

**Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei**

**PARP gátlók PARilációtól független hatásai az UVB és az UVA sugárzás által  
kiváltott sejthalál során**

**Lakatos Petra**



**DEBRECENI EGYETEM  
Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola**

**Debrecen, 2017**

**Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei**

**PARP gátlószerrek PARilációtól független hatásai az UVB és az UVA sugárzás által  
kiváltott sejthalál során**

**Lakatos Petra**

**Témavezető: Dr. Virág László**



**DEBRECENI EGYETEM  
Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola**

**Debrecen, 2017**

**PARP gátlószeres PARilációtól független hatásai az UVB és az UVA sugárzás által  
kiváltott sejthalál során**

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

Írta: Lakatos Petra molekuláris biológus

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

Témavezető: Prof. Dr. Virág László, az MTA doktora

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Szöllősi János, az MTA doktora  
tagok: Prof. Dr. Geiszt Miklós, az MTA doktora  
Dr. Mádi András, PhD

A doktori szigorlat időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK,  
Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet 2.306 iroda  
2015. június 24. 11:00 óra

Az értekezés bírálói: Prof. Dr. Széll Márta, az MTA doktora  
Dr. Emri Gabriella, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Szöllősi János, az MTA doktora  
tagok: Prof. Dr. Széll Márta, az MTA doktora  
Dr. Emri Gabriella, PhD  
Dr. Koltai Erika, PhD  
Dr. Koncz Gábor, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK,  
Belgyógyászati Intézet „A” épület tanterme  
2017. március 14. 13:00 óra



## **1. BEVEZETÉS**

### **1.1. A Napból érkező UV sugárzás**

Az ultraibolya sugárzás az egyik legáltalánosabb hatás, mely a bőrünket éri. Az Földet körülvevő ózonréteg által a legkárosabb UVC (200-290 nm) sugárzás nagy része kiszűrődik. Az UVA (320-400 nm) illetve az UVB (290 – 320 nm) sugárzás azonban, még így is viszonylag nagy dózisban ér minket napjainkban. Amellett, hogy ezek sugárzások szükségesek például a bőr pigmentációjához vagy a D-vitamin képzéshez, fokozhatják a bőr öregedési folyamatait, illetve karcinogén hatásúak lehetnek bőrtípustól valamint napozási szokásoktól függően.

### **1.2. Az UVC / UVB sugárzás jellemzői**

A DNS abszorpciós (260 nm-nél van az abszorpciós csúcsa) spektruma főleg az UVC és UVB hullámhosszainak tartományába esik, ezért ezek okozhatják potenciálisan a legtöbb kárt a DNS szerkezetében. A különböző hullámhosszú UV sugárzások okozta fő DNS károsodások a ciklobután-pirimidin-dimerek (CPD) és a pirimidin-pirimidon-fotoproduktumok ((6-4)-PP).

Az UVC illetve az UVB sugárzás hatására bekövetkező RNS szerkezet változás szintén végzetes hatású lehet az adott sejt biológiai folyamataira nézve, különösen az mRNS tekintetében, melynek károsodása vagy szekvenciabeli megváltozása akár működésképtelen fehérjéket is eredményezhet.

Az UVB sugárzás energiájának elnyelése esetében fennáll a reaktív gyökök képződésének veszélye. A triptofán és a tirozin aminosavak például triplett állapotban redukálják a diszulfidokat, mely által diszulfid-anion keletkezik, amely reagálva a molekuláris oxigénnel szuperoxid-aniont eredményez, mely ismert lipidmembrán és fehérje károsító hatású.

### **1.3. Az UVA sugárzás jellemzői**

A DNS a hosszú hullámhosszúságú UVA sugárzásból már csak nagyon kis mennyiséget nyel el. Következésképpen ez a fajta sugárzás kis eséllyel okoz a DNS szerkezetében CPD-eket, (6-4)-PP-eket vagy ezekhez hasonló léziókat. Ugyanakkor, meg kell említeni, hogy a (6-4)-PP-k 300 nm –nél hosszabb hullámhosszúságú sugárzás energiájának hatására Dewar izomerré alakulnak, amely az elődjéhez képest egy stabilabb forma, javítása pedig erősen korlátozott a DNS hibajavító rendszer által.

Az UVA sugárzás valódi veszélye abban rejlik, hogy képes a plazmamembránok lipidjeinek és a citoplazma komponenseinek károsítására, melynek révén különböző szabadgyökök termelődését indukálja. A szabadgyökök közül a hosszabb féléletidejűek bejutva a sejtmagba a DNS oxidatív károsodását okozhatják. A DNS oxidatív módosulása révén, mind egyszálú, mind kétszálú törések létrejöhetnek. Az oxidatív báziskárosodások közül a 8-OHdG az egyik leggyakrabban előforduló módosulás.

#### **1.4. Az UV sugárzás okozta DNS károsodások következményei**

Az UV sugárzás során a legnagyobb jelentősége a NER hibajavító rendszernek van, mivel ez felelős legnagyobb részben a CPD-k és a (6-4)-PP-k eltávolításáért. A NER még a replikációs villa érkezése előtt megpróbálja kijavítani a hibát a léziót tartalmazó DNS szálon, ugyanakkor ez DNS töréshez vezethet, mely végül kiválthatja a sejthalál elindulását, mely leggyakrabban apoptózis. Általánosságban elmondható, hogy csak a nagyon magas dózisu vagy a nagyon hosszantartó UV sugárzás az, amely az érintett sejtekben nekrozis elindulását indukálja.

Az apoptózissal elpusztult sejteket, melyeket morfológiájuk alapján is jó el lehet különíteni az egészséges társaiktól úgynevezett „*sunburn*” sejteknek hívjuk. Az említett sejtekben lejtászódó apoptózis fő induktora a genomi DNS károsodása, ugyanakkor a p53 útvonal-függőapoptózison kívül, a sejthalál receptorokból kiinduló és a mitokondriális diszfunkció-mediáltapoptotikus útvonal vagy ezeknek a kombinációja is lehet a sejthalál végső okozója.

#### **1.5. A fototerápia, a fotodinámiás terápia és a fotokemoterápia**

A fototerápia, a fotodinámiás terápia (PDT) és a fotokemoterápia(PUVA), nevükellenére különböző eljárások, azonban napjaink orvostudományában széleskörben alkalmazottak. A fototerápiát az *acnevulgaris* kezelésére, a fotodinámiás terápiát például a rák különböző típusainak kezelése során, míg a fotokemoterápiát a *psoriasis* kezelésénél alkalmazzák.

A fototerápia során a besugárzás csupán a nem-ionizáló sugárzással történik, mely lehet UVA vagy UVB sugárzás, illetve ezek kombinációi.

A fotodinámiás terápia és a fotokemoterápia sikeres kivitelezéséhez, többek között, egy fényérzékenyítőszere és az annak megfelelő hullámhosszúságú fényre van szükség. A fényérzékenyítőszere és a fény találkozásakor lejtászódó reakció eredményeképpen a megcélzott szövetben nagyfokú sejthalál és egyéb járulékos biológiai reakciók figyelhetők

meg. A kétféle terápia különbözősége a fényérzékenyítőszer típusában és a szernek a fényel való találkozása után lejátszódó folyamatokban keresendő.

A PDT során elsősorban porfirint illetve porfirin vagy nem porfirin alapú fényérzékenyítő szereket alkalmaznak, melyeket 600 – 1000 nm hullámhosszúságú fényel kombinálnak. A folyamat elengedhetetlen komponense a fényérzékenyítőszereken és a fényen kívül a molekuláris oxigén jelenléte. A fényérzékenyítőszer abszorpciós maximumának közelében lévő fény hatására a szer gerjesztett állapotba kerül. A gerjesztett állapotban lévő fényérzékenyítőszer pedig reaktív oxigén gyökök termelődését eredményezi végsősoron. A PDT során a tumorsejteket ért oxidatív károsodások mellett, az immunrendszer nagyfokú aktivációja, a tumor szövet vaszkularizációjának csökkenése figyelhető meg, valamint a tumor sejtek proliferációjának gátlása járul hozzá PDT tumor ellenes hatásához.

A fotokemoterápia vagy PUVA terápia alapja pszoralén és pszoralén alapú vegyületek (P) kombinálása hosszú-hullámhosszúságú ultraviola sugárzással (UVA). A pszoralének triciklikus – furokumarin vegyületek, melyek közül a legelterjedtebben alkalmazottak az 5-metoxipszoralén, 8-metoxipszoralén és a trioxalén. A PUVA terápia során a fény hatására gerjesztett állapotba kerülő pszoralén típusú vegyület, többek között, képes interkalálódni a DNS kettős láncába, illetve ott pszoralén-DNS fototermékek keletkezését indukálhatja, amely végső soron az adott sejt pusztulását eredményezheti.

## **1.6. PARP enzimek biológiai szerepe**

### **1.6.1. A poli-ADP-ribózpólimeráz -1 enzim tulajdonságai**

A poli-ADP-ribózpólimerázok (PARP) akceptor fehérjék ADP-ribozilációját katalizáló enzimek. Az enzimes család leginkább tanulmányozott és a humán sejtekben legnagyobb mennyiségben előforduló tagja a PARP-1. Az enzim aktiválódásának fő iniciátora a DNS egyszálú töreése, mely különböző indukciók hatására következhet be.

Az enzim három fő szerkezeti eleme a következő: a DNS-kötő domén, az automodifikációs domén és a katalitikus domén. A DNS kötő domén az N-terminális részen található és tartalmaz három Zn-ujj domént (FI-III) illetve egy nukleáris lokalizációs szignált, valamint egy kaszpáz -3 enzim által felismerhető hasító helyet. Az automodifikációs domén legfontosabb régiója az úgynevezett BRCT domén, melynek nagy szerepe van az enzim és a DNS hibajavító enzimek, illetve egyéb kölcsönható fehérjék között létrejövő fehérje-fehérje kölcsönhatások kialakulásában. A C-terminális részen található egyrészt a WGR domén, mely a különböző domének közötti kölcsönhatások létrejöttében fontos, valamint a katalitikus domén, mely a  $\text{NAD}^+$ , mint szubsztrát megkötéséért és a PAR polimer létrehozásáért felelős.

### **1.6.2. A PAR polimer szintézisének mechanizmusa**

Az aktivált PARP enzimek  $\text{NAD}^+$ -ot használnak szubsztrátként, mely az enzim működése által nikotinamidra és ADP-ribózra hasad. Az ADP-ribóz egységek kovalensen egymáshoz kötött egyenes vagy elágazó láncai, vagyis a poli-ADP-ribóz, az enzim által a megfelelő akceptor fehérjéhez kötődnek.

A PARP-1 enzim aktivációjának első lépése mikor az enzim egyik Zn-ujj doménje a DNS-hez kötődik, ezt a lépést a DNS-kötő és a katalitikus doménnek a kölcsönhatása, illetve az enzim dimerizációja teszi lehetővé valamint segíti elő. A polimerek hosszúsága változó, néhány egységnyitől 200 egységig is terjedhetnek, 20-50 egységenként létrejövő elágazásokkal vagy anélkül. Az akceptor fehérje szempontjából a reakció reverzibilis, mivel a polimerek viszonylag rövid időn belül lebomlanak a poli-ADP-ribóz-glikohidroláz (PARG), az ADP-ribozilhidroláz 3 (ARH3) és az ADP-protein liáz enzimek működése által.

Az *in vitro* kutatások már több, mint 200 sejtmagi fehérjét azonosítottak, melyekhez kovalensen kapcsolódhat PAR polimer. Ezek között olyan célpontok szerepelnek, mint a hisztonok, különböző transzkripciós faktorok, DNS replikációban és hibajavításban szereplő fehérjék, jelátvitelben résztvevő fehérjék, mint az NF $\kappa$ B, a topoisoméráz I és II és DNS függő protein kinázok.

### **1.6.3. A PARP-1 szerepe a különböző DNS hibajavító mechanizmusokban**

#### **1.6.3.1. Bázis kivágásos DNS hibajavítás (BER)**

A DNS lánc bázisai deaminálódás, alkilálódás vagy oxidatív hatás révén módosulhatnak. A báziskivágásos hibajavítás (BER) az egyik elsődleges mechanizmus a sérült bázisok és az egyszálú DNS törések javításában. A PARP-1 enzim, több, a BER rendszer tagjaként nyilvántartott fehérjével alakíthat ki kölcsönhatást, mint például az XRCC és az aprataxin. Számos munkacsoport kimutatta, hogy aktivitása befolyásolja a BER hatékonyságát olyan enzimek működésének szabályozása által, mint a DNS polimeráz- $\beta$ , a DNS ligáz III, a condensin vagy a 8-osoguanin DNS glikozoláz (OGG1).

#### **1.6.3.2. Homológ rekombináció (HR) és nem homológ DNS végek összekapcsolása (NHEJ)**

A kétszálú DNS törések kijavítása történhet homológ rekombinációval (HR) vagy a nem homológ DNS végek összekapcsolásával (NHEJ). A PARP-1 szerepét mind a két esetben leírták. A homológ rekombináció esetében, a DNS törés következtében felhalmozódott PAR



polimer, vagy fokozza az ATM aktivitását, vagy befolyásolja az ATM funkcióját a célfehérjék hozzáférhetőségének elősegítése által.

A klasszikus NHEJ mechanizmus (C-NHEJ) során, az úgynevezett Ku fehérje és a PARP-1 enzim verseng a szabad DNS végekhez való kötődés lehetőségéért. Amennyiben a C-NHEJ útvonal faktorai, főleg a Ku fehérje, nem állnak megfelelő mennyiségben rendelkezésre a PARP-1 enzim előtérbe kerül, és életbe lép az úgynevezett alternatív NHEJ útvonal (A-NHEJ). A folyamatban olyan fehérjék PARiláció általi szabályozása mutatható ki, mint a DNS ligáz III vagy DNS függő protein kináz.

### **1.6.3.3. Nukleotidkivágásos DNS hibajavítás (NER)**

A NER egyik jelentősége, hogy ez az a DNS hibajavító mechanizmus, amely az UV sugárzás következtében létrejött fototermékeket eliminálja. A PARP-1 enzimnek a NER hibajavító rendszerben való aktív részvételét viszonylag friss kutatási eredmények támasztják alá. Több munkacsoport is kimutatta a NER -ben szereplő XPC és XPA fehérjék PARilációját, de talán ennél is nagyobb jelentőséggel bír az a tény, hogy a NER egyik fehérjéjét a DDB2-t, a PARP-1 enzimmel kölcsönható fehérjeként azonosították. Kiderült továbbá az is, hogy a PARP-1 és a DDB2 fehérje kölcsönhatása UVC sugárzás által károsított DNS szakasz jelenléte esetén szignifikánsan erősebb, összehasonlítva egy hibátlan DNS szakasz jelenlétével.

A PARP-1 farmakológiai gátlása csökkentette a NER hibajavítás hatékonyságát, több munkacsoport által elvégzett kísérletben is, igazolva a PARP-1 enzim aktív szerepét ebben a fajta DNS hibajavító mechanizmusban is.

## **1.7. A PARP-1 enzim és a különböző sejthalál típusok kapcsolata**

Kismértékű DNS károsodás esetén a PARP-1 enzim, a DNS hibajavító rendszerben elfoglalt helye által hozzájárul a hiba kijavításához, és ezáltal növeli az adott sejt túlélési esélyeit.

Nagyobb mértékű DNS károsodás esetén, vagy apoptózis játszódik le, melyben a PARP-1 enzim hasítás által inaktiválódik, vagy nekrosis következik be, melyet a túlzott PARP-1 aktivitásból eredő NAD<sup>+</sup> és ATP depléción okoz.

A PARP enzim farmakológiai és egyéb módszerrel történő gátlása apoptózishoz vezethet az első és a harmadik útvonal lejátszódása során.

## 1.8. A PARP gátlószeres és kemoterápiás szerek kapcsolata

Egy 2005-ben megjelent publikáció szerint az emlődaganat sejtekben található BRCA1/2 fehérje mutációja a homológ rekombináció diszfunkcióját eredményezi, továbbá azt is kimutatták, hogy ezzel egy időben a sejtek PARP gátlószeresekre való érzékenysége nagymértékben megnőtt. A PARP enzim aktivitásának gátlása kromoszóma instabilitást, sejt ciklus összeomlást, apoptózist eredményezett, mely jelenségek tulajdonképpen a DNS károsodások ki nem javítására és akkumulációjára vezethetők vissza. A fent említett folyamat tulajdonképpen a szintetikus letalítás jelenségének körébe tartozik, amely tulajdonképpen azt jelenti, hogy egy DNS hibajavító rendszerben fontos szerepet betöltő enzim gátlószerének alkalmazásával és egy adott DNS hibajavító rendszert érintő mutáció által, fokozható egy külső DNS károsodást okozó ágensnek a citotoxikus hatása.

A klinikai kipróbálás alatt álló és a már használatban lévő PARP gátlószeres többsége a PARP család tagjai közül az PARP- 1 és -2 enzimeket gátolják. A szintetikus letalítás során a PARP-1 enzimnek a HR-ben betöltött szerepe az, amely a gátlószeresnek a hatékonyságát adja, ugyanakkor fontos megemlíteni, hogy ehhez a citotoxicitáshoz hozzájárulnak még másodlagos mechanizmusként, a PARP -1 enzimnek a BER-ben és az NHEJ-ben betöltött funkciójának gátlása is. A különböző PARP gátlószeres melyek kutatási vagy klinikai alkalmazásban vannak hatékonyságukat és specifitásukat tekintve nyilván különböznek, ugyanakkor abban általánosságban megegyeznek, hogy mindegyik NAD<sup>+</sup>- analóg, mely által képesek a PARP katalitikus alegységéhez kötődni és így gátolni annak működését.

Azértekezés alapját képező két publikációban a következő PARP gátlószereset alkalmaztuk:

### 3-aminobenzamid (3-AB):

Az egyik legrégebbi PARP gátlószer. Annak ellenére, hogy későbbi gátlószeresekkel összehasonlítva sokkal kevésbé specifikus és hatékonysága is csak viszonylag nagy koncentrációban érvényesül (1 mM- 5mM) napjainkban is gyakran alkalmazzák. Állatkísérletben is gyakran alkalmazott szer.

### PJ-34:

Sokkal hatékonyabb PARP gátlószer, mint a 3-AB. Gyakorlati szempontból sokkal kisebb koncentrációban hatékony, természetesen sejtípustól függően (1-20 µM). A PJ-34 PARP enzimtől függetlenül aktiválja a p21 gén expresszióját ezáltal mitotikus katasztrófát okozva néhány sejtvonalon.

### Veliparib:

Veliparib vagy más néven ABT-888 egy orálisan alkalmazott PARP-1 illetve PARP-2 enzimet is gátló szer, mely a humán kísérletek eredménye szerint jól tolerálható a szervezet

számára, gyorsan szívódik fel és viszonylag gyorsan is ürül ki. Különböző rák fajták esetében került már kipróbálásra, legtöbbször valamilyen kemoterápiás szerrel vagy ionizáló sugárzással kombinálva.

## 2. CÉLKITŰZÉSEK

I. Az UVB sugárzás okozta DNS károsodások, és azok kijavítását végző mechanizmusok alaposan tanulmányozott területei a tudománynak. A PARP-1 enzim szerepéről a sejthalál folyamatokban és a DNS hibajavításban szintén vannak ismereteink, különös tekintettel a BER, a HR és az NHEJ mechanizmusokra. A PARP-1 enzimnek az, UVB által kialakult léziók kijavítását főként végző, NER rendszerben való szerepéről és a sugárzás okozta sejthalálban való részvételéről viszonylag kevesebb az információnk. Munkánk első felében ennek feltérképezését tűztük ki célul.

1. HaCaT sejtek és normál humán epidermáliskeratinociták (NHEK) UVB dózis függésének összehasonlítása.
2. A PARP-1 - csendesítés hatásának vizsgálata az UVB sugárzás által kiváltott sejthalál során HaCaT sejtvonalon.
3. Különböző PARP gátlószerek hatásának megfigyelése NHEK sejteken UVB és UVA sugárzás által bekövetkező sejthalál során.

II. Az PUVA kezelés során keletkező DNS károsodások kijavítása többek között NER mechanizmussal történik. A PUVA-indukált sejthalál folyamatok esetében nincsenek részletes adataink a PARP-1 enzim szerepéről. Munkánk második felében főleg a PUVA által kiváltott sejthalál folyamatát kívántuk tanulmányozni a PARP-1 enzim szemszögéből.

1. A PARP-1 - csendesítés hatásának megfigyelése UVA-val sugárzott A431 sejtvonalon.
2. A PARP-1 - csendesítés hatásának megfigyelése PUVA kezelés által kiváltott fototoxicitásban.
3. Különböző PARP gátlószerek hatásának vizsgálata PUVA kezelés következtében fellépő sejthalál során.

### **3. ANYAGOK ÉSMÓDSZEREK**

#### **3.1. Sejttenyésztés**

A normál humán epidermáliskeratinocitákat (NHEK) a CELLnTEC cégtől beszerzett epidermáliskeratinociták tenyésztéséhez kifejlesztett tápfolyadékban tartottuk, melyet 100 U/ml penicillinnel és 100 µg/ml streptomocinnel egészítettünk ki. A sejteket a második és a negyedik passzálás között használtuk fel kísérletek elvégzésére.

A HaCaTimmortalizáltkeratinocita sejtvonala glükóz tartalmú (1000 mg/l) DMEM tápfolyadékban tartottuk.

Az A431 humán laphámsejtes bőr karcinóma sejteket magas glükóz tartamú (4500 mg/l) DMEM tápfolyadékban tenyésztettük. A tápfolyadékot mind a két esetben 10% FBS-sel, 2 mM L-glutaminnal, 100 U/ml penicillinnel és 100 µg/ml streptomocinnel egészítettünk ki.

A primer sejteket, illetve a két sejtvonalat 37 °C-on, 5% CO<sub>2</sub> tartalom mellett tartottuk sejttenyésztő inkubátorban. A passzálás során mind a három esetben tripszin-EDTA oldatot alkalmaztunk.

#### **3.2. A sejtek kezelése és az UV sugárzás alkalmazása**

Az UV besugárzást megelőzően a következő előkezeléseket végeztük: NHEK és HaCaT sejtek esetében a PARP gátlószereket 30 perccel az UVB vagy adott esetben az UVA sugárzást megelőzően adtuk a sejtekhez a PJ-34 esetében 10 µM-os, a 3AB esetében 3 mM-os végkoncentrációban. Az előkezelés és a sugárzás az NHEK sejtek esetében annak médiumában, HaCaT sejtek esetében pedig fenolred indikátor - mentes DMEM –ben történt.

Az A431 sejteknél a PJ-34 és a Veliparib PARP gátlószerek végkoncentrációja egyaránt 10 µM volt, 8-MOP fényérzékenyítőszeré pedig 800 nM, melyet 50 perccel az UVA sugárzást megelőzően adtunk a sejteket fedő PBS-hez. Az antioxidánsokat (aszorbinsav 500 µM, trolox 200 µM) az előkezelésekkel együtt, az adott ábrán jelölt kombinációban, a különböző specifikitáscaspáz gátlószereket (z-VAD-fmk, z-DEVD-fmk, z-IETD-fmk 50-50 µM) pedig az UVA sugárzás után, sejttenyésztő médiumban adtuk a sejtekhez. Az előkezelés és a sugárzás is PBS pufferben (0,2 M, pH 7,4) történt. A sugárzást számítógéppel vezérelt *Bio-Sun* UV besugárzó készülékkel végeztük.

#### **3.3. Spheroid kultúra létrehozása**

A 96 lyukú sejttenyésztő edényt a kísérletet megelőzően 0,5 % agar-agar oldattal kezeltük. Az A431 sejtekből egy 1x10<sup>4</sup> sejt/ml denzitású szuszpenziót készítettünk, melyből 50-50 µl került egy-egy lyukba. A stabil spheroid képződésére 48 órát vártunk. A

spheroidokatezt követően a fent leírtak szerint előkezeltük illetve kezeltük a PARP gátlószerekkel illetve az UVA sugárzással. A kezelés végén a spheroidokat Leica DM IL LED mikroszkóp rendszer segítségével fotóztuk. A spheroidok átmérőjét Image J szoftver segítségével határoztuk meg.

### **3.4. Sejtéletképesség vizsgálat**

Az adott kezelést követően a sejtek életképességét mind a három (HaCaT, NHEK, A431) esetben MTT redukciós assay segítségével határoztuk meg azonos protokoll szerint. A sejteket 96 lyukú sejtenyésző edényben növesztettük. A kezelést követően a sejteket fedő tápfolyadékhoz MTT oldatot (5 mg/ml PBS-ben hígítva) adtunk 0,5 mg/ml végkoncentrációban. Az inkubálási idő mind a három sejtípus esetében 40 perc volt. Az MTT oldatot tartalmazó médium eltávolítása után az élő sejtek mitokondriumában átalakult formában kristályok kioldásához 100 µl DMSO-t használtunk. Az így keletkező homogén oldat abszorbanciáját 590 nm-en mértük le Multiskan MS Plate olvasóval segítségével. Az életképességet minden esetben a kezeletlen kontrollhoz viszonyított százalékban adtuk meg.

### **3.5. Reaktív oxigén gyökök detektálása**

A reaktív oxigén gyökök detektálása az A431 sejtek esetében UVA sugárzást követően H2DCFDA ROS érzékeny festék segítségével történt. A H2DCFDA 10 µM végkoncentrációban került hozzáadásra az A431 sejteket borító PBS-be az előkezelésekkel (10 µM PJ34, 10 µM Veliparib) és az antioxidánsokkal aszszkorbinsavval (500 µM) és troloxszal (200 µM) együtt. A detektálás közvetlenül az UVA sugárzás után történt, Fluoroskan Ascent FL plate olvasó segítségével 580<sub>Ex</sub>/590<sub>Em</sub> nm hullámhosszon.

### **3.6. Hidrogén-peroxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) detektálása**

Az UV sugárzás hatására intracellulárisan termelődő hidrogén-peroxidot Amplex Red festék segítségével detektáltuk az NHEK sejtek esetében. Az NHEK sejteket 96 lyukú tenyészőedényben növesztettük. A sugárzást követően a sejtekhez Amplex Red festéket adtunk 50 µM végkoncentrációban illetve tormaperoxidáz enzimet 0,1 U/ml mennyiségben. 30 perces 37°C-on történő inkubáció után a fluoreszcenciát Fluoroskan Ascent FL platesegítségével határoztuk meg 530<sub>Ex</sub>/590<sub>Em</sub> nm hullámhosszon.

### **3.7. Géncsendesítés**

Specifikus szekvenciával rendelkező siRNS általi géncsendesítést a HaCaT és az A431 sejtvonalak esetében végeztünk. A csendesítés során alkalmazott transzfekeciós reagens (DharmaFECT 2 transzfekeciós reagens 1 µl/ml) valamint a kontroll szekvenciát tartalmazó siRNS (50 nM), PARP-1 siRNS (50 nM) szekvenciája (melyet a gyártó hozott nyilvánosságra) és azok koncentrációja mindkét esetben azonosak volt, a transzfekeció kivitelezésének protokollja azonban eltért egymástól.

A HaCaT sejteket a transzfekeciót megelőző napon 24 lyukú ( $2 \times 10^4$  sejt/lyuk) illetve 96 lyukú (5000 sejt/lyuk) sejttenyésztő edénybe raktuk, mely során a tápfolyadék antibiotikumot nem tartalmazott. Másnap hozzáadtuk a sejtekhez transzfekeciós reagens, a kontroll siRNS illetve a PARP-1 siRNS megfelelő arányú keverékét, melyet 10 % FBS tartalmú antibiotikum mentes médiumban állítottunk össze. 24 óra termosztátban történő inkubálást követően eltávolítottuk a sejtekről a transzfekeciós reagens és az siRNS keverékét tartalmazó tápfolyadékot és komplett médiumra cseréltük azt és további 24 óráig inkubáltuk a sejteket.

Az A431 sejtek esetében a csendesítést szuszpenzióban végeztük, mely során a tripszin-EDTA oldattal kezelt sejteket centrifugálást követően összegyűjtöttük antibiotikum- és FBS-mentes tápfolyadékban. A transzfekeciós reagens és a kontroll siRNS illetve a transzfekeciós reagens és a PARP-1 siRNS keverékét fél órán át inkubáltuk a sejtekkel, majd kiegészítettük a médiumot 10 % FBS-sel és 24 lyukú ( $2 \times 10^4$  sejt/lyuk) illetve 96 lyukú (5000 sejt/lyuk) sejttenyésztő edénybe raktuk ki őket. Másnap, lecseréltük a tápfolyadékot, és újabb 24 órán át inkubáltuk a sejteket sejttenyésztő termosztátban.

Mind a két esetben a transzfekeciót követő 48.órán kezeltük a sejteket UV sugárzással és kezeléstől függően inkubáltuk őket további 24 az UVB sugárzás esetében, és 16 órán át az UVA sugárzást követően. A Western –blot analízishez a mintavétel abban az időpontban történt, amikor az adott kísérlet véget ért.

### **3.8. Western blot analízis**

A HaCaT és az A431 sejtek esetében az siRNS általi csendesítés sikerességét Western blot módszerrel ellenőriztük. Az A431 sejtek esetében a hasított – PARP-1 és a H2AX fehérje foszforilációjának kimutatása szintén Western blot módszerrel történt. A transzfekeció illetve a kezelése után egyszer mostuk a sejteket hideg PBS pufferrel, majd hideg lízis pufferben kapartuk fel őket. Szonikálás, centrifugálás és forralás után minden mintából 35 µg fehérjét vittünk fel 8% illetve 12% SDS-poliakrilamid gélre. Elektroforézist követően a mintákat nitrocellulóz membránra transzferáltuk. A membrán aspecifikus kötőhelyeit 5% zsírszegény tejpor oldattal vagy 5% BSA oldattal blokkoltuk. PBSTw vagy TBSTw oldattal történő

mosást követően a membránt primer ellenanyaggal inkubáltuk egy éjszakán át 4°C –on. Újabb mosások után 1 óráig inkubáltuk a membránt szobahőmérsékleten a torna-peroxidázzal jelölt második antitesttel, majd kemilumineszcensszubsztrát hozzáadása után a kemilumineszcens jelet FluorChem FC2 Imager készülék segítségével detektáltuk.

### **3.9. Cometassay**

Maratott felszínű tárgylemezre 1% normál olvadáspontú agarózrétegeztünk. Az előkezelést és az UVA sugárzást követően a sejteket *mincing solution* – ben kapartuk fel, majd ezt követően a sejteket 0,5 % alacsony olvadáspontú agarózba kevertük és a tárgylemezre rétegeztük). A gél megszilárdulása után lízis következett 1 órán át 4 °C-on. Az elektroforézist alkalikus oldatban végeztük 25 percig 380 mA áramerősséggel. Ezt követően a tárgylemezeket 10 percig ekvibráltuk, majd a sejtmagokat 10 µg/ml TO-PRO-val festettük. LeicaTCS SP8 konfokális mikroszkóp és kamera segítségével készítettünk felvételeket a mintákról, a kvantitatív kiértékelést CometScore szoftver segítségével végeztük el.

### **3.10. Kaszpáz- enzim aktivitás mérése**

Az A431 sejteket a kísérletet megelőző napon 24 lyukú sejtenyésző edénybe tettük. Az előkezelést és az UVA sugárzást követően a tenyésztő médium eltávolítása után a sejteket PBS pufferben felkapartuk és centrifugálás (13000 RPM 90”) után a sejteket tartalmazó pelletet egy éjszakára -80°C-ra tettük. A fagyasztást követően jéghideg lízis puffert adtunk a sejtekhez.

A lizátumot 1:1 arányban kevertük össze a reakció pufferekkel. A kaszpáz – 3 aktivitás mérésnél a szubsztrát az ac-DEVD-AMC, míg a kaszpáz-8 aktivitás mérésnél a szubsztrát az ac – VETD-AMC volt. A lizátum és a reakció pufferek keverékét 1 órán át inkubáltuk 37°C-on, a fluoreszcenciát pedig Fluoroskan Ascent FL plate olvasó segítségével határoztuk meg 355<sub>Ex</sub>/460<sub>Em</sub> nm hullámhosszon.

### **3.11. A DNS fragmentáció kimutatása**

Két százalékos agaróz gélt készítettünk, melyről megszilárdulás után a fésűk feletti részt eltávolítottuk. Az eltávolított rész helyére egy 1%-os agaróz gélt került, melyet kiegészítettünk SDS-sel és proteináz K-val. Az előkezelés, a sugárzás, illetve az inkubációs idők lejártával a sejteket DNS mintapufferben vettük fel, és vittünk fel a géltre. Az elektroforézist 35 V feszültség mellett 10 órán át végeztük, majd a gélt etídium-bromiddal



festettük meg. A sávokat FluorChemFC2 Imager készülék segítségével detektáltuk. A kapott jelet Image J szoftver segítségével denzitometráltuk.

### **3.12. Laktát-dehidrogenáz enzim felszabadulásának mérése**

Az UV sugárzás hatására bekövetkező LDH felszabadulást az NHEK sejtek esetében a VWR cégtől vásárolt kit segítségével mértük. Az előkezeléseket és a sugárzást követően az MTT sejtéletképességi vizsgálatokkal párhuzamosan a sejtek felülszójából 50 -50 µl mennyiséget kevertünk össze a kit leírásának megfelelően előállított reagenssel, melynek abszorbanciáját 20 perc elteltével mértük 490 nm hullámhosszon Multiskan MS PlateReader segítségével. Az adatok kiértékelése a kit leírásában javasolt módon történt.

### **3.13. Sejtproliferációs vizsgálat**

A sejtek 10 napos tenyésztését követően, melynek során az ötödik napon médiumot cseréltünk, a sejteket PBS-sel mostuk, 4%-os formaldehiddel 15 percig szobahőmérsékleten fixáltuk, majd hematoxilinnel festettük 10 percig. Alapos csapvizes mosás és szárítás után képeket készítettünk a sejtekről Zeiss Axiolab mikroszkóp (Carl Zeiss, Oberkochen, Németország) segítségével. Mivel a primer keratinociták a növekedésük során nem képeztek kolóniákat, melyeket az eredeti protokoll szerint számolhattunk volna, ezért a hematoxilinnel való festéssel párhuzamosan minden kezelés esetében MTT sejtéletképesség vizsgálatot is végeztünk melynek eredményei összhangban voltak a mikroszkópos képekkel.

### **3.14. Immuncitokémia**

Az NHEK sejtek esetében a hasított PARP-1 enzim detektálása UVB sugárzást követően, valamint az A431 sejtek esetében a PAR polimer kimutatása hidrogén-peroxid kezelés után immunfestés segítségével történt.

Az NHEK sejteket 24 lyukú tenyésztőedényben növesztettük fedőlemezen. Az UVB sugárzást követően, PBS-sel történő mosás után a sejteket jéghideg metanollal. Az endogén peroxidáz enzimek blokkolása és PBS pufferrel történő mosás után a sejteket BSA oldattal blokkoltuk 1 órán át szobahőmérsékleten, majd 2 órán át a blokkoló oldatban hígított primer ellenanyaggal inkubáltuk. PBS pufferrel történő mosást követően peroxidázzal konjugált nyúl másodlagos ellenanyagot tartalmazó reagenset adtunk a sejtekhez mellyel 30 percig inkubáltuk a sejteket szobahőmérsékleten. A peroxidáz reakció kimutatásához DAB szubsztrátot használtunk. A fedőlemezek Mowiolal történő kifestése után a képeket Zeiss Axiolab mikroszkóp, illetve Zeiss AxioCam digitális kamera segítségével készítettük.

Az A431 sejtek esetében a PAR polimer detektálást hidrogén –peroxid kezelést követően hasonló protokoll szerint végeztük, azzal a különbséggel, hogy a peroxidázzal-konjugált második antitest helyett fluoreszcens detektálást alkalmaztunk. A sejtmag festésére TO-PRO festéket használtunk. A mosási lépéseket követően a fedőlemezeket Mowiol-dabco segítségével fedtük ki, melynek megkötése után a képeket LeicaTCS SP8 konfokálismikroszkóp és kamera segítségével készítettük.

### **3.15. May-Grünwald-Giemsa festés**

Az NHEK sejteket 24 lyukú tenyésztőedényben növesztettük fedőlemezen. A különböző UVB dózissal történő sugárzást és 24 órás inkubációt követően a sejteket PBS pufferrel mostuk egy alkalommal, majd formaldehiddel fixáltuk szobahőmérsékleten. A fixálást követően a sejteket desztillált vízzel mostuk, majd 30 percig inkubáltuk őket szobahőmérsékleten az előzőleg frissen elkészített May-Grünwald-Giemsa oldattal (1:10 May-Grünwald, 1:10 Giemsa, desztillált vízben). A festés után a fedőlemezeket háromszor mostuk desztillált vízzel, majd Zeiss Axiolab mikroszkóp, illetve Zeiss AxioCam digitális kamera segítségével készítettük a fotókat.

### **3.16. Mítokondriális membrán potenciál mérése**

Az NHEK sejteket fekete 96 lyukú sejtenyésztésre alkalmas tenyésztő edényben növesztettük. Az UVB sugárzás után 6 órával a sejtekhez TMRE festéket adtunk, mely lépést 20 perc 37°C-on történő inkubálás követett. Ezt követően a sejtekről eltávolítottuk a TMRE oldatot tartalmazó tápfolyadékot és PBS pufferrel történő mosás után mértük a TMRE fluoreszcenciáját Fluoroskan Ascent FL plate olvasó 530<sub>Ex</sub>/590<sub>Em</sub> nm hullámhosszon.

### **3.17. PARP aktivitásmérés**

A PARP aktivitás mérése a <sup>3</sup>H-NAD<sup>+</sup> beépülésének meghatározásán alapul a TCA-val kicsapható fehérjefrakcióban. Az A431 sejteket 5 percig kezeltük 1 mM koncentrációjú hidrogén-peroxiddal, majd a tenyésztő médiumot aktivitásmérő pufferre cseréltük és 30 percen át 37°C-on inkubáltuk a sejteket. A reakció leállítása, illetve a sejtfehérjék kicsapása céljából jéghideg 50 % -os TCA-t adtunk a sejtekhez, mely lépést 4 óra 4°C-on történő inkubálás követett. Centrifugálás után a keletkező csapadékot kétszer mostuk 5%-os TCA-val, majd szolubilizálás következett 2% SDS/0,1 N NaOH oldatban egy éjszakán át. A csövek tartalmát 6,5 ml Scintisafe Plus szcintillációs folyadékhoz mértük és a radioaktivitást Wallac márkájú folyadékszintillációs számlálóval mértük meg.

### 3.18. NMR spektroszkópia

A mérés kivitelezéséhez a PJ-34 gátlószert 2 mg/ml -es koncentrációban deuterált oldószerben oldottuk fel (DMSO-d<sub>6</sub>). A mérést Bruker AVANCE II (500,13 MHz) spektrométeren 298 K hőmérsékleten végeztük el. A mérés elvégzéséért köszönetilleti Dr. Kövér Katalint a Debreceni Egyetem Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszékének munkatársát.

### 3.19. Statisztika

Minden kísérletet legalább három alkalommal, egymástól független időpontban megismételtük. Az egyes kísérletek során triplikátumban dolgoztunk. Az ábrákon a szórás, mint *standard error* van jelölve. Az egyes kezelések hatásainak összehasonlítását *one-way* ANOVA módszerrel végeztük Tukey's teszttel. Szignifikánsnak azt a változást tekintettük, ahol a p értéke kevesebb volt, mint 0,05.

## **4. EREDMÉNYEK**

### **4.1. A 3-aminobenzamid PARilációtól független védő hatása az UVB és az UVA sugárzás által kiváltott sejthalál során**

#### **4.1.1. A PARP-1 csendesítése érzékenyítette a HaCaT sejteket az UVB sugárzás okozta sejthalálra**

A PARP-1-t siRNS segítségével csendesítettük HaCaTkeratinocita sejtvonalban. Western blot módszerrel detektáltuk a PARP-1 fehérje expresszióját illetve funkciókiesés vizsgálatot végeztünk. Ez utóbbi során a nem transzfektált és a transzfektált sejteket hidrogénperoxiddal (1 mM, 5 perc) kezeltük mely PARP-1 aktivációt eredményez és így PAR polimer felhalmozódást. A két kísérlet eredménye alapján elmondható, hogy a csendesítés kellő hatásfokú volt ahhoz, hogy a további kísérletek eredményét a PARP-1 enzim hiányának tudjuk be. UVB sugárzást követően vizsgáltuk a HaCaT sejtek életképességét, és azt az eredményt kaptuk, hogy  $0,6 \text{ J/cm}^2$  a legkisebb dózisú UVB sugárzás, amely szignifikánsan csökkenti a sejtek életképességét. A PARP-1 enzim siRNS általi csendesítése az előbb említett UVB dózis toxikus hatását szignifikánsan növelte.

#### **4.1.2. A PJ-34 és a 3-AB PARP gátlószerek ellentétes hatásúak az UVB sugárzás által kiváltott sejthalál során**

Sejtéletképességi vizsgálatok eredményeiserint az NHEK sejtek életképességét már  $0,1 \text{ J/cm}^2$  UVB dózis is szignifikánsan csökkenti. APARiláció szerepének tanulmányozása céljából a sejteket PARP gátlószerekkel (PJ-34, 3-AB) kezeltük. A PJ-34 kezelés szignifikánsan csökkentette az NHEK sejtek életképességét UVB sugárzás során, a 3-AB PARP gátlószer viszont teljes mértékben védett az UVB okozta toxicitás ellen.

A 10 nappal az UVB sugárzást követően proliferációs vizsgálatot végeztünk. Ennek eredménye alapján a következő állításokat tehetjük: (i) az NHEK sejtek proliferációs képessége már  $0,025 \text{ J/cm}^2$  UVB dózis esetén szignifikánsan csökkent (ii) a proliferáció csökkenését a PJ34 gátlószer fokozta (iii) a 3-AB gátlószerrel kezelt sejtek mind a három UVB dózis esetén a kezeletlen sejtekhez hasonlatos proliferációs rátát mutattak.

A PJ-34 PARP gátlószer a PARP-1 csendesítéshez hasonlóan, érzékenyíti a sejteket, míg a 3-AB PARP gátlószernek, az UVB sugárzással szemben védő hatása volt NHEK sejtek esetében.

#### **4.1.3. A 3-AB védi a normál humán epidermáliskeratinocitákat az UVB sugárzás által kiváltott apoptózissal és nekrozissal szemben is**

May-Grünwald-Giemsa festés segítségével megfigyeltük, az NHEK sejtek morfológiai változásait az UVB sugárzást követően. A PJ-34 érzékenyítő hatását jól mutatta, hogy az apoptotikus morfológia már alacsonyabb UVB dózis ( $0,1 \text{ J/cm}^2$ ) esetében is megjelenik, míg a csak UVB sugárzással kezelt keratinociták esetében csak magasabb ( $0,2 \text{ J/cm}^2$ ) dózisonál volt megfigyelhető hasonló morfológiai változás. A 3-AB kezelés teljes mértékben kivédte az UVB toxikus hatását.

Apoptotikus paraméterként immunfestés segítségével detektáltuk a hasított PARP-1 mennyiségét. Az eredmények szerint a csak UVB sugárzást kapott keratinocitákhoz ( $0,2 \text{ J/cm}^2$ ) képest a PJ-34 gátlószerral előkezelt sejtekben már alacsonyabb dózisonál ( $0,1 \text{ J/cm}^2$ ) detektálható volt a hasított PARP-1, míg a 3-AB-val előkezelt sejtek esetében egyik dózisonál sem volt mikroszkóposan látható mennyiségű hasított PARP-1.

Nekrotikus paraméterként LDH enzim felszabadulást mértünk, amely szerint a PJ-34 nem fokozta ennek a paraméternek a mennyiségét, azonban a 3-AB kezelés estében a LDH felszabadulás a sugárzást követően nagyon alacsony mértékű volt.

#### **4.1.4. A 3-AB premitokondriálisan fejt ki az UVB sugárzással szembeni védő hatását**

Az UVB sugárzás az általunk alkalmazott legmagasabb dózis ( $0,2 \text{ J/cm}^2$ ) esetében mitokondriálmembrán depolarizációt okozott. A PJ-34 gátlószerral történő kezelés nem befolyásolta szignifikánsan az UVB sugárzás indukálta depolarizációt. A 3-AB előkezelés esetében a mitokondriális membrán potenciál nem változott, vagyis a 3-AB védett az UVB sugárzás által kiváltott mitokondriális diszfunkció ellen.

#### **4.1.5. A 3-AB csökkentette a hidrogén – peroxid termelődését UVB -vel besugárzott NHEK sejtekben**

Az UVB sugárzás, ahogyan azt közvetlenül a sugárzás után kimutattuk, szignifikáns mértékű  $\text{H}_2\text{O}_2$  képződést eredményezett. A 3-AB gátlószerral történő kezelés esetében a  $\text{H}_2\text{O}_2$  szintje szignifikánsan alacsonyabb volt, ellentétben a PJ-34 előkezeléssel amely, összehasonlítva a csak besugárzott sejtekkel, nem változtatott szignifikáns mértékben az amúgy növekvő tendenciájú hidrogén-peroxid mennyiségen.

#### **4.1.6. A 3-AB védő hatása normál humán epidermáliskeratinociták esetében UVA sugárzás során is érvényesül**

Az UVA sugárzás dózisfüggően kiváltja az NHEK sejtek életképességének csökkenését. A 3-AB védő hatása UVA sugárzást követően is megnyilvánul NHEK sejteken végzett kísérletek eredményei alapján. May-Grünwald-Giemsa festéssel is hasonló eredményeket kaptunk, mely szerint a csak UVA sugárzással kezelt sejtek esetében csak magasabb UVA dózisonál ( $3 \text{ J/cm}^2$ ), a 3-AB gátlószerezrel kezelt sejtek esetében, egyik dózisonál sem figyelhető meg morfológiai változás.

Apoptotikus (hasított PARP-1) és nekrotikus (LDH-felszabadulás) paraméterek szignifikáns megjelenését csak a magasabb dózisú UVA sugárzás ( $6 \text{ J/cm}^2$ ) váltotta ki, ugyanakkor a 3-AB kezelés mind az apoptotikus mind a nekrotikus sejthalált gátolta UVA sugárzást követően.

A hidrogén-peroxid szint minden általunk alkalmazott UVA dózis esetében szignifikánsan magasabb volt, a sötét kontroll sejtekhez viszonyítva, ugyanakkor a 3-AB gátlószerezrel történő kezelés nem drasztikusan ugyan, de csökkentette az UVA sugárzás hatására termelődő hidrogén-peroxid mennyiségét.

#### **4.1.7. A 3-AB védő hatásavalószínűleg független a szer PARP gátló hatásától**

Kimutattuk, hogy a TIQ-A ( $10 \mu\text{M}$ ) és a DPQ ( $10 \mu\text{M}$ ) melyek szintén PARP gátlószerezek, hasonlóan a PJ-34 gátlószerezhez és a PARP-1 csendesítés hatásához, érzékenyítették az NHEK sejteket az UVB okozta sejthalálra, ellentétben a 3-AB gátlószerezrel.

## **4.2. A PJ-34 PARilációtól független fotogenotoxikus hatásának jellemzése**

### **4.2.1. Az alacsony dózisú UVA sugárzás nem csökkenti az A431 sejtek életképességét**

Az A431 sejt vonal esetében megállapítottuk a nem letális UVA dózist. Ennek céljából sejt életképességi vizsgálatot végeztünk, ahol különböző dózisokkal sugaraztuk a sejteket ( $2,5 - 10 \text{ J/cm}^2$ ) és különböző időkben határoztuk meg a sejtek életképességét ( $16 - 24 - 48 \text{ h}$ ). Az eredmények szerint csak a  $2,5 \text{ J/cm}^2$  UVA dózis nem volt szignifikáns mértékben hatással sejtek életképességére még 48 órával a besugárzást követően sem. További kísérleteinkben ezt az alacsony UVA dózist ( $2,5 \text{ J/cm}^2$ ) választottuk ki a PUVA modell kivitelezése és tanulmányozása céljából.

### **4.2.2. A PARP-1 csendesítés nem érzékenyítő hatású sem az UVA sugárzás sem a PUVA modell alkalmazása során**

Specifikus szekvenciájú siRNS általi transzfekció segítségével gátoltuk a PARP-1 kifejeződését az A431 sejtekben. A Western blot kísérletek eredménye szerint a PARP-1

fehérje expressziója és a PAR polimer mennyisége is szignifikánsan kisebb volt a csendesített sejtekben.

A továbbiakban sejtleletképeségi vizsgálatokat végeztünk a PARP-1 csendesített sejtekkel. A kontroll sejtek életképesége nem csökkent szignifikánsan az UVA sugárzás hatására, illetve a PARP-1 csendesítésnek sem volt érzékenyítő hatása egyik UVA dózis (2,5 - 10 J/cm<sup>2</sup>) esetében sem.

Következő lépésben a sejteket a előkezeltük 8-MOP nevű fényérzékenyítő szerrel, majd 2,5 J/cm<sup>2</sup> UVA sugárzással kezeltük őket. Az életképeség vizsgálat szerint a PARP-1 csendesítés nem volt szignifikáns hatással az UVA + 8MOP kezelés fototoxikus hatására.

#### **4.2.3. A PJ- 34 és Veliparib nevű PARP gátlószereket azonos koncentrációban alkalmazzuk a kísérleteink során**

<sup>3</sup>H-NAD<sup>+</sup> beépülésén alapuló enzimaktivitás mérést végeztünk. A hidrogén-peroxid kezelés nagymértékű PARP aktivációt okoz, melyet a Veliparib a legalacsonyabb (1 µM) és a legmagasabb (10 µM) alkalmazott koncentrációban is gátolt. A PJ-34 esetében a csak a legmagasabb (10 µM) koncentrációt tekinthetjük hatásosnak.

Az PAR polimer elleni antitesttel végzett immunfestés is hasonló eredménnyel zárult, vagyis a PJ-34 gátlószer alkalmazott koncentrációi közül csak legmagasabb (10 µM) gátolta teljesen a hidrogén-peroxid kezelés hatására keletkező PAR polimer akkumulációt, ellentétben a Veliparibbal ahol mind a két dózis hatékonyan bizonyult PARP gátlás tekintetében.

A továbbiakban az összehasonlíthatóság miatt a 10 µM koncentrációt választottuk ki a további kísérletekhez a PJ-34 és a Veliparib esetében is.

#### **4.2.4. A PJ-34 PARP gátlószer érzékenyítette az A431 sejteket az alacsony dózisú UVA sugárzásra, illetve fokozta a PUVA kezelés fototoxicitását.**

A PARP-1 csendesítése során kapott eredményeket meg akartuk erősíteni PARP gátlószerek alkalmazásával is. Az A431 sejteket tehát előkezeltük PJ-34 és Veliparib (10 µM) gátlószerrel és a 2,5 J/cm<sup>2</sup> UVA sugárzást követő 16. órában vizsgáltuk a sejtek életképeségét. Csak a PJ-34 volt az, amelyik fényérzékenyítő hatással rendelkezett, tehát 16 órával a sugárzást követően a sejtek ±50 %-nak a halálát okozta UVA sugárzással egyidejűleg alkalmazva. A Veliparibnak semmilyen érzékenyítő hatását nem tapasztaltuk az elvégzett kísérlet során.

Hasonló eredményt kaptunk a 8-MOP+ UVA kezelés után is, ahol a PJ-34 PARP gátlószerezrel történő kezelés fokozta a 8-MOP+UVA toxikus hatását. Mivel az itt kapott eredmények, ellentétesek a korábban a PARP csendesítés során bemutatottaktól és az előző kísérletben a Veliparib hatásától, ezért azt feltételezhetjük, hogy a PJ-34 fényérzékenyítő hatása annak PARP gátlószerez mivoltától legalább részben független mechanizmusra vezethető vissza.

#### **4.2.5. A PJ-34 fényérzékenyítő hatása szferoid kultúrában is kimutatható**

Az A431 sejtekből kialakult szferoidokat előkezeltük illetve kezeltük a PARP gátlószerezekkel (10  $\mu\text{M}$  PJ-34 és Veliparib) és 2,5  $\text{J}/\text{cm}^2$  nagyságú UVA sugárzással. 16 órával később vizsgáltuk a szferoid kultúra morfológiájában bekövetkező változásokat. A szferoidok átmérőjének méréséből származó adatok azt mutatták, hogy sem az UVA sugárzás, sem az UVA+Veliparib kezelés nem váltotta ki a szferoidok méretének csökkenését ellentétben a PJ-34 gátlószerezrel, mely UVA sugárzással egyidejűleg alkalmazva az szferoidok méretének körülbelül a felére való csökkenését eredményezte.

#### **4.2.6. A PJ-34 gátlószerez fényérzékenyítő hatását az antioxidánsok nem befolyásolták**

A ROS szerepének tisztázása végett a sejteket a PARP gátlószerezekkel párhuzamosan előkezeltük illetve kezeltük antioxidánsokkal is, aszkorbinsavval (500  $\mu\text{M}$ ) és troloxszal (200  $\mu\text{M}$ ), majd 16 órával az UVA sugárzást követően mértük a sejtek életképességét. Az UVA sugárzásnak (2,5  $\text{J}/\text{cm}^2$ ) illetve a Veliparibnak sem volt életképesség csökkentő, illetve fényérzékenyítő hatása így ezekben a kondíciókban az antioxidánsok alkalmazása sem okozott szignifikáns változást a sejtek életképességében. A PJ-34 + UVA kezelés által kiváltott körülbelül 50% mértékű sejtpusztulástegyik antioxidáns sem tudta csökkenteni.

A ROS mennyiségét közvetlenül a kezeléseik és az UVA sugárzás után ROS érzékeny festékkel mértük meg. A csak UVA sugárzással kezelt sejtekből jelentősen megnőtt a ROS szint. A Veliparib ezt a ROS mennyiséget szignifikánsan nem befolyásolta. Ellentétben a PJ-34 + UVA sugárzással kezelt sejtekből, amelyekben a ROS mennyisége szignifikánsan magasabb volt, mint a csak UVA sugárzást kapott sejtekből.

Az antioxidánsok hatására az UVA sugárzás által kiváltott ROS termelés csökkent, mind a csak UVA sugárzással, mind a Veliparib + UVA sugárzással kezelt sejtekből, illetve PJ-34 +UVA kezelés esetében szintén, de ez a ROS csökkenés az utóbbi esetben nem növelte a túlélő sejtek mennyiségét.



#### **4.2.7. A PJ34 + UVA kezelés együttesen DNS károsodást okoz, mely mind egyszálú, mind kétszálú DNS törésként kimutatható**

Alkalikus cometassay-t végeztünk, mely módszer az egyszeres DNS törés kimutatására alkalmas. A PARP gátlószerekkel való előkezelés (10  $\mu$ M PJ-34 és Veliparib) és UVA sugárzás (2,5 J/cm<sup>2</sup>) után azonnal, illetve 1 órával végeztük el a cometassay-t. Az UVA sugárzás önmagában nem okozott egyszeres DNS törést szignifikáns mértékben, hasonlóan a Veliparib + UVA kezeléshez. A PJ-34 + UVA kezelés esetében azonban, már azonnal az sugárzást követően tudtunk egyszeres DNS törést detektálni, amelynek mértéke 1 óra elteltével nem csökkent.

A  $\gamma$ -H2AXdetektálásaegy elterjedt módszere a DNS kettős törés kimutatásának például fényérzékenyítő szerek esetében. Az fent említett előkezeléseket és a sugárzást követően Western blot analízist végeztünk a különböző időpontokban vett mintából (2-4-8 h). A  $\gamma$ -H2AX jelét, sem a sötét kontrollokban vagy a csak UVA sugárzással kezelt sejtekben, sem a Veliparib + UVA sugárzással kezelt mintákban nem detektáltuk szignifikáns mértékben egyik vizsgált időpontban sem (2-4-8 h). A PJ-34+UVA sugárzással kezelt sejtekben azonban már 2 órával a sugárzást követően  $\gamma$ -H2AX fehérjét mutattunk ki, melynek mértéke a további két vizsgált időpontban (4-8 h) is detektálható maradt.

#### **4.2.8. A PJ-34 + UVA kezelés által kiváltott sejthalál főként apoptózis jegyeit mutatja**

Kaspáz-3 enzim aktivitást mértünk a PARP gátlószerekkel történő előkezelés (10  $\mu$ M PJ-34 és Veliparib) és UVA sugárzás (2,5 J/cm<sup>2</sup>) után különböző, időpontokban. Szignifikánsan magasabb kaspáz-3 enzim aktivitást csak a PJ-34+ UVA kezelésnél tapasztaltunk majdnem az összes mintavételi időpontban (4-8-16 h).

Az hasított PARP-1 kimutatására alkalmazott Western blot analízis szerint: egyrészt a sötét kontroll, a csak UVA sugárzással kezelt sejtekben és az UVA +Veliparib kezelés nem váltott ki PARP-1 hasítást, másrészt a sejtek UVA + PJ-34sugárzással való kezelése már 4 órával a sugárzást követően hasított PARP-1 fragmentum megjelenését eredményezte.

A PJ-34+UVA kezelés hatására DNS fragmentációt mutatható ki legalább 4 órával a sugárzás után. Sem a sötét kontroll, sem a csak UVA sugárzással kezelt, sem azUVA+Veliparibugárzással kezelt sejtek esetében nem detektáltunk szignifikáns mértékben DNS fragmentációt egyik vizsgált időpontban sem (4-8-16 h).

#### **4.2.9. A PJ-34+UVA kezelés által kiváltott sejthalál mértéke különböző specifitásúkaspáz-gátlószerekkel csökkenthető**

A kaszpáz-3 enzimaktivitás méréshez hasonlóan, megnövekedett kaszpáz-8 enzim aktivitás 4 órával az előkezeléseket és az UVA sugárzást követően szignifikáns mértékű volt a PJ-34 +UVA sugárzással kezelt sejtekben, míg a sötét kontroll, a csak UVA sugárzással kezelt sejtekben és a Veliparib+UVA kezelés esetében nem tapasztaltunk ilyen irányú változást.

A továbbiakban megvizsgáltuk, hogy a különböző specifitású kaszpáz gátlók mennyiben változtatják meg az A431 sejtek életképességét PJ-34+UVA kezelés során. Mind a pán kaszpáz inhibitor, mind a kaszpáz-3 inhibitor, valamint a kaszpáz-8 inhibitoris szignifikánsan csökkentette PJ-34+UVA kezelés által kiváltott citotoxicitást.

#### **4.2.10. A PJ-34 és a Veliparib az őket ért UVA sugárzás ellenére is megőrzi PARP gátló tulajdonságukat**

Hidrogén-peroxid kezelés által PAR polimer akkumulációt váltottunk ki A431 sejtekben, melyeket vagy sötétben tartottunk, vagy párhuzamosan a hidrogén-peroxiddal UVA sugárzással kezeltünk. Mind a két esetben volt olyan kombináció, ahol előkezeltük a sejteket a PARP gátlószerekkel a sugárzás és/vagy a hidrogén-peroxid kezelést megelőzően.

A Western blot analízis eredményéből a következő következtetéseket vonhattuk le: (i) az alacsony dózisu UVA sugárzás melyet a kísérleteinkben alkalmaztunk nem okoz PARP aktivációt, ennél fogva valószínűleg azt megelőző egyszeres DNS törést sem; (ii) a PARP gátlószerek hatékonyan csökkentették a hidrogén-peroxid által kiváltott PAR polimer felhalmozódást a sötét kontrollban és az UVA sugárzással kezelt sejtekben egyaránt.

#### **4.2.11. PJ-34 szerkezete megváltozik az UVA sugárzás következtében**

NMR spektroszkópia segítségével megvizsgáltuk a PJ-34 szerkezetét az UVA besugárzás előtt és azt követően. A módszer segítségével kimutatható volt, hogy az általunk alkalmazott alacsony dózisu UVA sugárzás ( $2,5 \text{ J/cm}^2$ ) a PJ-34 molekulák 20-30% -ban szerkezeti változást indukált. A szerkezeti módosulás az aromás (7-9 ppm) és a fenolos-OH (11-11,5 ppm) régióban azonosítható és konjugált p $\pi$ -elektron rendszer kialakulásában nyilvánul meg.

## 5. DISZKUSSZIÓ

### 5.1. A 3-aminobenzamid PARilációtól független védő hatása az UVB és az UVA sugárzás által kiváltott sejthalál során

Az első részben felvázolt kísérletsorozat célja annak megállapítása volt, hogy a PARP-1 enzimnek van-e valamilyen szerepe az UVB sugárzás által kiváltott sejthalálban, amelynek előzménye nagyrészt az UVB sugárzás által előidézett DNS léziók létrejötte.

Kimutattuk, hogy a PARP-1 siRNS általi csendesítése szignifikánsan fokozta az UVB sugárzás által kiváltott sejthalál mértékét HaCaT sejtek esetében.

További kísérleteinket humán primer epidermáliskeratinocitákon végeztük, ebben az esetben a PARP enzim farmakológia gátlásával próbáltuk modellezni a PARP-1 enzim hiányát. A gátláshoz kétféle PARP gátlószeret használtunk, melyeknek hatásmechanizmusa azonos, vagyis  $\text{NAD}^{+}$ -hoz hasonló szerkezetük révén képesek a PARP enzimek katalitikus alegységéhez bekötődni és gátolni azt. A 3-AB egy régebbi típusú PARP gátlószer, melynek specifitása és hatékonysága elmarad a PJ-34 mögött, melyet szintén alkalmaztunk a kísérleteink során. A gátlószerekkel végzett kísérletek eredménye szerint, a PJ-34 a PARP-1 csendesítéshez hasonlóan érzékenyítette az NHEK sejteket az UVB sugárzásra, mind rövid távú, mind hosszútávú életképességi illetve proliferációs vizsgálat esetében. Ugyanakkor a 3-AB PARP gátlószer jó hatásfokkal védte az NHEK sejteket az UVB által kiváltott sejthalál ellen, valamint a 3-AB kezelés megelőzte az alacsony dózisu UVB sugárzás proliferációt gátló hatását is. Mivel a PARP-1 csendesítés és a PJ-34 gátlószer hasonló eredményt adott kísérleteink során, arra a következtetésre jutottunk, hogy a 3-AB védő hatása a PARP gátlószer mivoltától független folyamat eredménye. Ezt támasztja alá az is, hogy két másik PARP gátlószer (TIQ-A, DPQ) szintén érzékenyítette az NHEK sejteket az UVB sugárzás citotoxikus hatására. Az NHEK sejtek UVB sugárzást követő morfológiai vizsgálatából és a PARP-1 hasított formájának detektálásából kiderül, hogy a PJ-34 általi PARP gátlás felgyorsítja az UVB sugárzás által önmagában is előidézett apoptózis megjelenését. A 3-AB kezelés esetén azonban nem láthatunk sem apoptotikus morfológiát, illetve nem detektálható hasított PARP-1 enzim sem, tehát a 3-AB teljes mértékben gátolja az UVB sugárzás által kiváltott apoptózist.

A 3-AB előkezelés szignifikánsan csökkentette az UVB sugárzás által kiváltott LDH felszabadulás mértékét. A PJ-34 gátlószernak nem volt befolyása a nekrotikus sejthalál jellemző paraméter változására. Az UVB sugárzás hatására fellépő mitokondriális membrán

depolarizációt a PJ-34 általi PARP gátlás nem befolyásolta, ugyanakkor a 3-AB szignifikánsan mértékben akadályozta ennek a jelenségnek a létrejöttét.

Kísérleteink igazolták, hogy az UVB sugárzást követően szignifikánsan fokozódott a hidrogén-peroxid mennyisége az NHEK sejtekben az UVB dózisok növekedésével arányosan. A 3-AB előkezelés esetében ez a hidrogén-peroxid termelés szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a csak UVB sugárzással kezelt sejtekben. Az irodalom szerint a 3-AB rendelkezik gyökfogó képességgel, és bár nekünk ezt nem sikerült igazolni, mégis azt feltételezzük, hogy ez áll a háttérben. A PJ-34 gátlószernek nem befolyásolta a hidrogén-peroxid termelődés mértékét az UVB sugárzás során.

A 3-AB az NHEK sejteken végzett kísérleteink szerint az UVA sugárzás során fellépő sejtéletképesség csökkenés esetén is minden szempontból szignifikáns védelmet nyújtott, vagyis, növelte az életképességet, gátolta az apoptózist a nekrozist és a csökkentette a hidrogén-peroxid termelődést.

12 Az általunk elvégzett kísérletek szerint, a PARP-1 enzim specifikus csendesítése és a PJ-34, DPQ és TIQ-A általi farmakológiai PARP gátlás érzékenyítette a HaCaT illetve az NHEK sejteket az UVB sugárzás által kiváltott sejthalálra. Az érzékenyítés háttérben valószínűleg a PARP gátlás által befolyásolt, nem elégséges hatásfokú DNS hibajavító rendszer áll.

A 3-AB gátlószernek azonban mindezekkel ellentétes hatását mutattuk ki, mely szerint véd, mind az UVB, mind az UVA indukálta apoptózis és nekrozis ellen is. Közvetett bizonyítékaink szerint tehát ez a hatás nem a PARP gátló hatásának a következménye, ugyanakkor valószínűleg közrejátszik benne valamilyen gyökfogó mechanizmus és az tény, hogy a 3-AB képes elnyelni az UVB és kisebb mértékben az UVA sugárzás egy részét, ezáltal fizikai fényvédőként is funkcionál elméletileg.

## **5.2. A PJ-34 PARilációtól független fotogenotoxikus hatásának jellemzése**

A PARP-1 szerepét a PUVA által kiváltott sejthalálban ezidáig még nem tanulmányozták. Az általunk választott PUVA modell az úgynevezett PUVA kezelés volt, mely jelentése szerint, egy pszoralén típusú vegyület és hosszú hullámhosszúságú UVA sugárzás kombinációja.

Eredeti elképzelésünk szerint a PARP gátlása fokozta volna a PUVA kezelés citotxicitását a DNS hibajavítás gátlása által. Az alaphipotézisünk már a kísérleti kivitelezés korai szakaszában megdőlt, ugyanis a PARP-1 csendesítése nem érzékenyítette az A431 sejteket az UVA sugárzásra ( $2,5-10 \text{ J/cm}^2$ ) illetve a PARP-1 enzim hiánya nem fokozta a 8-

MOP által kiváltott sejthalál mértékét. Ezekből az eredményekből arra következtettünk, hogy ebben az esetben a PARiláció nem esszenciális része a folyamatnak. Az eredményeket meg akartuk erősíteni a PARP enzim farmakológiai gátlásával is, mely kísérletek során a PJ-34 mellett a Veliparib nevű PARP gátlószer alkalmaztuk. A Veliparib, a PARP-1 csendesítéshez hasonlóan, nem érzékenyítette az A431 sejteket az UVA sugárzásra. Ugyanakkor a PJ-34 PARP gátlószerrel végzett kísérletek eredmény szerint, a szer nem csak, hogy a 8-MOP fototoxicitását növelte, de alacsony dózisu UVA sugárzással kombinálva önmagában is toxikus hatású volt, melynek mértéke vetekedett a pszoralén vegyület citotoxicitásával.

További fontos adalék a tanulmányozott jelenség mechanizmusának megértéséhez, hogy sem a PJ-34, sem a Veliparib nem veszíti el PARP gátló képességét az UVA sugárzás ideje alatt. A hidrogén-peroxid kezelés hatására bekövetkező nagyfokú PAR polimer felhalmozódást a két gátlószer, mind az UVA sugárzás jelenlétében, mind anélkül szignifikáns és azonos mértékben gátolta.

Kimutattuk továbbá, hogy az UVA+PJ-34 kezelés nem csak monolayersejtkultúrában citotoxikus hatású, hanem úgynevezett szferoidkultúrában is szignifikáns sejtpusztulást okoz.

Az UVA sugárzás hatására megnövekedett gyöktermelődés volt detektálható az A431 sejtekben, ezt az állapotot a Veliparib nem befolyásolta, a PJ-34 gátlószer viszont szignifikánsan fokozta. Az alkalmazott antioxidánsok, mint az aszkorbinsav és a trolox, mind a három esetben kifejtették gyökfogó hatásukat. Ennek ellenére az antioxidánsok nem befolyásolták a PJ-34 + UVA kezelés hatására bekövetkező életképesség csökkenés mértékét. A kísérlet eredménye alapján arra következtethetünk, hogy a PJ-34+ UVA által kiváltott sejthalál nem ROS-függő folyamat. Ezt azonban teljes bizonyossággal nem állíthatjuk e kísérlet alapján, hiszen léteznek olyan publikációk, amelyek szerint egyes ROS függő PDT szerek fototoxikus hatásán nem változtat az antioxidánsok hozzáadása a rendszerhez.

Továbbiakban kimutattuk, hogy a PJ-34 gátlószer, egyrészt már közvetlenül az UVA sugárzást követően okoz egyszálú DNS törést, másrészt ez a törés 1 órával a sugárzást követően is szignifikánsan jelen van, míg a csak UVA sugárzás és a Veliparib + UVA kezelés estében egyáltalán nem detektálható. Az egyszeres DNS törést követően foszforilált H2AX fehérjét mutattunk ki a PJ-34+UVA sugárzással kezelt mintákban. Az UVA kezelés önmagában és a Veliparib + UVA sugárzás nem okozta a H2AX fehérje foszforilációját. Több olyan publikáció létezik melyben a H2AX fehérje foszforilációját, mint a DNS kettős törés markerét alkalmazzák annak megállapítására, hogy például egy adott fényérzékenyítő szer más-más koncentrációban mennyire toxikus különböző hullámhosszú fény hatására. Más

kutatások viszont arra találtak bizonyítékot, hogy a H2AX foszforilált formában való jelenléte indirekt módon létrejött dupla szálú DNS törést jelöl, mely úgy alakul ki, hogy a replikációs villa a különböző DNS károsodások (DNS-keresztkötések, egyszeres DNS törések, fotoléziók) helyén összeomlik. A két kísérlet eredménye alapján annyi bizonyos, hogy a DNS szerkezetét ért károsodás, mely általunk először egyszeres DNS törésként lett azonosítva, nem javítódik ki az idő előrehaladtával, mivel foszforilált H2AX még a sugárzást követő 8. órában is kimutatható. Az, hogy ez a jelenség a károsodás súlyosságából adódik-e, vagy hozzájárul esetleg a PJ-34 aktív PARP gátló hatása is, nem jelenthetjük ki teljes bizonyossággal jelen állás szerint.

A csak UVA sugárzás vagy a Veliparib + UVA kezelés egyik, a következő sorokban részletezett, apoptotikus paraméter szignifikáns emelkedését sem váltotta ki, ahogy korábban életképesség csökkenést és DNS károsodást sem indukáltak. A PJ-34 + UVA kezelés hatására megnőtt a kaszpáz -3 enzim aktivitása, ebből következően sikerült hasított PARP-1 enzimet detektálni. Továbbá csak a PJ-34+UVA sugárzással kezelt mintákban tudtunk DNS fragmentálódást kimutatni, melynek erőssége és korai megnyilvánulása (4 h) arra utalhat, hogy a kaszpáz -3 enzim aktivitásából eredő fragmentálódás mellett a korábbi DNS károsodás súlyosbodása is hozzájárulhat annak erőteljes megnyilvánulásához. Az iniciátorkaspázok közül a kaszpáz-8 enzim aktivitása nőtt meg szignifikáns mértékben és időfüggően a PJ-34+UVA sugárzással kezelt mintákban, mely arra utal, hogy az apoptózison belül a sejthalálreceptorokból kiinduló útvonal része afotoxicitásnak. A kaszpázgátlószer alkalmazása, melyek vagy általános gátlószer, vagy a kaszpáz-3 - vagy a -8 enzimre voltak specifikusak, szignifikánsan de nem teljes mértékben csökkentették a PJ-34 +UVA sugárzás által előidézett sejthalál mértékét. Ez az eredmény arra is utalhat, hogy más, általunk nem vizsgált sejthalál útvonal vagy útvonalak is bekapcsolódhatnak a kezelés hatására.

NMR spektroszkópia segítségével kimutattuk, hogy az UVA sugárzás módosulást indukál a PJ-34 szerkezetében, melynek nagy valószínűséggel szerepe van a felsorolt fototoxikus hatások létrejöttében. Habár arra vonatkozóan nincsenek információink, hogy a PJ-34 PARP gátlószer pontosan hogyan vált ki elsősorban DNS törést UVA sugárzással együtt alkalmazva, annyi bizonyos, hogy maga a jelenség PARP enzimtől független folyamat eredménye. Ugyanakkor az a tény, hogy a PJ-34 nem veszíti el PARP gátló hatását az UVA sugárzás alatt, a szerkezet módosulás ellenére sem, hozzájárulhat ahhoz, hogy az általa kiváltott DNS károsodások végsősoron apoptózist váltanak ki, azok kijavítódása helyett.

## **6. KONKLÚZIÓK**

### **6.1. A 3-aminobenzamid PARilációtól független védő hatása az UVB és az UVA sugárzás által kiváltott sejthalál során**

1. Az UVB sugárzás dóziszfüggően okozza a HaCaT és NHEK sejtek életképességének csökkenését.
2. A PARP-1 csendesítése a HaCaT sejteket, a PARP farmakológiai gátlása PJ-34 gátlószer által pedig az NHEK sejteket érzékenyíti az UVB sugárzásra.
3. A 3-AB PARP gátlószer valószínűleg PARP-tól független mechanizmus révén, védi az NHEK sejteket az UVA és az UVB által kiváltott sejthaláltól egyaránt.
4. A 3-AB kezelés, mind az apoptotikus, mind a nekrotikus paraméterek csökkenését eredményezi, valamint csökkenti az UV sugárzás hatására keletkező hidrogén-peroxid mennyiségét

### **6.2. A PJ-34 PARilációtól független fotogenotoxikus hatásának jellemzése**

1. A PARP-1 csendesítése vagy a PARP farmakológiai gátlása, Veliparib gátlószer által, nem érzékenyíti az A431 sejteket az UVA sugárzásra, illetve nem befolyásolja a PUVA kezelés fototoxikus hatását.
2. A PJ-34 PARP gátlószer fokozza a PUVA kezelés fototoxicitását, továbbá önmagában UVA sugárzással kombinálva az A431 sejtek életképességének radikális csökkenését okozza.
3. A PJ-34 + UVA kezelés egyszeres DNS törést, és további DNS károsodást okoz valószínűsíthetően közvetlen, reaktív oxigén gyököktől független módon.
4. A PJ-34+ UVA kezelés apoptózist indukál, melynek mértéke különböző specifikitású kaspáz gátlószerekkel csökkenthető.
5. A PJ-34 szerkezete változik az UVA sugárzás alatt, ugyanakkor PARP gátló hatása változatlan marad.

## 7. ÖSSZEFOGLALÁS

A poli-ADP-ribózpólimeráz – 1 (PARP-1) enzim több biológiai funkciója mellett fontos szerepet játszik olyan DNS hibajavító mechanizmusok lejátszódásában, mint a bázis és nukleotid kivágásos hibajavítás vagy a homológ rekombináció és a nem homológ DNS végek összekapcsolása. Az említett folyamatokban való szerepe jól jellemzett az irodalomban, de még nem minden aspektusból ismert.

A Napból érkező különböző hullámhosszúságú UV sugárzások többféle DNS károsodást okoznak a velük érintkező sejtekben. Ezek a DNS károsodások a legfőbb kiinduló pontjai lehetnek a különböző bőrrák fajták kialakulásának amennyiben a DNS hibajavítás nem teljeskörű. Munkánk első felében a PARP-1 enzim szerepét szeretnénk volna tanulmányozni az UVB okozta sejthalál során. Eredményeink szerint, mind a PARP -1 enzim specifikus gátlása, mind a PARP farmakológiai gátlása fokozta az UVB által kiváltott sejthalál mértékét HaCaT sejtvonalon és primer keratinociták esetében is. A hatás valószínűleg a PARP gátlás következtében fellépő csökkent hatásfokú DNS hibajavítás eredménye. Ugyanakkor kimutattuk, hogy a 3-aminobenzamid (3-AB) nevű PARP gátlószer PARilációtól független módon védi a primer keratinocitákat az UVB és az UVA által kiváltott sejthaláltól. A védelem megnyilvánul rövid-, és hosszútávon egyaránt, valamint hatékony nekrozis és apoptózis esetében is. A 3-AB védelmi mechanizmusára nem derült fény teljes mélységében a kísérletek során, ugyanakkor valószínűsíthető, hogy a védelemhez hozzájárul antioxidáns és fényszűrő hatás egyaránt a gátlószer részéről.

Az UVA sugárzás kombinálása pszoralén típusú vegyülettel (PUVA), az orvostudományban elterjedten alkalmazott eljárás például a pszoriázis elleni terápiában. A PUVA kezelés rendkívül mutagén hatású lehet, adott esetben, az általa kiváltott különböző DNS károsodások miatt. A PARP-1 specifikus csendesítése és a Veliparib általi PARP gátlás nem befolyásolta szignifikáns mértékben a PUVA kezelés során fellépő sejthalál mértékét. A PJ-34 nevű gátlószer azonban, egyrészt fokozta ezt a toxicitást, másrészt kísérleteink eredménye szerint, UVA sugárzással egyidejűleg alkalmazva, szintén fototoxikus hatású. A fototoxicitás megnyilvánul egyszeres DNS törések és egyéb DNS károsodások indukciójában, valamint apoptózis kiváltásában. A sejthalál mértékét kaspáz gátlószerekkel jelentősen csökkenteni lehet. Kimutattuk továbbá, hogy a PJ-34 kémia szerkezete kismértékben ugyan, de változik az UVA sugárzás hatására, azonban ez nem változtat a PARP gátló képességén, ugyanakkor valószínűleg ez okozza fényérzékenyítő hatását.





## **8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS**

Szeretném köszönetemet kifejezni témavezetőmnek, Dr. Virág Lászlónak a munkám során nyújtott segítségéért, támogatásáért és nem utolsósorban türelméért.

Köszönöm a támogatást minden munkatársamnak az (DE) Orvosi Vegytani Intézetben. Külön köszönöm Bai Péternek, Bakondi Edinának, Erdélyi Katalinnak, Hegedűs Csabának, Herbály Mihálynének (Erzsikének), Kovács Katalinnak, Szabó Ildikónak, Valkó Zsuzsannának és Boratkó Anitának a szakmai és baráti támogatást munkám során.

Az NMR vizsgálat elvégzéséért köszönettel tartozom Prof. Dr. Kövér Katalinnak a Debreceni Egyetem Szervetlen és Analitikai Tanszékének egyetemi tanárának.

A disszertációban bemutatott eredmények megszületéséhez hozzájárult a TÁMOP-4.2.4.A/2-11/1-2012-0001 Nemzeti Kiválóság Program is.

A munkát a GINOP-2.3.2-15-2016-00020 TUMORDNS és GINOP-2.3.2-15-2016-00048-STAY ALIVE pályázatok támogatták.

Köszönettel tartozom a szüleimnek, a férjemnek és Sipos Adriennek, mindenért.



Nyilvántartási szám: DEENK/305/2016.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

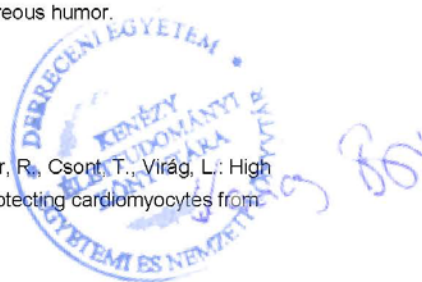
Jelölt: Lakatos Petra  
Neptun kód: CKG17B  
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Lakatos, P.**, Hegedűs, C., Salazar Ayestarán, N., Juarranz, Á., Kóvér, K. E., Szabó, É., Virág, L.:  
The PARP inhibitor PJ-34 sensitizes cells to UVA-induced phototoxicity by a PARP independent mechanism.  
*Mutat. Res.-Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 790, 31-40, 2016.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2016.07.001>  
IF: 2.581 (2015)
2. **Lakatos, P.**, Szabó, É., Hegedűs, C., Haskó, G., Gergely, P., Bai, P., Virág, L.: 3-Aminobenzamide protects primary human keratinocytes from UV-induced cell death by a poly(ADP-ribosyl)ation independent mechanism.  
*Biochim. Biophys. Acta-Mol. Cell Res.* 1833 (3), 743-751, 2013.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.12.003>  
IF: 5.297

### További közlemények

3. Géhl, Z., Bakondi, E., Resch, M. D., Hegedűs, C., Kovács, K., **Lakatos, P.**, Szabó, A., Nagy, Z., Virág, L.: Diabetes-induced oxidative stress in the vitreous humor.  
*Redox Biology.* 9, 100-103, 2016.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2016.07.003>  
IF: 6.235 (2015)
4. Gergely, S., Hegedűs, C., **Lakatos, P.**, Kovács, K., Gáspár, R., Csont, T., Virág, L.: High throughput screening identifies a novel compound protecting cardiomyocytes from doxorubicin-induced damage.  
*Oxid. Med. Cell. Longev.* 2015, 1-12, 2015.  
IF: 4.492





5. Hegedűs, C., Robaszkiewicz, A., **Lakatos, P.**, Szabó, É., Virág, L.: Poly(ADP-ribose) in the bone: from oxidative stress signal to structural element.  
*Free Radic. Biol. Med.* 82, 179-186, 2015.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.01.027>  
IF: 5.784
6. El-Hamoly, T., Hegedűs, C., **Lakatos, P.**, Kovács, K., Bai, P., El-Ghazaly, M. A., El-Denshary, E. S., Szabó, É., Virág, L.: Activation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 delays wound healing by regulating keratinocyte migration and production of inflammatory mediators.  
*Mol. Med.* 20, 363-371, 2014.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.2119/molmed.2014.00130>  
IF: 4.508
7. Hegedűs, C., **Lakatos, P.**, Kiss-Szikszai, A., Patonay, T., Gergely, S., Gregus, A., Bai, P., Haskó, G., Szabó, É., Virág, L.: Cytoprotective dibenzoylmethane derivatives protect cells from oxidative stress-induced necrotic cell death.  
*Pharmacol. Res.* 72, 25-34, 2013.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2013.03.002>  
IF: 3.976
8. Kovács, K., Erdélyi, K., Hegedűs, C., **Lakatos, P.**, Regdon, Z., Bai, P., Haskó, G., Szabó, É., Virág, L.: Poly(ADP-ribosyl)ation is a survival mechanism in cigarette smoke-induced and hydrogen peroxide-mediated cell death.  
*Free Radic. Biol. Med.* 53 (9), 1680-1688, 2012.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.08.579>  
IF: 5.271
9. Hegedűs, C., **Lakatos, P.**, Oláh, G., Tóth, I. B., Gergely, S., Szabó, É., Bíró, T., Szabó, C., Virág, L.: Protein kinase C protects from DNA damage-induced necrotic cell death by inhibiting poly(ADP-ribose) polymerase-1.  
*FEBS Lett.* 582 (12), 1672-1678, 2008.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2008.04.023>  
IF: 3.264

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 41,408**

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 7,878**

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, 2016.11.21.