az AMPK aktívan stimulálja a makromolekulák lebontását. A stimulált utak magukban foglalják a fokozott glükózfelhasználást -és transzportot (GLUT1,

GLUT4) [115, 116], a lipidek mobilizálását (ATGL) [117], a makromolekulák autofágia útján történő degradációját (Atg9, Beclin1) [118, 119], valamint a zsírsavak mitokondriális transzportját (CPT1) [120] [109]. Több AMPK-függő módon szabályozódó mitokondriális biogenezisben részt vevő fehérjék (PGC1, ERR, PPAR család tagjai) írtak le, melyek közül az AMPK-SIRT1-PGC1 $\alpha$  tengely az oxidatív anyagcsere fő szabályzója [109, 121].

**p53.** A p53 tumorsuppresszor fehérjék kódoló TP53 humán tumorok több mint 50%-ban megfigyelhető mutálódott gén [122, 123]. A p53-mal összefüggő anyagcsereaktivitással kapcsolatos adatok azt támasztják alá, hogy a p53 az oxidatív foszforilációt támogatja a glikolízissel szemben [124]. A p53 a PGM1, a HK1/2, a GAPDH, PDHK1 enzimek, valamint a GLUT1/4/12 glükóztranszporterek sejt felszíni expressziójának negatív szabályozásán keresztül gátolja a glikolízist [125-128]. Ugyanakkor a p53 számos komplementer mechanizmus révén fokozza a mitokondriális légzést [124]. A SCO2, a TFAM, a FDXR és az AIF transzkripciós faktorok [124], a mitokondriális fehérjeimportban résztvevő gének (TOM20, TIM23, mtHSP70 és mtHSP60) [124, 129] expressziójának, valamint az anapleuretikus útvonalak (pl. glutaminolízis) [130] indukciójával fokozza a mitokondriális biogenezist és az elektrontranszportlánc aktivitását. Metabolizmusban betöltött sokoldalú szerepére utal a p53 lipid homeosztázisra gyakorolt hatása. Az egész organizmus szintjén a p53 elősegíti a lipidek lebontását, bélben való felszívódásukat (NPC1L1), lipoproteineken keresztüli (PLTP, CEL) transzportjukat és intracelluláris fluxusukat (ABCA1, ABCA12, CAV) [124, 131]. Sejtszinten a p53 konvergens mechanizmusok révén gátolja a de novo zsírsavszintézist, feltölti a mitokondriális Ac-CoA készletét, és redukáló energiát (FADH<sub>2</sub> és NADH) biztosít a zsírsavoxidáció számára. Ez magában foglalja olyan gének transzkripcióját, melyek közvetlenül vagy közvetetten a zsírsavak mitokondriális importját (CROT, CPT1A és CPT1C) és oxidációját (LPIN1, ACAD11, HMGCLL1, GAMT, MCD) szabályozzák [124, 131-135].

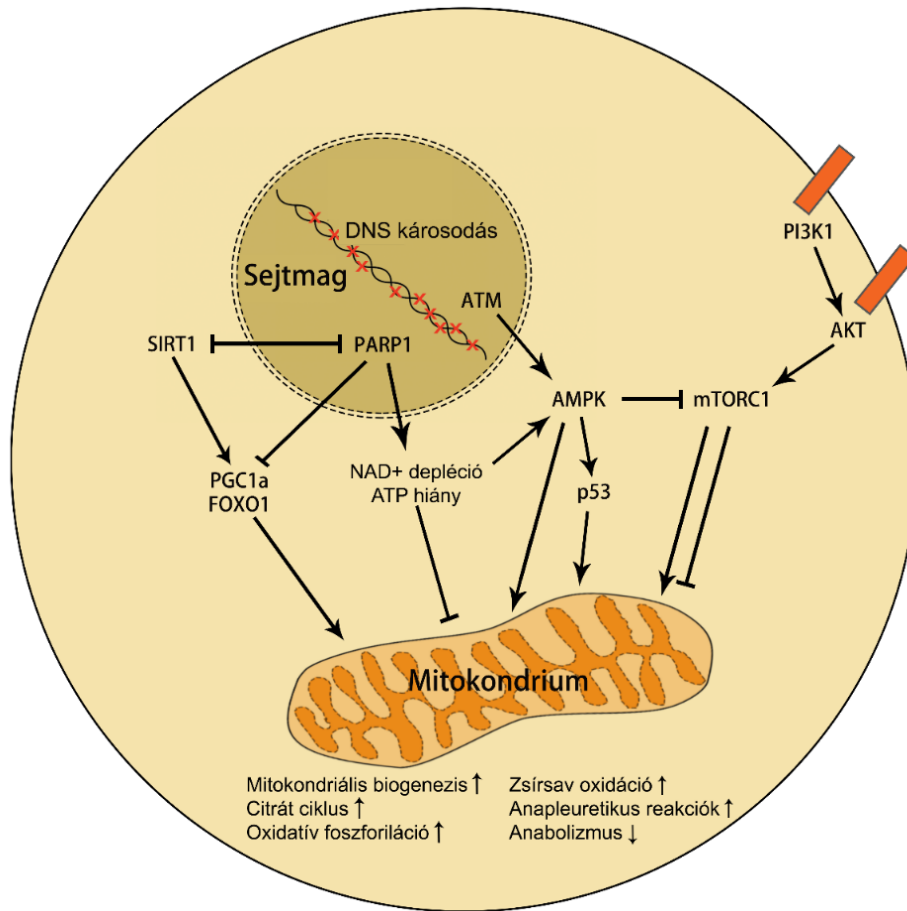
**PI3K1/AKT/mTOR útvonal.** A sejtek tápanyagérzékelő rendszerei közül az mTOR útvonal a sejtek növekedéshez és proliferációjához szükséges ATP-fogyasztó (anabolikus) folyamatokat szabályozza [136]. Az mTOR komplex egy kb. 280 kDa nagyságú szerin/treonin protein kináz, mely két különálló multiprotein komplexet alkot: az mTOR komplex 1 (mTORC1) és az mTOR komplex 2 (mTORC2) [136, 137]. Az mTORC1-t egyes aminosavak (leucin, arginin) emelkedett szintje [138], a sejtek magasabb energiaállapota, növekedési faktorok (EGF, IGF, FGF) [139, 140], valamint a PI3K1/Akt útvonal aktiválja [141]. A PI3K1/AKT/mTOR jelátvitel az aerob glikolitikus anyagcsere fő szabályzója. Sejt felszíni glükóztranszporterek

(GLUT1/4) [142], transzkripciós faktorok (HIF1 $\alpha$ ) [143, 144] és glikolitikus enzimek (HK2, PFK2, ALDOA, LDHA) [145-148] expresszióján keresztül növeli a sejtek glükózfelvétele és hasznosítását [141]. Ugyanakkor pozitívan szabályozzák a mitokondriális biogenezist és az oxidatív anyagcserét is. PGC1- $\alpha$  [149], PGC1-b [150], ERR $\alpha$  [149], YY1 [149], TFAM [151] és NRF1 [152] transzkripciós faktorok aktivációján keresztül elősegítik az elektrontranszportlánc felépítésében részt vevő mitokondriális gének és mitokondriális riboszómális proteinek [151] transzlációját [136, 141]. Emellett az mTORC1 külső mitokondriális membrán lokalizációt mutató fehérjékkel (VDAC1, HK2) kölcsönhatásba lépve a mitokondriális ATP termelést is szabályozza [153, 154]. Az ACLY, valamint a SREBP transzkripciós faktorok aktivációján és a PPAR $\alpha$  gátlásán keresztül a de novo lipid szintézist támogatják a béta oxidációval szemben [155, 156], ugyanakkor egyes közlemények beszámolnak az mTOR útvonal zsírsav oxidációt indukáló szerepéről is [157], mely ezen útvonalak komplexitására, sejt- és szövetspecifitására utal.

**A PARP1-NAD-SIRT1 tengely.** Az utóbbi években az egyik legjobban karakterizált poszttranszlációs módosítássá az úgynevezett poli(ADP-riboziláció) (PARiláció) és a mono(ADP-riboziláció) (MARiláció) vált. A PARilációt és MARilációt a Poli(ADP-ribóz) polimerázok (PARP-ok) végzik, melynek során a katalízishez használt NAD<sup>+</sup> ADP-ribóz része hosszú láncok vagy monomerek formájában akceptor fehérjék lizin (Lys), glutamát (Glu) és aszparát (Asp), ritkábban cisztein (Cys), tirozin (Tyr), hisztidin (His), arginin (Arg), és szerin (Ser) csoportjaihoz kapcsolódik [158]. Genomikai és proteomikai módszerekkel a PARP szupercsalád 17 tagját azonosították [158]. A család alapító tagja, a PARP1 a genomintegritás, a DNS repair, a transzkripció, a proliferáció, a differenciáció, a Ca<sup>2+</sup> homeosztázis, a gyulladáshoz kapcsolódó folyamatok, a sejthalál útvonalak, valamint a sejtek redoxpotenciáljának és mitokondriális aktivitásának szabályozásában játszik szerepet [159]. Az eukarióta sejtekben a PARP1 adja a teljes PARP aktivitás legnagyobb részét (85-90 %), és igen jelentős NAD<sup>+</sup>-fogyasztó enzim [160, 161]. Ugyanakkor a celluláris NAD<sup>+</sup> készlet szabályozásában kulcsszerepet tölt be egy másik, katalitikus aktivitásukhoz szintén NAD<sup>+</sup>-ot használó enzimes család is, a III-as osztályú hiszton deacetilázok csoportjába tartozó Sirtuinok. A Sirtuin család tagjai eltérő szubcelluláris lokalizációval (magi: SIRT1/2/6/7, citoplazmatikus: SIRT1/2/3, mitokondriális: SIRT3/4/5) és aktivitással (deacetiláz: SIRT1/2/3/5/6/7; ADP-ribozil-transzferáz: SIRT2/4/6 deszukciniláz, deglutariláz, demaloniláz: SIRT5; demirisztoiláz: SIRT6) rendelkeznek, emiatt számos sejtéletlen folyamat szabályozói [162]. A Sirtuinok közül a SIRT1 a legkarakterizáltabb fehérje, mely többek között mitokondriális oxidatív anyagcserét

és biogenezist fokozó hatással rendelkezik [163]. A SIRT1 és PARP1  $K_M$  értékeiket (PARP-1  $K_M$  20–60  $\mu\text{M}$   $\text{NAD}^+$  [164], SIRT-1  $K_M$  150–200  $\mu\text{M}$   $\text{NAD}^+$  [165]) figyelembe véve azonban a PARP1 sokkal agresszívabb  $\text{NAD}^+$ -fogyasztó, mint a SIRT1 és alacsonyabb  $\text{NAD}^+$  koncentráció mellett is hatékonyan működik. Emellett stresszhatástól függően a két fehérje egymás aktivitását negatívan regulálják, valamint közös, mitokondriális aktivitást moduláló célfehérjéket (PGC1A, FOXO1, NF- $\kappa\text{B}$ ) is eltérően szabályoznak, így a metabolizmusra eltérő hatást gyakorolnak [166]. Tekintve, hogy a citoszolikus és mitokondriális  $\text{NAD}^+$  pool fontos szerepet játszik a glikolízis, a citrátkör és az oxidatív foszforiláció szabályozásában, ezért a PARP1 aktivációt általában a mitokondriumok funkcionális romlásával hozzák összefüggésbe. A PARP1 számos mitokondriális aktivitást szabályzó fehérje (ETC komplexek, mitokondriális karrier fehérjék, transzport és struktúrfehérjék, transzkripció faktorok, glikolízisben, TCA ciklusban, lipid metabolizmusban részt vevő proteinek, SIRT-ek stb.) [166-170] PARilációjával csökkenti a sejtek energiatermelését. Folyamatos PARP aktivációt figyeltek meg olyan betegségekben (Cockayne-szindróma, Xeroderma Pigmentosum, Ataxia Teleangiectázia), ahol a permanens DNS károsodás-okozta PARP1 szignaling a mitokondriális funkció romlásával hozható összefüggésbe [95, 171-174]. Az ilyen súlyos metabolikus stressz a PARP1 fehérje gátlásával vagy  $\text{NAD}^+$  szupplementációval kivédhető, mely egyrészt helyreállítja a sejtek  $\text{NAD}^+$  és ATP szintjét [12, 175], csökkenti a DNS károsodást [176, 177], valamint az emelkedett  $\text{NAD}^+$  pool aktiválja a mitokondriális energiatermelő folyamatok szabályozásában részt vevő SIRT fehérjéket [171, 174, 178]. Ugyanakkor a PARP1 és a mitokondriumok funkcionális állapota közötti összefüggés nem mindig egyértelmű. Egyes közlemények beszámolnak arról, hogy egy átmeneti PARP1 aktiváció után a  $\text{NAD}^+$  szint gyorsan helyreállhat, és nem következik be mitokondriális diszfunkció, sőt a PARP1-indukált  $\text{NAD}^+$ -depléción a metabolikus egyensúlyt az oxidatív foszforiláció irányába tolja el, mely elengedhetetlen a károsodott sejtek túléléséhez [179, 180]. A tolerálható DNS károsodás stimulálhatja a mitokondriális fúziót [181] és az oxidatív foszforilációt a sejtek homeosztázisának helyreállítása érdekében [180, 182]. Emelkedett oxidatív foszforilációt vagy zsírsav oxidációt tapasztaltak UVC [180], ionizáló sugárzást [183], mitomicin [180] és ciszplatin [184] kezelést követően, melynek háttérében a PARP1 aktiváció-okozta tranziens  $\text{NAD}^+$  szint csökkenés szerepét feltételezik. Az átmeneti celluláris  $\text{NAD}^+$  depléción az AMP/ATP arányának az eltolódását, az AMPK fehérje aktivációját [185-187] és az mTOR gátlását okozza [187], mely az ATP-fogyasztó folyamatok kikapcsolásával és a katabolikus folyamatok aktiválásával növeli a mitokondriális aktivitást. A PARP1 aktiváció mitokondriális

metabolizmust szabályzó szerepe tehát nagyban a függ a DNS károsodás fajtájától, az adott sejt típusától és energiaállapotától, valamint a PARP aktiváció hosszától.



7. ábra. Az energiaszenzorok metabolizmusban betöltött szerepének sematikus ábrázolása

## 5. 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 irradációt 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 gyulladós 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-pszseuduridin 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.

## **6. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK**

### **6.1. Sejtkultúra**

A kísérletekhez használt humán immortalizált (HaCaT) keratinocitákat [188] (ATCC, Manassas, VA, Amerikai Egyesült Államok) és kínai hörcsög ovárium (CHO-K1) sejteket (ATCC, Manassas, VA, USA) L-glutamin és Nátrium-piruvát tartalmú 4500 mg/L-es Dulbecco's modified eagle media (DMEM) (Biosera, Budapest, Magyarország) médiumban tenyésztettük, melyet 10 %-os hőinaktivált főtális borjú szérummal (FBS) (Biosera, Budapest, Magyarország) és 0,5%-os antibiotikum-antimikotikum (Sigma-Aldrich) oldattal egészítettünk ki. A sejteket T75-ös flaskában, 37 °C-on, 5%-os CO<sub>2</sub> tenzió mellett tartottuk fenn. A humán eredetű primer keratinocitákat (NHEK) (Thermo Fisher Scientific) 60 µM-os kalcium tartalmú Epilife médiumban (Thermo Fisher Scientific) tenyésztettük, melyet humán keratinocita növekedési koktéllal (Thermo Fisher Scientific) és 0,5%-os antibiotikum-antimikotikum (Sigma-Aldrich) oldattal egészítettünk ki.

### **6.2. UVB irradiáció és sejtkelés**

A sejteket 1x-es tripszin-EDTA (Biosera, Budapest, Magyarország) oldattal gyűjtöttük be, majd munkánk első felében 12 lyukú műanyag sejtenyésző edénybe osztottuk szét  $2 \times 10^5$  sejt/well denzitásban. Amennyiben ettől eltérően kerültek szétosztásra a sejtek, az alkalmazott módszernél jelöltük a sejtszámot és sejtenyésző edény nagyságát. A következő nap az UVB besugárzáshoz eltávolítottuk a tápoldatot és 2x mostuk a sejteket előmelegített foszfátpufferelt sóoldattal (DPBS) (Lonza, Walkersville, Maryland, Amerikai Egyesült Államok). A sejteket 400 µl DPBS-ben 20 vagy 40 mJ/cm<sup>2</sup> UVB dózissal sugaraztuk be, 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 DMEM médiumra cseréltük le, majd további 24 órán át inkubátorban tartottuk a sejteket. Az alkalmazott UVB dózis nagyságát minden esetben UVX digitális radiométerrel (UVP Inc., San Gabriel, California, Amerikai Egyesült Államok) ellenőriztük. A sejteket az UVB irradiációt megelőzően minden esetben 2 órán keresztül előinkubáltuk az alábbi táblázatban összesített reagensekkel, majd az UVB besugárzást követően a sejteket további 24 órán keresztül inkubáltuk a reagenseket tartalmazó médiumban.

Reagensek	Gyártó	Katalógus szám	Végkoncentráció
(+)-Etomoxir nátrium só hidrát	Sigma-Aldrich	E1905	40 $\mu$ M
2-Deoxi-D-glükóz (2-DG)	Sigma-Aldrich	D8375	10 mM
Acetil-CoA (Ac- CoA)	Sigma-Aldrich	A2181	10 $\mu$ M
Antimicin	Sigma-Aldrich	A8674	5 $\mu$ M
BPTES	Sigma-Aldrich	SML0601	100 $\mu$ M
Kalcium-klorid (CaCl <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich	223506	1.5 mM
Klóramfenikol	AdooQ Bioscience	ADQ-A10200-100	25 $\mu$ M
Compound C	Selleckchem	S7840	2.5 $\mu$ M
KU-60019	AdooQ Bioscience	ADQ-A10507-10	6 $\mu$ M
L-Glutation	Sigma-Aldrich	G4251	5 mM
MitoTEMPO	Sigma-Aldrich	SML0737	10 $\mu$ M
N-acetil-L-cisztein	Sigma-Aldrich	A7250	5 mM
Olaparib (AZD2281)	Selleckchem	S1060	1 $\mu$ M
Oligomicin	Sigma-Aldrich	O4876	5 $\mu$ M
Oxálcetát	Sigma-Aldrich	O4126	5 mM
Palmitát	Sigma-Aldrich	P0500	25 $\mu$ M
Veliparib (ABT-888)	Selleckchem, Houston, TX, USA	S1004	25 $\mu$ M
Pifithrin-alpha-HBr	AdooQ Bioscience	ADQ-A12451-5	30 $\mu$ M
Rapamicin	AdooQ Bioscience	ADQ-A10782-5	300-600 nM
Rotenon	Sigma-Aldrich	R8875	500 nM
UK-5099	Sigma-Aldrich	PZ0160	50 $\mu$ M
Wortmannin	AdooQ Bioscience	ADQ-A11161-5	300-600 nM

1. táblázat. A kísérletekhez használt reagensek

### 6.3. 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 plazmával (pTEV-CPD-PL-A101) a Potorous tridactylus CPD-specifikus fotoliáz enzimjét kódoló génjéből. Az N1-metil pszeudouridint tartalmazó módosított RNS-t dsRNS-specifikus J2 mAb (English & Scientific Consulting, Budapest, Hungary) antitesttel tették duplaszálú RNS-mentessé. Az mRNS tisztaságát agaróz gélelektroforézissel ellenőrizték. A fotoliáz mRNS transzfecciónál 24 lyukú plate-et használtunk, melynek 1-1 well-jébe HaCaT-ok esetében  $1 \times 10^5$ , NHEK-ek esetében  $2 \times 10^5$  sejt került. Amennyiben ettől eltérően osztottuk szét a sejteket, az alkalmazott módszernél jelöltük a sejtszámot és sejttenyésztő edény nagyságát. A keratinociták fotoliáz mRNS transzfecciónóját 400  $\mu$ L szérum- és antibiotikummentes Epilife médiumban (Thermo Fisher Scientific) 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 (Thermo Fisher Scientific) egészítettünk ki. A komplexet 2 órán keresztül hagytuk állni a sejteken. Az UVB irradációt 300  $\mu$ L DPBS-ben végeztük, melyet 1 g/L D-glükózzal (Duchefa Biochemie, Haarlem, Hollandia), 100 mg/L  $\text{CaCl}_2$ -dal és 100 mg/L  $\text{MgCl}_2$ -dal (Spektrum 3D, Pécs, Magyarország) egészítettünk ki. 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 médiumban, további 24 órán át tartottuk az inkubátorban.

#### **6.4. Géncsendesítés**

A PARP1 fehérjére specifikus On-target plus SMARTpool PARP1 siRNS-t a Dharmacon Research, Inc. cégtől vásároltuk (Lafayette, Colorado, Amerikai Egyesült Államok). A kísérlethez nem-specifikus siRNS-t (Dharmacon) használtunk kontrollként. A HaCaT sejteket 12 lyukú edényben tenyésztettük antibiotikum-mentes, 10 %-os FBS tartalmú DMEM-ben. Az 1-es számú csőbe DharmaFECT transzfecciónos reagenst (Dharmacon), a 2-es számú csőbe az adott siRNS került 1x-es siRNS pufferrel (Dharmacon) komplexben, melyeket szérum- és antibiotikummentes DMEM-mel hígítottunk és szobahőn 5 percig állni hagytuk. A két cső tartalmát összeöntöttük, a mixet további 20 percig inkubáltuk, majd a sejtekre mértük 50 nM siRNS végkoncentrációban. 48 óra múlva a sejteket DPBS-sel mostuk, besugarztuk és komplett DMEM-ben további 24 óráig inkubáltuk őket. A transzfecciónó hatékonyságát 24 órával az UVB besugárzást követően ellenőriztük.

## **6.5. Sejtviabilitás**

A sejtek életképességének meghatározását az UVB irradációt követően 24 órával végeztük Dead Cell Apoptosis Kit-tel (Thermo Fisher Scientific) a gyártó leírása szerint. A festett sejteket áramlási citometriával FACSCalibur készüléken (Becton Dickinson, San Jose, California, Amerikai Egyesült Államok) analizáltuk. A propídium-jodid (PI), Annexin V dupla negatív sejteket tekintettük életképesnek. Az adatgyűjtéshez és kiértékeléshez CellQuest pro szoftver 5.2 (Becton Dickinson) és Flowjo Single Cell Analysis v10.0.7 (TreeStar, Ashland, Oregon, Amerikai Egyesült Államok) szoftvert használtunk.

## **6.6. Sejtproliferáció**

A sejtek proliferációját klonogén assay-vel határoztuk meg. 24 órával az UVB besugárzást követően a sejteket 1x-es tripszin-EDTA oldattal begyűjtöttük, 100 mm-es Petri csészébe raktuk őket egyenlő sejtszámban ( $5 \times 10^4$  sejt/edény) és 10 napig tartottuk őket inkubátorban. A médiumot minden 3. nap cseréltük. 10 nappal később a keratinocitákat DPBS-sel mostuk, 100%-os metanollal (VWR Chemicals, Radnor, Pennsylvania, Amerikai Egyesült Államok) fixáltuk és May-Grünwald-Giemsa oldattal (Histolab Products, Västra Frölunda, Svédország) festettük.

## **6.7. 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 propídium-jodidot (Thermo Fisher Scientific) használtunk 20 µg/mL végkoncentrációban. A nem kötődött PI eltávolításához kétszer mostuk a sejteket DPBS-sel. A minták DNS tartalmának meghatározásához áramlási citométerrel „doublet discrimination”-t végeztük az egyedi sejtek elkülönítése céljából, majd a PI intenzitását az FL2-A csatornán ábrázoltuk.

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

A CHO sejteket egy hétig hipoxantin–aminopterin–timidin (HAT) (Sigma-Aldrich) médiumban tartottuk a már meglévő HPRT mutációk eliminálásához. A HAT médiumot ezután komplett DMEM-re cseréltük, és a sejteket 3 napig hagytuk regenerálódni. A CHO sejteket a HaCaT-hoz hasonlóan transzfektáltuk, viszont alacsonyabb, 5, 10 vagy 20 mJ/cm<sup>2</sup> UVB irradációnak tettük ki. Heti háromszori passzálassal további egy héten át komplett DMEM-ben

növesztettük a sejteket, majd egyenlő,  $5 \times 10^4$  sejtszámban 100 mm-es Petri csészében 5  $\mu\text{g/mL}$  6-tioguanin (6-TG) (Sigma-Aldrich) tartalmú szelektív médiumban további 10 napig növesztettük őket. A sejtek fixálását, permeabilizálását és festését a sejtproliferációnál leírt klonogén assay-hez hasonlóan végeztük. A mutáns kolóniákat megszámláltuk.

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

A keratinocitákból DNS-t izoláltunk Purelink Genomic DNA Mini Kit-tel (Thermo Fisher Scientific) a gyártó leírását követve. A DNS minták koncentrációját és tisztaságát NanoDrop spektrofotométerrel ellenőriztük. A DNS-t 100 °C-on 10 percig denaturáltuk, majd jégen állni hagytuk 15 percig. Az előzőleg 0,003%-os protamin-szulfáttal (Sigma-Aldrich) 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) antitesttel (Cosmobio LTD, Japán) 1:1000 hígításban inkubáltuk a mintákat 37 °C-on további 30 percig. A PBST-vel történő mosási lépések után 1:3000 hígításban torna peroxidáz-konjugált egér-ellenes IgG másodlagos antitest (Bio-Rad, Hercules, California, Amerikai Egyesült Államok) 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  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 24,3 mM citromsav monohidrát, pH 5.0) cseréltünk. A puffert eltávolítottuk, majd 0,0063%-os  $\text{H}_2\text{O}_2$  és 0,04% o-feniléndiamin (Sigma-Aldrich) tartalmú citrát-foszfát szubsztrát oldatot került a mintákra. 30 perc után a színreakciót 2 M-os  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (VWR) oldattal állítottuk le, az abszorbanciát 492 nm-es hullámhosszon ELISA microplate olvasóval határoztuk meg.

### **6.10. Valós idejű kvantitatív RT-PCR**

A totál RNS izolálását guanidin izotiocianát-fenol-kloroformos extrakcióval végeztük. Az RNS minták koncentrációját és tisztaságát NanoDrop spektrofotométerrel ellenőriztük. A mintákból DNáz I kezeléssel (Fermentas, St. Leon-Rot, Németország) eltávolítottuk a genomi DNS szennyeződést. A reverz transzkripciót a gyártó leírásának megfelelően High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, California, Amerikai Egyesült Államok) felhasználásával végeztük. A PCR terméket a SYBR green festék (Applied Biosystems) fluoreszcencia intenzitásának növekedésével követtük nyomon 384 well optikai plate-en, Lightcycler 480 II (Roche Diagnostics) típusú készüléken. A génexpressziót  $2^{-\Delta\text{CT}}$  módszerrel határoztuk meg. A kapott értékeket a szukcinát dehidrogenáz (SDHA) és a

foszfoglicerát kináz 1 (PGK1) háztartási génekre normalizáltuk [189]. A primer párok szekvenciáját az alábbi táblázat tartalmazza:

Gén	Forward Primer (5'-3')	Reverz Primer (5'-3')
SDHA	TGGGAACAAGAGGGCATCTG	CCACCACTGCATCAAATTCATG
PGK1	GCGGGTCGTTATGAGAGT	CTCCATTGTCCAAGCAGAAT
NRF2	TGGCACAAAACACATCACAAC	CTTCATTACCCAAACCACCCA
TFAM	AGCTCAGAACCCAGATGCAAAAA	TACCTGCCACTCCGCCCTATAA
ERRA	GCCACAAGGAAGAGGAGGATG	TCACAGGATGCCACACCATAG

2. táblázat. Az oligonukleotidok szekvenciája

### 6.11. 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 (Sigma-Aldrich) tartalmú RIPA pufferben (Sigma-Aldrich) jégen lizáltuk. 10 perces 15000 rpm-en és 4 °C-on történő centrifugálás után a felülúszóból meghatároztuk a minták fehérje tartalmát BCA assay-vel (Thermo Fisher Scientific). A lizátumot 5x-ös loading pufferrel [Brómfenolkék (0,25%),  $\beta$ -merkaptoetanol (5%), Glicerol (50%), SDS (nátrium-dodecil-szulfát; 10%), Tris-HCl (0,25 M, pH 6.8)] egészítettük ki, majd 10 percen át 100 °C-on forraltuk. A detektálni kívánt fehérjék molekulatömegének megfelelően a mintákat 5%, 7,5%, 10%, vagy 12,5% SDS tartalmú poliakrilamid gélbe vittük fel. A fehérjéket nitrocellulóz membránra (Bio-Rad) blottoltuk át, majd a membránt 5%-os borjú szérum albumint (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 háromszor 5 percig TBST-vel történő mosási lépéseket követően toma peroxidáz-konjugált egér, illetve nyúl-ellenes IgG másodlagos antitesttel (Bio-Rad) inkubáltuk a membránokat szobahőmérsékleten egy órán át. A vizsgálni kívánt fehérjéket a kemilumineszcencia elvén működő Pierce™ ECL Western Blotting Substrate (Thermo Fisher Scientific) vagy SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Fisher Scientific) előhívó folyadékkal tettük láthatóvá. Standardként a ProSieve QuadColor Protein markert használtuk, mely 12 rekombináns fehérje keverékét tartalmazza 4,6, 10, 17, 26, 42, 55, 72, 95, 140, 180, 250 és 315 kDa molekulatömeggel. A sávokat a nyílt forráskódú ImageJ v1.52a szoftverrel [190] (National Institutes of Health, Bethesda, MD) denzitometráltuk. Az általunk használt normalizáló fehérje a  $\beta$ -aktin volt. Az értekezésben használt primer antitesteket az alábbi táblázat összesíti:

<b>Antitest</b>	<b>Hígítás</b>	<b>Gyártó</b>
ACADM (PA5-27201)	1:1000	ThermoFisher Scientific
AKT (9272)	1:1000	Cell Signaling Technology
AMPK $\alpha$ (23A3)	1:1000	Cell Signaling Technology
anti-PAR (10H) (sc-56198)	1:500	Santa Cruz
ATM (D2E2)	1:1000	Cell Signaling Technology
CPT1A (D3B3)	1:1000	Cell Signaling Technology
Drp1 (D6C7)	1:1000	Cell Signaling Technology
HADHA (PA5-29813)	1:1000	ThermoFisher Scientific
Keratin 1 (ab185628)	1:750	Abcam
LC3A/B (D3U4C) Alexa Fluor 488 Conjugate	1:50	Cell Signaling Technology
Mff (E5W4M)	1:1000	Cell Signaling Technology
Mfn1 (D6E2S)	1:1000	Cell Signaling Technology
Mfn2 (D1E9)	1:1000	Cell Signaling Technology
MTCO1 (PA5-79701)	1:500	ThermoFisher Scientific
OPA1 (D6U6N)	1:1000	Cell Signaling Technology
p53 CM 042 C	1:1000	Biocare Medical
p70 S6 kinase (SAB4502691)	1:1000	Cell Signaling Technology
phospho-AKT <sup>S473</sup> (D9E) XP®	1:1000	Cell Signaling Technology
phospho-AMPK $\alpha$ <sup>T172</sup> (40H9)	1:1000	Cell Signaling Technology
phospho-ATM <sup>S1981</sup>	1:1000	Cell Signaling Technology
phospho-p53 <sup>S15</sup> (16G8)	1:1000	Cell Signaling Technology
phospho-p70S6K1 <sup>T389</sup> (108D2)	1:1000	Cell Signaling Technology
SDHA (PA5-79962)	1:1000	ThermoFisher Scientific
SirT1 (07-131)	1:1000	Millipore
SirT2 (D4O5O)	1:1000	Cell Signaling Technology
SirT3 (D22A3)	1:1000	Cell Signaling Technology
SirT4 (PA581259)	1:1000	ThermoFisher Scientific
SirT5 (D8C3)	1:1000	Cell Signaling Technology
SirT6 (D8D12)	1:1000	Cell Signaling Technology
SirT7 (D3K5A)	1:1000	Cell Signaling Technology
$\beta$ -actin (8H10D10)	1:4000	Cell Signaling Technology

## 6.12. Elektron mikroszkópia

A keratinocitákat tripszinezéssel begyűjtöttük, DPBS-sel mostuk, 1500 rpm-en centrifugáltuk, majd a pelletet 3%-os glutáraldehidet (EMS, Hatfield, Pennsylvania, Amerikai Egyesült Államok) és 5% szacharózt tartalmazó 0,1 M-os kakodilát (EMS) pufferben fixáltuk 2 órán keresztül. 0,1 M-os kakodilát oldattal történő mosást követően a sejteket ozmifikáltuk 1% ozmium tetroxidban ( $\text{OsO}_4$ ), majd felszálló alkoholsorban dehidratáltuk a következők szerint:  $2 \times 10$  percig 50 %-os etanolban,  $2 \times 10$  percig 70 %-os etanolban,  $2 \times 15$  percig 96 %-os etanolban,  $3 \times 20$  percig abszolút etanolban és végül  $2 \times 10$  percig propilén-oxidban. Durcupan araldit kezeléssel beágyasztuk a mintákat, majd kapszulázást követően ultravékony metszeteket készítettünk Leica EM UC7 ultramikrotómmal (Leica Microsystems, GmbH, Wetzlar, Németország). A standard kontrasztot uranil-acetát (EMS) és Reynolds-féle ólom citrát oldattal végeztük. A nagy felbontású transzmissziós elektronmikroszkópiás (TEM) képeket Jeol JEM 1010 elektron mikroszkóppal és a hozzá tartozó szoftverrel (JEOL Inc. Peabody, MA, USA) készítettük.

## 6.13. Konfokális mikroszkópia

A sejteket üveglemezre növesztettük, majd 24 órával a sejtkezelést követően az alábbi reagensekkel festettük  $37^\circ\text{C}$ -on 30 percig a detektálni kívánt celluláris kompartmentől függően. A mitokondriális hálózat vizualizációjához 100 nM Mitotracker Red CMXRos-t (Thermo Fisher Scientific), a lipid cseppek detektálásához 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Bodipy 493/503-t (Thermo Fisher Scientific) vagy 1 mL DPBS-ben 30  $\mu\text{L}$  Adipored-et (Lonza) használtunk. A mintákat kétszer mostuk DPBS-sel; 3,7%-os paraformaldehid oldattal (Sigma-Aldrich) szobahőn 20 percig fixáltuk, majd 0,2% Triton X-100 oldattal permeabilizáltuk. A DPBS-sel történő mosást követően a mintákat 1 órán át 1 %-os BSA oldattal blokkoltuk, majd egy éjszakán át  $4^\circ\text{C}$ -on a primer antitesttel inkubáltuk nedves kamrában. Az autofagoszómákat 1:50 hígításban Alexa Fluor 488-konjugált LC3A/B antitesttel, a Keratin 1 (K1) expressziót 1:750 hígításban nyúlban termelt keratin 1 (Abcam) 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, mivel a primer antitest nem volt fluoreszcensen jelölve. DAPI-t tartalmazó mounting médiummal (Vector Laboratories Inc., California, Amerikai Egyesült Államok) fedtük a mintákat majd 60x-os olajimmerziós objektívval, Olympus FV3000 mikroszkóppal (Olympus Corporation, Tokyo, Japán) képeket készítettünk. A

mitokondriális hálózat jobb vizualizációja és megfelelő értékelése érdekében ImageJ szoftverrel zajcsökkentést, háttérkivonást és lokális kontraszt emelést alkalmaztunk az irodalom szerint [191]. A mitokondriális morfológiai paramétereket ImageJ szoftver Mitomorphology makrójával (URL:[https://imagejdocu.tudor.lu/plugin/morphology/mitochondrial\\_morphology\\_macro\\_plugin/start](https://imagejdocu.tudor.lu/plugin/morphology/mitochondrial_morphology_macro_plugin/start)), a kolokalizációt JACoP bővítményével (URL:[https://imagejdocu.tudor.lu/doku.php?id=plugin:analysis:jacop\\_2.0:just\\_another\\_colocalization\\_plugin:start](https://imagejdocu.tudor.lu/doku.php?id=plugin:analysis:jacop_2.0:just_another_colocalization_plugin:start)) végeztük.

#### **6.14. Mitokondriális tömeg mérése**

24 órával az UVB irradáció követően 100 nM Mitotracker Green-nel (Thermo Fisher Scientific) inkubáltuk a mintákat 37 °C-on 30 percig. A sejteket kétszer mostuk DPBS-sel, tripszinezéssel begyűjtöttük, és azonnal jégre helyeztük. A Mitotracker Green fluoreszcencia intenzitását áramlási citometriával az FL1 csatornában mértük.

#### **6.15. Mitokondriális membránpotenciál vizsgálata**

A mitokondriális membránpotenciál meghatározásához munkánk első felében 3,3'-dihexiloxakarbocianin jodidot [DiOC<sub>6</sub>(3)] (Thermo Fisher Scientific), a fotoliáz transzfekciónál 100 nM Mitotracker Red CMXRos-t (Thermo Fisher Scientific) használtunk. Mindkét festék alkalmas a mitokondriális membránpotenciál monitorozására. 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 fluoreszcencia intenzitását az FL3, a DiOC<sub>6</sub>(3) intenzitását az FL1 csatornában áramlási citometriával határoztuk meg.

#### **6.16. 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 (Thermo Fisher Scientific) 10 µM végkoncentrációban használtuk, és fluoreszcencia intenzitását az FL3 csatornában mértük [192, 193].

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

24 órával az UVB irradáció követően 1 µM MitoSOX Red-del (Thermo Fisher Scientific) inkubáltuk a mintákat 37 °C-on 10 percig [192, 194]. A sejteket kétszer mostuk DPBS-sel,

tripszinezéssel begyűjtöttük, és azonnal jégre helyeztük. A MitoSOX Red fluoreszcencia intenzitását áramlási citometriával az FL3 csatornában mértük.

#### **6.18. Mitokondriális DNS izolálás**

24 órával UVB irradációt követően a sejteket tripszinezéssel begyűjtöttük, mostuk DPBS-sel, majd 1500 rpm-en centrifugáltuk. A pelletből a Mitochondrial DNA Isolation Kit-tel (Biovision, Mountain View, California, Amerikai Egyesült Államok) a gyártó leírásának megfelelően mitokondriális DNSt izoláltunk. A mtDNS tisztaságát PCR módszerrel ellenőriztük. A magi DNS által kódolt  $\beta$ 2-mikroglobulin, valamint a mitokondriális genom által kódolt tRNS<sup>Leu</sup> génre tervezett specifikus primerpárokkal PCR-t végeztünk, majd a mintákat agaróz gélelektroforézissel megfuttattuk. A mtDNS izolálás optimalizálást addig folytattuk, amíg genomi DNS mennyisége 90%-kal nem csökkent.

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

A sejtek CS aktivitását Citrate Synthase Assay Kit (Sigma-Aldrich) 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.

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

A sejteket 96 lyukú XF96 sejtenyésző edénybe (Agilent Technologies, Santa Clara, California, Amerikai Egyesült Államok) osztottuk szét 10,000 sejt/well denzitásban, melyeket következő nap az alábbiak szerint transzfektáltunk: 125 ng CPD-specifikus fotoliáz enzimet kódoló mRNS, 0,25  $\mu$ L Lipofectamine Plus és 0,5  $\mu$ L Lipofectamine LTX Reagens került 100  $\mu$ L szérum- és antibiotikummentes Epilife médiumba. A sejteket 30  $\mu$ L-nyi D-glükózt, CaCl<sub>2</sub>-ot és MgCl<sub>2</sub>-ot tartalmazó DPBS-ben sugaraztuk be és a fotoreaktiválást is ebben a térfogatban végeztük 30 percig. 23 órával az UVB expozíciót követően és egy órával a mérés indítása előtt a sejtekről a komplett DMEM-et 1 mM nátrium-piruvát (Thermo Fisher Scientific), 2 mM L-glutamin (Sigma-Aldrich) és 10 mM glükóz tartalmú puffermentes, úgynevezett unbuffered DMEM-re (Agilent Technologies) cseréltük, és CO<sub>2</sub>-mentes inkubátorban egy órán keresztül ekvilibráltuk őket. BPTES, Etomoxir és UK-5099 inhibitorokkal mértük a glutamin, a zsírsavak és a piruvát mitokondriális oxidációját. Az egyes szubsztrátok alapfluxusát, maximális hozatalát és tartalék kapacitását az XF96 Extracellular Flux Analyzer (Seahorse Bioscience,

North Billerica, Massachusetts, Amerikai Egyesült Államok) készüléssel mért oxigén fogyasztási értékekből származtattuk az alábbiak szerint:

Mérés	Első injektálás	Második injektálás
Glutamin alapfluxus	BPTES	Etomoxir/UK-5099
Zsírsavak alapfluxus	Etomoxir	BPTES/UK-5099
Piruvát alapfluxus	UK-5099	Etomoxir/BPTES

Mérés	Első injektálás	Második injektálás
Glutamin maximális hozatal	Etomoxir/UK-5099	BPTES
Zsírsavak maximális hozatal	BPTES/UK-5099	Etomoxir
Piruvát maximális hozatal	Etomoxir/BPTES	UK-5099

4. táblázat. A Seahorse Mitofuel Flex Test sematikus ábrázolása

Alapfluxus (%) = (alap OCR-első injektálás utáni OCR)/(alap OCR-második injektálás utáni OCR) x 100

Maximális hozatal (%) = (1-(alap OCR-első injektálás utáni OCR)/(Baseline OCR-második injektálás utáni OCR)) x 100

Tartalék kapacitás (%) = Maximális hozatal-alapfluxus

## 6.21. Glikolízis és oxidatív foszforiláció vizsgálata

A keratinociták szétosztását, transzfekcióját, irradiációját és fotoreaktivációját az 5.20-as részben ismertettekhez hasonlóan végeztük. A munkánk első felében az UVB sugárzás, valamint a PARP gátlás hatásának a vizsgálatához szintén XF96 sejtenyésző edénybe kerültek a sejtek, de itt természetesen nem került sor transzfekcióra és fotoreaktivációra. Egy órával az assay indítása előtt a sejtekről a komplett DMEM-et 10 mM glükóz tartalmú puffermentes DMEM-re cseréltük és CO<sub>2</sub>-mentes inkubátorban tartottuk őket egy órán keresztül. Négy alpmérés után, oligomicin (Sigma-Aldrich), FCCP (Sigma-Aldrich) és antimicin A (Sigma-Aldrich) került befecskendezésre, melyekkel lehetővé vált többek között az oligomicin-szenzitív- és rezisztens légzés, a maximális respiráció és a mitokondriális légzés meghatározása. Az oxigénfogyasztási értékek (OCR) az oxidatív foszforilációt, az extracelluláris acidifikációs ráta (ECAR) a glikolízis aktivitását tükrözik. Minden OCR és ECAR értéket a sejtek összfehérje tartalmára normalizáltuk.

## 6.22. Endogén és exogén zsírsav oxidáció meghatározása

A keratinociták szétosztását, transzfekcióját, irradiációját és fotoreaktivációját az 5.20-as részben ismertettekhez hasonlóan végeztük. Közvetlen az UVB besugárzást követően a sejtekről a DPBS-t 0,5 mM D-glükóz, 1 mM L-glutamin, 0,5 mM L-karnitin (Sigma-Aldrich) és 1 %-os FBS tartalmú DMEM-re cseréltük az endogén szubsztrátok depléciójának céljából, és további 23 órán át tartottuk inkubátorban a sejteket ebben a szubsztrát-csökkentett médiumban. 45 perccel az assay-t megelőzően a szubsztrát limitált médiumot úgynevezett fatty acid oxidation assay (FAO) médiumra (111 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 1,25 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 1,2 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) cseréltünk, melyet 2,5 mM D-glükózzal, 0,5 mM L-karnitinnel és 5 mM HEPES-sel egészítettünk. Az oldatot pH 7.4-re állítottuk be. 135 µL FAO assay médium került minden well-be, és a plate-et egy órán át CO<sub>2</sub>-mentes inkubátorban tartottuk. Vehicle vagy 40 µM Etomoxir került a mintákra és további 15 percig hagytuk, hogy az inhibitor kifejtsen CPT1 gátló hatását. Az endogén és exogén zsírsav oxidáció elkülönítése céljából 30 µL XF Palmitate-BSA FAO Substrate vagy BSA (Seahorse Bioscience) került az adott mintákra. A négy alpmérés után, oligomicin, FCCP és antimicin A került befecskendezésre. Minden OCR értéket a sejtek összfehérje tartalmára normalizáltunk.

## 6.23. ATP szint mérés

A sejteket az UVB irradiációt követő 24. órában begyűjtöttük, PBS-sel mostuk és 1500 rpm-en centrifugáltuk. A felülúszó leszívása után a pellet teljes ATP készletének meghatározását ATP Colorimetric/Fluorometric Assay-vel (Biovision) végeztük a gyártó leírása szerint. Az optikai denzitást 570 nm-en határoztuk meg ELISA mikroplate olvasóval. A kapott OD értékeket a sejtek totál fehérje tartalmára normalizáltuk.

## 6.24. NAD<sup>+</sup> tartalom meghatározása

A keratinociták NAD<sup>+</sup> tartalmának meghatározását a Biovision-tól vásárolt NAD/NADH Quantitation Colorimetric Kit-tel végeztük. A keratinocitákat tripszinezéssel begyűjtöttük, PBS-sel mostuk és 1500 rpm-en centrifugáltuk. A felülúszó leszívása után a pelletet kétszeri fagyasztás-olvasztás ciklusnak vetettük alá NAD<sup>+</sup>/NADH extrakciós pufferben. A minták felét egy másik Eppendorf csőbe vittük át, és 60 °C-on melegítettük, ahol a hőre érzékeny NAD<sup>+</sup> lebomlik és csak a NADH marad vissza. A mintákat lecentrifugáltuk, a felülúszót 96 lyukú plate-re vittük át, és előhívó reagenst mértünk rájuk, majd meghatároztuk az OD értékeket 450 nm-en. A kapott OD adatokat a sejtek összfehérje tartalmára normalizáltuk.

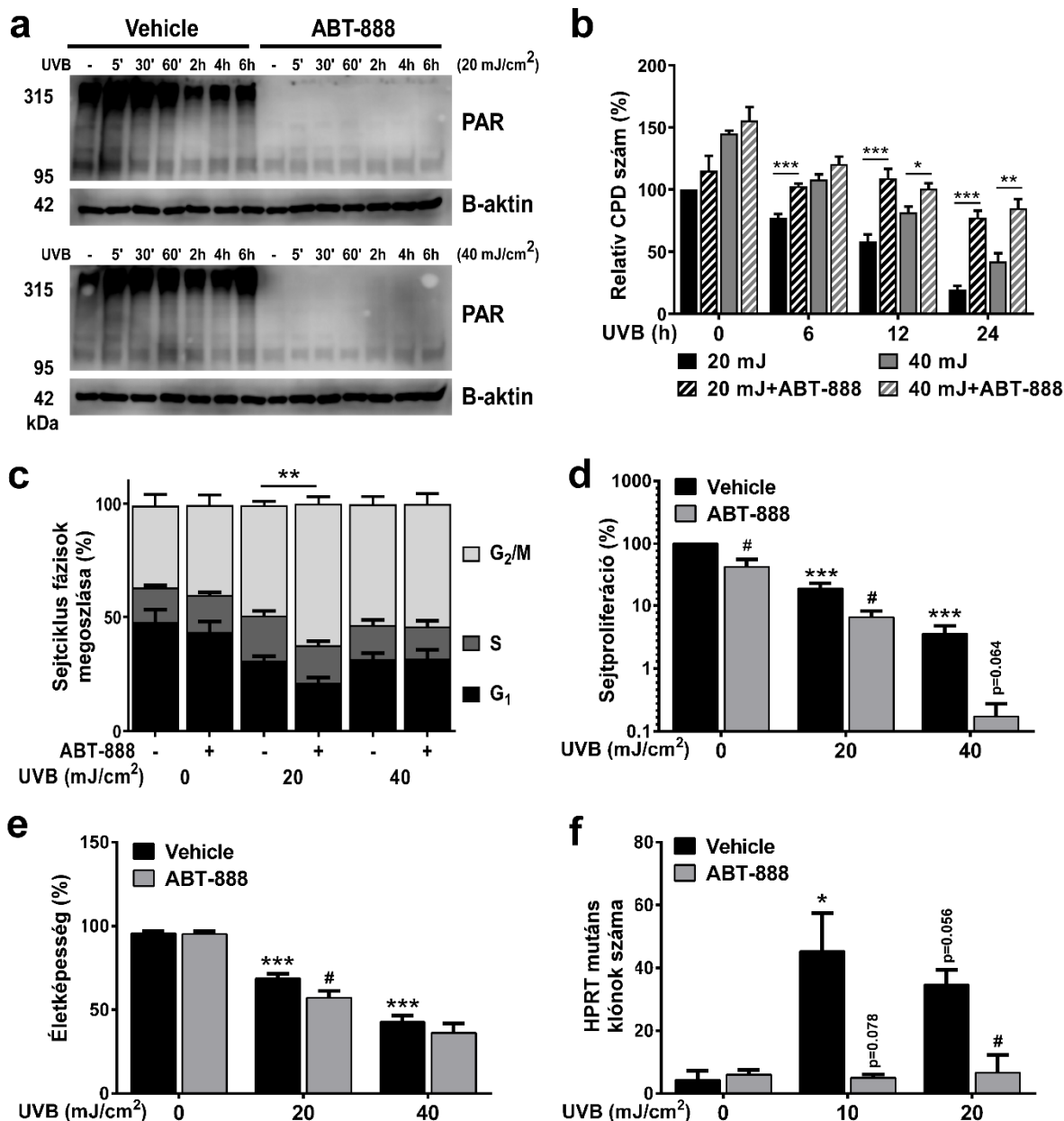
## 6.25. Statisztikai analízis

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 az átlag ± az átlag standard hibájaként (SEM) ábrázoltunk. Az eredményeket  $p < 0.05$  tekintettük szignifikánsnak. A statisztikai szignifikanciák meghatározását GraphPad Prism 7 (GraphPad Software Inc., San Diego, California, Amerikai Egyesült Államok) és SPSS 25 szoftverrel (SPSS package for Windows, Release 25.; SPSS, Chicago, Illinois, Amerikai Egyesült Államok) végeztük.

## 7. EREDMÉNYEK

### 7.1. A Poli(ADP-ribóz) polimeráz 1 (PARP1) gátlása fokozza az UVB-indukált DNS károsodást

Munkánk első felében az UVB sugárzás által indukált DNS károsodás és a mitokondriális metabolizmus közötti kapcsolat feltérképezését tűztük ki célul. Humán immortalizált (HaCaT) keratinocitákon vizsgáltuk az UVB sugárzás PARilációra kifejtett hatását két eltérő dózisu (20 vagy 40 mJ/cm<sup>2</sup>) UVB irradiációt követően. Már az UVB expozíciót követő első öt percben megfigyelhető 95 kDa fölött a PAR polimer megjelenése (8/a ábra). 40 mJ/cm<sup>2</sup> UVB dózis mellett nagyobb PARilációs jelet detektáltunk, mely a PARP1 fehérje dózisufüggő aktiválódására utal UVB besugárzást követően. Amennyiben a potens PARP1 inhibitort, ABT-888-t használtunk, a PARP1 aktivációja UVB mellett is gátolható volt. A PARP1 központi szerepet játszik a DNS repair útvonalak koordinálásában [195], ezért megvizsgáltuk, hogy a PARP1 gátlása hogyan befolyásolja az UVB-re keletkező fotoliéziók, a CPD-k eltávolítását. UVB besugárzást követően dózis- és időfüggő módon a CPD-k nukleotid excíziós repair rendszer aktivitásától függő lassú eltávolítása volt megfigyelhető (8/b ábra). Ezzel szemben a PARP gátló alkalmazása szignifikánsan lassította a CPD-k eltávolítását, mely arra enged következtetni, hogy a NER hatékony működéséhez elengedhetetlen a PARP1 fehérje katalitikus aktivitása. A ki nem javított fotoliéziók a DNS károsodással bíró sejtek mitózisba való lépését gátolhatják [196], ezért vizsgáltuk az egyes sejtciklus fázisok megoszlását. UVB hatására a keratinociták G<sub>2</sub>/M fázisban való feldúsulását tapasztaltuk (8/c ábra), mely PARP gátló hatására további emelkedést mutatott 20 mJ/cm<sup>2</sup> UVB dózis mellett. Ezzel együtt a PARP1 gátlása érzékenyítette a sejteket UVB besugárzásra, mely a keratinociták csökkent proliferációjában (8/d ábra) és viabilitásában (8/e ábra) nyilvánult meg. Mivel ABT-888 kezelés mellett fokozott fotoszenzitív választ figyeltünk meg, ezért kíváncsiak voltunk, hogy a PARP gátlás után tapasztalt fokozott DNS károsodás hajlamosít-e mutációk kialakulására. A HaCaT sejtek nagyon jól tolerálták a HPRT mutációs assay-nél használt 6-tioguanin szelektív médiumot, ezért szakirodalmi adatok alapján [197-199] CHO sejteket használtunk alternatívaként. UVB-re a HPRT mutáns klónok számának az emelkedését tapasztaltuk (8/f ábra), azonban a várakozásainkkal ellentétben a PARP1 gátlása az UVB-indukált mutációs ráta jelentős csökkenését okozta. Ezek az adatok azt mutatják, hogy habár a PARP gátlószer fotoszenzitív választ vált ki keratinocitákban, fokozott karcinogenezisre való hajlamot nem tudunk kimutatni.



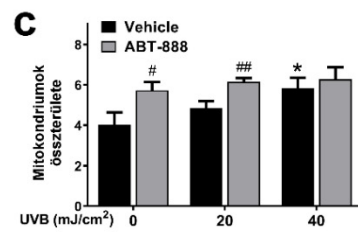
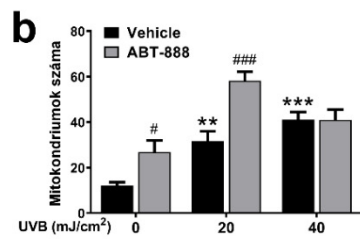
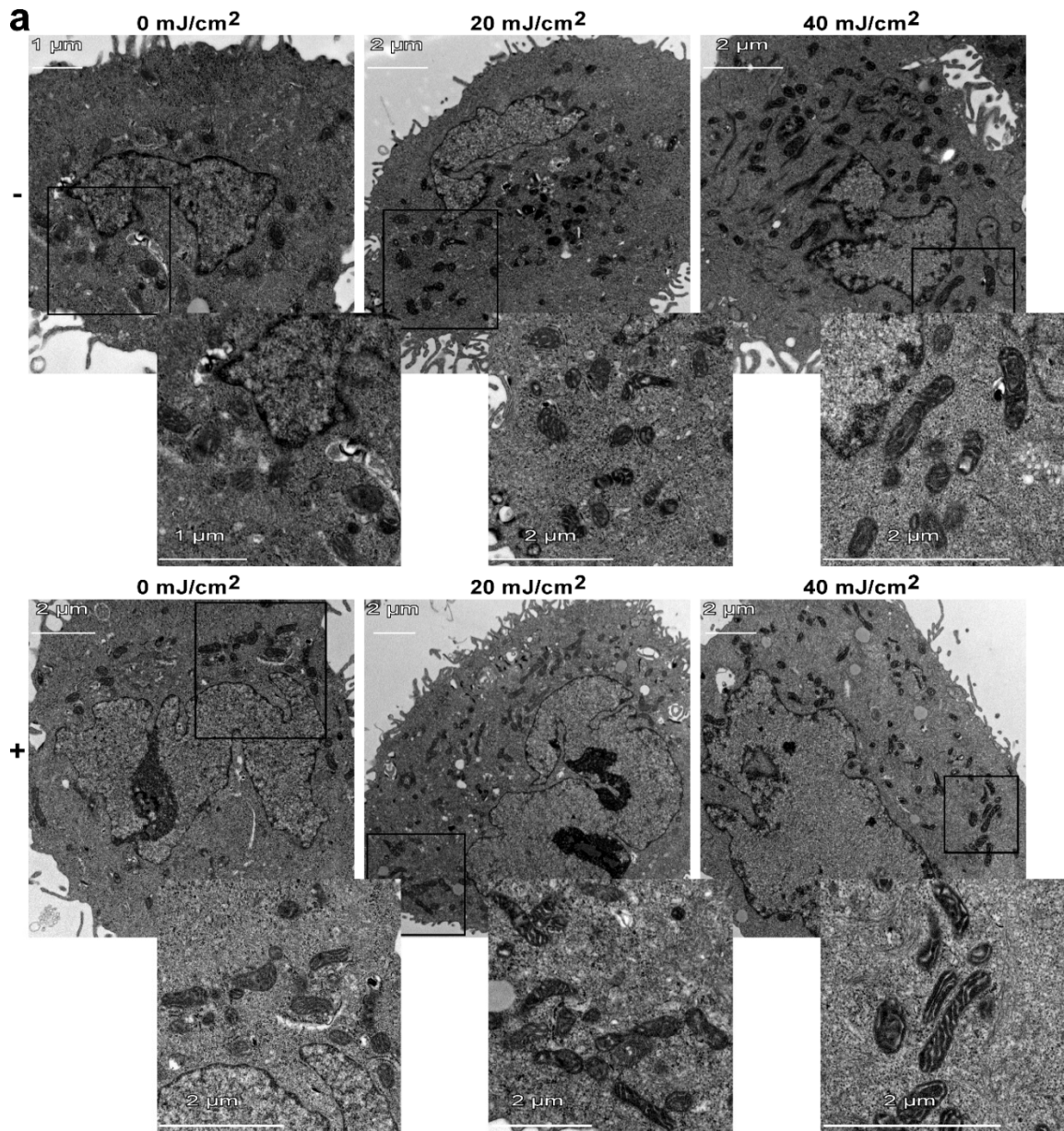
**8. ábra. A Poli(ADP-ribóz) polimeráz 1 (PARP1) gátlása fokozza az UVB-indukált DNS károsodást.**

(a) PARP aktivitás (PAR) időfüggésének meghatározását western blottal végeztük 20 és 40 mJ/cm<sup>2</sup> UVB expozíciót, valamint 25 μM ABT-888 kezelést követően (n=3). A feltüntetett időpontok az UVB besugárzás után eltelt időintervallumokat jelentik. A képeken kontraszt és fényerő korrekciót végeztünk. (b) A keratinocitákat 20 vagy 40 mJ/cm<sup>2</sup> UVB dózissal besugarastuk, majd különböző időpontokban DNS-t izoláltunk. A feltüntetett időpontok az UVB besugárzás után eltelt időintervallumokat jelentik. A CPD-k relatív mennyiségének meghatározását ELISA-val végeztük (n=4). (c) A sejtciklus fázisok megoszlását 24 órával UVB irradiációt követően propidium-jodidos festéssel áramlási citometriával határoztuk meg (n=4). (d) A sejtek proliferációjának meghatározását klonogén assay-vel végeztük 10 nappal az UVB irradiációt követően (n=4). (e) A sejtek viabilitását Alexa-488 konjugált Annexin V és

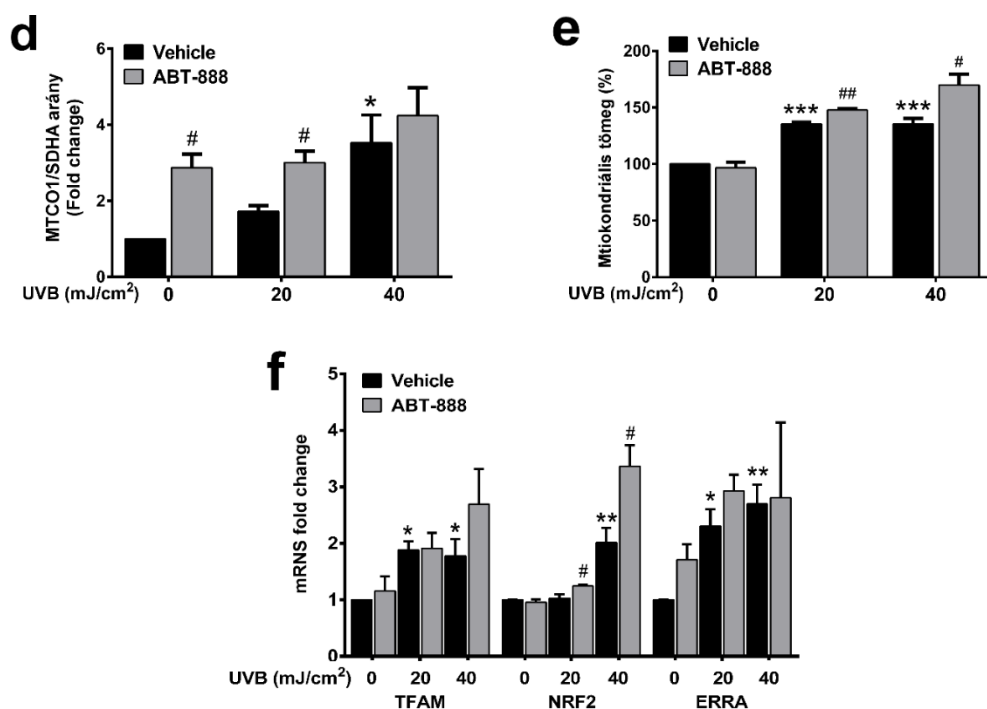
PI kettős festéssel elemeztük. A dupla negatív sejteket tekintettük életképesnek ( $n=5$ ). **(f)** A HPRT mutációs assay-t CHO tenyészetben végeztük. A sejteket 10 napig tartottuk UVB besugárzást követően szelektációs médiumban ( $n=3$ ). Az adatokat átlag  $\pm$  az átlag standard hibájaként (SEM) ábrázoltuk. \*, \*\* és \*\*\* jelöli a statisztikailag szignifikáns különbségeket a nem irradiált és az UVB besugárzásnak kitett minták között, ahol  $p<0.05$ ,  $p<0.01$  és  $p<0.001$ . #, ## és ### jelöli a statisztikailag szignifikáns különbségeket a vehicle kontroll és az ABT-888 kezelt minták között, ahol  $p<0.05$ ,  $p<0.01$  és  $p<0.001$ . A szignifikancia meghatározását egyszempontos varianciával (one-way ANOVA) végeztük, melyet Sidak's-féle post-hoc analízissel egészítettünk ki.

## 7.2. A PARP1 gátlása fokozza az UVB-okozta mitokondriális biogenezist

Irodalmi adatok arról számolnak be, hogy a DNS károsodás szoros összefüggést mutat a mitokondriális biogenezissel [91, 180, 200], mely folyamat során különböző transzkripciós faktorok aktiválódásával, a mitokondriális és magi gének koordinált expressziójával új mitokondriumok szintézise történik [73]. Transzmissziós elektronmikroszkópiával (TEM) vizsgálva a mitokondriumok ultrastruktúráját azt tapasztaltuk, hogy UVB besugárzásra a mitokondriumok strukturáltabb szerkezetet vesznek fel az UVB irradiációnak ki nem tett sejtekhez képest. Ez a jelenség még inkább megfigyelhető volt a PARP gátlószer alkalmazása után (9/a ábra). A mitokondriális szerkezet változása mellett a mitokondriumok számában (9/b ábra) és összterületében (9/c ábra) is emelkedést tapasztaltunk UVB besugárzást követően. A PARP1 gátlása itt is szignifikáns emelkedés okozott a nem irradiált és a  $20 \text{ mJ/cm}^2$ -os UVB-exponált mintákhoz képest. Mivel a sejtek mitokondriális tartalma igen dinamikusan változik a mitokondriális biogenezis és a mitofágia, mint két egymás ellen ható folyamat arányától, ezért direkt mitokondriális biogenezisre utaló markereket kerestünk eredményeink megerősítéséhez. Western blottal vizsgáltuk a mitokondriális genom által kódolt mitokondriális citokróm C oxidáz I (MTCO1) és a magi DNS által kódolt szukcinát dehidrogenáz A alegységének (SDHA) fehérje expresszióját, valamint áramlási citométerrel analizáltuk a mitokondriális tömeget. Eredményeink az MTCO1/SDHA arányának (9/d ábra), valamint a mitokondriális tömeg (9/e ábra) emelkedéséről számolnak be. A PARP1 gátlószer alkalmazása ebben az esetben is potenciózta ezeket a változásokat. Emellett a mitokondriális biogenezisre ható transzkripciós faktorok génexpressziós vizsgálatával igazoltuk a mitokondriális transzkripciós faktor A (TFAM), a magi respirációs faktor 2 (NRF2) és az ösztrogén receptor alfa izoformájának (ERRA) szerepét az UVB és a PARP1 inhibitor okozta mitokondriális biogenezis közvetítésében (9/f ábra). Ezeket az adatokat figyelembe véve elmondható, hogy aktív mitokondriális biogenezis zajlik UVB irradiációt követően, melyet a PARP1 gátlása tovább erősít.



(A 9. ábra a következő oldalon folytatódik)

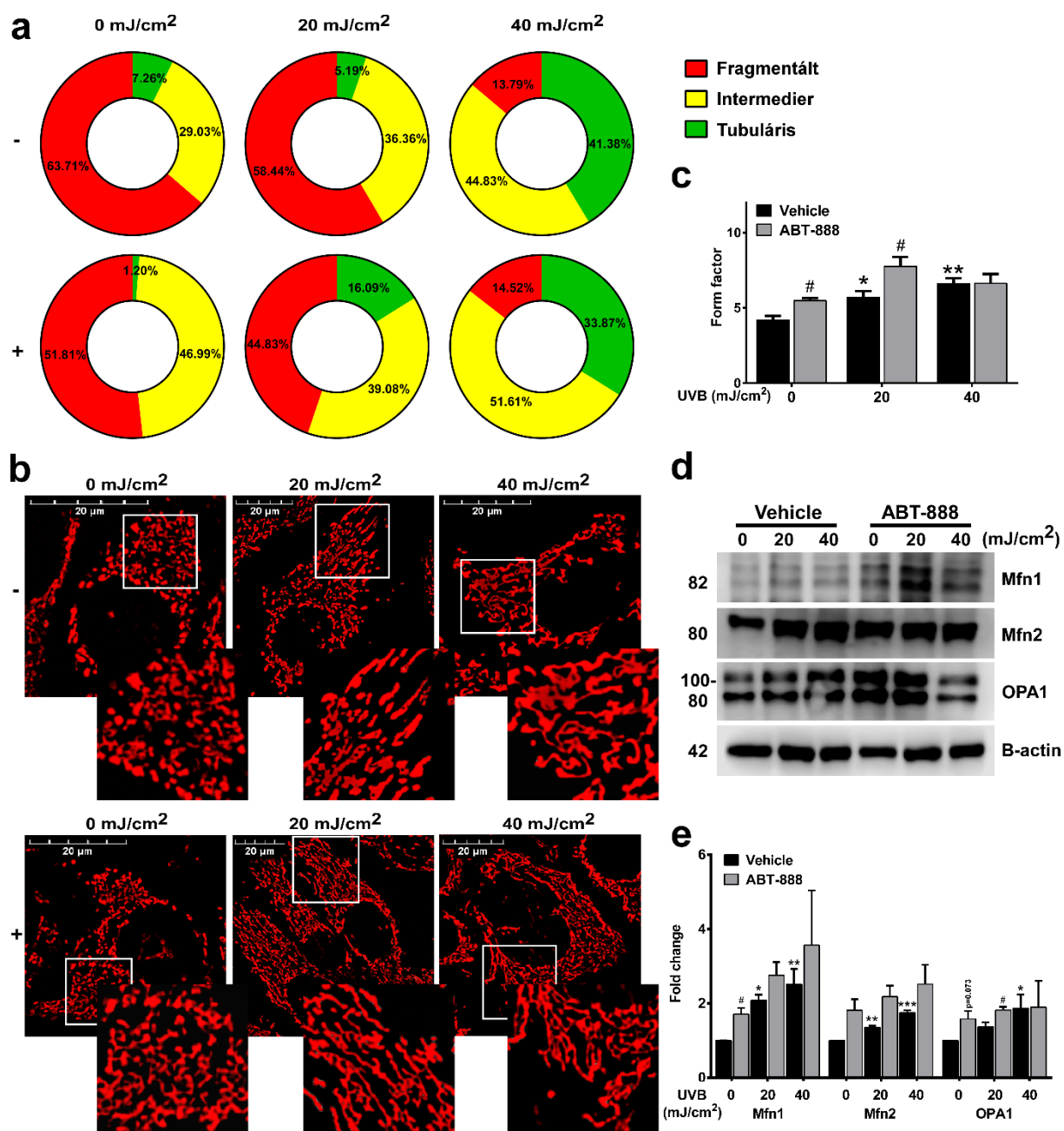


**9. ábra.** A PARP1 gátlása fokozza az UVB-okozta mitokondriális biogenezist. (a) Transzmissziós elektronmikroszkópiával (TEM) vizsgáltuk az UVB és a PARP gátlás hatását a mitokondriális ultrastruktúrára. A kinagyított képeket a jobb alsó sarokban jelenítettük meg. A mitokondriumok (b) számát és (c) területét a TEM képekből számoltuk ( $n \geq 7$ ) (d) az MTCO1/SDHA arányát western blotlalt határoztuk meg ( $n=3$ ). A sávokat denzitometráltuk, az MTCO1 expressziójára kapott értékeket pedig az SDHA háztartási fehérjére normalizáltuk (e) a mitokondriális tömeget a Mitotracker Green fluoreszcencia intenzitásából áramlási citometriával határoztuk meg ( $n=3$ ). (f) a mitokondriális biogenezist irányító transzkripciós faktorok mRNA expresszióját valós idejű PCR-rel vizsgáltuk ( $n \geq 3$ ). -/+ jelöli a Vehicle kontrollt, illetve az ABT-888 kezelt mintákat. Az adatokat átlag  $\pm$  az átlag standard hibájaként (SEM) ábrázoltuk. \*, \*\* és \*\*\* jelöli a statisztikailag szignifikáns különbségeket a nem irradiált és az UVB besugárzásnak kitett minták között, ahol  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  és  $p < 0.001$ . #, ## és ### jelöli a statisztikailag szignifikáns különbségeket a vehicle kontroll és az ABT-888 kezelt minták között, ahol  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  és  $p < 0.001$ . A szignifikancia meghatározását egyszempontos varianciával (one-way ANOVA) végeztük, melyet Sidak's-féle post-hoc analízissel egészítettünk ki.

### 7.3. A PARP1 gátlása fokozza az UVB-indukált mitokondriális fúziót

Mivel a TEM során kapott ultravékony metszetek nem mindig alkalmasak a mitokondriális hálózat összetettségének megállapítására, ezért konfokális mikroszkópiával vizsgáltuk a mitokondriális hálózat szerkezetét. A mitokondriális hálózat hosszúsága és elágazódási képessége alapján 3 morfológiai altípust különítettünk el: fragmentált, intermedier és tubuláris mitokondriumokat. Az UVB irradciónak ki nem tett sejtekben a dominánsan jelenlévő mitokondriális típus a fragmentált forma volt. Növekvő UVB dózis mellett megfigyelhető a

fragmentált forma csökkenése, valamint az intermedier és a tubuláris mitokondriális altípusok gyakoriságának emelkedése, mely  $40 \text{ mJ/cm}^2$  UVB dózis mellett mutatott legjelentősebb változást (10/a, b ábra). A PARP1 gátlószer önmagában is emelte az intermedier mitokondriális formát,  $20 \text{ mJ/cm}^2$  UVB dózis mellett pedig csökkentette a fragmentált, valamint emelte a tubuláris mitokondriumok számát. Az UVB, valamint az ABT-888 mitokondriális hálózatra gyakorolt hatását az úgynevezett „form factor” is megerősíti, mely a mitokondriumok elágazódási képességét tükrözi (10/c ábra). Végül western blottal vizsgáltuk a mitokondriális fúziót támogató Mfn1, Mfn2 és az OPA1 fehérjék kifejeződését. Mindhárom fehérje emelkedett expressziót mutatott UVB hatására, melyet a PARP1 gátlása tovább fokozott (10/d, e ábra). Fehérje expressziós eredményeink összhangban állnak a konfokális mikroszkópia során tapasztalt változásokkal, ami azt sugallja, hogy a PARP1 gátlása fokozza az UVB irradiáció hatására bekövetkező mitokondriális fúziót, melynek hátterében a fúzióért felelős fehérjék fokozott kifejeződése állhat.



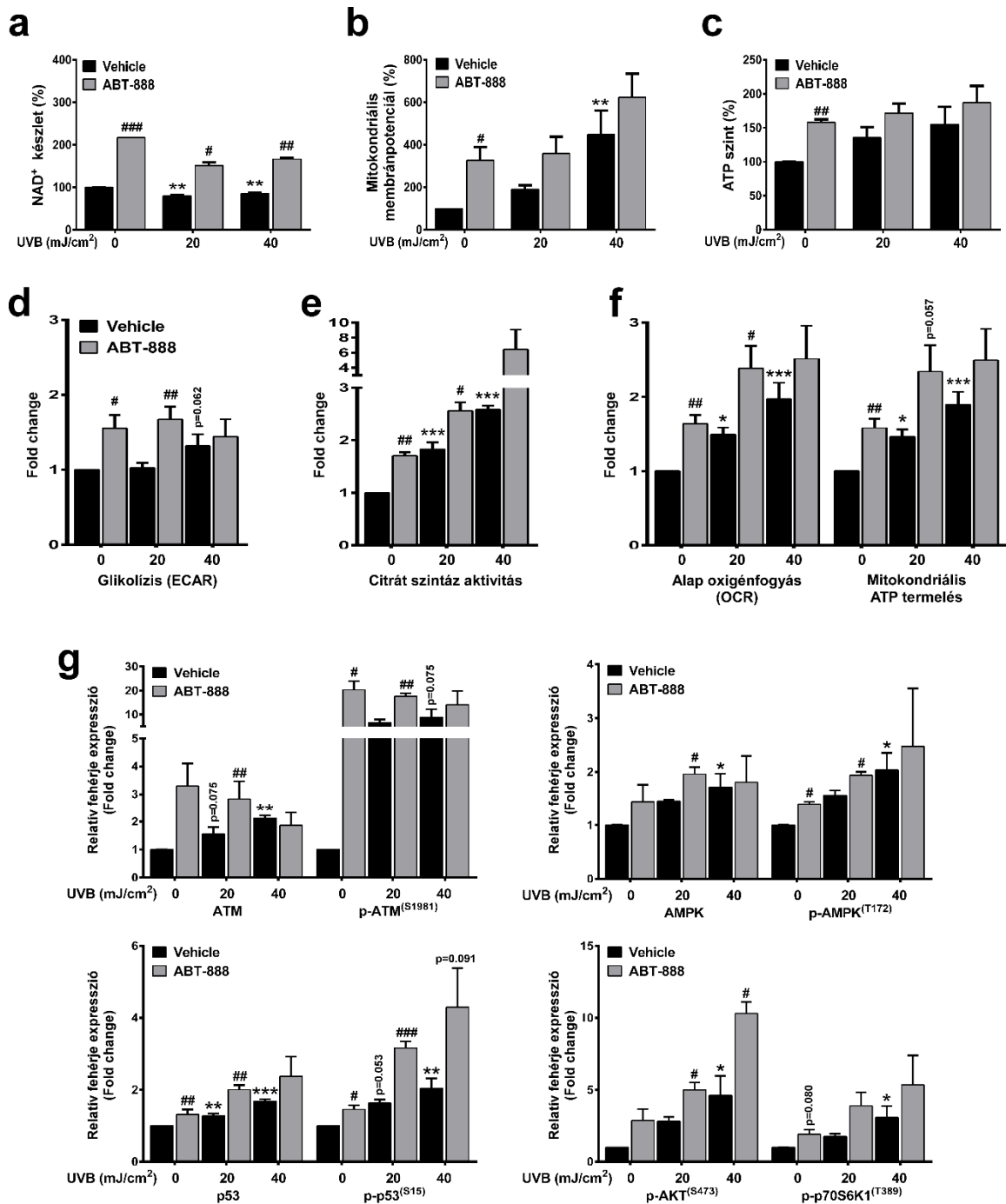
**10. ábra. A PARP1 gátlása fokozza az UVB-indukált mitokondriális fúziót. (a)** A PARP1 gátlás és az UVB hatása az egyes mitokondriális morfológiai altípusokra (fragmentált, intermediér, tubuláris) ( $n \geq 29$  sejt). **(b)** A mitokondriális morfológiát konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk Mitotracker Red CMXRos festéssel ( $n=3$ ). A nagyított képeket a jobb alsó sarokban jelenítettük meg. **(c)** A mitokondriális hálózat elágazódási képességét a konfokális mikroszkópos képekből számoltuk és form faktorként jelöltük ( $n=3$ ). **(d)** A mitokondriális fúzióért felelős Mfn1, Mfn2 és OPA1 fehérjéket western blottal vizsgáltuk. **(e)** A sávokat denzitometráltuk, a kapott értékeket pedig a  $\beta$ -aktin háztartási fehérjére normalizáltuk.  $-/+$  jelöli a Vehicle kontrollt, illetve az ABT-888 kezelt mintákat. Az adatokat átlag  $\pm$  az átlag standard hibájaként (SEM) ábrázoltuk. \*, \*\* és \*\*\* jelöli a statisztikailag szignifikáns különbségeket a nem irradiált és az UVB besugárzásnak kitett minták között, ahol  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  és  $p < 0.001$ . #, ## és ###

jelöli a statisztikailag szignifikáns különbségeket a vehicle kontroll és az ABT-888 kezelt minták között, ahol  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  és  $p < 0.001$ . A szignifikancia meghatározását egyszempontos varianciavizsgálattal (one-way ANOVA) végeztük, melyet Sidak's-féle post-hoc analízissel egészítettünk ki. Az **a** panelen  $\chi^2$  vagy Fisher-féle egzakt teszttel határoztuk meg az egyes mitokondriális morfológiai altípusok gyakoriságát.

#### **7.4. A PARP1 gátlása fokozza az UVB-okozta mitokondriális metabolizmust**

A mitokondriális hálózat morfológiai változásai szigorúan koordináltak intra-és extracelluláris szignáloknak, valamint környezeti hatásoknak megfelelően [201, 202], melyek a mitokondriális biogenezist [203] és fúziót [204, 205] a mitokondriumok funkcionális változásaival hangolják össze. Habár gyakran megfigyelhető, hogy a fragmentált mitokondriumok alacsony [206], míg a fuzionált hálózat magas [205] metabolikus aktivitással rendelkezik, előfordul, hogy a mitokondriumok aktivitása és morfológiája között nem találnak összefüggést [207, 208]. Megvizsgáltunk több, a mitokondriumok aktivitását tükröző paramétert, hogy a kísérleti rendszerünkben tapasztalt mitokondriális hálózat reorganizációja a mitokondriális aktivitás emelkedésével társul-e. A sejtek redox potenciálját is befolyásoló  $\text{NAD}^+$  szint vizsgálatánál azt tapasztaltuk, hogy UVB hatására minimálisan, ugyanakkor szignifikánsan csökken a sejtek  $\text{NAD}^+$  szintje (11/a ábra). A PARP1 gátlása nem csak ellensúlyozta az UVB-okozta  $\text{NAD}^+$  depléciót, de önmagában is jelentősen emelte a  $\text{NAD}^+$  mennyiségét. Ezzel szemben, a mitokondriális aktivitást tükröző mitokondriális membránpotenciál (11/b ábra) és ATP szint (11/c ábra) jelentősen emelkedett UVB besugárzás hatására, melyet a PARP1 gátlása tovább erősített. Mindazonáltal figyelembe kell venni, hogy mindkét paraméter egymástól függetlenül is változhat, és nem feltétlenül tükrözi a sejtek metabolikus állapotát. Az  $\text{F}_0\text{F}_1$  ATP szintetáz (légzési lánc V-ös komplex) gátlása pl. jelentősen csökkenti a sejtek ATP termelését, ami a proton gradiens gátlása révén mitokondriális membrán hiperpolarizációt okoz [209]. Az ATP szint is dinamikusan emelkedhet a fokozott oxidatív foszforiláció (OXPHOS) vagy a csökkent ATP felhasználás miatt. Éppen ezért valós idejű metabolikus fluxus vizsgálattal egészítettük ki eredményeinket, ahol az ECAR a glikolízis aktivitásáról, az OCR pedig az OXPHOS aktivitásáról ad információt. Habár a glikolízis aktivitása csak minimálisan változott 40  $\text{mJ}/\text{cm}^2$  UVB dózis mellett (11/d ábra), a PARP1 gátlószer szignifikánsan fokozta a glikolízist. Ezzel szemben az alap OXPHOS és a mitokondriális ATP termelés UVB hatására is dóziszfüggő módon emelkedett (11/f ábra). A Szent-Györgyi-Krebs ciklus (citrátkör) első lépését katalizáló citrát-szintáz (CS) enzim aktivitása az OXPHOS-hoz hasonlóan emelkedett UVB irradiáció hatására (11/e ábra). A PARP1 gátlása mind az CS, mind az OXPHOS aktivitását markánsan

növelte 0 és 20 mJ/cm<sup>2</sup> UVB dózis mellett. Végül irodalmi adatok alapján megvizsgáltunk több olyan fehérje expresszióját, melyek összehangolhatják az UVB-indukált DNS károsodást a lebontó folyamatok aktiválódásával. Szerepükkel összhangban az ATM, az AMPK, a p53, az AKT és a p70S6K1 foszforilációjának emelkedését tapasztaltuk dóziszfüggő módon UVB irradációt követően, melyet a PARP1 gátlása a legtöbb esetben szignifikánsan fokozott (11/g ábra). A fehérjék foszforilációs állapotának emelkedése az adott protein aktivitásának emelkedését, az oxidatív anyagcsere fokozódását jelentik. Ezek az adatok arra engednek következtetni, hogy valóban a katabolikus folyamatok felerősödése okozza az ATP szint emelkedését, illetve nem csak a mitokondriális légzési lánc disztális része mutat növekvő aktivitást UVB és PARP gátlószer mellett, hanem az OXPHOS indukcióját a citrátkör aktivitásának emelkedése előzi meg. Ezeknek a mitokondriális változásoknak a közvetítésében játszhatnak szerepet az ATM, AMPK, p53, AKT és p70S6K1 útvonalak aktiválódása.

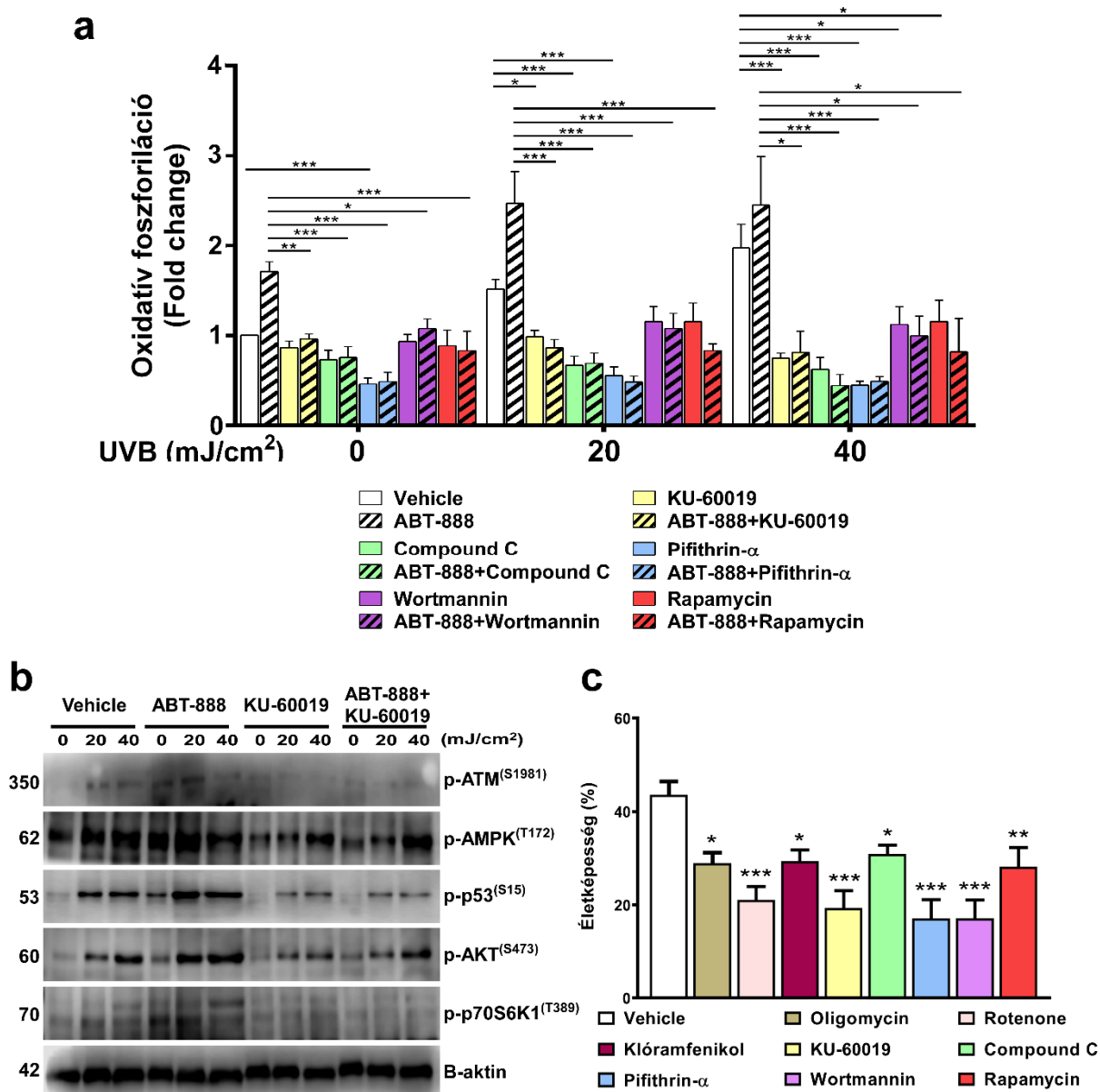


**11. ábra.** A PARP1 gátlása fokozza az UVB-okozta mitokondriális metabolizmust. (a) A sejtek NAD<sup>+</sup> tartalmát kolorimetriás assay-vel határoztuk meg 24 órával UVB besugárzást követően. Az abszorbanciát 490 nm-en mértük (n=2). (b) 3,3'-dihexil-oxakarbocianin jodid [DiOC<sub>6</sub>(3)] festéssel, áramlási citometriával mértük a sejtek mitokondriális membránpotenciálját (n=4). (c) A keratinociták ATP készletét kolorimetriás assay-vel határoztuk meg (n=3). A (d) glikolízis és a (f) az oxidatív foszforiláció, valamint a mitokondriális ATP termelés meghatározását Seahorse XF96 készülékkel végeztük (n=6). (e) A Szent-Györgyi-Krebs ciklus (citrátkör) aktivitását kolorimetriás assay-vel vizsgáltuk (n=3). (g) Az oxidatív foszforilációt szabályozó fehérjék mennyiségi kimutatását western blottal végeztük. A sávokat denzitometráltuk, a kapott értékeket pedig a β-aktin háztartási fehérjére

normalizáltuk ( $n \geq 3$ ). Az adatokat átlag  $\pm$  az átlag standard hibájaként (SEM) ábráztuk. \*, \*\* és \*\*\* jelöli a statisztikailag szignifikáns különbségeket a nem irradiált és az UVB besugárzásnak kitett minták között, ahol  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  és  $p < 0.001$ . #, ## és ### jelöli a statisztikailag szignifikáns különbségeket a vehicle kontroll és az ABT-888 kezelt minták között, ahol  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  és  $p < 0.001$ . A szignifikancia meghatározását egyszempontos varianciával (one-way ANOVA) végeztük, melyet Sidak's-féle post-hoc analízissel egészítettünk ki.

### **7.5. Az anti-apoptotikus hatású oxidatív foszforiláció ATM, AMPK, p53, PI3K1 és mTOR-függő módon szabályozódik UVB után**

Az ATM, AMPK, p53, PI3K1 (AKT upstream) és p70S6K1 (mTOR downstream) fehérjék oxidatív foszforilációban betöltött szerepének igazolására, az adott fehérje specifikus inhibitorával valós idejű metabolikus fluxus vizsgálatot végeztünk a 11/f ábrához hasonlóan. ATM inhibitoraként KU-60019, AMPK gátlószereként compound C-t, p53 inhibitoraként pifithrin-alpha-HBr-ot alkalmaztunk. A PI3K1 és az mTOR útvonalak aktivációját wortmanninal vagy rapamicinnel gátoltuk. Az általunk vizsgált fehérjék gátlása során azt tapasztaltuk, hogy az UVB irradiáció, valamint a PARP gátlószertellett megfigyelt emelkedett OCR értékek a nem irradiált csoportnak megfelelő szintre csökkentek (12/a ábra). Ezek az adatok arra engednek következtetni, hogy az UVB és az ABT-888 kezelés mellett jelentkező fokozott fehérje expresszió és foszforiláció aktívan részt vesznek az UVB sugárzás-indukált oxidatív anyagcsere elindításában. A PARP1 mellett az ATM fehérjét tekintik az egyik kulcsszereplőnek a DNS károsodás felismerésében és a DNS hibajavítás elindításában [210]. Az ATM gátlása hatékonyan csökkentette az AMPK, p53, AKT és a p70S6K1 fehérjék foszforilációját az UVB, valamint az UVB+PARP inhibitor kezelt csoportban egyaránt (12/b ábra). Ez azt sugallja, hogy az ATM fehérje az AMPK, p53, AKT és az mTOR útvonalak aktivációján keresztül vezet az UVB és PARP1 gátló mellett tapasztalt OXPHOS emelkedéséhez. A fokozott mitokondriális bioenergetika egy adaptív válasz része lehet, mellyel az UVB-irradiált keratinociták a DNS hibajavítás ATP igényét próbálják fedezni. Ennek a feltételezésnek a bizonyításához olyan gátlószereket alkalmaztunk, melyek irodalmi adatok alapján hatékonyan gátolják a V-ös komplex (oligomicin) [211] és az I-es komplex [212] aktivitását (rotenon), csökkentik a mitokondriális biogenezist (klóramfenikol) [213] vagy a mi kísérleti rendszerünkben az OXPHOS aktivitását szignifikánsan csökkentették (KU-60019, compound C-t, pifithrin-alpha-HBr, wortmannin vagy rapamicin). Eredményeink azt mutatják, hogy bármely, a fokozott mitokondriális aktivitás ellen ható gátlószertellett az UVB-irradiált sejtek életképességének a csökkenését okozta (12/c ábra), mely arra utal, hogy az UVB-indukált OXPHOS adaptív és anti-apoptotikus hatással bír.

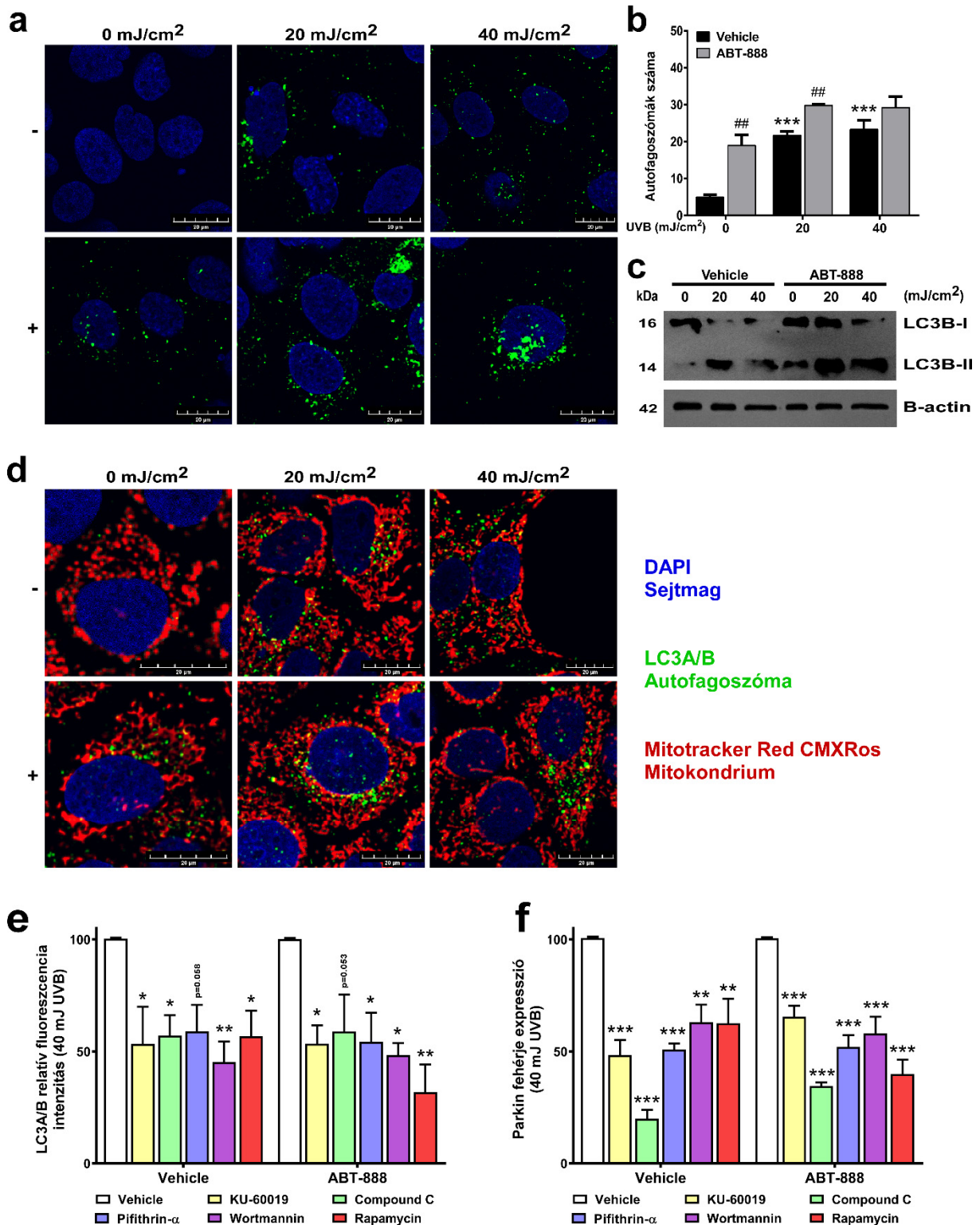


**12. ábra.** Az anti-apoptotikus hatású oxidatív foszforiláció ATM, AMPK, p53, PI3K1 és mTOR-függő módon szabályozódik UVB után. (a) Az oxidatív foszforilációt szabályzó fehérjék vizsgálatához ATMi (KU-60019), AMPKi (Compound C), p53i (Pifithrin- $\alpha$ -HBr), PI3K1i (Wortmannin) és mTORi (Rapamycin) került adott koncentrációban a médiumba majd az oxigénfogyást a 11/f ábrához hasonlóan végeztük ( $n \geq 3$ ). (b) Az ATM-függő útvonalak meghatározását western blottal végeztük ( $n = 3$ ). A képeken kontraszt és fényerő korrekció történt. (c) A sejtek életképességének a meghatározását a 8/e ábránál leírtakhoz hasonlóan végeztük. 40 mJ/cm<sup>2</sup> UVB besugárzás mellett oligomycin, rotenon, klóramfenikol, KU-60019, compound C, pifithrin- $\alpha$ -HBr, wortmannin valamint rapamicin került a médiumba adott koncentrációban ( $n \geq 4$ ). Az adatokat átlag  $\pm$  az átlag standard hibájaként (SEM) ábrázoltuk. \*, \*\* és \*\*\* jelöli a statisztikailag szignifikáns különbségeket, ahol  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  és  $p < 0.001$ . A szignifikancia meghatározását egyszempontos varianciával (one-way ANOVA) végeztük, melyet Sidak's-féle

*post-hoc* analízissel egészítettünk ki. A c panelen a szignifikanciát egyszempontos varianciával (one-way ANOVA) határoztuk meg, melyet Dunnett's-féle *post-hoc* analízissel egészítettünk ki.

## **7.6. Az UVB-indukált autofágia ATM, AMPK, p53, PI3K1 és mTOR-függő módon szabályozódik**

A DNS károsodásra adott celluláris válasznak fontos szerepe van a sérült sejtalkotók és a makromolekulák autofágia útján történő degradációjának elindításában [214]. Konfokális mikroszkópiával, valamint western blottal vizsgálva az autofágia egyik általános markerét (LC3) azt tapasztaltuk, hogy UVB-re emelkedik az LC3<sup>+</sup> vezikulumok (autofagoszómák) száma (13/a, b ábra) és az LC3B-II fehérje expressziója (13/c ábra). A PARP1 fehérje gátlása önmagában, valamint az UVB-irradiált mintákban is fokozta az autofágiát. Meglepő módon a mitokondrium szelektív degradációjára szolgáló mitofágia csak minimális emelkedést mutatott UVB és ABT-888 kezelés után (13/d ábra). Irodalmi adatok azt mutatják, hogy az autofágia indukciójával újrahaznosított makromolekulák metabolitokat szolgáltathatnak az OXPHOS hatékony működéséhez [215], így elképzelhető, hogy az 12/a részben a különböző inhibitorok mellett tapasztalt OXPHOS csökkenését az autofágia defektusa előzi meg. Az ATM, AMPK, p53, PI3K1 és mTOR útvonalak inhibitorait alkalmazva megvizsgáltuk az általános autofágiára specifikus LC3A/B és a mitofágiára specifikus PARKIN expressziót. Az egyes útvonalak gátlása során azt tapasztaltuk, hogy az LC3A/B (13/e ábra) és a PARKIN fehérjék (13/f ábra) mennyisége párhuzamosan csökkent, mely arra utal, hogy az autofágia és a mitofágia az oxidatív foszforilációhoz hasonlóan ATM, AMPK, p53, PI3K1 és mTOR-függő módon szabályozódnak UVB besugárzás után; felmerül tehát az autofágia oxidatív foszforilációt szabályzó szerepének lehetősége.

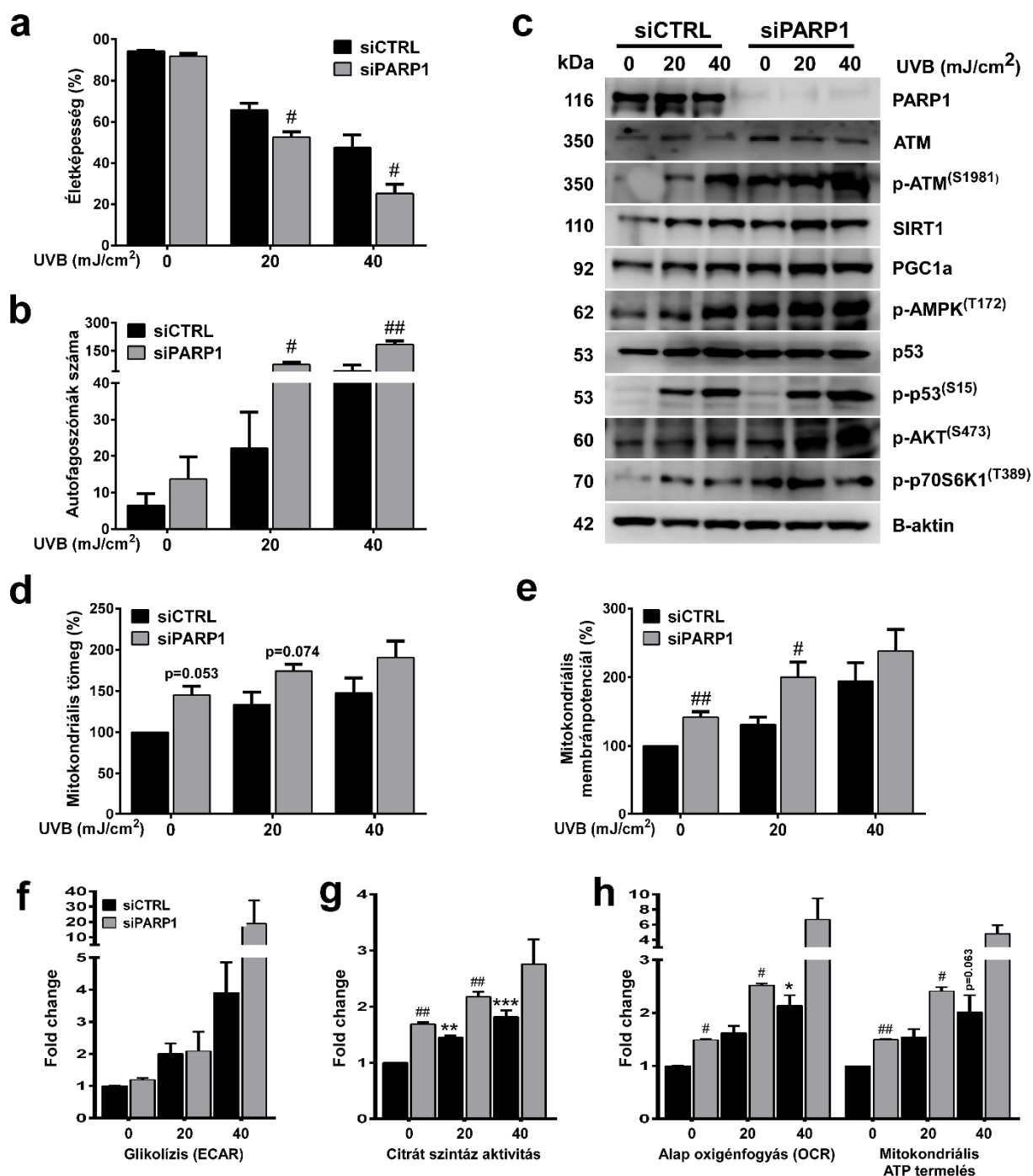


13. ábra. Az UVB-indukált autofágia ATM, AMPK, p53, PI3K1 és mTOR-függő módon szabályozódik. (a) Az autofágia indukcióját az LC3A/B fehérje expressziójának meghatározásával konfokális mikroszkópiával vizsgáltuk (n=3). (b) Az autofagoszómák számát a konfokális mikroszkópiával készült képekből származtattuk (n=3). (c) A LC3A/B fehérje expresszióját western blottal vizsgáltuk (n=3). A képeken kontraszt és fényerő korrekciót végeztünk. (d) A mitokondriumok és

az autofagoszómák kolokalizációját konfokális mikroszkópiával mutattuk ki (n=3). Az (e) autofágiát, valamint a (f) mitofágiát szabályzó fehérjék vizsgálatához ATMi (KU-60019), AMPKi (Compound C), p53i (Pifithrin- $\alpha$ -HBr), PI3K1i (Wortmannin) és mTORi (Rapamycin) került adott koncentrációban a médiumba majd 40 mJ/cm<sup>2</sup> UVB besugárzás mellett vizsgáltuk az LC3A/B és a PARKIN fehérje expresszióját (n=4). -/+ jelöli a Vehicle kontrollt, illetve az ABT-888 kezelt mintákat. Az adatokat átlag  $\pm$  az átlag standard hibájaként (SEM) ábrázoltunk. Az adatokat átlag  $\pm$  az átlag standard hibájaként (SEM) ábrázoltuk. \*, \*\* és \*\*\* jelöli a statisztikailag szignifikáns különbségeket, ahol  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  és  $p < 0.001$ . #, ## és ### jelöli a statisztikailag szignifikáns különbségeket a vehicle kontroll és az ABT-888 kezelt minták között, ahol  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  és  $p < 0.001$ . A szignifikancia meghatározását egyszempontos varianciával (one-way ANOVA) végeztük, melyet Sidak's-féle post-hoc analízissel egészítettünk ki.

### **7.7. A PARP1 csendesítése hasonló fenotípusbeli változásokat okoz, mint az ABT-888 kezelés**

Az ABT-888 egy potens, de nem szelektív PARP inhibitor, mely egyaránt képes gátolni a poli(ADP-riboziláz) aktivitással rendelkező PARP1 és PARP2 fehérjét [216]. Habár a totál PARiláció mindössze 10-15%-ért felelős a PARP2 fehérje, a többi 85-90%-ot a PARP1 katalitikus aktivitása adja [217, 218], szeretnénk volna megbizonyosodni arról, hogy a PARP1 gátlószert mellett tapasztalt molekuláris és celluláris változások nem az ABT-888 PARP2-re gyakorolt, esetleg „off-target”, azaz a PARP1 és PARP2 fehérje gátlása mellett jelentkező, de attól független hatásának köszönhető. PARP1 mRNS-re specifikus siRNS transzfekcióval igazoltuk a teljesség igénye nélkül, hogy a PARP1 fehérje hiánya csökkentette UVB mellett a sejtek életképességét (14/a ábra), fokozta az autofágiát (14/b ábra), a mitokondriális profilra jellemző fehérjék expresszióját (14/c ábra), emelte a mitokondriális biogenezist (14/d ábra) és a keratinociták metabolikus aktivitást (14/e, f, g, h ábra). Ezek alapján elmondható, hogy a PARP1 gátlásához használt ABT-888 hasonló fenotípusos változásokat hoz létre, mint a PARP1 fehérje csendesítése, vagyis a kísérleti rendszerünkben tapasztalt celluláris és molekuláris változások a PARP1, nem pedig a PARP2 fehérje gátlásának köszönhető.



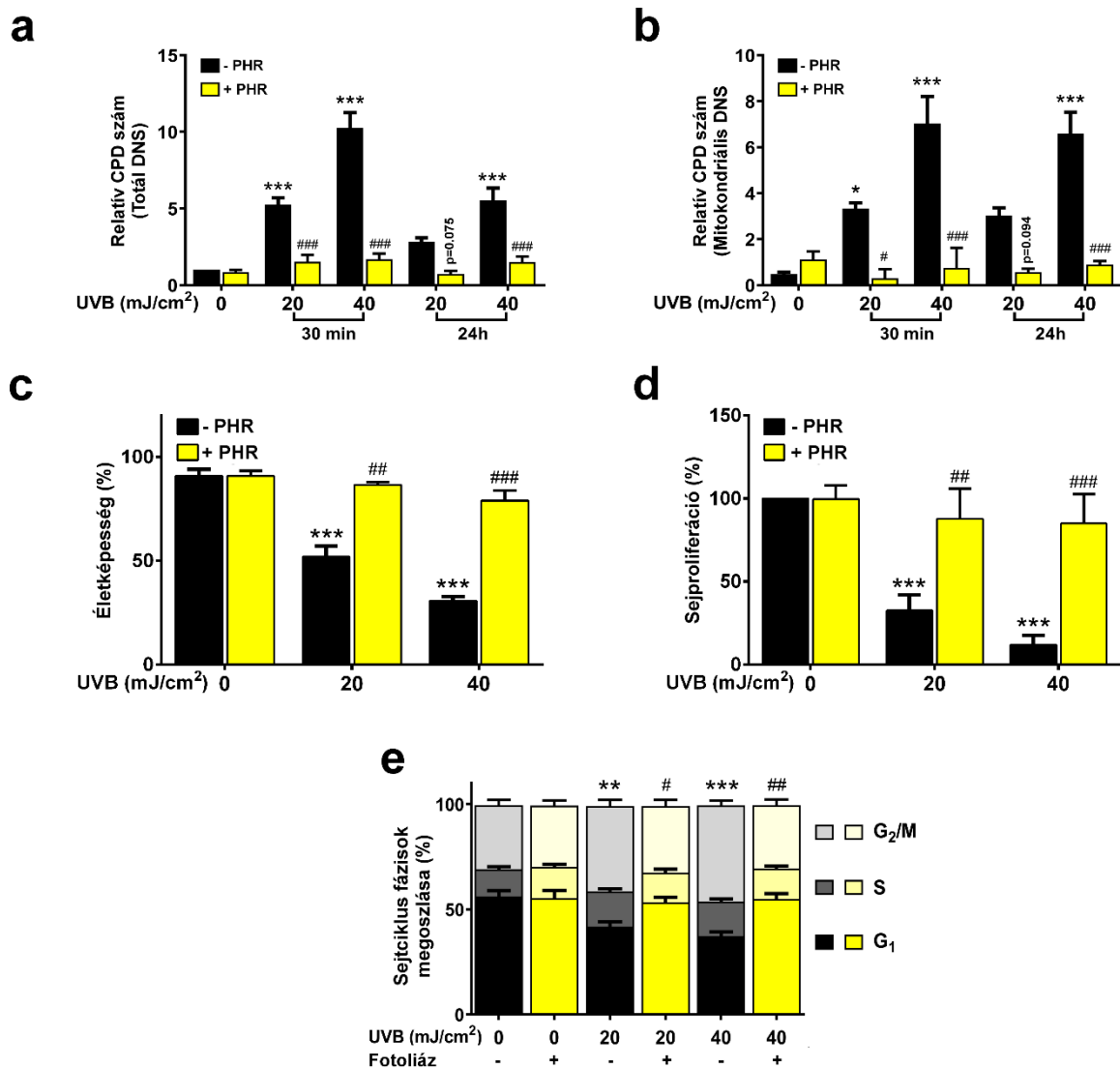
14. ábra. A PARP1 csendesítése hasonló fenotípusbeli változásokat okoz, mint az ABT-888 kezelés.

(a) A sejtek viabilitását áramlási citometriával a 8/e ábrához hasonlóan vizsgáltuk specifikus PARP1 siRNA transzfekcióval (n=3). (b) Az autofagoszómák jelölését LC3A/B festéssel végeztük, számukat a konfokális mikroszkópiával készült képekből származtattuk (n=4). (c) Az oxidatív foszforilációt szabályzó fehérjéket western blottal határoztuk meg (n=3). A képeken kontraszt és fényerő korrekciót végeztünk. A (d) mitokondriális tömeget és a (e) mitokondriális membránpotenciált áramlási citometriával követtük nyomon (n=4). A (f) glikolízist, valamint (h) az oxidatív foszforiláció és a mitokondriális ATP termelés meghatározását Seahorse XF96 készülékkel végeztük (n=2). (g) A Szent-

*Györgyi-Krebs ciklus (citrátkör) aktivitását kolorimetriás assay-vel határoztuk meg (n=3). Az adatokat átlag ± az átlag standard hibájaként (SEM) ábráztuk. \*, \*\* és \*\*\* jelöli a statisztikailag szignifikáns különbségeket a nem irradiált és az UVB besugárzásnak kitett minták között, ahol  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  és  $p < 0.001$ . # és ## jelöli a statisztikailag szignifikáns különbségeket a kontroll siRNS valamint a PARP1 siRNS-sel kezelt csoportok között, ahol  $p < 0.05$  és  $p < 0.01$ . A szignifikancia meghatározását egyszempontos varianciával (one-way ANOVA) végeztük, melyet Sidak's-féle post-hoc analízissel egészítettünk ki.*

### **7.8. A fotoliáz aktivációja gátolja az UVB-okozta DNS károsodást és visszaállítja a sejtek életképességét**

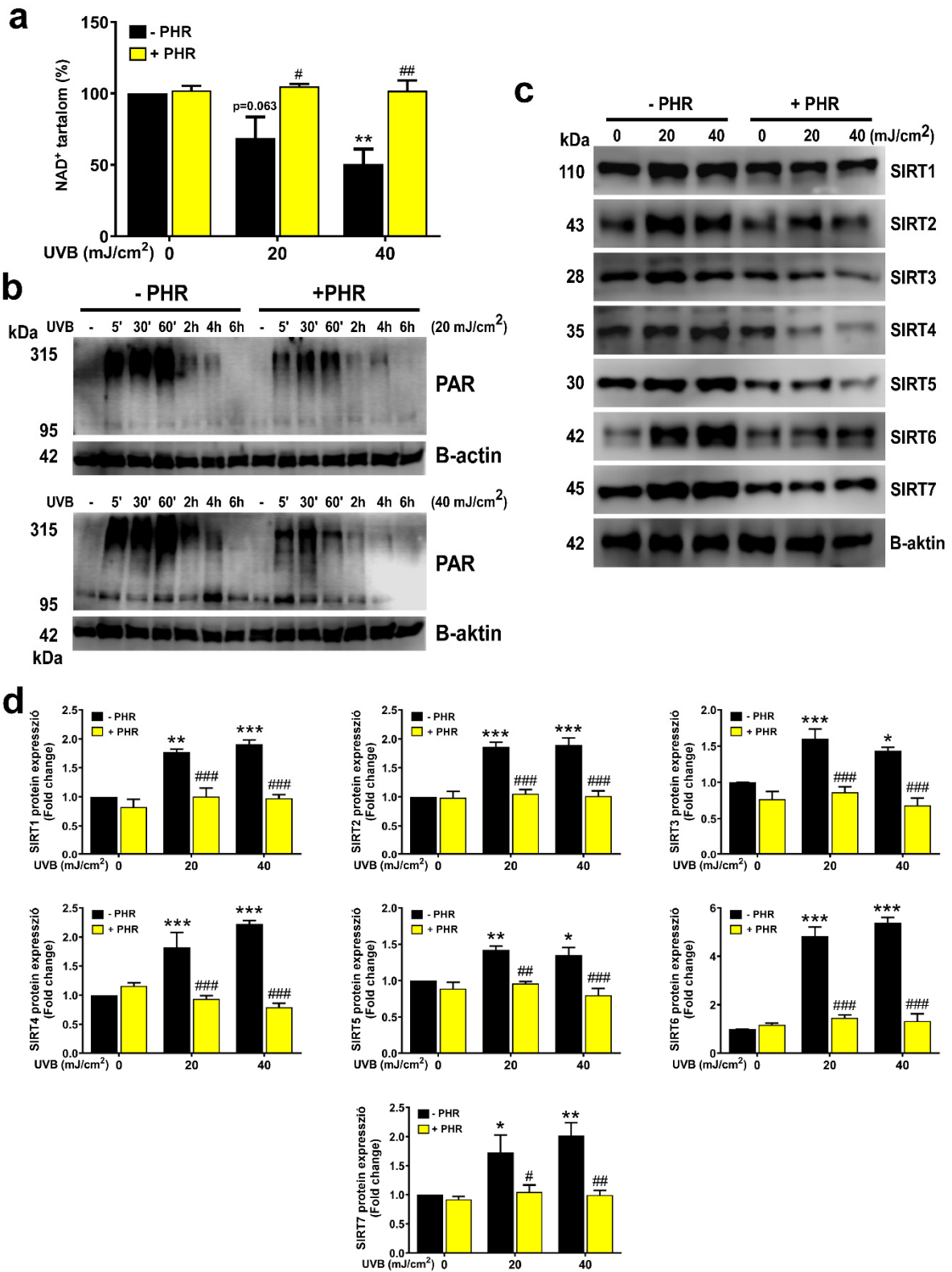
Munkánk második felében a CPD-függő mechanizmusok feltérképezését tűztük ki célul. Vizsgálni kívántuk, hogy a CPD-k, mint az UVB sugárzásra keletkező domináns fotolézisok hatással vannak-e a keratinociták metabolikus állapotára, illetve gátolható-e az UVB-indukált celluláris és molekuláris útvonalak aktiválódása a humán sejtekben normál körülmények között nem jelenlévő CPD-specifikus fotoliáz enzim overexpressziójával. Az enzim aktivációjához a látható fény energiáját használtuk fel, melyet fotoreaktivációval (+PHR) jelöltünk a disszertációban. A -PHR kontroll sejteket sötétben tartottuk, itt nem történt meg az enzim aktivációja és így a CPD-k eltávolítása. A transzfekció hatékonyságát és a fotoliáz enzim aktivitását CPD-specifikus ELISA módszerrel ellenőriztük. Az UVB dózisfüggő módon emelte a CPD-k számát a magi (15/a ábra) és a mitokondriális genomban (15/b ábra) egyaránt. Már 30 perccel a fotoreaktivációt követően a CPD-k számának szignifikáns csökkenését tapasztaltuk mind a magi, mind a mitokondriális DNS-ben. Ez az arra utal, hogy a fotoliáz mRNS fehérjévé íródott át, mindkét szubcelluláris kompartmentben jelen van, és igen hatékony biológiai aktivitással rendelkezik fotoreaktivációt követően. A CPD-k eltávolítása megszüntette az UVB-okozta G<sub>2</sub>/M sejtciklus blokkot (15/e ábra), valamint visszaállította a sejtek proliferációját (15/d ábra) és életképességét (15/c ábra) is. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy az UVB sugárzás hatására keletkező CPD léziók kulcsfontosságúak az UVB-okozta DNS károsodás közvetítésében.



15. ábra. A fotoliáz aktivációja gátolja az UVB-okozta DNS károsodást és visszaállítja a sejtek életképességét. A keratinocitákat 20 vagy 40 mJ/cm<sup>2</sup> UVB dózissal besugaraztuk, majd különböző időpontokban (a) totál és (b) mitokondriális DNS-t izoláltunk. A CPD-k relatív mennyiségének meghatározását ELISA-val végeztük (n=3). (c) A sejtek viabilitását Alexa-488 konjugált Annexin V és PI kettős festéssel végeztük. A dupla negatív sejteket tekintettük életképesnek (n=5). (d) A sejtek proliferációjának meghatározására klonogén assay-t használtunk 10 nappal az UVB irradiációt követően (n=4). (e) A sejtciklus fázisok megoszlását 24 órával UVB irradiációt követően propidium-jodidos (PI) festéssel áramlási citometriával határoztuk meg (n=4). Az adatokat átlag ± az átlag standard hibájaként (SEM) ábrázoltunk. \*, \*\* és \*\*\* jelöli a statisztikailag szignifikáns különbségeket a nem irradiált és az UVB besugárzásnak kitett minták között, ahol  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  és  $p < 0.001$ . #, ## és ### jelöli a statisztikailag szignifikáns különbségeket a nem fotoreaktivált (-PHR) és fotoreaktivációnak (+PHR) kitett minták között, ahol  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  és  $p < 0.001$ . A szignifikancia meghatározását egyszempontos varianciával (one-way ANOVA) végeztük, melyet Sidak's-féle post-hoc analízissel egészítettünk ki.

### **7.9. A CPD-k eltávolítása megakadályozza az UVB hatására indukálódó NAD<sup>+</sup>-fogyasztó enzimek aktivációját**

Az UVB-okozta DNS károsodás, mint korábban azt már láthattuk, szorosan kapcsolódik a sejtek metabolikus állapotával, így a NAD<sup>+</sup> szinttel is. UVB irradiáció után dóziszfüggő módon a NAD<sup>+</sup> szint szignifikáns csökkenését tapasztaltuk (16/a ábra). Amennyiben a CPD-k eltávolításra kerültek, az UVB-okozta NAD<sup>+</sup> depleció teljes mértékben kivédhető volt. Az általunk tapasztalt markáns NAD<sup>+</sup> csökkenés NAD<sup>+</sup>-fogyasztó enzimek aktivációjára utal, így első körben a legjelentősebb NAD<sup>+</sup>-fogyasztó PARP1 fehérje aktivitását vizsgáltuk. Az UVB irradiáció a PAR polimer akkumulációját okozta már 5 perccel a besugárzást követően (16/b ábra). A fotoliáz enzim fotoreaktivációja csökkentette az UVB-indukált PARilációt, mely a CPD-k PARP1 fehérje aktiváló szerepére utal. A fotoreaktiváció azonban teljes mértékben nem tudta gátolni az UVB-indukált PARP aktivációt, így valószínű, hogy a CPD-k mellett a 6-4 fototermékek szintén fontos szereppel bírnak a PARiláció elindításában. Emellett figyelembe kell vennünk, hogy a CPD-k teljes eltávolításához 30 perc fotoreaktivációra van szükség, ezért az UVB besugárzás után 5 perccel aktiválódott PARP1 már folyamatos PARilációs szignált biztosít a későbbi időpontokban is. Megvizsgáltunk egy másik fontos, aktivitásukhoz szintén NAD<sup>+</sup>-ot használó enzimes családot az úgynevezett Sirtuinokat. Eredményeink azt mutatják, hogy a SIRT-ek expressziója UVB után igen erős CPD függést mutatott (16/c, d ábra). A fotoliáz enzim aktivációjával az összes SIRT izoforma expressziója a nem irradiált csoporttal egyezett meg. Ezek alapján elmondható, hogy az általunk vizsgált fehérjék expressziója, aktivitása CPD-függő módon szabályozódik, illetve az UVB sugárzás NAD<sup>+</sup> depletáló hatása a PARP1 és a sirtuinok aktivációjának köszönhető.

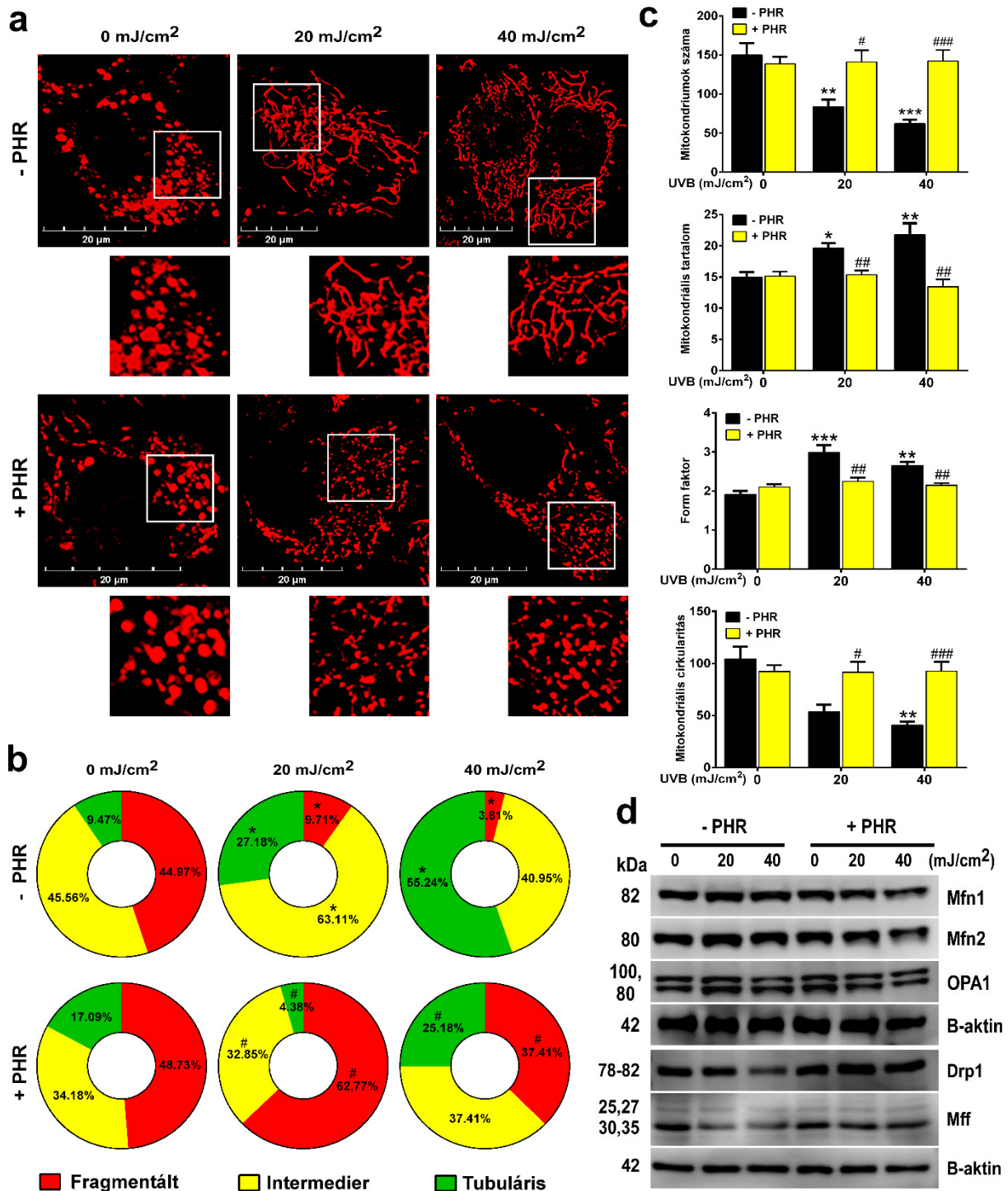


16. ábra. A CPD-k eltávolítása megakadályozza az UVB hatására indukálódó NAD<sup>+</sup>-fogyasztó enzimek aktivációját. (a) A sejtek NAD<sup>+</sup> tartalmát kolorimetriás assay-vel határoztuk meg 24 órával UVB besugárzást követően (n=4). (b) PARP aktivitás (PAR) időfüggésének meghatározását western blottal végeztük 20 és 40 mJ/cm<sup>2</sup> UVB expozíciót követően (n=3). A képeken kontraszt és fényerő

korrekciót végeztünk. (c) A Sirtuin enzimes család tagjainak expresszióját western blottal vizsgáltuk. (d) A sávokat denzitometráltuk, a kapott értékeket pedig a  $\beta$ -aktin háztartási fehérjére normalizáltuk ( $n=4$ ). A képeken kontraszt és fényerő korrekciót végeztünk. Az adatokat átlag  $\pm$  az átlag standard hibájaként (SEM) ábrázoltunk. \*, \*\* és \*\*\* jelöli a statisztikailag szignifikáns különbségeket a nem irradiált és az UVB besugárzásnak kitett minták között, ahol  $p<0.05$ ,  $p<0.01$  és  $p<0.001$ . #, ## és ### jelöli a statisztikailag szignifikáns különbségeket a nem fotoreaktivált (-PHR) és fotoreaktivációnak (+PHR) kitett minták között, ahol  $p<0.05$ ,  $p<0.01$  és  $p<0.001$ . A szignifikancia meghatározását egyszempontos varianciával (one-way ANOVA) végeztük, melyet Sidak's-féle post-hoc analízissel egészítettünk ki.

### **7.10. Az UVB-indukált mitokondriális fúzió CPD-függő módon szabályozódik**

Az UVB-okozta mitokondriális fúzió CPD függésének vizsgálatához a mitokondriumokat Mitotracker Red CMXRos festékkel jelöltük, a mitokondriális morfológiát pedig konfokális mikroszkópiával analizáltuk. Korábbi eredményeinkhez hasonlóan itt is három mitokondriális altípust különítettünk el a mitokondriális hálózat összetettsége alapján: fragmentált, intermedier és tubuláris formát. Alapállapotban, UVB irradiáció nélkül a keratinocitákban egyenlő arányban volt jelen a fragmentált és az intermedier mitokondriális forma. UVB hatására dózisfüggő módon megfigyelhető a fragmentált altípus előfordulásának jelentős csökkenése, valamint az intermedier és tubuláris forma gyakoriságának emelkedése (17/a,b ábra), ami mitokondriális fúzióra utal. Amennyiben fotoreaktivációval eltávolítottuk a CPD-eket, úgy a mitokondriális morfológia nem változott UVB besugárzás mellett sem. Megvizsgáltunk több olyan mitokondriális morfológiai paramétert is, melyek a CPD-okozta mitokondriális fúzió teóriáját erősíthetik meg (17/c ábra). A mitokondriumok számának CPD-függő csökkenése az emelkedő mitokondriális tartalommal együtt már utal a fúzióra. Ilyenkor a mitokondriumok „összeolvadnak” és egy hosszú elongált hálózatot vesznek fel. Az emelkedő „form factor”, mely a mitokondriumok elágazódási képességét tükrözi, valamint a csökkent mitokondriális cirkularitás megerősíti mitokondriális fúzió CPD függését. A fúziót szabályzó Mfn1, Mfn2 és OPA1 fehérjék expressziójának emelkedése, valamint a fissionát irányító Drp1 és Mff kifejeződésének csökkenése szintén CPD függést mutatott (17/d ábra). Ezek az eredmények azt bizonyítják, hogy az UVB-indukált mitokondriális fúzió elindításában kiemelt szerepe van a CPD-knek és az általuk szintén CPD-függő módon szabályozódó fúziós/fissionációs gépezetnek.

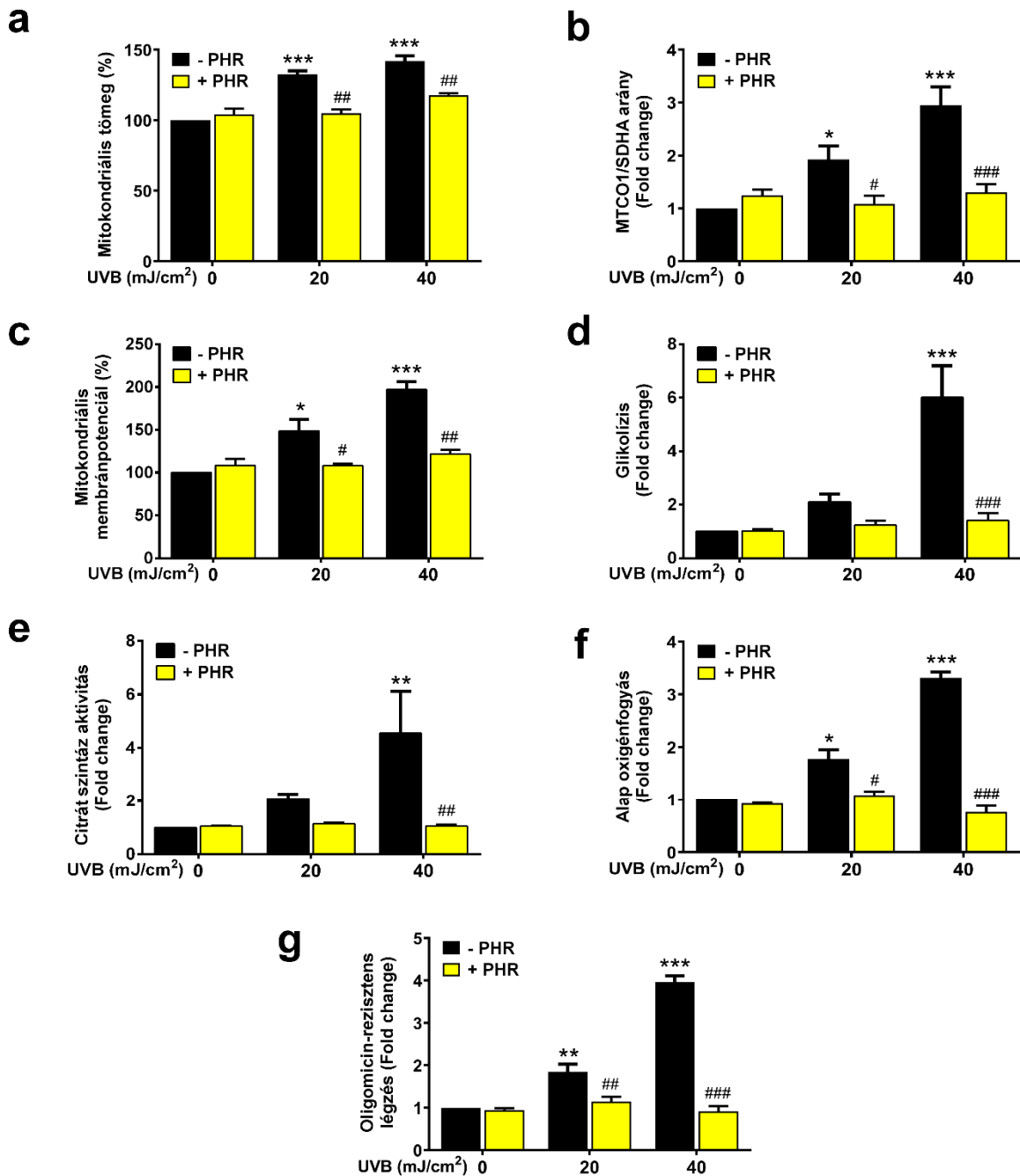


*OPAI (n=4), valamint a mitokondriális fissziót irányító Drp1 és Mff fehérjéket (n=2) western blottal vizsgáltuk. A képeken kontraszt és fényerő korrekciót végeztünk. Az adatokat átlag ± az átlag standard hibájaként (SEM) ábrázoltunk. \*, \*\* és \*\*\* jelöli a statisztikailag szignifikáns különbségeket a nem irradiált és az UVB besugárzásnak kitett minták között, ahol  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  és  $p < 0.001$ . #, ## és ### jelöli a statisztikailag szignifikáns különbségeket a nem fotoreaktivált (-PHR) és fotoreaktivációnak (+PHR) kitett minták között, ahol  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  és  $p < 0.001$ . A szignifikancia meghatározását egyszempontos varianciával (one-way ANOVA) végeztük, melyet Sidak's-féle post-hoc analízissel egészítettünk ki. Az **b** panelen  $\chi^2$  teszttel határoztuk meg az egyes mitokondriális morfológiai altípusok gyakoriságát.*

### **7.11. A CPD-k eliminációja csökkenti az UVB-okozta mitokondriális hipermetabolizmust**

Láthattuk, hogy konfokális mikroszkópiával vizsgálva a sejteket emelkedő mitokondriális tartalmat detektáltunk UVB besugárzás hatására (17/c ábra), mely utalhat egy fokozottabb mitokondriális biogenezisre. Direkt mitokondriális biogenezis markerként a sejteket Mitotracker Green-nel festettük, mely mitokondriális membránpotenciál-független módon jelöli a mitokondriumokat, valamint kvantitáltuk a mitokondriális genom által kódolt MTCO1 expresszióját a magi DNS által kódolt SDHA fehérjéhez képest. A korábbi emelkedett mitokondriális tartalomhoz hasonlóan UVB irradiációra nagyobb mitokondriális tömeget (18/a ábra) és magasabb MTCO1/SDHA arányt detektáltunk (18/b ábra), melyek szintén CPD-függést mutattak. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a CPD fotoléziók nemcsak a mitokondriális fúzió, hanem a mitokondriális biogenezis szabályozásában is aktívan részt vesznek. Az UVB-okozta mitokondriális dinamikában és biogenezisben bekövetkezett változásokat bioenergetikai események is követték. Extramitokondriális energiatermelő folyamatként a glikolízis aktivitása CPD-függő módon markánsan megemelkedett 40 mJ/cm<sup>2</sup> UVB dózis mellett (18/d ábra). A mitokondriális aktivitásra utaló mitokondriális membránhiperpolarizáció (18/c ábra), a növekvő CS aktivitás (18/e ábra) és oxidatív foszforiláció (18/f ábra) is dóziszfüggően változott UVB irradiációt követően. Amennyiben a fotoliáz enzimet aktiváltuk, ezek a mitokondriális hipermetabolikus változások elmaradtak. Meglepő módon az oligomicin-rezisztens légzés CPD-függő emelkedését tapasztaltuk UVB besugárzás hatására (18/g ábra), mely némileg ellentmondhat a fokozott mitokondriális metabolizmusnak. Az oligomicin-rezisztens légzés ugyan valóban utalhat a mitokondriumok szétkapcsolt állapotára, diszfunkciójára [219], mégis számos más fiziológias folyamat aktivitásával is magyarázható, mely a disszertáció keretein már túlmutat. Mindazonáltal, ezeket

az eredményeket figyelembe véve kijelenthetjük, hogy a CPD-k központi szerepet töltenek be az UVB-okozta mitokondriális biogenezis és hipermetabolizmus szabályozásában.

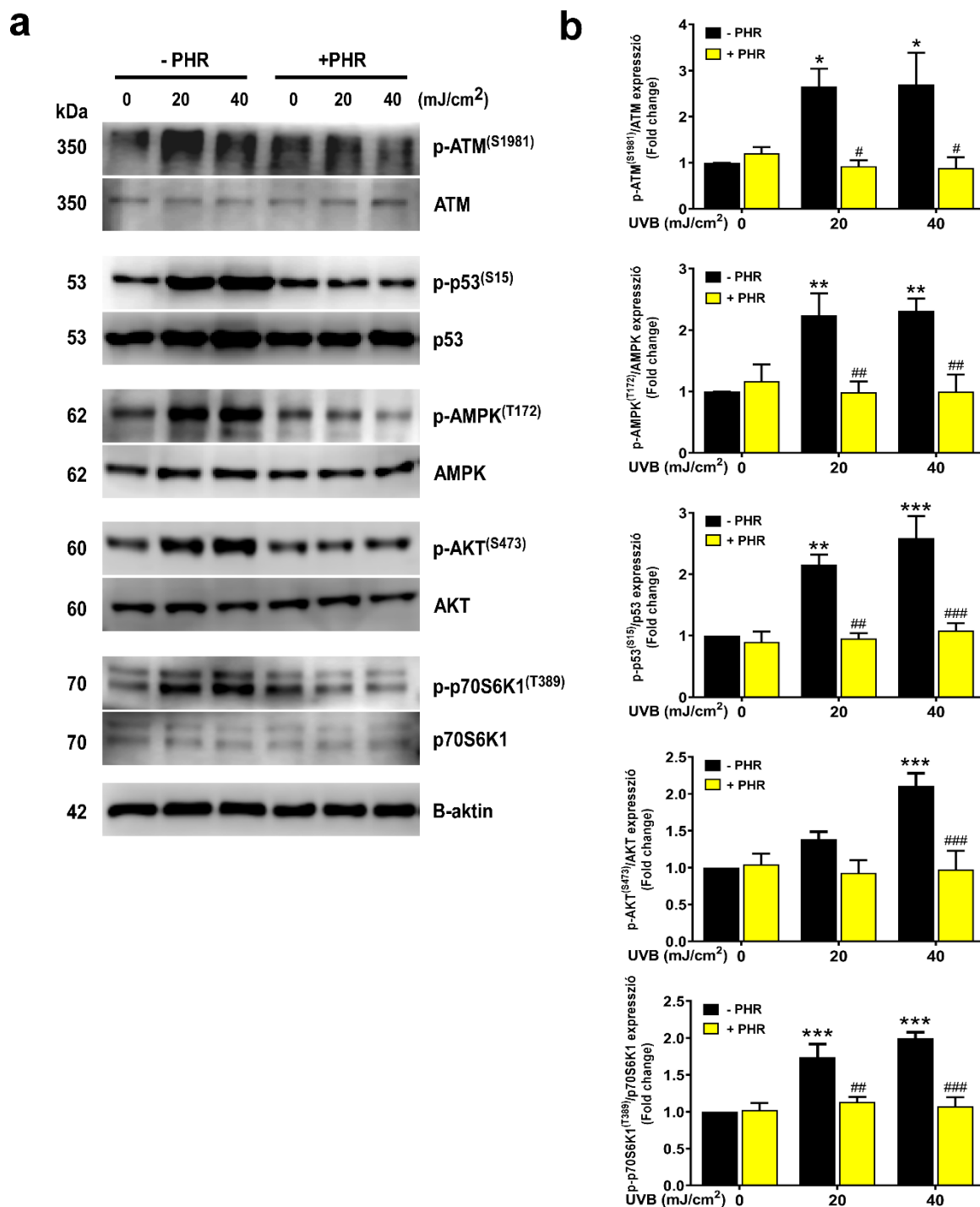


**18. ábra.** A CPD-k eliminációja csökkenti az UVB-okozta mitokondriális hipermetabolizmust. (a) A mitokondriális tömeget a Mitotracker Green fluoreszcencia intenzitásából áramlási citometriával határoztuk meg (n=3). (b) A mitokondriális biogenezist a mitokondriális genom által kódolt MTCO1, valamint a magi DNS által kódolt SDHA arányának a meghatározásával vizsgáltuk (n=4). (c) Mitotracker Red CMXRos festéssel, áramlási citometriával mértük a sejtek mitokondriális membránpotenciálját (n=3). A (d) glikolízis és a (f) az oxidatív foszforiláció, valamint az (g) oligomicin-rezisztens légzés meghatározását Seahorse XF96 készülékkel végeztük (n=3). (e) A Szent-Györgyi-Krebs

*ciklus (citrátkör) aktivitását kolorimetriás assay-vel határoztuk meg (n=4). Az adatokat átlag ± az átlag standard hibájaként (SEM) ábrázoltunk. \*, \*\* és \*\*\* jelöli a statisztikailag szignifikáns különbségeket a nem irradiált és az UVB besugárzásnak kitett minták között, ahol  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  és  $p < 0.001$ . #, ## és ### jelöli a statisztikailag szignifikáns különbségeket a nem fotoreaktivált (-PHR) és fotoreaktivációnak (+PHR) kitett minták között, ahol  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  és  $p < 0.001$ . A szignifikancia meghatározását egyszempontos varianciánálizissel (one-way ANOVA) végeztük, melyet Sidak's-féle post-hoc analízissel egészítettünk ki. A g panel eredményeit logaritmikusan transzformáltuk, mivel a populáció nem normál eloszlást mutatott.*

### **7.12. A fotoliáz enzim fotoreaktivációja gátolja az OXPHOS aktivitását szabályzó enzimek foszforilációját UVB irradiáció után**

Munkánk korábbi részében igazoltuk, hogy az ATM, az AMPK, a p53, az AKT és a p70S6K1 fehérjék potenciálisan képesek összehangolni a DNS hibajavítást a fokozott mitokondriális metabolizmussal. Ezeknek a fehérjéknek a kémiai úton történő gátlása az UVB-indukált oxidatív foszforiláció jelentős csökkenését okozta (12/a ábra). Mivel az UVB hatására emelkedő OXPHOS CPD-függő módon változott (18/f ábra), ezért megvizsgáltuk, hogy az oxidatív foszforilációt szabályzó fehérjék is CPD függést mutatnak-e. A fehérjék foszforilált formáját a teljes fehérje expressziójához viszonyítva azt tapasztaltuk, hogy az ATM, az AMPK, a p53, az AKT és a p70S6K1 foszforilációja CPD-függő módon emelkedik UVB besugárzás hatására (19/a, b ábra). A CPD-k eltávolítása után a fehérjék foszforilációs állapota a nem irradiált csoportnak felelt meg, ami arra utal, hogy a CPD-függő oxidatív foszforiláció fokozódása a szintén CPD-függő módon szabályozódó ATM, AMPK, p53, AKT és mTOR útvonalak aktiválódásának köszönhető.



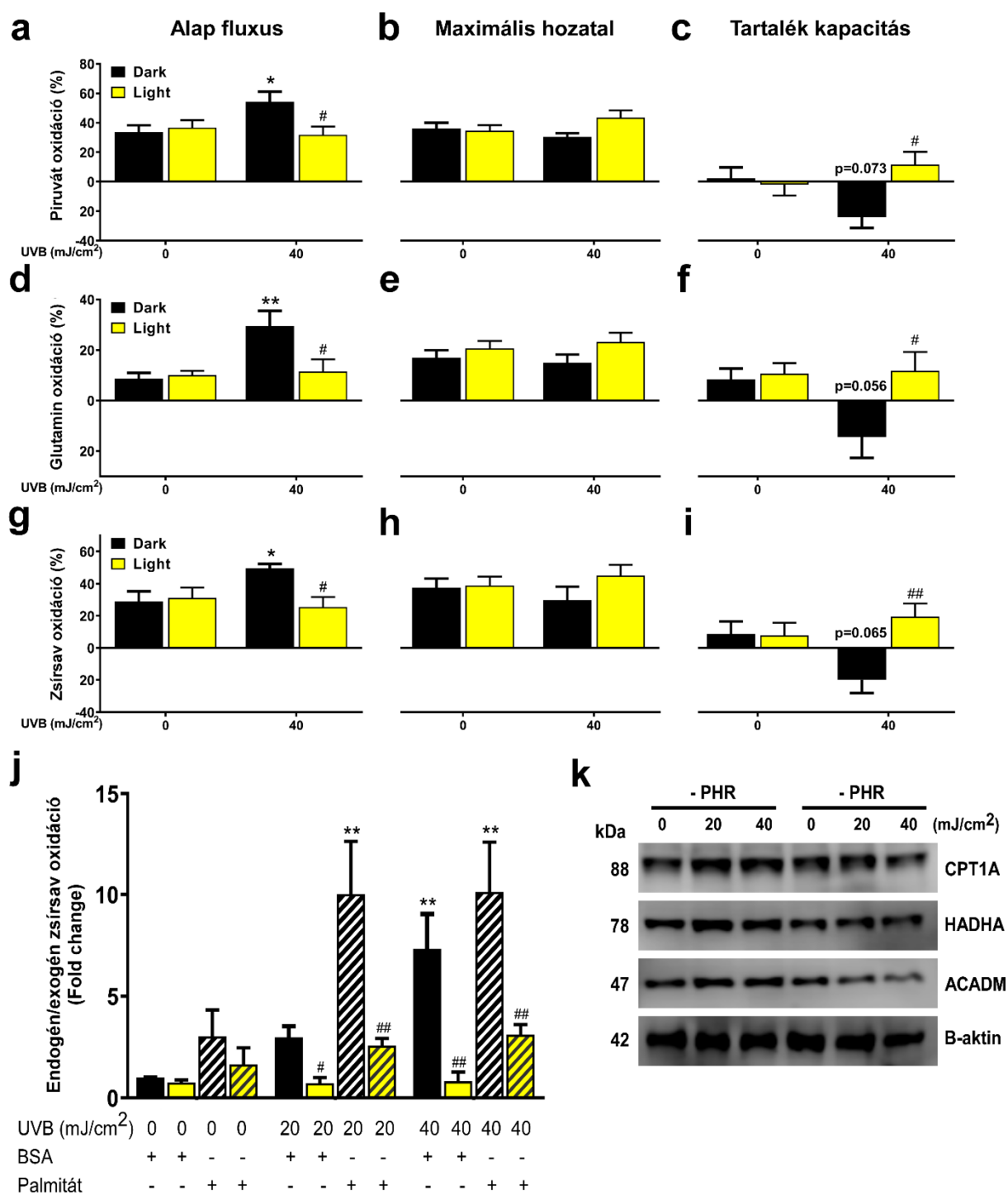
19. ábra. A fotoliáz enzim fotoreaktivációja gátolja az OXPPOS aktivitását szabályzó enzimek foszforilációját UVB irradiáció után. (a) Az OXPPOS-ért felelős fehérjék foszforilált és nem foszforilált formáinak mennyiségi kimutatását western blottal vizsgáltuk. (b) A sávokat denzitometráltuk, a kapott értékeket pedig a  $\beta$ -aktin háztartási fehérjére normalizáltuk ( $n \geq 3$ ). A képeken kontraszt és fényerő korrekciót végeztünk. Az adatokat átlag  $\pm$  az átlag standard hibájaként (SEM) ábrázoltunk. \*, \*\* és \*\*\* jelöli a statisztikailag szignifikáns különbségeket a nem irradiált és az UVB besugárzásnak kitett minták között, ahol  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  és  $p < 0.001$ . #, ## és ### jelöli a statisztikailag

*szignifikáns különbségeket a nem fotoreaktivált (-PHR) és fotoreaktivációnak (+PHR) kitett minták között, ahol  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  és  $p < 0.001$ . A szignifikancia meghatározását egyszempontos varianciavizsgálattal (one-way ANOVA) végeztük, melyet Sidak's-féle post-hoc analízissel egészítettünk ki.*

### **7.13. A CPD-k módosítják a keratinociták szubsztrát oxidációs profilját**

Megfigyeltük, hogy a CPD-k kulcsfontosságú szerepet töltenek be a keratinociták mitokondriális aktivitásának szabályozásában, így a továbbiakban arra a kérdésre kerestük a választ, hogy az UVB által létrehozott fototermékek módosíthatják-e a sejtek szubsztrát oxidációs profilját. Kísérletünk megvalósításához az ún. Mitofuel Flex tesztet használtuk, mellyel a piruvát, a zsírsavak és glutamin, mint fő mitokondriális szubsztrátok oxidációját tudjuk mérni az OCR értékek alapján. UK-5099-et, etomoxirt és BPTES-t használtunk a mitokondriális piruvát karrier (MPC), a karnitin palmitoil-transzferáz 1 (CPT1) és a glutamináz (GLS) enzimek gátlásához, melyekkel a piruvát és a zsírsavak citoplazmából mitokondriumba való transzportját, valamint a glutaminolízist tudtuk gátolni. Az adott útvonal alap fluxusát, maximális hozatalát és tartalék kapacitását az OCR értékekből számoltuk az anyag módszer részben leírtaknak megfelelően. Az alap fluxus az adott metabolikus útvonaltól való függést jelenti. Minél magasabb ez az érték annál nagyobb szüksége van a sejteknek az adott útvonalra. A maximális hozatal a sejtek adaptációs képességét jelenti, mellyel a mitokondriumok oxidatív foszforilációjukat próbálják fenntartani a másik két komplementer útvonal gátlása során. A tartalék kapacitás a mitokondriumok kompenzációs képességéről ad felvilágosítást. A csökkenő tartalék kapacitás azt jelenti, hogy a mitokondriumoknak az adott útvonalra van szükségük alap oxidatív foszforilációjuk fenntartásához és nem tudnak kompenzálni más útvonalak hasznosításával. Úgy is lehet fogalmazni, hogy az alap fluxus jelenti azt, „ami kell”, a maximális hozatal jelenti azt, „ami rendelkezésre áll”, a tartalék kapacitás pedig a „nettó eredmény”. Utóbbi negatív értékeknél energetikai krízisre, valamint arra utalhat, hogy a három szubsztrát között nem tudnak hatékonyan váltani a sejtek. A nem irradiált keratinocitákban a glutamin csak minimálisan járul hozzá a sejtek OXPHOS-jának fenntartásához, így a sejtek a piruvát és a zsírsavak oxidációjából nyernek energiát (20/a, d, g ábra). UVB irradiációt követően az alap fluxus szignifikáns emelkedését tapasztaltuk mindhárom szubsztrát oxidációjában (20/a, d, g ábra), vagyis a sejteknek fokozott igénye van a piruvát, a zsírsavak és a glutamin hasznosítására. Mindhárom szubsztrát esetében ezek a változások CPD-függő módon szabályozódtak, hiszen a fotoliáz aktivációja csökkentette az alapfluxust, vagyis az UVB irradiált keratinociták piruváttól, zsírsavaktól és glutamintól való függését. Ezzel

szemben az UVB-besugárzott sejtek nem tudták tovább emelni szubsztrát oxidációjukat, amennyiben a komplementer metabolikus útvonalak gátolva voltak (20/b, e, h ábra), vagyis az adott útvonal megnövekedett igénye (alap fluxus) nem járt egyik szubsztrát esetén sem a rendelkezésre álló teljes készlet (maximális hozatal) növekedésével. Ez a tartalék kapacitás meredek csökkenését okozta CPD-függő módon, mely mindhárom metabolikus útvonal inflexibilitására utal (20/c, f, i ábra), vagyis a sejtek nem tudtak megbirkózni UVB irradiációt követően az adott útvonal megnövekedett igényével. Megfigyeltük az endogén zsírsav oxidáció CPD-függő fokozódását is UVB irradiáció mellett (20/j ábra). Amennyiben oxidálható többlet szubsztrátot adtunk a keratinocitáknak (palmitát), úgy a béta oxidáció igen markáns emelkedést mutatott, mely azt sugallja, hogy egy esetleges szubsztrát hiány vezethet a metabolikus útvonalak inflexibilitásához. Western blottal igazoltuk, hogy a zsírsav transzportért felelős CPT1A, valamint a zsírsavak oxidációját katalizáló hidroxiacil-CoA dehidrogenáz (HADHA) és az acil-CoA dehidrogenáz (ACADM) enzimek expressziója CPD-függő emelkedést mutatott UVB sugárzás hatására (20/k ábra), vagyis a funkcionális változások mögött fehérje expressziós változások rejlenek. Összességében tehát elmondható, hogy a CPD-k hatással vannak a keratinociták szubsztrát preferenciájára, illetve a már korábban tapasztalt oxidatív foszforiláció emelkedéséhez (18/f ábra) a piruvát, a zsírsavak és a glutamin oxidációja CPD-függő módon egyaránt hozzájárul.

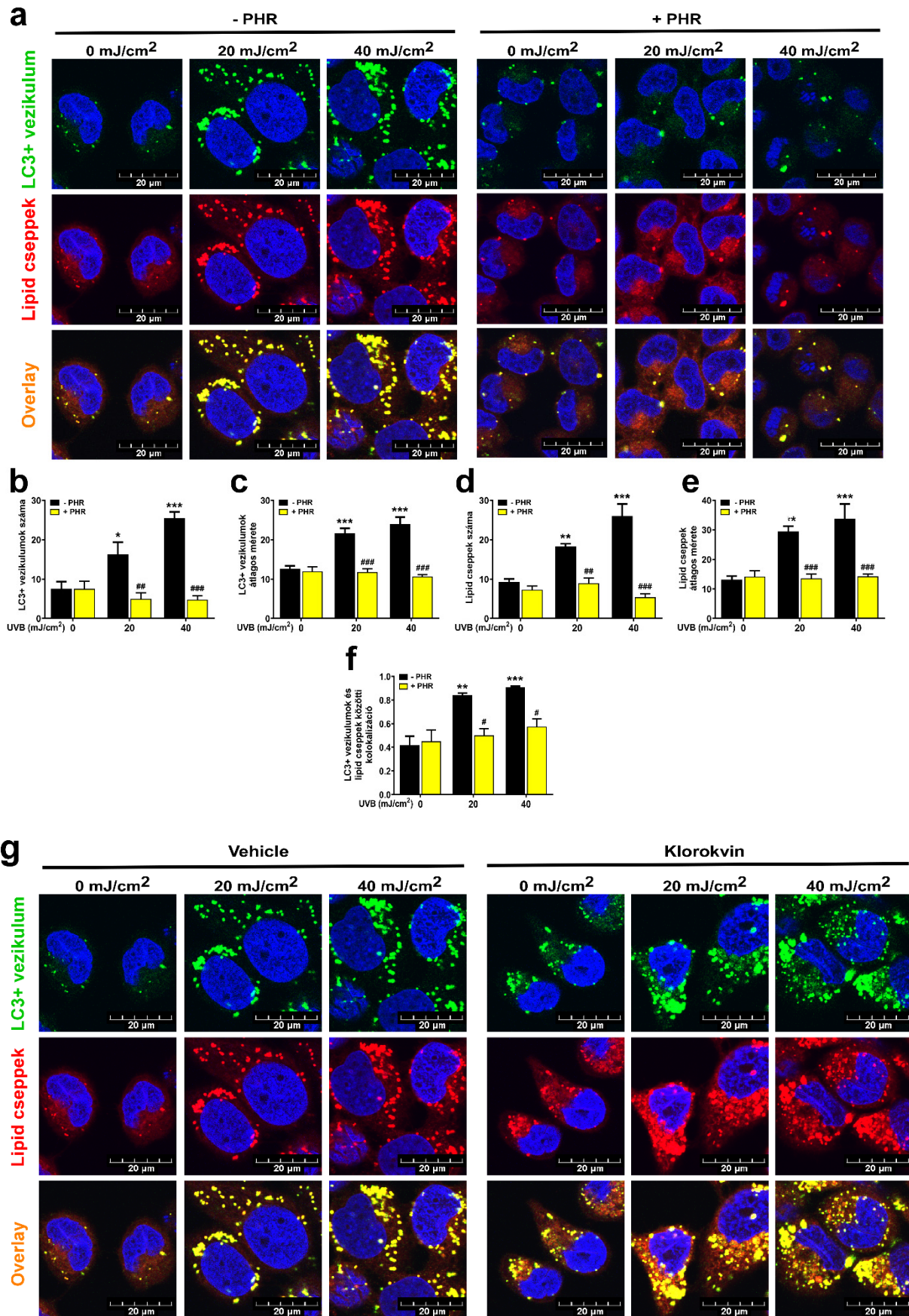


20. ábra. A CPD-k módosítják a keratinociták szubsztrát oxidációs profilját. (a-c) A piruvát, (d-f) a glutamin, és (g-i) a zsírsavak hasznosítását a Mitofuel Flex test-tel vizsgáltuk Seahorse XF96 készüléken. BPTES, Etomoxir és UK-5099 inhibitorokkal specifikusan gátoltuk a glutaminolízist, valamint a zsírsavak és piruvát citoplazmából mitokondriumba történő transzportját (n=6). (j) Az endogén (BSA kezelés) valamint az exogén (palmitát kezelés) béta oxidációt szintén XF96 oximéterrel mértük (n=4). (k) A zsírsav transzportért felelős CPT1A, valamint a béta oxidációt szabályzó HADHA és ACADM fehérjék kifejeződését Western blottal vizsgáltuk (n=3). A képeken kontraszt és fényerő korrekciót végeztünk. Az adatokat átlag ± az átlag standard hibájaként (SEM) ábrázoltunk. \*, \*\* és \*\*\*

jelöli a statisztikailag szignifikáns különbségeket a nem irradiált és az UVB besugárzásnak kitett minták között, ahol  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  és  $p < 0.001$ . #, ## és ### jelöli a statisztikailag szignifikáns különbségeket a nem fotoreaktivált (-PHR) és fotoreaktivációnak (+PHR) kitett minták között, ahol  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  és  $p < 0.001$ . A szignifikancia meghatározását egyszempontos varianciával (one-way ANOVA) végeztük, melyet Sidak's-féle post-hoc analízissel egészítettünk ki.

#### **7.14. Az UVB lipofágiát indukál CPD-függő módon**

A fokozott szénhidrát metabolizmus (glikolízis, citrát ciklus, oxidatív foszforiláció) mellett igazoltuk a zsírsavak szerepét a mitokondriális aktivitás szabályozásában (21/g, j, k ábra). Ehhez kapcsolódóan vizsgáltuk a lipid cseppek szerepét, melyek az egyik legfontosabb energiaraktárt jelentik a sejtek számára tápanyagmegvonás, valamint különböző stresszhatások mellett [220]. Konfokális mikroszkópiával vizsgálva a sejteket a lipid cseppek mennyiségének (21/a, d ábra) és méretének (21/a, e ábra) CPD-függő emelkedését tapasztaltuk UVB sugárzás hatására. Bár ez némiképp ellentmondhat az UVB-indukált zsírsav oxidáció fokozódásának, a két folyamat egymást nem szükségszerűen kizáró. A lipid cseppekkel párhuzamosan, az autofagoszómák számában (21/a, b ábra) és méretében (21/a, c ábra) is hasonló változást detektáltunk. Az UVB-indukált autofágia CPD-vezéreltnek bizonyult, hiszen a fotoliáz enzim fotoreaktivációja után az LC3<sup>+</sup> vezikulumok száma és mérete a nem irradiált keratinocitákkal volt egyenlő. A lipid cseppek és az autofagoszómák közötti Pearson's-féle korreláció azt mutatja, hogy UVB besugárzásra CPD-függő módon emelkedik a két sejtstruktúra közötti kolokalizáció (21/f ábra), mely az autofágia egy speciális formájára, az úgynevezett lipofágiára utal. Ennek a folyamatnak során a lipid cseppek az autofagoszómák belsejében kerülnek lebontásra [221], a lipid cseppekből felszabaduló zsírsavak pedig szubsztrátot biztosíthatnak az oxidatív foszforilációhoz vagy új lipid cseppek szintéziséhez. Ezt támasztja alá, hogy az autofagoszómák-lizoszómák fúziójának klorokvinnal történő gátlása a lipid cseppek és az autofagoszómák számának feldúsulását okozta (21/g ábra). Ezek az adatok az UVB-indukált CPD-függő lipofágiára hívják fel a figyelmet, melynek metabolizmus regulátor szerepe lehet.

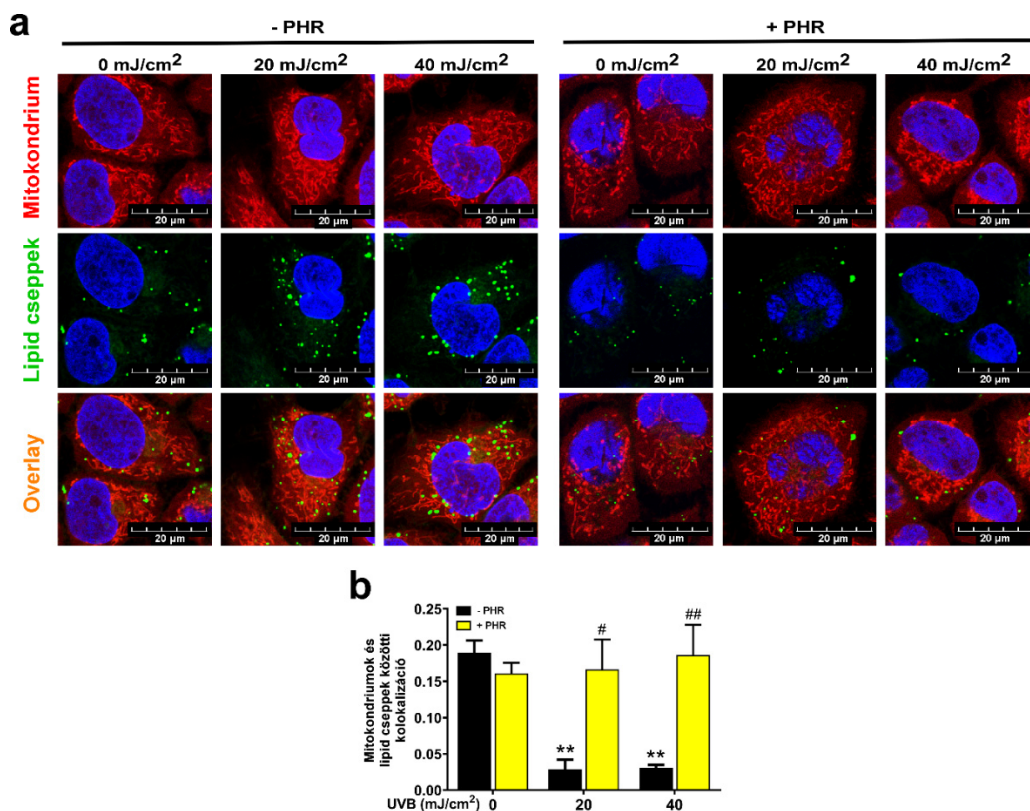


21. ábra. Az UVB lipofágiát indukál CPD-függő módon. (a, g) Az autofagoszómák (LC3<sup>+</sup> vezikulumok) és a lipid cseppeket LC3A/B és Adipored kettős jelöléssel vizsgáltuk (n=3). A képeken kontraszt és

fényerő korrekciót végeztünk. Az **(b)** autofagoszómák és a **(d)** lipid cseppek számát, valamint **(c, e)** átlagos méretüket a konfokális mikroszkópiával készült képekből számoltuk ImageJ programmal ( $n=5$ ). **(f)** Az autofagoszómák és a lipid cseppek közötti kolokalizációt (Pearson's-féle korreláció) az ImageJ JACoP bővítményével határoztuk meg ( $n=3$ ). \*, \*\* és \*\*\* jelöli a statisztikailag szignifikáns különbségeket a nem irradiált és az UVB besugárzásnak kitett minták között, ahol  $p<0.05$ ,  $p<0.01$  és  $p<0.001$ . #, ## és ### jelöli a statisztikailag szignifikáns különbségeket a nem fotoreaktivált (-PHR) és fotoreaktivációnak (+PHR) kitett minták között, ahol  $p<0.05$ ,  $p<0.01$  és  $p<0.001$ . A szignifikancia meghatározását egyszempontos varianciával (one-way ANOVA) végeztük, melyet Sidak's-féle post-hoc analízissel egészítettünk ki.

### 7.15. Az UVB besugárzásra keletkező lipid cseppek nem mutatnak kolokalizációt a mitokondriumokkal

A mitokondriumok lipid cseppekkel való kolokalizációját vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy alap állapotban nagyon gyenge átfedés mutatható ki a két kompartment között (22/a ábra). UVB besugárzás hatására ez a minimális kolokalizáció is CPD-függő módon eltűnik. (pearson's $\sim$ 0.03). Habár UVB irradiáció után a mitokondriumok és a lipid cseppek közötti csökkenő kolokalizáció pontos oka ismeretlen, paradox módon arra utalhat, hogy ezek a mitokondriumok aktívabb zsírsav oxidációt folytatnak [222]. Természetesen ennek a hipotézisnek a bizonyítása további kísérletes munkát igényelne, így a jelenleg rendelkezésre álló adatok tükrében messzemenő következtetéseket nem lehet levonni.

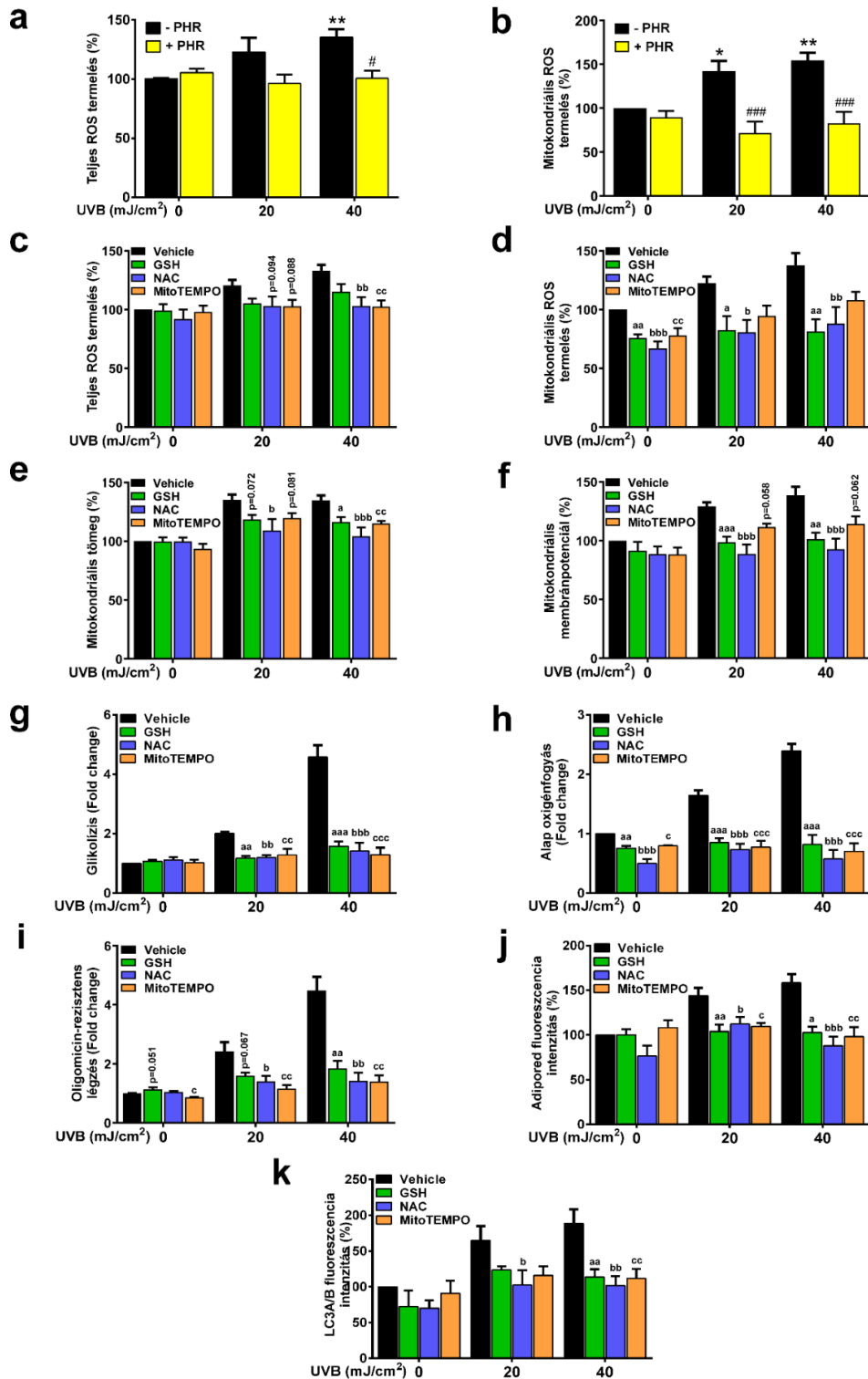


**22. ábra.** Az UVB besugárzásra keletkező lipid cseppek nem mutatnak kolokalizációt a mitokondriumokkal. (a) Az mitokondriumok és a lipid cseppeket Mitotracker Red CMXRos és Adipored kettős festéssel vizsgáltuk (n=3). A képeken kontraszt és fényerő korrekciót végeztünk. (b) Az autofagoszómák és a lipid cseppek közötti kolokalizációt (Pearson's-féle korreláció) az ImageJ JACoP bővítményével határoztuk meg (n=3). \*, \*\* és \*\*\* jelöli a statisztikailag szignifikáns különbségeket a nem irradiált és az UVB besugárzásnak kitett minták között, ahol  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  és  $p < 0.001$ . #, ## és ### jelöli a statisztikailag szignifikáns különbségeket a nem fotoreaktivált (-PHR) és fotoreaktivációnak (+PHR) kitett minták között, ahol  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  és  $p < 0.001$ . A szignifikancia meghatározását egyszempontos varianciával (one-way ANOVA) végeztük, melyet Sidak's-féle post-hoc analízissel egészítettünk ki.

### 7.16. A CPD-vezérelt útvonalak ROS-függő módon szabályozódnak

Bár az UVB legfontosabb hatása a DNS direkt módon történő károsítása [(CPD, (6-4) fototermékek], irodalmi adatok arról is beszámolnak, hogy az UVB direkt módon képes ROS képződését indukálni a bőrben [223]. Emellett különböző enzimek pl. a NADPH oxidázok indirekt módon is hozzájárulhatnak az UVB-indukált ROS termeléshez, azonban ezek a hatások általában rövidtávúak [58, 224]. A keratinociták teljes ROS tartalmának meghatározásához dihidroetidiumot (DHE), a mitokondriális ROS (mtROS) kimutatásához MitoSOX Red-et használtunk. Meglepő módon az UVB irradiációt követő 24. órában is emelkedő totál (23/a ábra) és mitokondriális ROS (23/b ábra) termelést detektáltunk, melyek CPD-függő módon szabályozódtak. Természetesen itt az UVB indirekt ROS induktor hatásáról van szó, mivel a szabadgyökök féléletideje nagyon rövid, tehát egy olyan útvonal aktivációja történik, amely folyamatos ROS utánpótlást biztosít. Korábban láthattuk, hogy UVB besugárzás hatására hipermetabolizmus zajlik (18.ábra), ezért feltételezhető, hogy az emelkedő ROS, különös tekintettel a mtROS produkció fokozott mitokondriális aktivitás következménye. Irodalmi adatokból tudjuk, hogy mennyiségüktől és minőségüktől függően a szabadgyököknek is lehet mitokondriális biogenezist és aktivitást fokozó szerepe [225]. A teljesség igénye nélkül vizsgáltuk, hogy antioxidánsok alkalmazása hatással van-e a korábban már vizsgált CPD-függő módon szabályozódó folyamatok aktiválódására. Általános gyökfogóként L-glutationt (GSH) és N-acetil-L-ciszteint (NAC), mitokondriális ROS termelésre specifikus scavengerként pedig MitoTEMPO-t használtunk. Mindhárom gyökfogó hatékonyan csökkentette a keratinociták totál (23/c ábra) és mitokondriális ROS (23/d ábra) termelését. A mitokondriális biogenezisre utaló mitokondriális tömeg (23/e ábra), a sejtek metabolikus állapotát tükröző glikolízis (23/g ábra), mitokondriális membránpotenciál (23/f ábra), az oxidatív foszforiláció (23/h ábra) és az oligomicin-rezisztens légzés (23/i ábra) jelentősen csökkent GSH, NAC és MitoTEMPO

kezelés hatására UVB expozíciót követően. A lipid cseppek mennyiségében (23/j ábra) és az autofágia indukciójában (23/k ábra) is hasonló változást tapasztaltunk antioxidáns kezelés mellett. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az UVB hatására keletkező CPDk-nek indirekt módon ROS induktor szerepük van, és a szabadgyökök több mitokondriális és extramitokondriális útvonalat is szabályoznak.

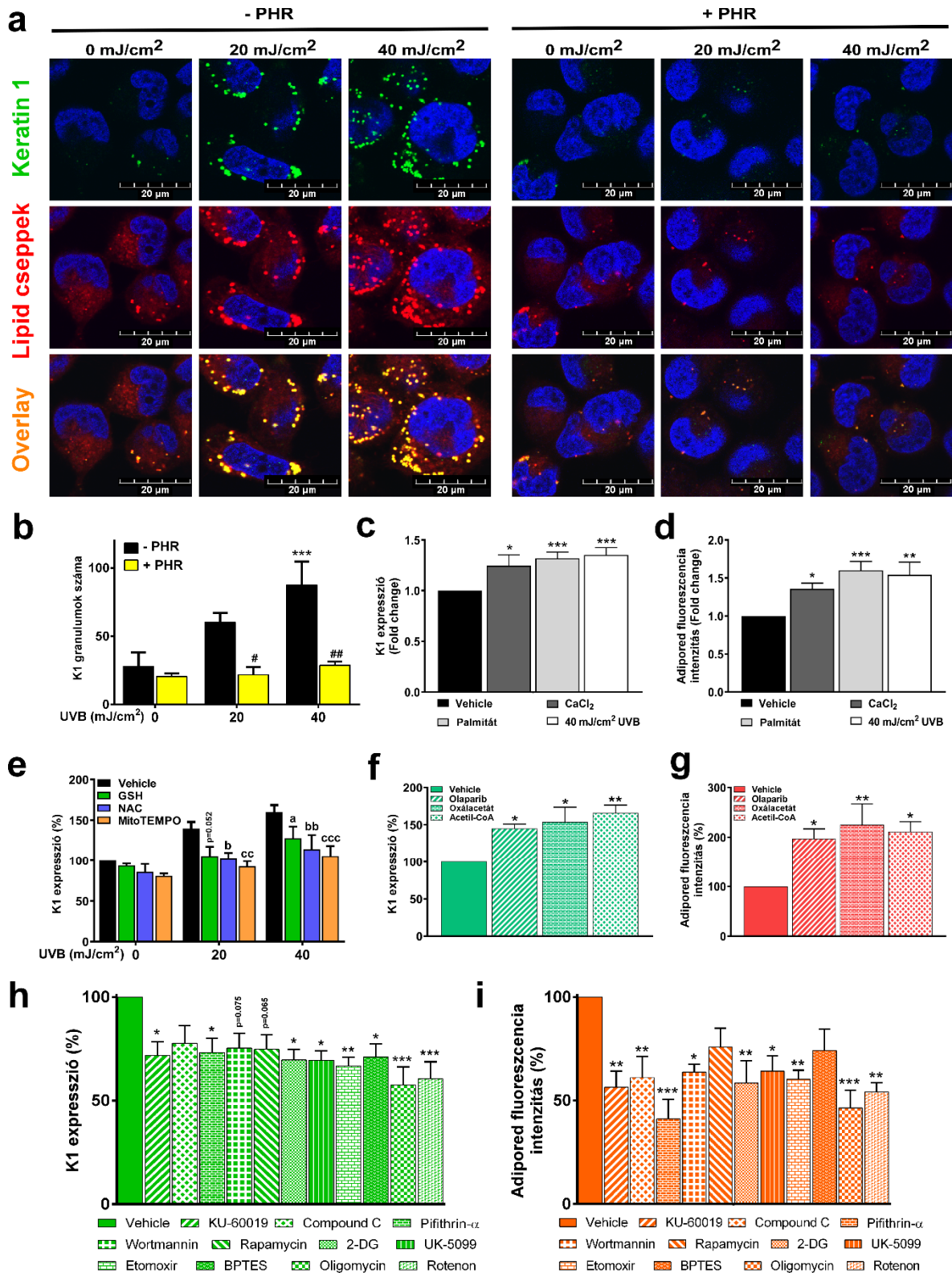


**23. ábra. A CPD-vezérelt útvonalak ROS-függő módon szabályozódnak. (a)** A totál (n=5) és **(b)** a mitokondriális ROS termelés (n=4) CPD-függését dihidroetidium and MitoSOX Red festéssel áramlási citometriával vizsgáltuk. GSH, NAC és MitoTEMPO gyökfogókkal vizsgáltuk **(c)** a teljes (n=9) és **(d)** a mitokondriális ROS termelést (n=8), **(e)** a mitokondriális biogenezist (n=7), **(f)** a mitokondriális membránpotenciált (n=7), **(g)** a glikolízist (n=3), **(h)** az alap oxigénfogyást (n=3), **(i)** az oligomicin-rezisztens légzést (n=3), **(j)** a lipid cseppek felhalmozódását (n=7), és **(k)** az autofágia indukcióját (n=6). \*, \*\* és \*\*\* jelöli a statisztikailag szignifikáns különbségeket a nem irradiált és az UVB besugárzásnak kitett minták között, ahol  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  és  $p < 0.001$ . #, ## és ### jelöli a statisztikailag szignifikáns különbségeket a nem fotoreaktivált (-PHR) és fotoreaktivációnak (+PHR) kitett minták között, ahol  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  és  $p < 0.001$ . a, aa, aaa, b, bb, bbb, c, cc, ccc jelöli a statisztikailag szignifikáns különbségeket a vehicle és a gyökfogókkal kezelt minták között, ahol  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  és  $p < 0.001$ . A szignifikancia meghatározását egyszempontos varianciánálizissel (one-way ANOVA) végeztük, melyet Sidak's-féle post-hoc analízissel egészítettünk ki. Az **i** és **j** panel eredményeit logaritmikusan transzformáltuk, mivel a populáció nem normál eloszlást mutatott.

### **7.17. A keratinocita differenciáció és a lipid cseppek felhalmozódása CPD-, ROS-, és mitokondriális aktivitás függően változik**

A proliferatív keratinociták a bőr epidermiszének bazális rétegében különböző stimulusok hatására differenciálódhatnak, melynek során úgynevezett lamelláris testek felhalmozódása figyelhető meg [226]. Ezek a főleg zsírtartalmú képletek szekréciójukkal többek között a bőr barrier funkciójának a fenntartásához járulnak hozzá. Korábban már láthattuk, hogy UVB irradiációt követően a lipid cseppek CPD-függő akkumulációja figyelhető meg (21/a, d ábra). A továbbiakban arra a kérdésre kerestük a választ, hogy a fokozott lipid csepp felhalmozódás mutathat-e valamilyen összefüggést a keratinociták differenciációjával. Immunfluoreszcens vizsgálattal igazoltuk, hogy UVB besugárzásra a lipid cseppekkel párhuzamosan emelkedik a keratin 1 (K1), mint korai differenciáció marker expressziója (24/a, b ábra). Meglepő módon a K1 fehérje nem filamentózisos hálózatot alkotott, hanem granuláris szerkezetet vett fel, mely kolokalizációt mutatott a lipid partikulumokkal (24/a ábra). Ezek a hatások a fotoliáz enzim aktivációjával gátolhatóak voltak, mely a keratinocita differenciáció CPDk-tól való függését mutatja. A K1 expresszió és a lipid cseppek közötti kapcsolat további vizsgálatához olyan anyagokat használtunk, amikről irodalmi adatok alapján biztosan tudjuk, hogy keratinocita differenciációt indukáló hatással rendelkeznek ( $\text{CaCl}_2$ ) [226] vagy a lipid cseppek megjelenését indukálják (palmitát) [227]. Adataink azt mutatják, hogy mindkét kezelés párhuzamosan emelte a K1 expresszióját (24/c ábra) és a lipid cseppek (24/d ábra) mennyiségét. A K1 fehérje kifejeződése UVB mellett gátolható volt antioxidánsok használatával (24/e ábra), mely az UVB

besugárzásra keletkező ROS szerepét igazolja a keratinocita differenciáció elindításában. Végül szerettük volna feltárni, hogy a lipid cseppek és a keratinociták differenciációja mutat-e összefüggést a sejtek mitokondriális aktivitásával. A PARP1 inhibitor, olaparib hipermetabolikus aktivitása révén emelte a K1 expressziót és a lipid cseppek mennyiségét (24/f, g ábra). Hasonló változást detektáltunk az oxálacetát és az acetyl-CoA esetében (24/f, g ábra), melyek citrát kör részeiként az oxidatív foszforilációt fokozzák. Végül olyan inhibitorokat alkalmaztunk, melyekről már korábban bizonyítottuk, hogy csökkentik az oxidatív foszforilációt az általunk használt kísérleti rendszerben (KU-60019, compound C, pifithrin-alpha-HBr, wortmannin, rapamicin), csökkentik a glikolízist (2-DG), gátolják a glutaminolízist (BPTES), az I-es és V-ös komplex aktivitását (rotenon, oligomocin), a piruvát (UK-5099) és a zsírsavak (etomoxir) mitokondriális transzportját, tehát összességében a mitokondriális katabolizmus ellen hatnak. Mindegyik gátlószer parallel módon csökkentette a lipid cseppek és a K1 fehérje mennyiségét (24/h, i ábra), mely a keratinocita differenciáció és lipid cseppek mitokondriális metabolizmustól való függésére hívja fel a figyelmet. Ezek az adatok arra utalnak, hogy a keratinocita differenciáció és a lipid cseppek felhalmozódása szorosan kapcsolt, valamint CPD-, ROS- és mitokondriális aktivitástól függő módon szabályozódnak.

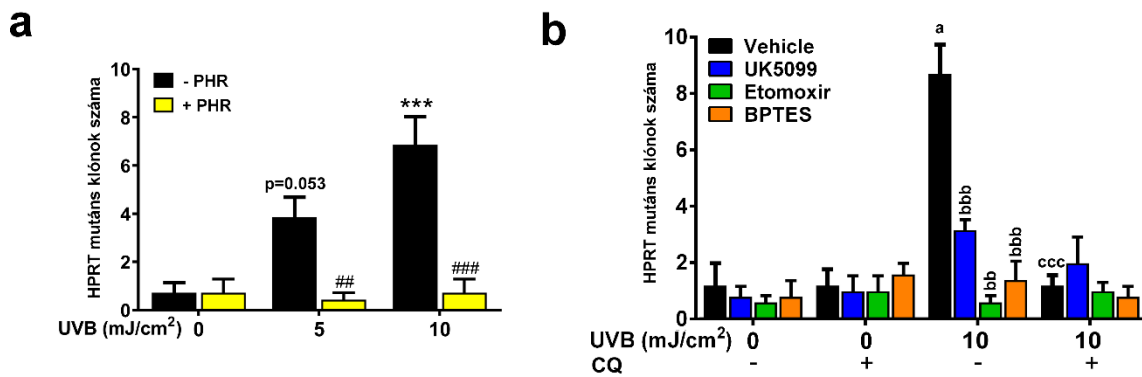


24. ábra. A keratinocita differenciáció és a lipid cseppek felhalmozódása CPD-, ROS- és mitokondriális aktivitás függően változik. (a) A keratinocita differenciáció és a lipid cseppek közötti kapcsolatot a keratin 1 (K1) fehérje expressziójának kimutatásával és az Adipored fluoreszcencia intenzitásának a vizsgálatával konfokális mikroszkópiával határoztuk meg. A képeken kontraszt és fényerő korrekciót végeztünk. (b) A K1 granulumok számában bekövetkezett változásokat a konfokális

mikroszkópiával nyert képekből származtattuk ImageJ szoftverrel (n=4). **(c)** A KI expressziót és **(d)** a lipid cseppek képződését áramlási citometriával határoztuk meg CaCl<sub>2</sub>, palmitát kezelést, valamint 40 mJ/cm<sup>2</sup> UVB besugárzást követően (n≥5). A gyökfogók KI expresszióra kifejtett hatását áramlási citométerrel vizsgáltuk (n=5). A sejtek KI expresszióját és a lipid csepp tartalmát 40 mJ/cm<sup>2</sup> UVB dózis mellett olyan kezeléseket követően határoztuk meg, melyek **(f, g)** emelik az OXPHOS-t (n≥4) vagy **(h, i)** gátolják a mitokondriális tevékenységet (n=6). \*, \*\* és \*\*\* jelöli a statisztikailag szignifikáns különbségeket a nem irradiált és az UVB besugárzásnak kitett minták között, ahol p<0.05, p<0.01 és p<0.001. #, ## és ### jelöli a statisztikailag szignifikáns különbségeket a nem fotoreaktivált (-PHR) és fotoreaktivációnak (+PHR) kitett minták között, ahol p<0.05, p<0.01 és p<0.001. a, aa, aaa, b, bb, bbb, c, cc, ccc jelöli a statisztikailag szignifikáns különbségeket a vehicle és a gyökfogókkal kezelt minták között, ahol p<0.05, p<0.01 és p<0.001. A szignifikancia meghatározását egyszempontos varianciánálizissel (one-way ANOVA) végeztük, melyet Sidak's-féle post-hoc analízissel egészítettünk ki a **b** és az **e** panel esetében. A **c, d, f, g, h, i** paneleknél szignifikancia meghatározását egyszempontos varianciánálizissel (one-way ANOVA) végeztük, melyet Dunnett's-féle post-hoc analízissel egészítettünk ki a **b** és az **e** panel esetében. Az **i** és **j** panel eredményeit logaritmikusan transzformáltuk, mivel a populáció nem normál eloszlást mutatott.

### **7.18. A mitokondriális aktivitás CPD- és autofágia-függő módon központi szerepet játszik az UVB-indukált karcinogenezis elindításában**

Vizsgáltuk, hogy a CPD-k, az autofágia, valamint az UVB-indukált hipermetabolikus változások milyen hatással vannak a sejtek mutációs rátájára UVB besugárzást követően. Korábbi HPRT mutációs kísérletünkhöz hasonlóan itt is CHO sejteket használtunk. Várakozásunknak megfelelően a HPRT-mutáns klónok számának dózisfüggő emelkedését tapasztaltuk UVB sugárzást követően (25/a ábra). A CPD-k eltávolítását követően a mutációk száma a nem irradiált csoporttal volt egyenlő. Amennyiben gátoltuk a mitokondriális transzporterek (UK-5099, etomoxir) és a glutaminolízis (BPTES) aktivitását (25/b ábra), az UVB-okozta mutációs ráta is meredeken csökkent. Az autofágiás fluxus klorokvinnal (CQ) történő gátlása hasonló csökkenést eredményezett a mutációk számában UVB besugárzást követően (25/b ábra). Ezek az adatok azt mutatják, hogy a CPD-k mellett az autofágia indukciója a lebontott makromolekulák újrahasznosításával metabolitokat szolgáltathatnak a mitokondriumok számára az általunk vizsgált transzporterek (MPC, CPT1) keresztül, így az autofágiát és a mitokondriális metabolizmust potenciálisan mutagenézist közvetítő folyamatnak kell tekintenünk UVB irradiációt követően.

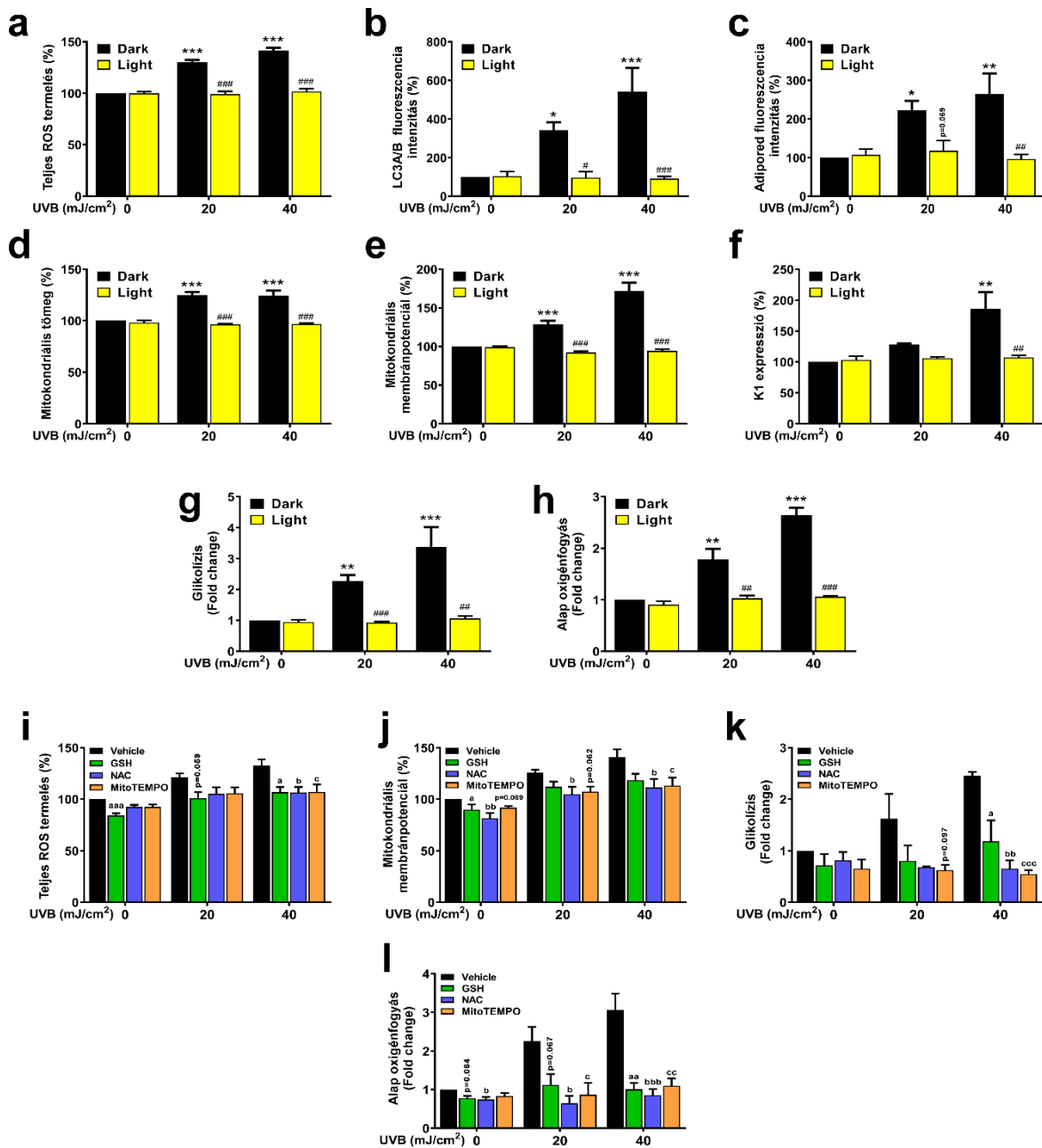


**25. ábra. A mitokondriális aktivitás CPD és autofágia-függő módon központi szerepet játszik az UVB-indukált karcinogenezis elindításában. (a)** A HPRT mutációs assay-t kínai hörcsög ovárium sejteken (CHO) végeztük fotoliáz transzfeccióval ( $n=6$ ) és **(b)** mitokondriális, valamint az autofágia aktivitását csökkentő inhibitorokkal ( $n=6$ ). A sejteket 10 napig tartottuk UVB besugárzást követően szelektív médiumban. \*\*\* jelöli a statisztikailag szignifikáns különbségeket a nem irradiált és az UVB besugárzásnak kitett minták között, ahol  $p<0.001$ . #, ## és ### jelöli a statisztikailag szignifikáns különbségeket a nem fotoreaktivált (-PHR) és fotoreaktivációnak (+PHR) kitett minták között, ahol  $p<0.05$ ,  $p<0.01$  és  $p<0.001$ . a jelöli a statisztikailag szignifikáns különbségeket a nem irradiált, valamint UVB-exponált sejtek között, ahol  $p<0.05$ . bbb jelöli a statisztikailag szignifikáns különbségeket az UVB-irradiált vehicle kontroll és az UVB-besugárzott de UK-5099, Etomoxir vagy BPTES-sel kezelt sejtek között, ahol  $p<0.01$  és  $p<0.001$ . ccc jelöli a statisztikailag szignifikáns különbségeket a vehicle és a klorokvin (CQ) kezelt minták között, ahol  $p<0.001$ . A szignifikancia meghatározását egyszempontos varianciánálizissel (one-way ANOVA) végeztük, melyet Sidak's-féle post-hoc analízissel egészítettünk ki. Az **a** panel eredményeit logaritmikusan, a **b** panel eredményeit Box-Cox módszerrel transzformáltuk, mivel a populáció nem normál eloszlást mutatott.

### 7.19. Az UVB-okozta CPD- és ROS-függő hatások keratinocita-specifikusak

A HaCaT széles körben használt sejtvonal a primer keratinociták alternatívjaként gyors növekedésük és hosszútávú fenntarthatóságuk miatt, mégis az immortalizált sejtek fentotípusbeli eltéréseket mutathatnak a primer sejtekhez képest. Ez különösen igaz lehet a HaCaT-okra, melyekben két pontmutáció található a p53 génben [228]. Bár ellentmondásos az irodalom a mutációk p53 funkciójára vonatkozó hatásairól, a korábbi adatokkal szemben egyre több közleményben a p53 [229, 230] normál működéséről vagy funkciónyeréses mutációjáról számolnak be [231]. Mindazonáltal szerettük volna eredményeink főbb pontjait megerősíteni primer sejtekkel (NHEK) is. Adataink azt mutatják, hogy az NHEK sejtekben a ROS termelés (26/a, i ábra), a mitokondriális és metabolikus változások (26/d, e, f, g, h, j, k, l ábra), az autofágia indukciója (26/b ábra), a lipid cseppek felhalmozódása (26/c ábra) és a keratinociták differenciációja (26/f ábra) nem mutat eltérést a HaCaT sejtekhez képest. Ezek alapján

elmondható, hogy a primer sejtek is hasonló fenotípusbeli változásokat mutatnak UVB irradiációt, fotoliáz transzfekeiót, valamint antioxidáns kezelést követően, vagyis a CPD- és ROS-függő hatások nem HaCaT, hanem keratinocita specifikusak.



**26. ábra.** Az UVB-ozkta CPD- és ROS-függő hatások keratinocita-specifikusak. CPD-specifikus fotoliáz mRNS transzfekeiót követően áramlási citometriával vizsgáltuk NHEK sejteken (a) a teljes ROS termelést (n=3), (b) az autofágia indukcióját (n=4), (c) a lipid cseppek felhalmozódását (n=4), (d) a mitokondriális biogenezist (n=3), (e) a mitokondriális membránpotenciált (n=3) és (e) a K1 fehérje expresszióját (n=3). (g) a glikolízis (n=3) és (h) az alap oxigénfogyást (n=3) meghatározását Seahorse XF96 készülékkel végeztük. GSH, NAC és MitoTEMPO gyökfogókkal vizsgáltuk NHEK sejteken (i) a teljes ROS termelést (n=4), (j) a mitokondriális membránpotenciált (n=5), (k) a glikolízist (n=3) és (l)

az alap oxigénfogyást ( $n=3$ ). \*, \*\* és \*\*\* jelöli a statisztikailag szignifikáns különbségeket a nem irradiált és az UVB besugárzásnak kitett minták között, ahol  $p<0.05$ ,  $p<0.01$  és  $p<0.001$ . #, ## és ### jelöli a statisztikailag szignifikáns különbségeket a nem fotoreaktivált (- PHR) és fotoreaktivációnak (+ PHR) kitett minták között, ahol  $p<0.05$ ,  $p<0.01$  és  $p<0.001$ . a, aa, aaa, b, bb, bbb, c, cc, ccc jelöli a statisztikailag szignifikáns különbségeket a vehicle és a gyökfogókkal kezelt minták között, ahol  $p<0.05$ ,  $p<0.01$  és  $p<0.001$ . A szignifikancia meghatározását egyszempontos varianciával (one-way ANOVA) végeztük, melyet Sidak's-féle post-hoc analízissel egészítettünk ki. Az **a** és **e** panel eredményeit logaritmikusan, a **d**, **i**, **k**, **l** panel eredményeit Box-Cox módszerrel transzformáltuk, mivel a populáció nem normál eloszlást mutatott.

## 8. MEGBESZÉLÉS

Disszertációban az UVB-okozta DNS károsodás és a sejtek megváltozott metabolizmusa közötti kapcsolat feltérképezését tűztük ki célul. Napjainkban igen felkapott kutatási területnek számít a sejtmag és a mitokondriumok közötti anterográd/retrográd szignalizációs útvonalak vizsgálata [232, 233]. Különböző tanulmányokból ismert, hogy a folyamatosan fennálló DNS károsító tényezők, valamint a DNS repair defektusa a sejtek mitokondriális funkcióromlását okozza [174, 234, 235]. Ilyen bioenergetikai romlás figyelhető meg olyan genetikai betegségekben (Ataxia-teleangiectázia, Xeroderma Pigmentosum, Cockayne szindróma) [95, 172, 236, 237], ahol károsodott valamelyik, a DNS hibajavítás szempontjából esszenciális gén. Habár az UV tartomány UVB komponensének szerepe jól karakterizált a DNS károsodás [22], az apoptózis [238], a fotoaging [239], valamint a karcinogenezis [240, 241] szabályozásában, kevés adat áll rendelkezésre, hogy az UVB miként befolyásolhatja a mitokondriumok működését. Mindössze néhány irodalmi adat utal arra, hogy az UVB potenciális mitokondriális diszfunkciót indukáló hatással rendelkezik. Ezekben a tanulmányokban azonban olyan magas UVB dóziseket használtak [242, 243], amiktől egy III-as Fitzpatrick bőrtípussal rendelkező ember is le tudna égni. Mint ahogy a bőrünk epidermisze is elhal (hólyagképződés, hámlás alakul ki) egy akut napégést követően, úgy az ilyen nagy UVB dózissal irradiált keratinociták is elhalnak, az UVB-okozta patofiziológias változások a mitokondriumokat is érintik. Munkacsoportunk azonban arra volt kíváncsi, hogyan alakul a DNS károsodás-indukált mitokondriális szignalizáció olyan, fiziológiailag is releváns UVB dózis mellett, amivel késő tavasszal, egész nyáron és kora ősszel egyaránt találkozhatunk. 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 stresszválasz, mitokondrium szignalizáció feltárására a leíró jellegű vizsgálat nem alkalmas, ezzel szemben, ha a folyamatot biológiailag releváns behatások modellezésével vizsgáljuk, nagyon értékes információkat nyerhetünk, és jobban megismerhetjük a valós működést. Ehhez olyan kémiai ágenst (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 [244]. 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 ciklobutan 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 [245]. 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 sejttypusban és UVB dózist követően.

UVB irradiációt követően időfüggő 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 [218, 246], 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. Ez többek között azzal magyarázható, hogy számos PARP1-gyel kölcsönható, a nukleoid excíziós repair aktivitását segítő szabályzó fehérjét (DDB1, DDB2, ATM, RAD51, ALC1, XPC) írt le a szakirodalom [247-249]. Emellett a PARiláció jelentős negatív töltéssel látja el hiszton fehérjéket [250], melynek hatására a kromatin szerkezete megbomlik, a lokális relaxáció pedig elősegíti a hibajavító enzimek DNS-hez kötődését [195, 251]. Ebből következik, hogy PARilációs jel hiányában a repair enzimek katalitikus aktivitása csökken, a DNS kompakt szerkezetet vesz fel, ezért az UVB-okozta DNS károsodást javító enzimek feltehetőleg nem tudnak kötődni a fotoléziókhoz, melyek együttesen járulnak hozzá a CPD eltávolítás hatékonyságának csökkenéséhez. A NER defektusával egy időben fokozott G<sub>2</sub>/M sejtciklus blokkot tapasztaltunk PARP gátló mellett, mely tipikus példája az akut DNS károsodásnak [252, 253]. Ez egyrészt az el nem távolított CPD-kből fakadhat, másrészt az úgynevezett PARP trapping következménye, melynek során az inaktivált PARP1 katalitikus aktivitásának hiánya miatt továbbra is kötődve marad a DNS-hez gátolva a DNS replikációt, transzkripciót, mely végül replikatív stresszhez, duplaszálú DNS törések megjelenéséhez vezet [254]. Emiatt a tulajdonsága miatt használják előszeretettel a PARP inhibitorokat ritkábban olyan rákos sejtek monoterápiájában, ahol valamelyik, a DNS repair-t szabályzó gén (BRCA) defektusa figyelhető [255], gyakrabban azonban más DNS károsító szerekkel kombinálva alkalmazzák citotoxikus hatásának maximalizálása érdekében [256, 257]. 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 választ vált ki [258-260]. 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.) [261] 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. Az UVB-re keletkező domináns fotoléziók, a CPD-k mellett megfigyelhetők az úgynevezett (6-4) fototermékek felhalmozódása is. Ezek a fototermékek nagyobb torziós feszültséget okoznak a DNS-en, ezért gyorsan, az UVB besugárzást követő első hat órában kijavításra kerülnek [32, 262], szemben a CPD-kkel melyek teljes eltávolításához 48 óra szükséges [32, 262]. Emiatt az UVB-okozta DNS károsodás közvetítésében a CPD-ket 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-ket a magi és a mitokondriális genomból egyaránt, mely arra utal, hogy az *in vitro* szintetizált RNS a klasszikus eukarióta fotoliázokhoz hasonlóan tartalmazza mind a nukleáris, mind a mitokondriális lokalizációs szignált [263]. 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 szabályozásának szempontjából.

A PARP1 az egyik legkorábban aktiválódó DNS károsodásban szerepet játszó fehérje, mely központi szereppel bír többek között a sejtek  $\text{NAD}^+$  készletének szabályozásában [179]. Igen agresszív  $\text{NAD}^+$ -fogyasztó, egyes közlemények szerint 50-80%-ban a PARP1 fehérje felelős a teljes  $\text{NAD}^+$  deplécióért [167, 264]. Nem meglepő tehát, hogy UVB hatására a  $\text{NAD}^+$  szint szignifikáns csökkenését tapasztaltuk, még órákkal a lezajlott PARP aktivációt követően is. A PARP gátló alkalmazása robosztus módon emelte a sejtek  $\text{NAD}^+$  tartalmát. Hasonló változást tapasztaltunk a fotoliáz aktivációja során, az UVB  $\text{NAD}^+$ -depletáló hatása teljesen elmaradt. Meglepő módon, a CPD-k eltávolítása csak részlegesen csökkentette a PARP aktivációt, így felmerül a (6-4) fototermékek PARilációt szabályozó szerepe, illetve egy másik enzimes család, a

Sirtuinok, mint potenciális NAD<sup>+</sup>-fogyasztók [265] 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 [266, 267] és a DNS repair [268-273] 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.

A mitokondriumok morfológiája dinamikusan változik endogén és exogén környezeti szignáloknak, valamint a sejtek metabolikus igényeinek megfelelően [62, 201]. 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 [274, 275]. Eredményeink azt mutatják, hogy az UVB irradiáció, valamint a PARP gátlás hatására emelkedik a mitokondriumok száma, összterülete, tömege, MTCO1 fehérjéjének mennyisége és több, a mitokondriális biogenezist irányító transzkripciós faktor génexpressziós változását 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 [276, 277] és etopozid [91] kezelést, ionizáló, valamint UVC sugárzást [180] 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 [181]. Ez az adaptív mitokondriális fúzió folyamatosan megfigyelhető, amíg a stressz stimulus jelen van és a sejtek nem apoptotizálnak. 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 [278, 279]. Az akut DNS károsodás-okozta mitokondriális biogenezissel a sejtek megnövekedett energiaigényüket új mitokondriumok szintézisével próbálják fedezni. Ezt támasztja alá, hogy ezek a változások dóziszfüggő módon azokban az UVB-irradiált keratinocitákban voltak megfigyelhetőek, melyek magasabb mitokondriális aktivitást mutatnak. A PARP1 gátlása fokozta, a fotoliáz enzim aktivációja csökkentette az UVB hatására keletkező CPD szintet, így a mitokondriális fúzió és biogenezis akut DNS károsodástól való függését igazoltuk.

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 [109, 141, 280-282]. Ilyen fehérjék csökkent vagy hibás működését figyelték meg többek között Werner szindrómában (WS) [283] Ataxia Teleangiectáziában (AT) [284], Hutchinson–Gilford progériában (HGPS) [285] és Cockayne szindrómában (CS) [286]. Közös tulajdonságuk ezeknek a betegségeknek, hogy valamelyik, a DNS károsodásra adott válaszban szerepet játszó fehérje elégtelen működése miatt alakulnak ki. Többek között a korai öregedés és testsúlycsökkenés jellemző ezekre a kórképekre, mely általában a sejtek fokozott metabolikus aktivitására vezethető vissza. 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 [180]. 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 szignaling 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 játszó fehérje a DNS károsodás felismeréséhez és a DNS lézióhoz való kötődéséhez ATP-t igényel [287-289]. A kromoszóma-remodelling hasonlóképpen energiaigényes folyamat melynek során a DNS kompaktságát módosító enzimek a kromatin struktúra lokális relaxációjával a DNS hibák javítását segítik elő [290]. Így 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 útvonalak CPD-függő aktiválódása fokozhatja a nukleotid excíziós repair hatékonyságát. Habár a fokozott mitokondriális metabolizmussal összhangban UVB irradiációt követően CPD-függő módon emelkedett a sejtek piruvát, zsírsavak és glutamin oxidációjától 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 [291, 292]. 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 repairt [180, 293-295]. Végül megfigyelték, hogy a piruvát szupplementáció csökkenti a DNS károsodást [296]; a piruvát metabolizmusban részt vevő piruvát kináz 2 (PKM2) magi transzlokációja pedig elősegíti a homológ rekombináció stimulálása révén a DNS léziók kijavítását H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> és UVB irradiációt követően [297, 298]. 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.

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 az XPC, az UVRAG, valamint a DDB1/DDB2 fehérjék kifejeződésének és aktivitásának szabályozásán keresztül a globál genom NER elindításában [299], 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 irradációt követően, vagyis nem következett be mitokondriális funkcióromlás, ami a szignált biztosítja a PINK1 és PARKIN fehérjék számára a mitofágia elindításához [300, 301]. 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 újrahaznosítása során felszabaduló szabad zsírsavtartalom lipid vezikulumokba csomagolódik, amennyiben a mitokondriális béta oxidációban nem kerül felhasználásra [302, 303]. A sejtek megnövekedett szubsztrát igényüket, fokozott mitokondriális aktivitásukat a károsodott szubcelluláris elemek autofágia útján történő újrahaznosításával is tudják fedezni [215, 304]. 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 megnövekedett 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 [305], 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 [306, 307]. Ezt támasztja alá az UVB irradációt követő mitokondriális hiperfúzió, a fokozott zsírsav oxidáció és az emelkedett zsírsav preferencia. Amennyiben a mitokondriális hálózat fúzióját gátolták, a szabad zsírsavak

mitokondriális metabolizációja nem volt hatékony és a zsírsavak lipid cseppekkel újra-asszociálódva a szomszédos sejtekbe transzportálódtak [306]. 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.

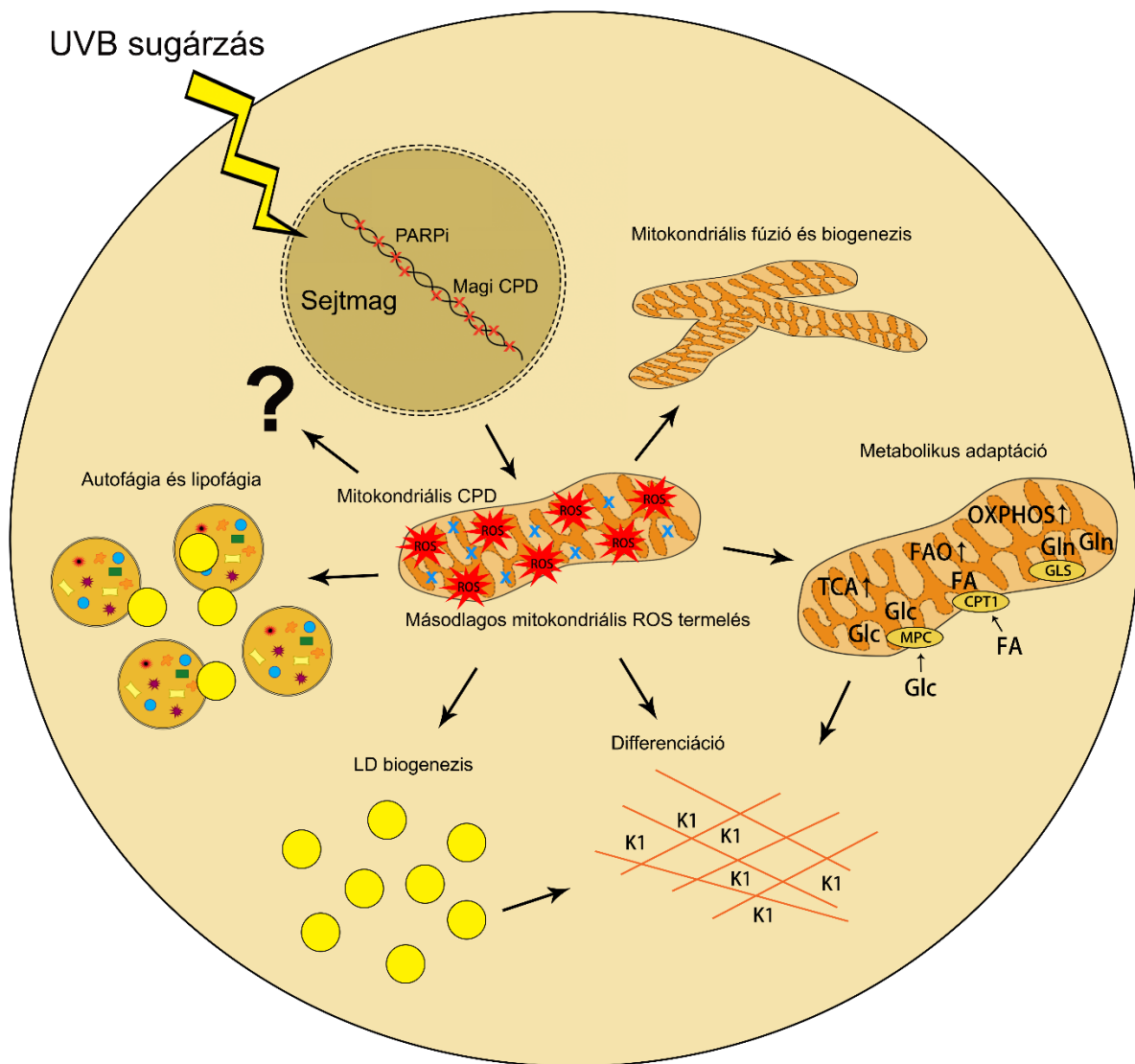
A keratinociták differenciációja a programozott sejthalál egyik speciális formája, melynek során az extracelluláris magas  $Ca^{2+}$ -gradiens elősegíti a differenciáció specifikus markerek, így a keratinok (KRT), filaggrin (FLG), lorikrin (LOR) és az involucrin (INV) megjelenését [226]. A keratinociták differenciációja során a lipid cseppek felhalmozódása figyelhető meg, mely a bőr homeosztázisnak, barrier funkciójának fenntartását szolgálja [226]. A differenciációban bekövetkezett zavarok többek között az atópiás dermatitisz kialakulását iniciálhatja [308] illetve a pszoriázis patomechanizmusában [309] 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 [310], valamint az mTOR [311] 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 [52, 312]. Az UVB besugárzás hatására tapasztalt lipid metabolizmusban bekövetkezett változások szintén a keratinociták differenciációjára hatnak. Korábban már igazolták a foszfatidilglicerol (PG) [313, 314] és a diacilglicerol (DAG) [315] differenciációt indukáló szerepét. Emellett a lipid cseppek stratum corneumban történő abnormális felhalmozódását figyelték meg pszoriázisos bőrben [316, 317]. Habár az UVB-indukált keratinocita differenciáció szerepe egyelőre vitatott, irodalmi adatokkal összhangban úgy gondoljuk, hogy az UVB által kiváltott adaptív válasz részenként a sejtek túlélését, a szöveti homeosztázis és integritás fenntartását szolgálja.

A reaktív oxigén szabadgyökök központi szerepet játszanak a sejtek élettani folyamatainak szabályozásában [318, 319]. A peroxiszómák fokozott működése, különböző oxidázok

aktivitása, átmeneti fémionok, az endoplazmatikus retikulumban zajló protein folding, valamint a timidin és poliaminok metabolizmusa mind hozzájárulnak a szabadgyökök képződéséhez [46]. Mindazonáltal a legjelentősebb ROS forrásnak fokozott oxidatív foszforilációjuk révén a mitokondriumokat tekintik [320]. 24 órával az UVB irradációt 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 biogeneze, az autofágia, valamint a keratinociták differenciációja, mely arra utal, hogy a mitokondriális ROS-nak igen jelentős szerepe van ezeknek a változásoknak a közvetítésében UVB irradációt követően. Habár egyes közlemények beszámolnak az antioxidánsok CPD képződést csökkentő hatásáról [321], mi ilyen jellegű változást egyik gyökfogó estében 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.

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 [322]. Azonban egyre több közlemény a fokozott mitokondriális biogenezist és aktivitást potenciális mutagenezist közvetítő szignálként írja le [323-325], 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 teljesen gátolható volt, mely a CPD-k szerepére utal a karcinogenezis elindításában. Ez nem meglepő, ha figyelembe vesszük, hogy a CPD-k kis torziós feszültséget okoznak a DNS-en, gyenge szubsztátja a DNS léziók felismerését végző XPC-UV-DDB komplexnek [32], ezért a NER során a CPD-k eltávolítása alacsony hatékonysággal valósul meg. Az ilyen, ki nem javított CPD léziók CC-TT tranzícióhoz [326] vezethetnek a magi és mitokondriális DNS-en egyaránt. Az autofágia, valamint egyes szubsztátok mitokondriális transzportjának gátlása a CPD-k eltávolításához hasonlóan jelentősen csökkentette az UVB-indukált mutagenezist. Az autofágia indukciója, valamint a piruvát, a zsírsavak és a glutamin mitokondriális oxidációja CPD-függést mutatott korábbi kísérleteinkben, ezért

valószínűsíthető, hogy a mitokondriális aktivitás növekedése, a károsodott celluláris elemek újrahasznosítása 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 repairt, az autofágiával koordináltan elősegíthetik a potenciálisan mutációt hordozó sejtek túlélését is. Ezek az útvonalak tehát terápiás célpontként is relevánsak lehetnek az UVB-indukált mutagenézisben.



**27. ábra. A CPD-indukált mitokondriális oxidatív stressz kompenzatorikus hipermetabolikus változásokat hoz létre keratinocitákban (sematikus ábra)**

## 9. ÖSSZEFOGLALÁS

Munkánk során igazoltuk az UVB irradiációt követő 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 béta oxidációval párhuzamosan, a piruvát, a zsírsavak, valamint a glutamin, mint fő mitokondriális szubsztrátok CPD-függő fokozott 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. Igazoltuk az autofágia és a mitokondriumok közötti aktív szignalingot, melyben az autofágia indukciója a mitokondriális oxidatív foszforilációját 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 hátterében a PARP1 aktivitás 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 az 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.

## 10. SUMMARY

We identified a novel link between UVB-induced acute DNA damage and altered mitochondrial morphology and metabolism. Inhibition of PARP1 enhanced UVB-induced mitochondrial biogenesis, fusion and metabolism by augmenting DNA damage. In contrast, removal of CPDs by photolyase effectively diminished these mitochondrial phenotypes. In parallel with increased oxidative phosphorylation and fatty acid oxidation, we observed enhanced utilization of the major mitochondrial substrates including pyruvate, fatty acids, and glutamine after UVB in a CPD-dependent fashion. We identified the CPD-dependent involvement of ATM, AMPK, p53, PI3K1/AKT, and mTOR pathways in the regulation of autophagy, lipid droplet biogenesis, keratinocyte differentiation, and mitochondrial activity. Autophagy-mitochondria crosstalk was observed in UVB-exposed keratinocytes, in which the induction of autophagy may support mitochondrial oxidative phosphorylation. We have described that increased mitochondrial activity of cells promotes the survival of UVB-irradiated keratinocytes. The induction of the mitochondrial metabolism regulator lipohagy was observed in UVB-irradiated keratinocytes. In parallel with UVB-induced lipid droplet biogenesis, we detected increased keratinocyte differentiation, both showing strong dependency on mitochondrial activity. We demonstrated that UVB-induced  $\text{NAD}^+$ -depletion is due to enhanced PARP1 activity and increased Sirtuin expression. We have reported the activation of several pathways that support DNA repair, but also promote the survival of UVB-irradiated cells with unrepaired DNA damage leading to mutations. Finally, we demonstrated that CPDs and CPD-induced secondary mitochondrial ROS production play a prominent role in mediating several mitochondrial and extramitochondrial changes. So far publications have largely focused on UVB-induced DNA damage and carcinogenesis, ignoring metabolic changes, potential events that could lead to the development of the long-term effects of UVB. In addition, activation of signaling pathways between the nucleus and mitochondria has remained a completely unexplored area in photobiology. Our results shed new light on the role of acute DNA damage following UVB irradiation at physiologically relevant doses, including the role of CPDs in the regulation mitochondrial function. With such a unique methodological approach, our data are novel in photobiology: the delivery of CPD-specific photolyase enzyme into the skin, the use of antioxidants, the inhibition of certain metabolic pathways, as well as the transport of mitochondrial substrates may have therapeutic potential in preventing UVB-induced effects.

## 11. REFERENCIÁK

1. Shea, C.R. and Y.Y. He, *Skin, Effects of Ultraviolet Radiation*, in *Reference Module in Biomedical Sciences*. 2014, Elsevier.
2. D'Orazio, J., et al., *UV radiation and the skin*. International journal of molecular sciences, 2013. **14**(6): p. 12222-12248.
3. Sher, E., *Chapter 2 - Environmental Aspects of Air Pollution*, in *Handbook of Air Pollution From Internal Combustion Engines*, E. Sher, Editor. 1998, Academic Press: San Diego. p. 27-41.
4. Slieman, T.A. and W.L. Nicholson, *Artificial and solar UV radiation induces strand breaks and cyclobutane pyrimidine dimers in Bacillus subtilis spore DNA*. Applied and environmental microbiology, 2000. **66**(1): p. 199-205.
5. Cadet, J. and T. Douki, *Formation of UV-induced DNA damage contributing to skin cancer development*. Photochem Photobiol Sci, 2018. **17**(12): p. 1816-1841.
6. Douki, T., et al., *Formation of the main UV-induced thymine dimeric lesions within isolated and cellular DNA as measured by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. J Biol Chem, 2000. **275**(16): p. 11678-85.
7. Douki, T. and J. Cadet, *Individual determination of the yield of the main UV-induced dimeric pyrimidine photoproducts in DNA suggests a high mutagenicity of CC photolesions*. Biochemistry, 2001. **40**(8): p. 2495-501.
8. Vile, G.F. and R.M. Tyrrell, *Uva radiation-induced oxidative damage to lipids and proteins in vitro and in human skin fibroblasts is dependent on iron and singlet oxygen*. Free Radical Biology and Medicine, 1995. **18**(4): p. 721-730.
9. Vostálová, J., et al., *Differential modulation of inflammatory markers in plasma and skin after single exposures to UVA or UVB radiation in vivo*. Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia, 2013. **157**.
10. Engelsen, O., *The relationship between ultraviolet radiation exposure and vitamin D status*. Nutrients, 2010. **2**(5): p. 482-495.
11. Murphy, G., et al., *The molecular determinants of sunburn cell formation*. Exp Dermatol, 2001. **10**(3): p. 155-60.
12. Hegedűs, C., et al., *PARP1 Inhibition Augments UVB-Mediated Mitochondrial Changes-Implications for UV-Induced DNA Repair and Photocarcinogenesis*. Cancers (Basel), 2019. **12**(1).
13. Harrison, G.I. and A.R. Young, *Ultraviolet radiation-induced erythema in human skin*. Methods, 2002. **28**(1): p. 14-9.
14. Jablonski, N.G. and G. Chaplin, *The evolution of human skin coloration*. J Hum Evol, 2000. **39**(1): p. 57-106.
15. Hawryluk, E.B., A. Oztan, and D. Fisher, *Effects of Ultraviolet Exposure Behaviors on Skin Pigmentation and Melanoma*. Journal of Pigmentary Disorders, 2014. **2014**: p. 1-2.
16. Hruza, L.L. and A.P. Pentland, *Mechanisms of UV-Induced Inflammation*. Journal of Investigative Dermatology, 1993. **100**(1, Supplement): p. S35-S41.
17. Harrison, G.I., A.R. Young, and S.B. McMahon, *Ultraviolet Radiation-Induced Inflammation as a Model for Cutaneous Hyperalgesia*. Journal of Investigative Dermatology, 2004. **122**(1): p. 183-189.
18. Saeed, A., S. Hassan, and N. Maaruf, *Ultraviolet Type B-Radiation-Induced Hyperplasia and Seborrheic Keratosis is Reduced by Application of Commercial Sunscreens*. Pakistan Veterinary Journal, 2016. **36**: p. 253-8318.
19. Schwarz, T., *Mechanisms of UV-induced immunosuppression*. Keio J Med, 2005. **54**(4): p. 165-71.

20. Panich, U., et al., *Ultraviolet Radiation-Induced Skin Aging: The Role of DNA Damage and Oxidative Stress in Epidermal Stem Cell Damage Mediated Skin Aging*. Stem Cells International, 2016. **2016**: p. 7370642.
21. Ramasamy, K., et al., *Ultraviolet radiation-induced carcinogenesis: Mechanisms and experimental models*. Journal of Radiation and Cancer Research, 2017. **8**: p. 4.
22. Rastogi, R.P., et al., *Molecular mechanisms of ultraviolet radiation-induced DNA damage and repair*. Journal of nucleic acids, 2010. **2010**: p. 592980-592980.
23. Paul, D., et al., *Structure and mechanism of pyrimidine–pyrimidone (6-4) photoproduct recognition by the Rad4/XPC nucleotide excision repair complex*. Nucleic Acids Research, 2019. **47**(12): p. 6015-6028.
24. Katiyar, S.K., M.S. Matsui, and H. Mukhtar, *Kinetics of UV light-induced cyclobutane pyrimidine dimers in human skin in vivo: an immunohistochemical analysis of both epidermis and dermis*. Photochem Photobiol, 2000. **72**(6): p. 788-93.
25. Brash, D.E., *UV signature mutations*. Photochemistry and photobiology, 2015. **91**(1): p. 15-26.
26. Amaro-Ortiz, A., B. Yan, and J.A. D'Orazio, *Ultraviolet radiation, aging and the skin: prevention of damage by topical cAMP manipulation*. Molecules, 2014. **19**(5): p. 6202-19.
27. Nospikel, T., *DNA repair in mammalian cells : Nucleotide excision repair: variations on versatility*. Cell Mol Life Sci, 2009. **66**(6): p. 994-1009.
28. Kumar, N., S. Raja, and B. Van Houten, *The involvement of nucleotide excision repair proteins in the removal of oxidative DNA damage*. Nucleic Acids Research, 2020. **48**(20): p. 11227-11243.
29. Reed, E., *Nucleotide excision repair and anti-cancer chemotherapy*. Cytotechnology, 1998. **27**(1-3): p. 187-201.
30. Schärer, O.D., *Nucleotide excision repair in eukaryotes*. Cold Spring Harbor perspectives in biology, 2013. **5**(10): p. a012609-a012609.
31. Kobaisi, F., et al., *Signaling Pathways, Chemical and Biological Modulators of Nucleotide Excision Repair: The Faithful Shield against UV Genotoxicity*. Oxidative medicine and cellular longevity, 2019. **2019**: p. 4654206-4654206.
32. Marteijn, J.A., et al., *Understanding nucleotide excision repair and its roles in cancer and ageing*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2014. **15**(7): p. 465-481.
33. Lans, H., J.A. Marteijn, and W. Vermeulen, *ATP-dependent chromatin remodeling in the DNA-damage response*. Epigenetics & Chromatin, 2012. **5**(1): p. 4.
34. Weber, S., *Light-driven enzymatic catalysis of DNA repair: a review of recent biophysical studies on photolyase*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics, 2005. **1707**(1): p. 1-23.
35. Jorns, M.S., *DNA photorepair: chromophore composition and function in two classes of DNA photolyases*. Biofactors, 1990. **2**(4): p. 207-11.
36. Liu, Z., L. Wang, and D. Zhong, *Dynamics and mechanisms of DNA repair by photolyase*. Physical chemistry chemical physics : PCCP, 2015. **17**(18): p. 11933-11949.
37. Thiagarajan, V., et al., *Kinetics of cyclobutane thymine dimer splitting by DNA photolyase directly monitored in the UV*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2011. **108**(23): p. 9402.
38. Asgatay, S., et al., *Evidence that the (6-4) photolyase mechanism can proceed through an oxetane intermediate*. J Am Chem Soc, 2008. **130**(38): p. 12618-9.
39. Kim, S.T., et al., *Characterization of (6-4) photoproduct DNA photolyase*. J Biol Chem, 1994. **269**(11): p. 8535-40.

40. Ramírez, N., et al., *Immobilization strategies of photolyases: Challenges and perspectives for DNA repairing application*. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 2021. **215**: p. 112113.
41. Puig, S., et al., *Field Cancerisation Improvement with Topical Application of a Film-Forming Medical Device Containing Photolyase and UV Filters in Patients with Actinic Keratosis, a Pilot Study*. Journal of Clinical & Experimental Dermatology Research, 2014. **5**: p. 1-7.
42. Giustini, S., et al., *Preventive Long-Term Effects of a Topical Film-Forming Medical Device with Ultra-High UV Protection Filters and DNA Repair Enzyme in Xeroderma Pigmentosum: A Retrospective Study of Eight Cases*. Case Rep Dermatol, 2014. **6**(3): p. 222-6.
43. Eibenschutz, L., et al., *A 9-month, randomized, assessor-blinded, parallel-group study to evaluate clinical effects of film-forming medical devices containing photolyase and sun filters in the treatment of field cancerization compared with sunscreen in patients after successful photodynamic therapy for actinic keratosis*. Br J Dermatol, 2016. **175**(6): p. 1391-1393.
44. Mei, Q. and V. Dvornyk, *Evolutionary History of the Photolyase/Cryptochrome Superfamily in Eukaryotes*. PloS one, 2015. **10**(9): p. e0135940-e0135940.
45. Thompson, C.L. and A. Sancar, *Photolyase/cryptochrome blue-light photoreceptors use photon energy to repair DNA and reset the circadian clock*. Oncogene, 2002. **21**(58): p. 9043-9056.
46. Snezhkina, A.V., et al., *ROS Generation and Antioxidant Defense Systems in Normal and Malignant Cells*. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2019. **2019**: p. 6175804.
47. Kohen, R. and A. Nyska, *Invited Review: Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification*. Toxicologic pathology, 2002. **30**: p. 620-50.
48. de Jager, T.L., A.E. Cockrell, and S.S. Du Plessis, *Ultraviolet Light Induced Generation of Reactive Oxygen Species*. Adv Exp Med Biol, 2017. **996**: p. 15-23.
49. Li, R., Z. Jia, and M.A. Trush, *Defining ROS in Biology and Medicine*. Reactive oxygen species (Apex, N.C.), 2016. **1**(1): p. 9-21.
50. Choi, T. and S.S. Kim, *Physiological Functions of Mitochondrial Reactive Oxygen Species*. 2019.
51. Xu, H., et al., *Reactive Oxygen Species in Skin Repair, Regeneration, Aging, and Inflammation*. 2018.
52. Hamanaka, R.B. and N.S. Chandel, *Mitochondrial metabolism as a regulator of keratinocyte differentiation*. Cellular logistics, 2013. **3**(1): p. e25456-e25456.
53. Young, A.R., *Chromophores in human skin*. Physics in Medicine and Biology, 1997. **42**(5): p. 789-802.
54. Chen, L., J.Y. Hu, and S.Q. Wang, *The role of antioxidants in photoprotection: a critical review*. J Am Acad Dermatol, 2012. **67**(5): p. 1013-24.
55. Xian, D., et al., *Emerging Perspective: Role of Increased ROS and Redox Imbalance in Skin Carcinogenesis*. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2019. **2019**: p. 8127362.
56. Peus, D., et al., *UVB Activates ERK1/2 and p38 Signaling Pathways via Reactive Oxygen Species in Cultured Keratinocytes*. Journal of Investigative Dermatology, 1999. **112**(5): p. 751-756.
57. Pittayapruerk, P., et al., *Role of Matrix Metalloproteinases in Photoaging and Photocarcinogenesis*. International journal of molecular sciences, 2016. **17**(6): p. 868.

58. Glady, A., et al., *Involvement of NADPH oxidase 1 in UVB-induced cell signaling and cytotoxicity in human keratinocytes*. Biochemistry and biophysics reports, 2018. **14**: p. 7-15.
59. Park, E.K., et al., *The Anti-Wrinkle Mechanism of Melatonin in UVB Treated HaCaT Keratinocytes and Hairless Mice via Inhibition of ROS and Sonic Hedgehog Mediated Inflammatory Proteins*. Int J Mol Sci, 2018. **19**(7).
60. Bellezza, I., et al., *Reductive stress in striated muscle cells*. Cellular and Molecular Life Sciences, 2020. **77**(18): p. 3547-3565.
61. Finkel, T. and N.J. Holbrook, *Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing*. Nature, 2000. **408**(6809): p. 239-247.
62. Mishra, P. and D.C. Chan, *Metabolic regulation of mitochondrial dynamics*. The Journal of cell biology, 2016. **212**(4): p. 379-387.
63. Sebastián, D. and A. Zorzano, *Mitochondrial dynamics and metabolic homeostasis*. Current Opinion in Physiology, 2018. **3**: p. 34-40.
64. Ferree, A. and O. Shirihai, *Mitochondrial dynamics: the intersection of form and function*. Advances in experimental medicine and biology, 2012. **748**: p. 13-40.
65. Rambold, A.S., et al., *Tubular network formation protects mitochondria from autophagosomal degradation during nutrient starvation*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2011. **108**(25): p. 10190.
66. Dorn, G.W., *Evolving Concepts of Mitochondrial Dynamics*. Annual Review of Physiology, 2019. **81**(1): p. 1-17.
67. Tilokani, L., et al., *Mitochondrial dynamics: overview of molecular mechanisms*. Essays in biochemistry, 2018. **62**(3): p. 341-360.
68. Palikaras, K., E. Lionaki, and N. Tavernarakis, *Balancing mitochondrial biogenesis and mitophagy to maintain energy metabolism homeostasis*. Cell Death & Differentiation, 2015. **22**(9): p. 1399-1401.
69. Pickles, S., P. Vigié, and R.J. Youle, *Mitophagy and Quality Control Mechanisms in Mitochondrial Maintenance*. Current Biology, 2018. **28**(4): p. R170-R185.
70. Ploumi, C., I. Daskalaki, and N. Tavernarakis, *Mitochondrial biogenesis and clearance: a balancing act*. Febs j, 2017. **284**(2): p. 183-195.
71. Popov, L.-D., *Mitochondrial biogenesis: An update*. Journal of cellular and molecular medicine, 2020. **24**(9): p. 4892-4899.
72. Gebert, N., et al., *Mitochondrial protein import machineries and lipids: A functional connection*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 2011. **1808**(3): p. 1002-1011.
73. Dominy, J.E. and P. Puigserver, *Mitochondrial Biogenesis through Activation of Nuclear Signaling Proteins*. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2013. **5**(7).
74. Hock, M.B. and A. Kralli, *Transcriptional Control of Mitochondrial Biogenesis and Function*. Annual Review of Physiology, 2009. **71**(1): p. 177-203.
75. Jin, S.M. and R.J. Youle, *PINK1- and Parkin-mediated mitophagy at a glance*. Journal of Cell Science, 2012. **125**(4): p. 795.
76. Seo, B.J., S.H. Yoon, and J.T. Do, *Mitochondrial Dynamics in Stem Cells and Differentiation*. Int J Mol Sci, 2018. **19**(12).
77. Boya, P., F. Reggiori, and P. Codogno, *Emerging regulation and functions of autophagy*. Nature cell biology, 2013. **15**(7): p. 713-720.
78. Kaur, J. and J. Debnath, *Autophagy at the crossroads of catabolism and anabolism*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2015. **16**(8): p. 461-472.
79. Mizushima, N. and M. Komatsu, *Autophagy: renovation of cells and tissues*. Cell, 2011. **147**(4): p. 728-41.

80. Wang, L., X. Ye, and T. Zhao, *The physiological roles of autophagy in the mammalian life cycle*. Biological Reviews, 2019. **94**(2): p. 503-516.
81. Yao, R.-Q., et al., *Organelle-specific autophagy in inflammatory diseases: a potential therapeutic target underlying the quality control of multiple organelles*. Autophagy, 2020: p. 1-17.
82. Condello, M., et al., *Targeting Autophagy to Overcome Human Diseases*. International journal of molecular sciences, 2019. **20**(3): p. 725.
83. Goldsmith, J., B. Levine, and J. Debnath, *Autophagy and cancer metabolism*. Methods in enzymology, 2014. **542**: p. 25-57.
84. Spinelli, J.B. and M.C. Haigis, *The multifaceted contributions of mitochondria to cellular metabolism*. Nature cell biology, 2018. **20**(7): p. 745-754.
85. Sousa, J.S., E. D'Imprima, and J. Vonck, *Mitochondrial Respiratory Chain Complexes*, in *Membrane Protein Complexes: Structure and Function*, J.R. Harris and E.J. Boekema, Editors. 2018, Springer Singapore: Singapore. p. 167-227.
86. Maldonado, E.N. and J.J. Lemasters, *ATP/ADP ratio, the missed connection between mitochondria and the Warburg effect*. Mitochondrion, 2014. **19 Pt A**: p. 78-84.
87. Pizzamiglio, L., E. Focchi, and F. Antonucci, *ATM Protein Kinase: Old and New Implications in Neuronal Pathways and Brain Circuitry*. Cells, 2020. **9**(9): p. 1969.
88. Lee, J.-H. and T.T. Paull, *Mitochondria at the crossroads of ATM-mediated stress signaling and regulation of reactive oxygen species*. Redox biology, 2020. **32**: p. 101511-101511.
89. Krüger, A. and M. Ralser, *ATM is a redox sensor linking genome stability and carbon metabolism*. Sci Signal, 2011. **4**(167): p. pe17.
90. Cosentino, C., D. Grieco, and V. Costanzo, *ATM activates the pentose phosphate pathway promoting anti-oxidant defence and DNA repair*. Embo j, 2011. **30**(3): p. 546-55.
91. Fu, X., et al., *Etoposide induces ATM-dependent mitochondrial biogenesis through AMPK activation*. PLoS One, 2008. **3**(4): p. e2009.
92. Luo, L., et al., *ATM and LKB1 dependent activation of AMPK sensitizes cancer cells to etoposide-induced apoptosis*. Cancer Lett, 2013. **328**(1): p. 114-9.
93. Chow, H.-M., et al., *ATM is activated by ATP depletion and modulates mitochondrial function through NRF1*. The Journal of cell biology, 2019. **218**(3): p. 909-928.
94. Alexander, A., et al., *ATM signals to TSC2 in the cytoplasm to regulate mTORC1 in response to ROS*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(9): p. 4153-8.
95. Valentin-Vega, Y.A., et al., *Mitochondrial dysfunction in ataxia-telangiectasia*. Blood, 2012. **119**(6): p. 1490-500.
96. Patel, A.Y., et al., *Ataxia telangiectasia mutated influences cytochrome c oxidase activity*. Biochemical and biophysical research communications, 2011. **405**(4): p. 599-603.
97. Peng, M., et al., *Intracellular citrate accumulation by oxidized ATM-mediated metabolism reprogramming via PFKF and CS enhances hypoxic breast cancer cell invasion and metastasis*. Cell Death & Disease, 2019. **10**(3): p. 228.
98. Zakikhani, M., et al., *Alterations in Cellular Energy Metabolism Associated with the Antiproliferative Effects of the ATM Inhibitor KU-55933 and with Metformin*. PLOS ONE, 2012. **7**(11): p. e49513.
99. Shi, Y., et al., *Direct regulation of CREB transcriptional activity by ATM in response to genotoxic stress*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(16): p. 5898-903.
100. Schieke, S.M. and T. Finkel, *Mitochondrial signaling, TOR, and life span*. Biol Chem, 2006. **387**(10-11): p. 1357-61.

101. Schieke, S.M., et al., *The mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway regulates mitochondrial oxygen consumption and oxidative capacity*. J Biol Chem, 2006. **281**(37): p. 27643-52.
102. Coene, E.D., et al., *Phosphorylated BRCA1 is predominantly located in the nucleus and mitochondria*. Mol Biol Cell, 2005. **16**(2): p. 997-1010.
103. Matoba, S., et al., *p53 regulates mitochondrial respiration*. Science, 2006. **312**(5780): p. 1650-3.
104. de Souza-Pinto, N.C., C.C. Harris, and V.A. Bohr, *p53 functions in the incorporation step in DNA base excision repair in mouse liver mitochondria*. Oncogene, 2004. **23**(39): p. 6559-68.
105. Dmitrieva, N.I., D. Malide, and M.B. Burg, *Mre11 is expressed in mammalian mitochondria where it binds to mitochondrial DNA*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2011. **301**(3): p. R632-40.
106. Ambrose, M. and R.A. Gatti, *Pathogenesis of ataxia-telangiectasia: the next generation of ATM functions*. Blood, 2013. **121**(20): p. 4036-4045.
107. Watters, D., et al., *Localization of a portion of extranuclear ATM to peroxisomes*. J Biol Chem, 1999. **274**(48): p. 34277-82.
108. Zhang, J., et al., *ATM functions at the peroxisome to induce pexophagy in response to ROS*. Nature cell biology, 2015. **17**(10): p. 1259-1269.
109. Herzig, S. and R.J. Shaw, *AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2018. **19**(2): p. 121-135.
110. Galic, S., et al., *AMPK signaling to acetyl-CoA carboxylase is required for fasting- and cold-induced appetite but not thermogenesis*. eLife, 2018. **7**: p. e32656.
111. Loh, K., et al., *Inhibition of Adenosine Monophosphate-Activated Protein Kinase-3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase Signaling Leads to Hypercholesterolemia and Promotes Hepatic Steatosis and Insulin Resistance*. Hepatol Commun, 2019. **3**(1): p. 84-98.
112. Li, Y., et al., *AMPK phosphorylates and inhibits SREBP activity to attenuate hepatic steatosis and atherosclerosis in diet-induced insulin-resistant mice*. Cell metabolism, 2011. **13**(4): p. 376-388.
113. Bultot, L., et al., *AMP-activated protein kinase phosphorylates and inactivates liver glycogen synthase*. The Biochemical journal, 2012. **443**: p. 193-203.
114. Xu, J., J. Ji, and X.H. Yan, *Cross-talk between AMPK and mTOR in regulating energy balance*. Crit Rev Food Sci Nutr, 2012. **52**(5): p. 373-81.
115. Abbud, W., et al., *Stimulation of AMP-Activated Protein Kinase (AMPK) Is Associated with Enhancement of Glut1-Mediated Glucose Transport*. Archives of biochemistry and biophysics, 2000. **380**: p. 347-52.
116. Habegger, K.M., et al., *AMPK enhances insulin-stimulated GLUT4 regulation via lowering membrane cholesterol*. Endocrinology, 2012. **153**(5): p. 2130-2141.
117. Ahmadian, M., et al., *Desnutrin/ATGL is regulated by AMPK and is required for a brown adipose phenotype*. Cell metabolism, 2011. **13**(6): p. 739-748.
118. Mack, H., et al., *AMPK-dependent phosphorylation of ULK1 regulates ATG9 localization*. Autophagy, 2012. **8**: p. 1197-214.
119. Zhang, D., et al., *AMPK regulates autophagy by phosphorylating BECN1 at threonine 388*. Autophagy, 2016. **12**(9): p. 1447-59.
120. McGarry, J.D., G.F. Leatherman, and D.W. Foster, *Carnitine palmitoyltransferase I. The site of inhibition of hepatic fatty acid oxidation by malonyl-CoA*. J Biol Chem, 1978. **253**(12): p. 4128-36.
121. Cantó, C. and J. Auwerx, *PGC-1alpha, SIRT1 and AMPK, an energy sensing network that controls energy expenditure*. Current opinion in lipidology, 2009. **20**(2): p. 98-105.

122. Lomax, M.E., et al., *Characterization of p53 oligomerization domain mutations isolated from Li-Fraumeni and Li-Fraumeni like family members*. *Oncogene*, 1998. **17**(5): p. 643-649.
123. Ozaki, T. and A. Nakagawara, *Role of p53 in Cell Death and Human Cancers*. *Cancers*, 2011. **3**(1): p. 994-1013.
124. Lacroix, M., et al., *Metabolic functions of the tumor suppressor p53: Implications in normal physiology, metabolic disorders, and cancer*. *Molecular Metabolism*, 2020. **33**: p. 2-22.
125. Kim, H.R., et al., *p53 regulates glucose metabolism by miR-34a*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013. **437**(2): p. 225-31.
126. Schwartzenberg-Bar-Yoseph, F., M. Armoni, and E. Karnieli, *The Tumor Suppressor p53 Down-Regulates Glucose Transporters and GLUT1 and GLUT4 Gene Expression*. *Cancer Research*, 2004. **64**(7): p. 2627.
127. Zawacka-Pankau, J., et al., *Inhibition of glycolytic enzymes mediated by pharmacologically activated p53: targeting Warburg effect to fight cancer*. *J Biol Chem*, 2011. **286**(48): p. 41600-15.
128. Corcoran, C.A., Y. Huang, and M.S. Sheikh, *The regulation of energy generating metabolic pathways by p53*. *Cancer Biol Ther*, 2006. **5**(12): p. 1610-3.
129. Saleem, A., et al., *Effect of p53 on mitochondrial morphology, import, and assembly in skeletal muscle*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2015. **308**(4): p. C319-29.
130. Hu, W., et al., *Glutaminase 2, a novel p53 target gene regulating energy metabolism and antioxidant function*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2010. **107**(16): p. 7455.
131. Goldstein, I., et al., *p53, a novel regulator of lipid metabolism pathways*. *J Hepatol*, 2012. **56**(3): p. 656-62.
132. Ide, T., et al., *GAMT, a p53-inducible modulator of apoptosis, is critical for the adaptive response to nutrient stress*. *Molecular cell*, 2009. **36**(3): p. 379-392.
133. Jiang, D., et al., *Analysis of p53 transactivation domain mutants reveals Acad11 as a metabolic target important for p53 pro-survival function*. *Cell reports*, 2015. **10**(7): p. 1096-1109.
134. Sanchez-Macedo, N., et al., *Depletion of the novel p53-target gene carnitine palmitoyltransferase 1C delays tumor growth in the neurofibromatosis type I tumor model*. *Cell Death Differ*, 2013. **20**(4): p. 659-68.
135. Assaily, W., et al., *ROS-mediated p53 induction of Lpin1 regulates fatty acid oxidation in response to nutritional stress*. *Mol Cell*, 2011. **44**(3): p. 491-501.
136. de la Cruz López, K.G., et al., *mTORC1 as a Regulator of Mitochondrial Functions and a Therapeutic Target in Cancer*. *Frontiers in oncology*, 2019. **9**: p. 1373-1373.
137. Santulli, G. and H. Totary-Jain, *Tailoring mTOR-based therapy: molecular evidence and clinical challenges*. *Pharmacogenomics*, 2013. **14**(12): p. 1517-1526.
138. Kim, S., et al., *Amino acid signaling to mTOR mediated by inositol polyphosphate multikinase*. *Cell Metab*, 2011. **13**(2): p. 215-21.
139. Chen, K.S., et al., *EGF Receptor and mTORC1 Are Novel Therapeutic Targets in Nonseminomatous Germ Cell Tumors*. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2018. **17**(5): p. 1079.
140. Duan, L. and C.G. Maki, *The IGF-1R/AKT pathway determines cell fate in response to p53*. *Translational Cancer Research*, 2016. **5**(6): p. 664-675.
141. Hoxhaj, G. and B.D. Manning, *The PI3K-AKT network at the interface of oncogenic signalling and cancer metabolism*. *Nature Reviews Cancer*, 2020. **20**(2): p. 74-88.

142. Beg, M., et al., *Distinct Akt phosphorylation states are required for insulin regulated Glut4 and Glut1-mediated glucose uptake*. eLife, 2017. **6**: p. e26896.
143. Zhong, H., et al., *Modulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics*. Cancer Res, 2000. **60**(6): p. 1541-5.
144. Hudson, C.C., et al., *Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression and function by the mammalian target of rapamycin*. Molecular and cellular biology, 2002. **22**(20): p. 7004-7014.
145. Wang, L., et al., *Hexokinase 2-Mediated Warburg Effect Is Required for PTEN- and p53-Deficiency-Driven Prostate Cancer Growth*. Cell reports, 2014. **8**.
146. Novellasdemunt, L., et al., *Akt-dependent activation of the heart 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase (PFKFB2) isoenzyme by amino acids*. The Journal of biological chemistry, 2013. **288**(15): p. 10640-10651.
147. Hu, H., et al., *Phosphoinositide 3-Kinase Regulates Glycolysis through Mobilization of Aldolase from the Actin Cytoskeleton*. Cell, 2016. **164**(3): p. 433-46.
148. Manerba, M., et al., *The activation of lactate dehydrogenase induced by mTOR drives neoplastic change in breast epithelial cells*. PloS one, 2018. **13**(8): p. e0202588-e0202588.
149. Cunningham, J.T., et al., *mTOR controls mitochondrial oxidative function through a YY1-PGC-1alpha transcriptional complex*. Nature, 2007. **450**(7170): p. 736-40.
150. Wang, L., et al., *Apoptosis induced by PGC-1β in breast cancer cells is mediated by the mTOR pathway*. Oncol Rep, 2013. **30**(4): p. 1631-1638.
151. Morita, M., et al., *mTORC1 controls mitochondrial activity and biogenesis through 4E-BP-dependent translational regulation*. Cell Metab, 2013. **18**(5): p. 698-711.
152. Zhang, Y. and B.D. Manning, *mTORC1 signaling activates NRF1 to increase cellular proteasome levels*. Cell cycle (Georgetown, Tex.), 2015. **14**(13): p. 2011-2017.
153. Ramanathan, A. and S.L. Schreiber, *Direct control of mitochondrial function by mTOR*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009. **106**(52): p. 22229-22232.
154. Roberts, D.J. and S. Miyamoto, *Hexokinase II integrates energy metabolism and cellular protection: Acting on mitochondria and TORCing to autophagy*. Cell death and differentiation, 2015. **22**(2): p. 248-257.
155. Teng, C.-F., et al., *Activation of ATP Citrate Lyase by mTOR Signal Induces Disturbed Lipid Metabolism in Hepatitis B Virus Pre-S2 Mutant Tumorigenesis*. Journal of Virology, 2015. **89**(1): p. 605.
156. Laplante, M. and David M. Sabatini, *mTOR Signaling in Growth Control and Disease*. Cell, 2012. **149**(2): p. 274-293.
157. Zhu, Y., et al., *Regulation of fatty acid metabolism by mTOR in adult murine hearts occurs independently of changes in PGC-1α*. American journal of physiology. Heart and circulatory physiology, 2013. **305**(1): p. H41-H51.
158. Sanderson, D.J. and M.S. Cohen, *Mechanisms governing PARP expression, localization, and activity in cells*. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, 2020. **55**(6): p. 541-554.
159. Mangerich, A. and A. Bürkle, *Pleiotropic Cellular Functions of PARP1 in Longevity and Aging: Genome Maintenance Meets Inflammation*. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2012. **2012**: p. 321653.
160. Szántó, M., et al., *Poly(ADP-ribose) polymerase-2 depletion reduces doxorubicin-induced damage through SIRT1 induction*. Cardiovascular Research, 2011. **92**(3): p. 430-438.

161. Shieh, W.M., et al., *Poly(ADP-ribose) polymerase null mouse cells synthesize ADP-ribose polymers*. J Biol Chem, 1998. **273**(46): p. 30069-72.
162. Osborne, B., et al., *The role of mitochondrial sirtuins in health and disease*. Free Radical Biology and Medicine, 2016. **100**: p. 164-174.
163. Tang, B.L., *Sirt1 and the Mitochondria*. Molecules and cells, 2016. **39**(2): p. 87-95.
164. Mendoza-Alvarez, H. and R. Alvarez-Gonzalez, *Poly(ADP-ribose) polymerase is a catalytic dimer and the automodification reaction is intermolecular*. J Biol Chem, 1993. **268**(30): p. 22575-80.
165. Smith, B.C., W.C. Hallows, and J.M. Denu, *A continuous microplate assay for sirtuins and nicotinamide-producing enzymes*. Analytical biochemistry, 2009. **394**(1): p. 101-109.
166. Chung, H.T. and Y. Joe, *Antagonistic crosstalk between SIRT1, PARP-1, and -2 in the regulation of chronic inflammation associated with aging and metabolic diseases*. Integrative Medicine Research, 2014. **3**(4): p. 198-203.
167. Fouquerel, E., et al., *ARTD1/PARP1 negatively regulates glycolysis by inhibiting hexokinase I independent of NAD<sup>+</sup> depletion*. Cell reports, 2014. **8**(6): p. 1819-1831.
168. Du, X., et al., *Inhibition of GAPDH activity by poly(ADP-ribose) polymerase activates three major pathways of hyperglycemic damage in endothelial cells*. J Clin Invest, 2003. **112**(7): p. 1049-57.
169. Zhou, H.Z., et al., *Poly(ADP-ribose) polymerase-1 hyperactivation and impairment of mitochondrial respiratory chain complex I function in reperfused mouse hearts*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006. **291**(2): p. H714-23.
170. Brunyanszki, A., et al., *Mitochondrial poly(ADP-ribose) polymerase: The Wizard of Oz at work*. Free radical biology & medicine, 2016. **100**: p. 257-270.
171. Scheibye-Knudsen, M., et al., *A high-fat diet and NAD(+) activate Sirt1 to rescue premature aging in cockayne syndrome*. Cell Metab, 2014. **20**(5): p. 840-855.
172. Fang, E.F., et al., *Defective mitophagy in XPA via PARP-1 hyperactivation and NAD(+)/SIRT1 reduction*. Cell, 2014. **157**(4): p. 882-896.
173. Fang, E.F., et al., *NAD(+) Replenishment Improves Lifespan and Healthspan in Ataxia Telangiectasia Models via Mitophagy and DNA Repair*. Cell Metab, 2016. **24**(4): p. 566-581.
174. Fakouri, N.B., et al., *Toward understanding genomic instability, mitochondrial dysfunction and aging*. Febs j, 2019. **286**(6): p. 1058-1073.
175. Jiang, N., et al., *Effects of poly (ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) inhibition on sulfur mustard-induced cutaneous injuries in vitro and in vivo*. PeerJ, 2016. **4**: p. e1890.
176. Batra, V. and B. Kislaly, *Mitigation of gamma-radiation induced abasic sites in genomic DNA by dietary nicotinamide supplementation: metabolic up-regulation of NAD(+) biosynthesis*. Mutation research, 2013. **749**(1-2): p. 28-38.
177. Surjana, D., G.M. Halliday, and D.L. Damian, *Nicotinamide enhances repair of ultraviolet radiation-induced DNA damage in human keratinocytes and ex vivo skin*. Carcinogenesis, 2013. **34**(5): p. 1144-9.
178. Cerutti, R., et al., *NAD(+)-dependent activation of Sirt1 corrects the phenotype in a mouse model of mitochondrial disease*. Cell metabolism, 2014. **19**(6): p. 1042-1049.
179. Murata, M.M., et al., *NAD<sup>+</sup> consumption by PARP1 in response to DNA damage triggers metabolic shift critical for damaged cell survival*. Molecular biology of the cell, 2019. **30**(20): p. 2584-2597.
180. Brace, L.E., et al., *Increased oxidative phosphorylation in response to acute and chronic DNA damage*. NPJ Aging Mech Dis, 2016. **2**: p. 16022.
181. Tondera, D., et al., *SLP-2 is required for stress-induced mitochondrial hyperfusion*. The EMBO journal, 2009. **28**(11): p. 1589-1600.

182. Qin, L., et al., *CDK1 Enhances Mitochondrial Bioenergetics for Radiation-Induced DNA Repair*. Cell Rep, 2015. **13**(10): p. 2056-63.
183. Lu, C.-L., et al., *Tumor cells switch to mitochondrial oxidative phosphorylation under radiation via mTOR-mediated hexokinase II inhibition--a Warburg-reversing effect*. PloS one, 2015. **10**(3): p. e0121046-e0121046.
184. Shen, L., et al., *PGC1 $\alpha$  promotes cisplatin resistance in human ovarian carcinoma cells through upregulation of mitochondrial biogenesis*. International Journal of Oncology, 2018. **53**.
185. Han, X., et al., *AMPK activation protects cells from oxidative stress-induced senescence via autophagic flux restoration and intracellular NAD(+) elevation*. Aging cell, 2016. **15**(3): p. 416-427.
186. Xiao, Y., et al., *Metabolic Response to NAD Depletion across Cell Lines Is Highly Variable*. PLOS ONE, 2016. **11**(10): p. e0164166.
187. Schuster, S., et al., *FK866-induced NAMPT inhibition activates AMPK and downregulates mTOR signaling in hepatocarcinoma cells*. Biochemical and biophysical research communications, 2015. **458**(2): p. 334-340.
188. Boukamp, P., et al., *Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line*. Journal of Cell Biology, 1988. **106**(3): p. 761-771.
189. Balogh, A., et al., *Reference genes for quantitative real time PCR in UVB irradiated keratinocytes*. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 2008. **93**(3): p. 133-139.
190. Rueden, C.T., et al., *ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data*. BMC Bioinformatics, 2017. **18**(1): p. 529.
191. Merrill, R.A., K.H. Flippo, and S. Strack, *Measuring Mitochondrial Shape with ImageJ*, in *Techniques to Investigate Mitochondrial Function in Neurons*, S. Strack and Y.M. Usachev, Editors. 2017, Springer New York: New York, NY. p. 31-48.
192. Dikalov, S.I. and D.G. Harrison, *Methods for detection of mitochondrial and cellular reactive oxygen species*. Antioxidants & redox signaling, 2014. **20**(2): p. 372-382.
193. Zhou, G., et al., *Optimal ROS Signaling Is Critical for Nuclear Reprogramming*. Cell Rep, 2016. **15**(5): p. 919-925.
194. Roelofs, B.A., et al., *Low micromolar concentrations of the superoxide probe MitoSOX uncouple neural mitochondria and inhibit complex IV*. Free Radic Biol Med, 2015. **86**: p. 250-8.
195. Wei, H. and X. Yu, *Functions of PARylation in DNA Damage Repair Pathways*. Genomics Proteomics Bioinformatics, 2016. **14**(3): p. 131-139.
196. Lo, H.-L., et al., *Differential biologic effects of CPD and 6-4PP UV-induced DNA damage on the induction of apoptosis and cell-cycle arrest*. BMC cancer, 2005. **5**: p. 135-135.
197. Hsie, A.W., D.B. Couch, and J.P. O'Neill. *Utilization of a quantitative mammalian cell mutation system, CHO/HGPRT, in experimental mutagenesis and genetic toxicology*. 1977. United States.
198. Johnson, G., *Mammalian cell HPRT gene mutation assay: Test methods*. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.), 2012. **817**: p. 55-67.
199. Dixit, M. and A. Kumar, *In Vitro Gene Genotoxicity Test Methods*. 2018. p. 67-89.
200. Gong, B., Q. Chen, and A. Almasan, *Ionizing radiation stimulates mitochondrial gene expression and activity*. Radiat Res, 1998. **150**(5): p. 505-12.
201. Picard, M., et al., *Mitochondrial morphology transitions and functions: implications for retrograde signaling?* American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology, 2013. **304**(6): p. R393-R406.

202. Scott, I. and R.J. Youle, *Mitochondrial fission and fusion*. Essays in biochemistry, 2010. **47**: p. 85-98.
203. LeBleu, V.S., et al., *PGC-1 $\alpha$  mediates mitochondrial biogenesis and oxidative phosphorylation in cancer cells to promote metastasis*. Nat Cell Biol, 2014. **16**(10): p. 992-1003, 1-15.
204. Westermann, B., *Bioenergetic role of mitochondrial fusion and fission*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics, 2012. **1817**(10): p. 1833-1838.
205. Yao, C.-H., et al., *Mitochondrial fusion supports increased oxidative phosphorylation during cell proliferation*. eLife, 2019. **8**: p. e41351.
206. Jheng, H.-F., et al., *Mitochondrial fission contributes to mitochondrial dysfunction and insulin resistance in skeletal muscle*. Molecular and cellular biology, 2012. **32**(2): p. 309-319.
207. Lewis, T.L., et al., *MFF-dependent mitochondrial fission regulates presynaptic release and axon branching by limiting axonal mitochondria size*. Nature Communications, 2018. **9**(1): p. 5008.
208. Coronado, M., et al., *Physiological Mitochondrial Fragmentation Is a Normal Cardiac Adaptation to Increased Energy Demand*. Circ Res, 2018. **122**(2): p. 282-295.
209. Nicholls, D.G. and S.L. Budd, *Mitochondria and neuronal survival*. Physiol Rev, 2000. **80**(1): p. 315-60.
210. Maréchal, A. and L. Zou, *DNA damage sensing by the ATM and ATR kinases*. Cold Spring Harbor perspectives in biology, 2013. **5**(9): p. a012716.
211. Symersky, J., et al., *Oligomycin frames a common drug-binding site in the ATP synthase*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012. **109**(35): p. 13961-13965.
212. Heinz, S., et al., *Mechanistic Investigations of the Mitochondrial Complex I Inhibitor Rotenone in the Context of Pharmacological and Safety Evaluation*. Scientific Reports, 2017. **7**(1): p. 45465.
213. McKee, E.E., et al., *Inhibition of Mammalian Mitochondrial Protein Synthesis by Oxazolidinones*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2006. **50**(6): p. 2042.
214. Eliopoulos, A.G., S. Havaki, and V.G. Gorgoulis, *DNA Damage Response and Autophagy: A Meaningful Partnership*. Frontiers in genetics, 2016. **7**: p. 204-204.
215. Fu, D., J. Lippincott-Schwartz, and I.M. Arias, *Increased mitochondrial fusion and autophagy help isolated hepatocytes repolarize in collagen sandwich cultures*. Autophagy, 2013. **9**(12): p. 2154-2155.
216. Thorsell, A.-G., et al., *Structural Basis for Potency and Promiscuity in Poly(ADP-ribose) Polymerase (PARP) and Tankyrase Inhibitors*. Journal of medicinal chemistry, 2017. **60**(4): p. 1262-1271.
217. Shieh, W.M., et al., *Poly(ADP-ribose) Polymerase Null Mouse Cells Synthesize ADP-ribose Polymers*. Journal of Biological Chemistry, 1998. **273**(46): p. 30069-30072.
218. Zarkovic, G., et al., *Characterization of DNA ADP-ribosyltransferase activities of PARP2 and PARP3: new insights into DNA ADP-ribosylation*. Nucleic Acids Research, 2018. **46**(5): p. 2417-2431.
219. Garcia Roche, M., et al., *Respiratory Analysis of Coupled Mitochondria in Cryopreserved Liver Biopsies*. Redox Biology, 2018. **17**.
220. Welte, M.A. and A.P. Gould, *Lipid droplet functions beyond energy storage*. Biochimica et biophysica acta. Molecular and cell biology of lipids, 2017. **1862**(10 Pt B): p. 1260-1272.
221. Kounakis, K., et al., *Emerging Roles of Lipophagy in Health and Disease*. Frontiers in Cell and Developmental Biology, 2019. **7**(185).

222. Benador, I.Y., et al., *Mitochondria Bound to Lipid Droplets Have Unique Bioenergetics, Composition, and Dynamics that Support Lipid Droplet Expansion*. Cell metabolism, 2018. **27**(4): p. 869-885.e6.
223. Heck, D.E., et al., *UVB light stimulates production of reactive oxygen species: unexpected role for catalase*. J Biol Chem, 2003. **278**(25): p. 22432-6.
224. Raad, H., et al., *NADPH Oxidase-1 Plays a Key Role in Keratinocyte Responses to UV Radiation and UVB-Induced Skin Carcinogenesis*. Journal of Investigative Dermatology, 2017. **137**(6): p. 1311-1321.
225. Dornas, W. and V. Lagente, *Blocking Reactive Oxygen Species Generation Inhibits Biogenesis in Mitochondrial Dysfunction*. Reactive Oxygen Species, 2019.
226. Bikle, D., Z. Xie, and C.-L. Tu, *Calcium regulation of keratinocyte differentiation*. Expert review of endocrinology & metabolism, 2012. **7**: p. 461-472.
227. den Hartigh, L.J., et al., *Fatty acids from very low-density lipoprotein lipolysis products induce lipid droplet accumulation in human monocytes*. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950), 2010. **184**(7): p. 3927-3936.
228. Lehman, T.A., et al., *p53 mutations in human immortalized epithelial cell lines*. Carcinogenesis, 1993. **14**(5): p. 833-9.
229. Abd Elmageed, Z.Y., et al., *Characterization of Coordinated Immediate Responses by p16INK4A and p53 Pathways in UVB-Irradiated Human Skin Cells*. Journal of Investigative Dermatology, 2009. **129**(1): p. 175-183.
230. Henseleit, U., et al., *Role of p53 in UVB-induced apoptosis in human HaCaT keratinocytes*. The Journal of investigative dermatology, 1997. **109** **6**: p. 722-7.
231. Martynova, E., et al., *Gain-of-function p53 mutants have widespread genomic locations partially overlapping with p63*. Oncotarget, 2012. **3**(2): p. 132-143.
232. Yang, D. and J. Kim, *Mitochondrial Retrograde Signalling and Metabolic Alterations in the Tumour Microenvironment*. Cells, 2019. **8**(3): p. 275.
233. Whelan, S.P. and B.S. Zuckerbraun, *Mitochondrial Signaling: Forwards, Backwards, and In Between*. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2013. **2013**: p. 351613.
234. Shimura, T., et al., *Mitochondrial reactive oxygen species perturb AKT/cyclin D1 cell cycle signaling via oxidative inactivation of PP2A in lowdose irradiated human fibroblasts*. Oncotarget, 2016. **7**(3): p. 3559-3570.
235. Bai, P., et al., *Poly(ADP-ribose) polymerases as modulators of mitochondrial activity*. Trends Endocrinol Metab, 2015. **26**(2): p. 75-83.
236. Scheibye-Knudsen, M., et al., *Cockayne syndrome group B protein prevents the accumulation of damaged mitochondria by promoting mitochondrial autophagy*. J Exp Med, 2012. **209**(4): p. 855-69.
237. Guarente, L., *Linking DNA damage, NAD(+)/SIRT1, and aging*. Cell Metab, 2014. **20**(5): p. 706-707.
238. Lee, C.-H., et al., *Molecular Mechanisms of UV-Induced Apoptosis and Its Effects on Skin Residential Cells: The Implication in UV-Based Phototherapy*. International Journal of Molecular Sciences, 2013. **14**(3).
239. Battie, C., et al., *New insights in photoaging, UVA induced damage and skin types*. Experimental Dermatology, 2014. **23**(s1): p. 7-12.
240. Sample, A. and Y.Y. He, *Mechanisms and prevention of UV-induced melanoma*. Photodermatol Photoimmunol Photomed, 2018. **34**(1): p. 13-24.
241. Narayanan, D.L., R.N. Saladi, and J.L. Fox, *Review: Ultraviolet radiation and skin cancer*. International Journal of Dermatology, 2010. **49**(9): p. 978-986.
242. Jugé, R., et al., *Quantification and Characterization of UVB-Induced Mitochondrial Fragmentation in Normal Primary Human Keratinocytes*. Scientific Reports, 2016. **6**(1): p. 35065.

243. Shimmura, S. and K. Tsubota, *Ultraviolet B-induced mitochondrial dysfunction is associated with decreased cell detachment of corneal epithelial cells in vitro*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1997. **38**(3): p. 620-6.
244. Wagner, L.M., *Profile of veliparib and its potential in the treatment of solid tumors*. OncoTargets and therapy, 2015. **8**: p. 1931-1939.
245. Lucas-Lledó, J.I. and M. Lynch, *Evolution of mutation rates: phylogenomic analysis of the photolyase/cryptochrome family*. Molecular biology and evolution, 2009. **26**(5): p. 1143-1153.
246. Kamaletdinova, T., Z. Fanaei-Kahrani, and Z.-Q. Wang, *The Enigmatic Function of PARP1: From PARylation Activity to PAR Readers*. Cells, 2019. **8**(12): p. 1625.
247. Robu, M., et al., *Poly(ADP-ribose) polymerase 1 escorts XPC to UV-induced DNA lesions during nucleotide excision repair*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017. **114**(33): p. E6847-e6856.
248. Robu, M., et al., *Role of poly(ADP-ribose) polymerase-1 in the removal of UV-induced DNA lesions by nucleotide excision repair*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(5): p. 1658-63.
249. Pines, A., et al., *PARP1 promotes nucleotide excision repair through DDB2 stabilization and recruitment of ALC1*. The Journal of cell biology, 2012. **199**(2): p. 235-249.
250. Messner, S., et al., *PARP1 ADP-ribosylates lysine residues of the core histone tails*. Nucleic acids research, 2010. **38**(19): p. 6350-6362.
251. Poirier, G.G., et al., *Poly(ADP-ribosylation) of polynucleosomes causes relaxation of chromatin structure*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1982. **79**(11): p. 3423-7.
252. Chung, T.-W., et al., *Simularin induces DNA damage, G2/M phase arrest, and apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells*. BMC complementary and alternative medicine, 2017. **17**(1): p. 62-62.
253. Athar, M., et al., *Mechanism of ultraviolet B-induced cell cycle arrest in G2/M phase in immortalized skin keratinocytes with defective p53*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **277**(1): p. 107-11.
254. Murai, J., et al., *Trapping of PARP1 and PARP2 by Clinical PARP Inhibitors*. Cancer Research, 2012. **72**(21): p. 5588-5599.
255. Helleday, T., *The underlying mechanism for the PARP and BRCA synthetic lethality: clearing up the misunderstandings*. Mol Oncol, 2011. **5**(4): p. 387-93.
256. Muvarak, N.E., et al., *Enhancing the Cytotoxic Effects of PARP Inhibitors with DNA Demethylating Agents - A Potential Therapy for Cancer*. Cancer cell, 2016. **30**(4): p. 637-650.
257. Horton, J.K. and S.H. Wilson, *Strategic Combination of DNA-Damaging Agent and PARP Inhibitor Results in Enhanced Cytotoxicity*. Frontiers in oncology, 2013. **3**: p. 257-257.
258. Plummer, R., et al., *453P - Phase I Study of the Parp Inhibitor E7449 As a Single Agent in Patients with Advanced Solid Tumors or B-Cell Lymphoma*. Annals of Oncology, 2014. **25**: p. iv151.
259. Coleman, R.L., et al., *Rucaparib maintenance treatment for recurrent ovarian carcinoma after response to platinum therapy (ARIEL3): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial*. The Lancet, 2017. **390**(10106): p. 1949-1961.
260. LaFargue, C.J., et al., *Exploring and comparing adverse events between PARP inhibitors*. The Lancet. Oncology, 2019. **20**(1): p. e15-e28.
261. Ray Chaudhuri, A. and A. Nussenzweig, *The multifaceted roles of PARP1 in DNA repair and chromatin remodelling*. Nature reviews. Molecular cell biology, 2017. **18**(10): p. 610-621.

262. Mitchell, D.L., J.E. Cleaver, and J.H. Epstein, *Repair of Pyrimidine (6-4)pyrimidone Photoproducts in Mouse Skin*. Journal of Investigative Dermatology, 1990. **95**(1): p. 55-59.
263. Takahashi, S., et al., *Transport of rice cyclobutane pyrimidine dimer photolyase into mitochondria relies on a targeting sequence located in its C-terminal internal region*. Plant J, 2014. **79**(6): p. 951-63.
264. Wright, R.H.G., et al., *CDK2-dependent activation of PARP-1 is required for hormonal gene regulation in breast cancer cells*. Genes & development, 2012. **26**(17): p. 1972-1983.
265. Imai, S.-i. and L. Guarente, *It takes two to tango: NAD<sup>+</sup> and sirtuins in aging/longevity control*. npj Aging and Mechanisms of Disease, 2016. **2**(1): p. 16017.
266. Houtkooper, R.H., E. Pirinen, and J. Auwerx, *Sirtuins as regulators of metabolism and healthspan*. Nature reviews. Molecular cell biology, 2012. **13**(4): p. 225-238.
267. Ye, X., et al., *Sirtuins in glucose and lipid metabolism*. Oncotarget, 2017. **8**(1): p. 1845-1859.
268. Zhang, H., P.E. Head, and D.S. Yu, *SIRT2 orchestrates the DNA damage response*. Cell Cycle, 2016. **15**(16): p. 2089-2090.
269. Toiber, D., et al., *SIRT6 recruits SNF2H to DNA break sites, preventing genomic instability through chromatin remodeling*. Mol Cell, 2013. **51**(4): p. 454-68.
270. Sengupta, A. and D. Haldar, *Human sirtuin 3 (SIRT3) deacetylates histone H3 lysine 56 to promote nonhomologous end joining repair*. DNA Repair (Amst), 2018. **61**: p. 1-16.
271. Ming, M., et al., *Regulation of global genome nucleotide excision repair by SIRT1 through xeroderma pigmentosum C*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2010. **107**(52): p. 22623.
272. Li, L., et al., *SIRT7 is a histone desuccinylase that functionally links to chromatin compaction and genome stability*. Nat Commun, 2016. **7**: p. 12235.
273. Jeong, S.M., et al., *SIRT4 has tumor-suppressive activity and regulates the cellular metabolic response to DNA damage by inhibiting mitochondrial glutamine metabolism*. Cancer Cell, 2013. **23**(4): p. 450-63.
274. Stotland, A. and R.A. Gottlieb, *Mitochondrial quality control: Easy come, easy go*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, 2015. **1853**(10, Part B): p. 2802-2811.
275. Diaz, F. and C.T. Moraes, *Mitochondrial biogenesis and turnover*. Cell calcium, 2008. **44**(1): p. 24-35.
276. Kamble, P., et al., *Aspirin may promote mitochondrial biogenesis via the production of hydrogen peroxide and the induction of Sirtuin1/PGC-1 $\alpha$  genes*. European journal of pharmacology, 2013. **699**(1-3): p. 55-61.
277. Spiegelman, B.M., *Transcriptional control of energy homeostasis through the PGC1 coactivators*. Novartis Found Symp, 2007. **286**: p. 3-6; discussion 6-12, 162-3, 196-203.
278. Skulachev, V.P., *Mitochondrial filaments and clusters as intracellular power-transmitting cables*. Trends in Biochemical Sciences, 2001. **26**(1): p. 23-29.
279. Schrepfer, E. and L. Scorrano, *Mitofusins, from Mitochondria to Metabolism*. Molecular Cell, 2016. **61**(5): p. 683-694.
280. Dahl, E.S. and K.M. Aird, *Ataxia-Telangiectasia Mutated Modulation of Carbon Metabolism in Cancer*. Frontiers in oncology, 2017. **7**: p. 291-291.
281. Liu, J., et al., *Tumor suppressor p53 and metabolism*. Journal of Molecular Cell Biology, 2019. **11**(4): p. 284-292.
282. Mao, Z. and W. Zhang, *Role of mTOR in Glucose and Lipid Metabolism*. International journal of molecular sciences, 2018. **19**(7): p. 2043.

283. Li, B., et al., *Downregulation of the Werner syndrome protein induces a metabolic shift that compromises redox homeostasis and limits proliferation of cancer cells*. Aging Cell, 2014. **13**(2): p. 367-78.
284. Volkow, N.D., et al., *Brain glucose metabolism in adults with ataxia-telangiectasia and their asymptomatic relatives*. Brain, 2014. **137**(6): p. 1753-1761.
285. Kreienkamp, R. and S. Gonzalo, *Metabolic Dysfunction in Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome*. Cells, 2020. **9**(2): p. 395.
286. Scheibye-Knudsen, M., et al., *A High-Fat Diet and NAD<sup>+</sup> Activate Sirt1 to Rescue Premature Aging in Cockayne Syndrome*. Cell Metabolism, 2014. **20**(5): p. 840-855.
287. Petermann, E., M. Ziegler, and S.L. Oei, *ATP-dependent selection between single nucleotide and long patch base excision repair*. DNA Repair (Amst), 2003. **2**(10): p. 1101-14.
288. Kisker, C., J. Kuper, and B. Van Houten, *Prokaryotic nucleotide excision repair*. Cold Spring Harbor perspectives in biology, 2013. **5**(3): p. a012591-a012591.
289. Matsumoto, S., et al., *Functional regulation of the DNA damage-recognition factor DDB2 by ubiquitination and interaction with xeroderma pigmentosum group C protein*. Nucleic acids research, 2015. **43**(3): p. 1700-1713.
290. Varga-Weisz, P., *ATP-dependent chromatin remodeling factors: Nucleosome shufflers with many missions*. Oncogene, 2001. **20**(24): p. 3076-3085.
291. Boza, J., et al., *Role of glutamine on the de novo purine nucleotide synthesis in Caco-2 cells*. Eur. J. Nutr., 2000. **39**: p. 38-46.
292. Tran, T.Q., et al., *Glutamine deficiency induces DNA alkylation damage and sensitizes cancer cells to alkylating agents through inhibition of ALKBH enzymes*. PLoS biology, 2017. **15**(11): p. e2002810-e2002810.
293. Zhang, C., et al., *Bacterial lipid droplets bind to DNA via an intermediary protein that enhances survival under stress*. Nature Communications, 2017. **8**(1): p. 15979.
294. Edifizi, D., et al., *Multilayered Reprogramming in Response to Persistent DNA Damage in C. elegans*. Cell Rep, 2017. **20**(9): p. 2026-2043.
295. Wu, X., et al., *FASN regulates cellular response to genotoxic treatments by increasing PARP-1 expression and DNA repair activity via NF-κB and SPI*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016. **113**(45): p. E6965-e6973.
296. Roudier, E., C. Bachelet, and A. Perrin, *Pyruvate reduces DNA damage during hypoxia and after reoxygenation in hepatocellular carcinoma cells*. The FEBS Journal, 2007. **274**(19): p. 5188-5198.
297. Steták, A., et al., *Nuclear Translocation of the Tumor Marker Pyruvate Kinase M2 Induces Programmed Cell Death*. Cancer research, 2007. **67**: p. 1602-8.
298. Sizemore, S.T., et al., *Pyruvate kinase M2 regulates homologous recombination-mediated DNA double-strand break repair*. Cell Research, 2018. **28**(11): p. 1090-1102.
299. Qiang, L., et al., *Autophagy positively regulates DNA damage recognition by nucleotide excision repair*. Autophagy, 2016. **12**(2): p. 357-368.
300. Truban, D., et al., *PINK1, Parkin, and Mitochondrial Quality Control: What can we Learn about Parkinson's Disease Pathobiology?* Journal of Parkinson's Disease, 2017. **7**: p. 13-29.
301. Kondapalli, C., et al., *PINK1 is activated by mitochondrial membrane potential depolarization and stimulates Parkin E3 ligase activity by phosphorylating Serine 65*. Open biology, 2012. **2**(5): p. 120080-120080.
302. Schulze, R.J., A. Sathyanarayan, and D.G. Mashek, *Breaking fat: The regulation and mechanisms of lipophagy*. Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids, 2017. **1862**(10 Pt B): p. 1178-1187.

303. Li, Y., W.X. Zong, and W.X. Ding, *Recycling the danger via lipid droplet biogenesis after autophagy*. *Autophagy*, 2017. **13**(11): p. 1995-1997.
304. Bosc, C., et al., *Autophagy regulates fatty acid availability for oxidative phosphorylation through mitochondria-endoplasmic reticulum contact sites*. *Nature Communications*, 2020. **11**(1): p. 4056.
305. Thomas, H.E., et al., *Mitochondrial Complex I Activity Is Required for Maximal Autophagy*. *Cell Rep*, 2018. **24**(9): p. 2404-2417.e8.
306. Rambold, A.S., S. Cohen, and J. Lippincott-Schwartz, *Fatty acid trafficking in starved cells: regulation by lipid droplet lipolysis, autophagy, and mitochondrial fusion dynamics*. *Dev Cell*, 2015. **32**(6): p. 678-92.
307. Nguyen, T.B., et al., *DGAT1-Dependent Lipid Droplet Biogenesis Protects Mitochondrial Function during Starvation-Induced Autophagy*. *Developmental cell*, 2017. **42**(1): p. 9-21.e5.
308. Suárez-Fariñas, M., et al., *Nonlesional atopic dermatitis skin is characterized by broad terminal differentiation defects and variable immune abnormalities*. *J Allergy Clin Immunol*, 2011. **127**(4): p. 954-64.e1-4.
309. Pasquali, L., et al., *The Keratinocyte Transcriptome in Psoriasis: Pathways Related to Immune Responses, Cell Cycle and Keratinization*. *Acta Derm Venereol*, 2019. **99**(2): p. 196-205.
310. Calautti, E., et al., *Phosphoinositide 3-kinase signaling to Akt promotes keratinocyte differentiation versus death*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(38): p. 32856-65.
311. Ding, X., et al., *mTORC1 and mTORC2 regulate skin morphogenesis and epidermal barrier formation*. *Nature Communications*, 2016. **7**(1): p. 13226.
312. Rizzuto, R., P. Bernardi, and T. Pozzan, *Mitochondria as all-round players of the calcium game*. *J Physiol*, 2000. **529 Pt 1**(Pt 1): p. 37-47.
313. Bailey, L.J., V. Choudhary, and W.B. Bollag, *Possible Role of Phosphatidylglycerol-Activated Protein Kinase C-βII in Keratinocyte Differentiation*. *The open dermatology journal*, 2017. **11**: p. 59-71.
314. Bollag, W.B., et al., *A Potential Role for the Phospholipase D2-Aquaporin-3 Signaling Module in Early Keratinocyte Differentiation: Production of a Phosphatidylglycerol Signaling Lipid*. *Journal of Investigative Dermatology*, 2007. **127**(12): p. 2823-2831.
315. Bollag, W.B., *Lipid signaling in keratinocytes: Lipin-1 plays a PArt*. *Journal of lipid research*, 2016. **57**(4): p. 523-525.
316. Brody, I., *The Ultrastructure of the Horny Layer in Normal and Psoriatic Epidermis as Revealed by Electron Microscopy\*\*From the Department of Zoology, and the Department of Medicine, Division of Dermatology, Medical School, University of California, Los Angeles, Calif*. *Journal of Investigative Dermatology*, 1962. **39**(6): p. 519-528.
317. SUMMERLY, R., E. ILBERTON, and G.M. GRAY, *Possible defects in triacylglycerol and phosphatidyl- choline metabolism in psoriatic epidermis*. *British Journal of Dermatology*, 1978. **99**(3): p. 279-288.
318. Milkovic, L., et al., *Short Overview of ROS as Cell Function Regulators and Their Implications in Therapy Concepts*. *Cells*, 2019. **8**(8): p. 793.
319. Bardaweel, S.K., et al., *Reactive Oxygen Species: the Dual Role in Physiological and Pathological Conditions of the Human Body*. *The Eurasian journal of medicine*, 2018. **50**(3): p. 193-201.
320. Zorov, D.B., M. Juhaszova, and S.J. Sollott, *Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release*. *Physiological reviews*, 2014. **94**(3): p. 909-950.

321. Hochberg, M., R. Kohen, and C.D. Enk, *Role of antioxidants in prevention of pyrimidine dimer formation in UVB irradiated human HaCaT keratinocytes*. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2006. **60**(5): p. 233-237.
322. Tokarz, P. and J. Blasiak, *Role of mitochondria in carcinogenesis*. *Acta biochimica Polonica*, 2014. **61**.
323. Martinez-Outschoorn, U.E., et al., *Mitochondrial biogenesis drives tumor cell proliferation*. *The American journal of pathology*, 2011. **178**(5): p. 1949-1952.
324. Haumann, S., et al., *Mitochondrial DNA mutations induce mitochondrial biogenesis and increase the tumorigenic potential of Hodgkin and Reed–Sternberg cells*. *Carcinogenesis*, 2020.
325. Porporato, P.E., et al., *Mitochondrial metabolism and cancer*. *Cell Research*, 2018. **28**(3): p. 265-280.
326. Brash, D.E., et al., *A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1991. **88**(22): p. 10124.

## **12. TÁRGYSZAVAK**

mitokondrium, metabolizmus, UVB, autofágia, lipofágia, CPD, fotoliáz, PARP, keratinocita differenciáció, ROS, biogenezis

## **13. KEYWORDS**

mitochondria, metabolism, UVB, autophagy, lipophagy, CPD, photolyase, PARP, keratinocyte differentiation, ROS, biogenesis

## 14. 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 elkészítéséért.

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.

## 15. 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., Tósaki, 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 actinic 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.  
*Metalomics.* 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 tudománymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2021.03.01.



## 16. FÜGGELÉK

Első szerzős publikációk:

PARP1 Inhibition Augments UVB-Mediated Mitochondrial Changes—Implications for UV-Induced DNA Repair and Photocarcinogenesis. **Csaba Hegedűs**, Gábor Boros, Eszter Fidrus, Gréta Nikoletta Kis, Miklós Antal, Tamás Juhász, Eszter Anna Janka, Laura Jankó, György Paragh, Gabriella Emri, Péter Bai, Éva Remenyik. *Cancers* 2020, 12(1), 5 <https://doi.org/10.3390/cancers12010005>

Cyclobutane pyrimidine dimers from UVB exposure induce a hypermetabolic state in keratinocytes via mitochondrial oxidative stress. **Csaba Hegedűs**, Tamás Juhász, Eszter Fidrus, Eszter Anna Janka, Gábor Juhász, Gábor Boros, György Paragh, Karen Uray, Gabriella Emri, Éva Remenyik, Péter Bai. *Redox Biology*, Volume 38, January 2021, 101808 <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101808>