

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**PARP gátlók szerek 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

TARTALOMJEGYZÉK

1. RÖVDÍTÉS JEGYZÉK.....	6
2. BEVEZETÉS.....	7
2.1. A Napból érkező UV sugárzás.....	7
2.1.1. Az UVC / UVB sugárzás jellemzői.....	8
2.1.2. Az UVA sugárzás jellemzői	9
2.2. UV sugárzás okozta DNS károsodások következményei	10
2.3. Bőrdaganatok kialakulása és azok típusai.....	12
2.4. A fototerápia, a fotodinámiás terápia és a fotokemoterápia	13
2.5. A fényvédőszerek típusai.....	17
2.6. PARP-1 enzim biológiai szerepe	18
2.6.1. A poli-ADP-ribóz polimeráz -1 enzim tulajdonságai.....	18
2.6.2. A PAR polimer szintézisének mechanizmusa	19
2.6.3. Az DNS törés és a PARP aktiváció kapcsolata	21
2.6.4. A PARP-1 szerepe a különböző DNS hibajavító mechanizmusokban	22
2.6.4.1. Bázis kivágásos DNS hibajavítás (BER)	22
2.6.4.2. Homológ rekombináció (HR) és nem homológ DNS végek összekapcsolása (NHEJ).	23
2.6.4.3. Nukleotid kivágásos DNS hibajavítás (NER)	23
2.6.5. A PARP-1 enzim és a különböző sejthalál típusok kapcsolata	24
2.7. A PARP gátlószerek és kemoterápiás szerek kapcsolata.....	26
3. CÉLKITŰZÉSEK.....	31
4. ANYAGOK.....	32
5. MÓDSZEREK.....	33
5.1. Sejttenyésztés.....	33
5.2. A sejtek kezelése és az UV sugárzás alkalmazása.....	33
5.3. Szferoid kultúra létrehozása.....	34
5.4. Sejtéletképesség vizsgálat.....	34
5.5. Reaktív oxigén gyökök detektálása	35
5.6. Hidrogén-peroxid (H ₂ O ₂) detektálása	35
5.7. Géncsendesítés.....	35
5.8. Western blot analízis.....	36

5.9. Comet assay	37
5.10. Kaszpáz- enzim aktivitás mérése	38
5.11. A DNS fragmentáció kimutatása	38
5.12. Laktát-dehidrogenáz enzim felszabadulásának mérése	39
5.13. Sejtproliferációs vizsgálat	39
5.14. Immuncitokémia	40
5.15. May-Grünwald-Giemsa festés	40
5.16. Mitokondriális membrán potenciál mérése.....	41
5.17. PARP aktivitásmérés	41
5.18. NMR spektroszkópia	41
5.19. Statisztikai analízis	42
6. EREDMÉNYEK	43
6.1. A 3-aminobenzamid PARilációtól független védő hatása az UVB és az UVA sugárzás által kiváltott sejthalál során.....	43
6.1.1. A PARP-1 csendesítése érzékenyítette a HaCaT sejteket az UVB sugárzás okozta sejthalálra	43
6.1.2. A PJ-34 és a 3-AB PARP gátlószerek ellentétes hatásúak az UVB sugárzás által kiváltott sejthalál során.....	45
6.1.3. A 3-AB védi a normál humán epidermális keratinocitákat az UVB sugárzás által kiváltott apoptózissal és nekrozissal szemben is.....	47
6.1.4. A 3-AB premitokondriálisan fejt ki az UVB sugárzással szembeni védő hatását	49
6.1.5. A 3-AB csökkentette a hidrogén – peroxid termelődését UVB -vel besugárzott NHEK sejtekben.....	49
6.1.6. A 3-AB védő hatása normál humán epidermális keratinociták esetében UVA sugárzás során is érvényesül	50
6.1.7. A 3-AB védő hatása valószínűleg független a szer PARP gátló hatásától.....	53
6.2. A PJ-34 PARilációtól független fotogenotoxikus hatásának jellemzése.....	54
6.2.1. Az alacsony dózisú UVA sugárzás nem csökkenti az A431 sejtek életképességét.....	54
6.2.2. A PARP-1 csendesítés nem érzékenyítő hatású sem az UVA sugárzás sem a PUVA modell alkalmazása során.....	54
6.2.3. A PJ- 34 és a Veliparib gátlószerek összehasonlítása	57
6.2.4. A PJ-34 PARP gátlószer érzékenyítette az A431 sejteket az alacsony dózisú UVA sugárzással szemben, illetve fokozta a PUVA kezelés fototoxicitását.	58
6.2.5. A PJ-34 fényérzékenyítő hatása szferoid kultúrában is kimutatható.....	60
6.2.6. A PJ-34 fényérzékenyítő hatását az antioxidánsok nem befolyásolták.....	61

6.2.7. Az UVA+PJ-34 kezelés együttesen DNS károsodást okoz mely, mind egyszálú, mind kétszálú DNS törésként kimutatható	63
6.2.8. A PJ-34 + UVA kezelés által kiváltott sejthalál főként apoptózis jegyeit mutatja	65
6.2.9. A PJ-34+UVA kezelés által kiváltott sejthalál mértéke különböző specifikus kaspázgátlószerekkel csökkenthető.....	67
6.2.10. A PJ-34 és a Veliparib UVA expozíciót követően is megőrzi PARP gátló tulajdonságukat.....	70
6.2.11. PJ-34 szerkezete megváltozik az UVA sugárzás következtében	71
7. MEGBESZÉLÉS.....	74
7.1. A 3-aminobenzamid PARilációtól független védő hatása az UVB és az UVA sugárzás által kiváltott sejthalál során.....	74
7.2. A PJ-34 PARilációtól független fotogenotoxikus hatásának jellemzése.....	77
8. KONKLÚZIÓK	81
9. ÖSSZEFOGLALÁS.....	82
10. SUMMARY	83
11. IRODALOMJEGYZÉK.....	84
12. TÁRGYSZAVAK/ KEY WORDS.....	104
13. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	105
14. FÜGGELÉK	109

1. RÖVDÍTÉS JEGYZÉK

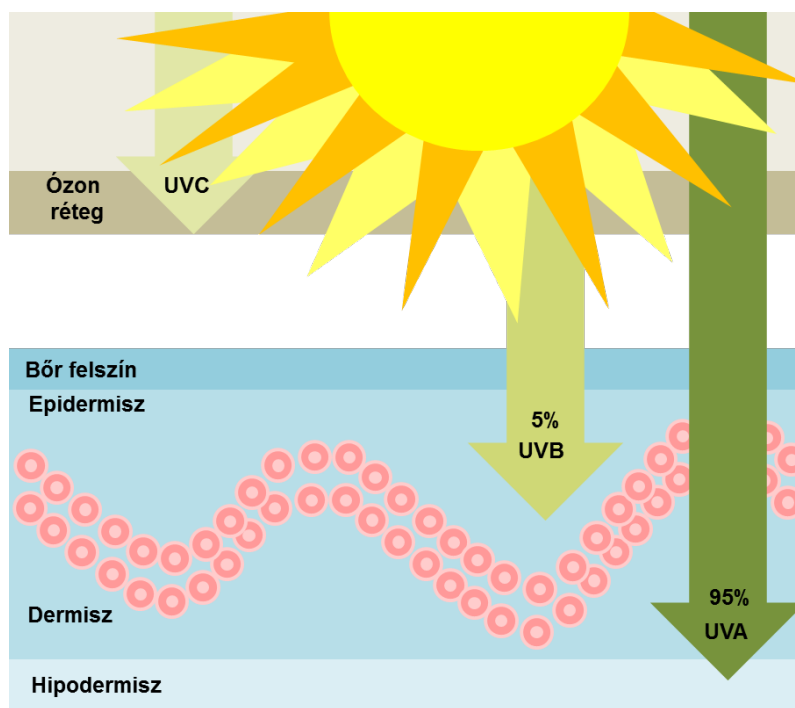
A magyarra csak nehézkesen fordítható kifejezések angolul szerepelnek

3-AB: 3-aminobenzamid	NHEJ: <i>non-homologous end joining</i>
ARH3: ADP-ribozil hidroláz 3	NMR: mágneses magrezonancia
ATM: ataxia telangiectasia mutated	spektroszkópia (<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>)
ATP: adenzin-trifoszfát	PAR: poli-ADP-ribóz
BCC: Bazálsejtes karcinóma (<i>Basal cell carcinoma</i>)	PARG: poli-ADP-ribóz glikohidroláz
BER: bázis excíziós DNS javítás	PARP: poli-ADP-ribóz polimeráz
BRCT: BRCA1 C terminális domén (<i>Breast cancer type 1 susceptibility protein</i>)	PCT: fotokemoterápia (<i>photochemotherapy</i>)
CAT: kataláz	PDT: fotodinámiás terápia (<i>photodynamic therapy</i>)
CPD: ciklobután-pirimidin-dimer	PMSF: fenilmetilszulfonil-fluorid
DDB1: <i>DNA damage – binding protein 1</i>	PUVA: pszoralén + UVA
DDB2: <i>DNA damage – binding protein 2</i>	(6-4)-PP: pirimidin – (6-4)-primidon
DMSO: dimetil-szulfoxid	fototermék (<i>photoproduct</i>)
DTT: 1,4-ditiotreitol	ROS: reaktív oxigén gyökök (<i>reactive oxygen species</i>)
FADD: <i>Fas associated via death domain</i>	RIP: <i>receptor-interacting protein 1</i>),
FBS: főtális borjúsavó	SCC: Laphámsejtes rák (<i>Squamous cell carcinoma</i>)
H2DCFDA: 2',7'-diklorodihidrofluorescein diacetát	SDS: nátrium-dodecil-szulfát
HR: homológ rekombináció	SOD: szuperoxid-dizmutáz
8-OHdG: 8-hidroxi-2' -deoxiguanozin	TMRE: tetrametilrodamin-etilészter
JNK: c-Jun N-terminális kináz	TNFR: tumor nekrozis faktor receptor
LDH: laktát-dehidrogenáz	TRAIL: <i>Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand</i>
8-MOP: 8- metoxipszoralén	XP: Xeroderma pigmentosum
MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid	XPA: Xeroderma pigmentosum – A
NAD ⁺ : nikotinamid-adenin dinukleotid	XPC: Xeroderma pigmentosum - C
NER: nukleotid excíziós DNS javítás	WGR: triptofán-glicin-arginin domén
NHEK: normál humán epidermális keratinocita	

2. BEVEZETÉS

2.1. A Napból érkező UV sugárzás

Az ultraibolya sugárzás az egyik legáltalánosabb hatás, mely a bőrünket éri. Az Földet körülvevő ózonréteg a legkárosabb UVC (100-280 nm) sugárzás nagy részét elnyeli. Az UVA (315-400 nm) illetve az UVB (280 – 315 nm) sugárzás azonban még így is viszonylag nagy dózisban ér minket napjainkban [1] (1.ábra). Amellett, hogy ezen sugárzások melanin szintézist és polimerizációt indukálnak [2] szükségesek a D-vitamin képzéshez [3], fokozhatják a bőr öregedési folyamatait [4] illetve karcinogén hatásúak lehetnek bőrtípustól illetve napozási szokásoktól függően [5]. A molekuláris oxigén nem abszorbeálja sem az UVB sem az UVA sugárzást, tehát nem potenciális célpontja az említett sugárzásoknak. Okozhatnak azonban oxidatív stresszt [6] és közvetett vagy közvetlen módon DNS



károsodásokat [7].

1. ábra. A Napból érkező UV sugárzás típusai

A napból érkező sugárzás összetétele körülbelül 5 % UVB és 95 % UVA sugárzás, ha az ózonréteg folytonossága sértetlen és ezáltal kiszűri az UVC sugárzás teljes mennyiségét. Az UVB és az UVA sugárzás eltérő hullámhosszából kifolyólag különböző mértékben képes penetrálni a bőr rétegeibe: míg az UVB sugárzás csak a bőr epidermisz részéig hatol, addig az UVA sugárzás képes a dermiszen keresztül a hipodermisz felső részéig eljutni.

2.1.1. Az UVC / UVB sugárzás jellemzői

Az UVC sugárzást az ózon réteg hatékonyan elnyeli, ezért ennek csak elenyésző része éri el az légkört. Az UVB sugárzás jelentős részét is kiszűri az ózonréteg, azonban napjainkban is észlelhető károsodása és elvékonyodása következtében, ez a sugárzás egyre nagyobb százalékban eljut a Föld felszínére [1].

A DNS abszorpció (260 nm-nél van az abszorpció csúcsa) spektruma főleg az UVC és UVB hullámhosszainak tartományába esik, ezért ezek okozhatják potenciálisan a legtöbb kárt a DNS szerkezetében [8]. A különböző hullámhosszú UV sugárzások okozta fő DNS károsodások a ciklobután-pirimidin-dimerek (CPD) és a pirimidin-pirimidon-fotoproduktumok ((6-4)-PP) [9]. Mind a két károsodás esetén felállítható egy gyakoriságbeli sorrend az egyes bázisok között kialakuló rendellenes kötések tekintetében. CPD: TT>TC>CT>CC dimerek [10]; (6-4)-PP: TC>CC>TT=CT [11]. A citozin bázis a CPD –ben nem stabil és könnyen deaminálódik uracil bázissá eredményezve. Ezek az uracil-tartalmú CPD-k a legjobb példák a DNS károsodás mutagén hatására [12] (2. ábra).

Az UVC – és az UVB – sugárzás hatására főleg CPD-k keletkeznek, míg a (6-4)-PP jóval ritkábban alakul ki. Hasonló mennyiségű CPD létrehozásához az UVB sugárzásból nagyjából 100 –szor nagyobb mennyiség szükséges, mint az UVC sugárzásból [13]. Ezért is nagyon fontos az ózon rétegünk állapotának megőrzése és további romlásának megakadályozása.

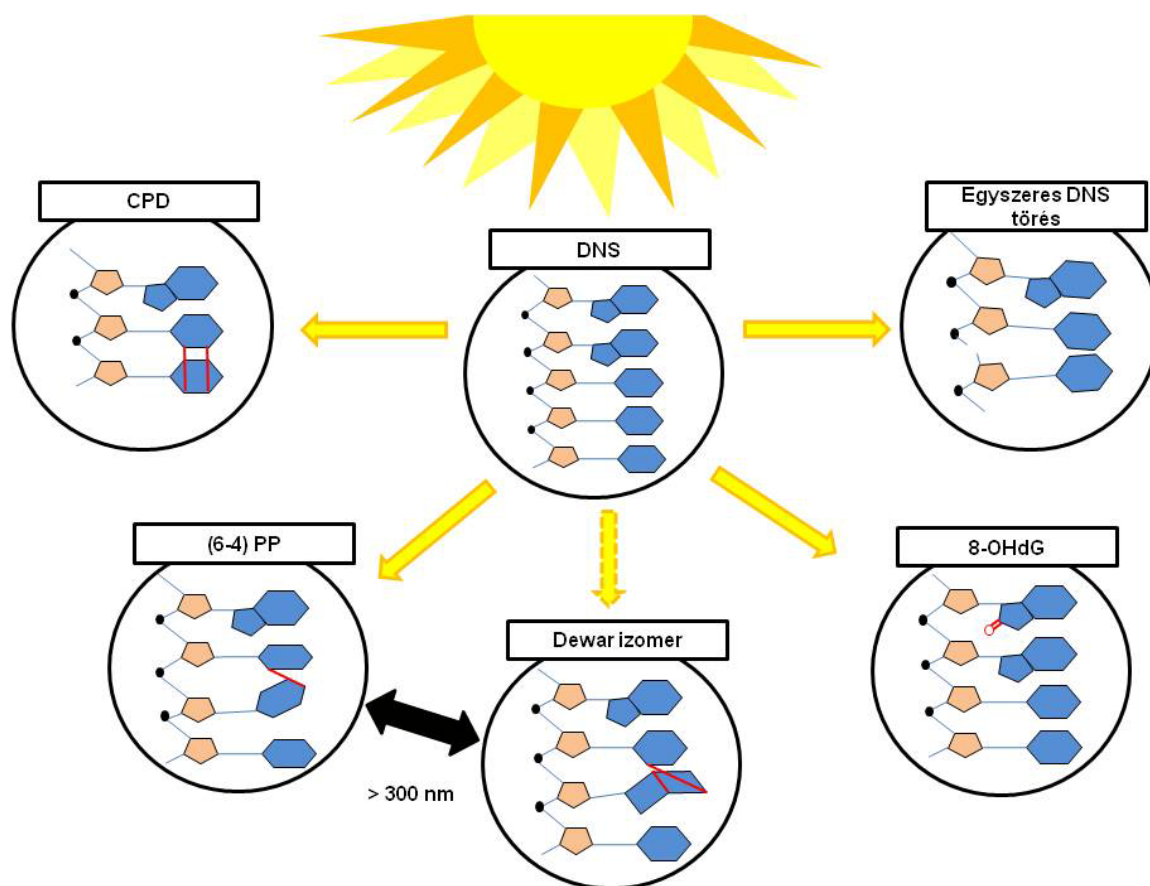
Az UVC illetve az UVB sugárzás hatására bekövetkező RNS szerkezet változás szintén végzetes hatású lehet az adott sejt biológiai folyamataira nézve, különösen az mRNS tekintetében, melynek károsodása vagy szekvenciájának megváltozása csökkent vagy működésképtelen fehérjéket eredményezhet [14].

Az UVB sugárzás abszorpciója az epidermiszben elsősorban az aromás aminosavak által történik, mint a triptofán, tirozin valamint a cisztein illetve a diszulfid – híd által kötött cisztein közreműködésével [15]. 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 [16] [17].

2.1.2. Az UVA sugárzás jellemzői

A DNS, az abszorpciós spektrumának köszönhetően, a hosszú hullámhosszúságú UVA sugárzásból már csak nagyon kis mennyiséget nyel el. Következésképpen ez a fajta sugárzás kis eséllyel okoz a DNS szerkezetében CPD-ket vagy (6-4)-PP-ket vagy ezekhez hasonló léziókat [18]. 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 [19] (2. ábra).

Az UVA sugárzás valódi veszélye azonban abban rejlik, hogy képes a plazmamembránok lipidjeinek és a citoplazma komponenseinek károsítására, melynek révén különböző szabadgyökök termelődését indukálja [20] [21]. A szabadgyökök közül a hosszabb féléletidejűek bejutva a sejtmagba a DNS oxidatív károsodását okozhatják azáltal, hogy láncreakciókat elindítva rövid féléletidejű, de nagy-energiájú szabadgyököket hoznak létre, melyek megfelelő hatótávolságon belül ez említett károsodásokat okozzák [22]. A DNS oxidatív módosulása révén, mind egyszálú, mind kétszálú törések létrejöhetnek [23]. Az oxidatív báziskárosodások közül a 8-OHdG (8-hidroxi-2' -deoxiguanozin) az egyik leggyakrabban előforduló módosulás [24].



2. ábra. A Napból érkező különböző hullámhosszúságú sugárzások által okozott DNS károsodások összefoglalása

Egyszeres DNS töréseket minden hullámhosszúságú sugárzás képes előidézni közvetett vagy közvetlen módon. A 8-OHdG egy oxidatív stressz által kiváltott károsodás, amelyet elsősorban az UVA sugárzás következtében kialakult sejteken belül megnövekedett szabadgyök termelődés okoz. A CPD-k és a (6-4)-PP-k elsősorban UVB sugárzás hatására alakulnak ki, ugyanakkor fontos megjegyezni, hogy a (6-4)-PP 300 nm-nél magasabb hullámhosszú sugárzás által, úgynevezett Dewar izomerré alakul, amely az előzőhöz képest egy stabil és nem kijavítható DNS károsodás.

2.2. UV sugárzás okozta DNS károsodások következményei

Az UV sugárzás következtében kialakuló DNS károsodások, melyek veszélyeztetik a genom stabilitását és integritását, normál körülmények között aktiválják az olyan DNS hibajavító mechanizmusokat, mint a nukleotid kivágásos hibajavítás (NER), a bázis kivágásos hibajavítás (BER), *mismatch* javítás, dupla szálú DNS hibajavító mechanizmus, és a replikációt követő hibajavítás [25].

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 [26]. A NER hibajavító rendszer jelentőségét a rák megelőzésében jól demonstrálja a xeroderma pigmentosum (XP) nevű betegség. Ez egy olyan recesszíven öröklődő genetikai elváltozás, mely ennek a hibajavító rendszernek az elégtelen működéséhez vezet. Az XP kialakulása következtében, körülbelül 10000X-re növekedik az UV indukálta DNS károsodások és az abból kiinduló neopláziák kialakulásának esélye [27] [28]. 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 [29].

Általánosságban elmondható, hogy csak a nagyon magas dózisú vagy a nagyon hosszantartó UV sugárzás az, amely az érintett sejtekben nekrosis elindulását indukálja [30]. Normál körülmények között az UV sugárzás apoptózist vált ki, mely a mutációk kialakulásának elkerülése végett egy „szerencsésebb” végkifejlett az adott szervezet számára. Ezeket az apoptózissal elpusztult sejteket, melyeket morfológiájuk alapján is jó el lehet különíteni az egészséges társaiktól úgynevezett „sunburn” sejteknek hívjuk [31] [32]. Az említett sejtekben lejátszódó apoptózis fő induktora a genomi DNS károsodása, ugyanakkor a p53 útvonal-függő apoptózison kívül, a sejthalál receptorokból kiinduló és a mitokondriális diszfunkció-mediált apoptotikus útvonal vagy ezeknek a kombinációja a sejthalál végső okozója [33].

A bőrben található keratinocitákban az apoptózis általában p53- independens útvonalon megy végbe, azonban a p53 fehérje elengedhetetlenül fontos a DNS hibajavításhoz. A p53 közvetlen kölcsönhatásba léphet ugyanis több - a NER rendszerben szereplő – fehérjével [34] [35].

A külső stimulus hatására bekövetkező apoptotikus útvonalat a HaCaT keratinociták esetében is megfigyelték UVB sugárzást követően [36]. Ez az útvonal a CD95 (Fas/APO-1) receptorból indul ki, mely a tumor nekrosis faktor receptorcsalád (TNFR) tagja, és rendelkezik egy cisztein-gazdag extracelluláris doménnel illetve egy intracelluláris sejthalál doménnel is. A folyamat során, az UV sugárzás hatására, a CD95 multimerizálódik, melynek eredményeképpen képes FADD (*Fas associated via death domain*) megkötésére, melynek következtében elindul a kaszpáz kaszkád, kaszpáz-8 kaszpáz-3 irányban [37]. Az UV sugárzás stimulálja továbbá a TNFR aktivációját is, mely során a TNFR-1 és a TRAF -2 közreműködésével elindul az apoptózis [38].

A TRAIL (*Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand*) receptorok szintén aktiválódhatnak az UV sugárzás hatására, melyek közül kettő továbbítja az apoptotikus jelet, kettő másik pedig „ál-receptorként” működik, gátolva az apoptózist. Végül az ezek közötti versengés határozza meg a folyamat kimenetelét [39] [40].

Az UV sugárzás az apoptózis ún. belső stimulus által kiváltott útvonalát is képes aktiválni az általa előidézett DNS károsodásokon keresztül, mely során a mitokondriumból citokróm -c szabadul fel. A mitokondriális membrán permeabilizálódása és a citokróm-c kiszabadulása kaszpáz-kaskád elindulását teszi lehetővé. A citokróm- c és az Apaf-1 (*Apoptotic protease activating factor 1*) együttesen az apoptoszómát alkotják, mely képes aktiválni az útvonal iniciátor kaszpázát a kaszpáz- 9 proteázt [41]. A folyamatban nagy szerepe van a pro-apoptotikus (Bax, Bak, Bid) és az anti-apoptotikus (Bcl-2, Bcl-x) fehérjéknek, melyek egymáshoz viszonyított aránya döntő az apoptózis végbemenetelének szempontjából [42] [43]. A p53-nak ebben a folyamatban is van szerepe azáltal, hogy részt vesz a Bcl-2 és a Bcl-xl proteinek expressziójának szabályozásában [44].

A bőr sejtjeiben is találhatók olyan antioxidáns enzimek, mint a SOD, a CAT vagy a glutation-peroxidáz, amelyek működése képes befolyásolni ezeket a sejthalál útvonalakat. Például az UV sugárzás hatására képződő reaktív oxigén gyökök (ROS) eliminálásával megvédi a mitokondriális DNS -t az esetleges oxidatív károsodástól, mely egyébként szintén vezethet apoptózishoz [45] [46].

2.3. Bőrdaganatok kialakulása és azok típusai

Az UV sugárzás által kiváltott karcinogenezis egy viszonylag hosszú folyamat, melynek első lépése akár az adott sejt DNS állományának a károsodása is lehet [47]. A károsodás történhet közvetlenül, legtöbbször UVB sugárzás hatására, vagy közvetett módon reaktív oxigén gyökök révén, főleg UVA sugárzás során [48]. Amennyiben a képződött fototermékek és a DNS szerkezetében történt egyéb elváltozások „túlélnek” a sejt első osztódását, fixálódhatnak a genomban és a továbbiakban megkezdődhet az adott sejt neoplasztikus fenotípusának kialakulása, amennyiben ehhez egyéb tényezők is hozzájárulnak [49]. Az említett fototermékek mellett a bőrdaganatokban pontmutációkat [50], deléciókat [51], sőt egész kromoszóma fragment vagy teljes kromoszóma hiányt mutattak már ki [52], melyek egy része szintén a túlzott UV expozícióhoz köthető. Az UV sugárzás továbbá képes különböző onkogéneket aktiválni, ezzel párhuzamosan pedig tumorszupresszor gének

expresszióját gátolni és ezzel is elősegítve a DNS károsodások konzerválódását, és az ilyen károsodott DNS -t tartalmazó sejtek túlélését és proliferációját [53] [54].

A következő szakasz során a tumorsejtek számának növekedése figyelhető meg. Mindezen folyamatok kialakulásához a fent említett DNS hibajavító mechanizmusok hiánya vagy elégtelen működése hozzájárulhat, melyért szintén felelős lehet adott esetben az UV sugárzás [55].

A bőrből kiinduló melanóma és nem- melanóma típusú daganatok kialakulásában, az esetek nagy részében szerepe van a túlzott UV –expozíciónak [56].

A melanóma kialakulásában, amely a bőr pigment-termelő sejteiből kiinduló rosszindulatú daganat, mind az UVB mind az UVA sugárzásnak szerepe van. Úgy tűnik azonban, hogy az UVB okozta DNS károsodásokból eredő konzervált mutációknak jelentősebb szerepet tulajdonítanak a kutatók manapság [57] [58] [59]. A kialakult DNS károsodások mellett továbbá, kimutatták melanóma sejtvonalakon, hogy a DNS hibajavító képesség erősen csökkent formában működik, mely főleg a sejtciklus S fázisában nyilvánul meg [60]. A hibajavításban aktívan résztvevő fehérjék közül az XPC a DDB1 és a DDB2 (*DNA damage binding protein*) expressziójának csökkenését mutatták ki UVB sugárzást követően ezekben a sejtvonalakban [61].

A non-melanóma típusú bőrdaganatok közül a bazál sejtes karcinóma (BCC), és az elszarusodó laphámrák (SCC) esetében is bizonyították az UV sugárzás iniciáló hatását [62]. Az iniciáló hatás legerősebb bizonyítéka az, hogy ezekben a tumorsejtekben többnyire kimutatható p53 mutáció, vagy legrosszabb esetben a p53 fehérje teljes funkciókiesése, melyet általában CPD lézióra lehet visszavezetni [63]. Az elszarusodó laphámrák megelőző állapota az úgynevezett aktinikus keratózis [64]. Ez az esetek 10-15%-ban alakul át laphámsejtes bőrrákká. Az aktinikus keratózis a fotokarcinogenezis többlépcsős folyamatának egyik bizonyítéka [65].

Becslések szerint a melanóma esetek 65 % - ban, míg a nem-melanóma típusú daganatok kialakulásáért, beleértve az bazál-, és a laphámsejtes karcinómákat, 90 % -ban a túlzott UV sugárzás következtében kialakult DNS károsodások a felelősek [62].

2.4. A fototerápia, a fotodinámiás terápia és a fotokemoterápia

A fototerápia, a fotodinámiás terápia (PDT) és a fotokemoterápia (PCT), nevük ellenére különböző eljárások, azonban napjaink orvostudományában széleskörben alkalmazottak. A fototerápiát az *acne vulgaris* kezelésére [66], a fotodinámiás terápiát például a rák különböző

típusainak kezelése során [67, 68], míg a fotokemoterápiát a *psoriasis* kezelésénél alkalmazzák [69].

A fototerápia során a besugárzás csupán a nem-ionizáló sugárzással történik, mely lehet UVA vagy UVB sugárzás illetve ezek kombinációi [70].

A fotodinámiás terápia és a fotokemoterápia sikeres kivitelezéséhez, többek között, egy fényérzékenyítőszerre és az annak megfelelő hullámhosszúságú fényre van szükség [71]. A fényérzékenyítő anyag és a fény találkozása során lejátszódó reakció eredményeképpen a megcélzott szövetben nagyfokú sejthalál és egyéb járulékos biológiai reakciók figyelhetők meg. A kétféle terápia különbözősége az alapmechanizmusban, fényérzékenyítő szerek típusában, és a szernek a fénnel való találkozása után lejátszódó folyamatokban keresendő.

A fotodinámiás terápia során elsősorban porfirint illetve porfirin vagy nem porfirin alapú fényérzékenyítő szereket alkalmaznak, melyeket 600 – 1000 nm hullámhosszúságú fénnel kombinálnak [72] [73]. A folyamat elengedhetetlen komponense a fényérzékenyítő szeren és a fényen kívül a molekuláris oxigén jelenléte [74]. A fényérzékenyítő szer abszorpciós maximumának közelében lévő fény hatására a szer gerjesztett állapotba kerül. A gerjesztett állapotban lévő fényérzékenyítő szer pedig végsősoron reaktív oxigén gyökök termelődését eredményezi [75]. A reaktív oxigén gyökök termelődése történhet direkt útvonalon, mely során a gerjesztett állapotban lévő fényérzékenyítő szerről emittáló elektron közvetlenül a molekuláris oxigénre kerül szinglet oxigént létrehozva vagy közvetett útvonalon sejten belüli szubsztrátokon keresztül, mely során legtöbbször szuperoxid-anion illetve hidrogén-peroxid keletkezik [76] (3. ábra). A végkimenetelét tekintve a két reakció nem különbözik egymástól, vagyis a képződött ROS a tumorszövet pusztulását eredményezi többféle útvonalon keresztül [77]. A PDT során alkalmazott fényérzékenyítő szerekről általában elmondható, hogy többféle sejthalál folyamatot indítanak el, beleértve az apoptózist, a nekrozist és az autofágiát [78] [79] [80]. Ezek a fényérzékenyítő szerek önmagukban általában nem mutagének vagy karcinogének, mivel ritkán okoznak közvetlen DNS károsodást [81]. A PDT során a tumorsejteket ért oxidatív károsodások mellett az immunrendszer nagyfokú aktivációja [82], a tumorszövet vaszkularizációjának csökkenése [83] figyelhető meg, valamint a tumorsejtek proliferációjának gátlása [84] járul hozzá a PDT tumor ellenes hatásához. Optikai kábelek segítségével már nem csak felszíni daganatok kezelésében használatos a terápia, hanem a test mélyebb rétegeiben kialakult tumorok kezelésében is [85] [86].

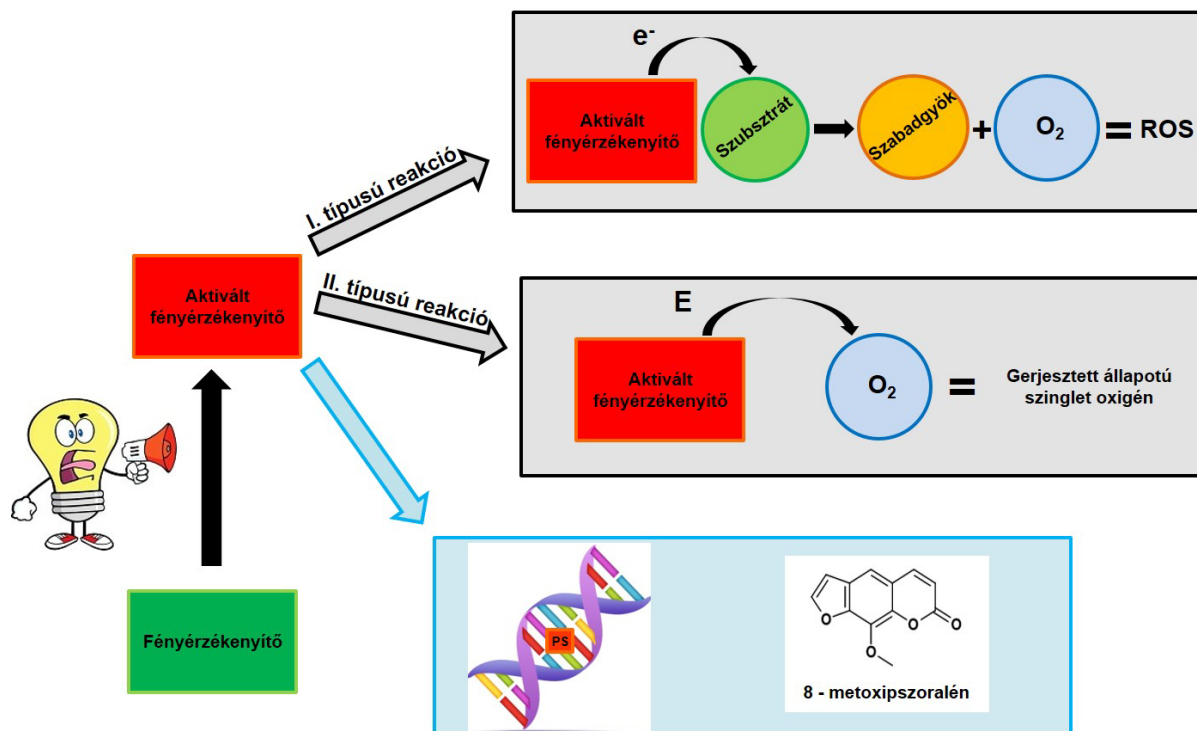
A fotokemoterápia vagy PUVA terápia alapja pszoralén és pszoralén-alapú vegyületek (P) kombinálása hosszú hullámhosszú ultraibolya sugárzással (UVA) [87] (3. ábra). A pszoralének triciklikus – furokumarin vegyületek, melyek közül a legelterjedtebben alkalmazottak az 5-metoxipszoralén, a 8-metoxipszoralén (8-MOP) és a trioxalén [88] [89].

A PUVA kezelés elsődleges célja a lokális immunszuppresszió és a fokozott keratinocita proliferáció gátlása, mellékhatásként fokozott keatinocita citotoxicitás tapasztalható, mely egyébként hosszútávon a daganat-kialakulás rizikóját hordozza magában az alább vázolt okok következtében.

A kezelés hatására bekövetkező sejthalál (és esetleges daganat képződés) elsődleges okozója a folyamat során kialakuló DNS károsodás. A DNS és a pszoralének fotokémiai interakciója három úton mehet végbe [90]:

- 1.) A pszoralén interkalálódik a DNS kettős szálába, ezzel károsítva annak szerkezetét. Megjegyzendő, hogy a folyamat UVA sugárzás nélkül is végbemehet [91].
- 2.) A sugárzás során 3,4- monoaddukt vagy 4',5'- monoaddukt keletkezhet, de csak a 4',5'-monoaddukt képes pszoralén-DNS keresztkötést létrehozni egy második foton abszorpciójával. Az, hogy a felsoroltak közül melyik fototermék keletkezik az alkalmazott fény hullámhosszától függ [92].
- 3.) A gerjesztett állapotban lévő fényérzékenyítőszer képes reakcióba lépni a molekuláris oxigénnel ezáltal reaktív oxigén gyökök, főleg szinglet oxigént képződik. A ROS termelődés által, a DNS károsodás mellett, egyéb sejtszintű károsodások is történhetnek, melyek fokozzák a PUVA citotoxikus hatását [93].

A fent említett reakciók eredményeképpen létrejövő pszoralén-DNS fototermékek, tulajdonképpen mutagéneknek illetve karcinogéneknek tekinthetők, melyek potenciálisan SCC vagy BCC tumorok kialakulását eredményezhetik az ilyen kezelést kapott betegeknél, amennyiben a várt sejthalál helyett ezen változások konzerválódása történik meg a genomban [94].



3. ábra. A fotodinámiás terápia és a fotokemoterápia mechanizmusának összefoglalása

Az önmagában ártalmatlan fényérzékenyítőszer, és az annak megfelelő hullámhosszúságú fény találkozásának eredményeképpen aktivált, vagyis gerjesztett állapotú fényérzékenyítőszer keletkezik. A fotodinámiás terápia során a molekuláris oxigén jelenléte is elengedhetetlen a kellő mértékű citotoxicitás kialakulásához. A fény hatására gerjesztett állapotba kerülő fényérzékenyítőszer vagy közvetlen kapcsolatba lép a molekuláris oxigénnel szinglet oxigént eredményezve (II. típusú reakció), vagy valamilyen sejten belüli szubsztráttal kapcsolatba lépve többféle reaktív oxigén gyök felhalmozódását eredményezi a célsejtekben (I. típusú reakció). A PUVA terápia során a fény hatására gerjesztett állapotba kerülő pszoralén típusú vegyület (pl.: 8-metoxipszoralén) képes interkalálódni a DNS kettős láncába, illetve ott pszoralén-DNS fototermékek keletkezését indukálhatja, amely végső soron az adott sejt pusztulását eredményezheti.

2.5. A fényvédőszerek típusai

Bőrünk védelmére, a Napból érkező sugárzás ellen napjainkban, már nagyon hatékony lokális fényvédő készítmények állnak rendelkezésünkre. Általában ezek a fényvédő vegyületek a fizikai vagy a kémiai szűrők csoportjának valamelyikébe tartoznak.

A kémiai fényvédők (organikus filterek) olyan molekulákból tevődnek össze, amelyek konjugált kettős kötést tartalmaznak, és ennek köszönhetően elnyelik a különböző hullámhosszúságú fénysugarakat. A fényelnyelés után gerjesztett állapotba kerülnek és az energiatöbbletükől különböző formában (hő, fluoreszcencia, foszforeszcencia) szabadulnak meg [95]. Elméletben elvárható lenne, hogy az adott fényvédőszer minden hullámhossz - tartományban elfogadható mértékben védelmet nyújtson, de a valóságban ezek a szerek az UVB sugárzást nyelik el a leghatékonyabban [96]. További hátrányos tulajdonságuk, hogy kémiai ágensek révén allergizáló hatásúak lehetnek illetve hosszú expozíciónak kitéve csökken a fényvédő hatásuk [97].

A fizikai fényvédők (anorganikus filterek) olyan szervesetlen vegyületekből állnak, melyek részecskéi tulajdonképpen visszaverik a beeső fotonokat. A bőr felszínén alkalmazva képesek visszaverni a Napból érkező sugárzást, akadályozva ezzel, hogy az a bőr mélyebb rétegeibe penetráljon. A fizikai fényvédők közé a következők tartoznak például: titán-dioxid, cink-oxid, alumínium-hidroxid, vas-oxid, magnézium-szilikát [98]. A részecskeméret csökkentésével ezeknek a vegyületeknek a fényvédő spektruma kiszélesedett [99]. Előnyös tulajdonságaik közé tartozik, hogy széles spektrumú védelmet nyújtanak, nem allergizálnak, hosszú expozíció mellett is stabilak, valamint szerves fényvédőkkel kombinálhatóak, nem befolyásolják egymás hatását [100] [101].

Antioxidánsok, mint béta-karotin, polifenolok, flavonoidok alkalmazása a fényvédő készítményekben ma már elterjedt eljárás, ezek az esetleges DNS károsodások kialakulásának esélyét hivatottak csökkenteni [102].

Napjainkban DNS –hibajavító enzimek bejuttatását megcélzó fejlesztések állnak az ilyen irányú kutatások központjában [103]. Ezek a készítmények elméletben nem csak gátolják az UV sugárzás által előidézett DNS léziók kialakulását - de valamilyen formában támogatva a DNS hibajavító mechanizmusokat - hozzájárulnának azok azonnali kijavításához a további mutációk elkerülése végett.

2.6. PARP-1 enzim biológiai szerepe

2.6.1. A poli-ADP-ribóz polimeráz -1 enzim tulajdonságai

A poli-ADP-ribóz polimerázok (PARP-ok, más néven ADP-ribosil transzferázok, ARTD-k) olyan akceptor fehérjék ADP-ribosilációját katalizáló enzimek, melyek ritka esetben prokariótákban, de jellemzően eukariótákban fordulnak elő [104]. A PARP enzimcsalád eddig 17 tagját azonosították [105], melyek kódolásáért külön gének felelnek, ugyanakkor mindegyikük tartalmaz egy 50 aminosavból álló konzervált szekvenciát, amely a katalitikus centrumot alakítja [106].

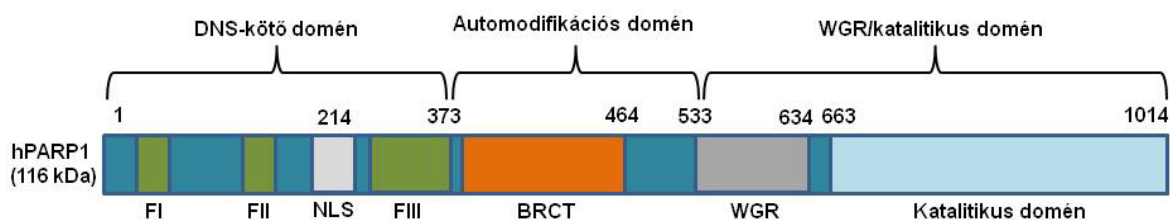
Az enzimcsalád leginkább tanulmányozott és a humán sejtekben legnagyobb mennyiségben előforduló tagja a PARP-1, melynek kódoló génje az 1-es kromoszómán található [107]. A PARP-1 enzim aktiválódásának fő iniciátora a DNS egyszálú törése [108], mely különböző indukciók hatására következhet be. A humán PARP-1 1014 aminosavból áll, molekulatömege pedig 116 kDa. Az enzim három fő szerkezeti eleme a következő: a DNS-kötő domén, az automodifikációs domén és a katalitikus domén [109] (4. ábra).

Az enzimnek a DNS – hez való kötődését - a DNS törés észlelését követően - az N-terminális régióban elhelyezkedő két Zn-ujj domén biztosítja [110]. A DNS kötő doménben megtalálható továbbá egy nukleáris lokalizációs szignál [111] valamint, egy a kaszpáz-3 proteáz által specifikusan felismerhető hasítóhely, mely az enzim inaktiválásáért felelős [112]. Az N-terminális részen azonosítottak egy harmadik Zn-ujj domént is, mely nem a DNS-hez való kötődést szolgálja, hanem az enzim DNS általi aktivációjához szükséges [113]. Az említett Zn-ujjak eltérő szereppel rendelkeznek az enzim működése szempontjából. Az N-terminális vég közelében elhelyezkedő FI az enzim aktivációjához kell. A második Zn-ujj domén (FII) fő tulajdonsága, hogy nagy affinitással kötődik szabad DNS végződésekhöz, így az egyszálú DNS-törések felismerésében és azokhoz való kötődésében van nagy szerepe [114]. A harmadik Zn-ujj (FIII) domén a DNS-kötő motívum és a katalitikus domén kölcsönhatásához szükséges, mely a PARP-1 dimerizációjához elengedhetetlen [113].

Az automodifikációs domén tartalmaz egy BRCT domént (BRCA1 C terminális domén [*Breast cancer type 1 susceptibility protein*]), mely gyakran előfordul a DNS hibajavításban szereplő és a sejtciklust szabályozó enzimekben is [115]. Ez a BRCT domén a felelős a PARP-1 és a DNS hibajavító enzimek egyes tagjai, valamint egyéb fehérjék között kialakuló fehérje-fehérje kölcsönhatásokért [116].

Az enzim C-terminális részének közelében található továbbá egy konzervált WGR (triptofán-glicin-arginin) domén is, melynek pontos funkciója ugyan nem ismert, de annyi

bizonyos, hogy megléte elengedhetetlen az enzim aktiválódásához. Újabb kutatások eredményei szerint, igen nagy valószínűséggel a domének közötti kölcsönhatások kialakításában vagy stabilizációjában van szerepe[117]. A C-terminális végen helyezkedik el az enzim katalitikus doménje. Ez egy erősen konzervált régió, mely a nikotinamid-adenin dinukleotid (NAD^+) szubsztrát megkötéséért és a poli-ADP-ribóz (PAR) polimer szintéziséért felelős [106].



4. ábra. A humán PARP-1 enzim szerkezete

Az enzim három fő szerkezeti egysége a DNS kötő domén, az automodifikációs domén és a WGR/katalitikus domén. A DNS kötő domén az N-terminális részen található és tartalmaz három Zn-ujj domént (FI-III) illetve egy nukleáris lokalizációs szignált (NLS) valamint egy kaszpáz -3 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 NAD^+ megkötéséért és a PAR polimer létrehozásáért felelős.

2.6.2. A PAR polimer szintézisének mechanizmusa

A PARP enzimcsalád tagjai által katalizált reakciót poli-ADP-ribózilációnak nevezzük, mely egy poszttranszlációs fehérjemódosítás. Az aktivált PARP enzimek NAD^+ -ot használnak szubsztrátként, mely az enzim működése által nikotinamidra és ADP-ribózra hasad. Az ADP-ribóz kovalensen egymáshoz kötött egyenes vagy elágazó láncai, vagyis a poli-ADP-ribóz, az enzim által a megfelelő akceptor fehérjéhez kötődnek [118].

Az akceptor fehérje szempontjából a reakció reverzibilis, mivel a polimerek viszonylag rövid időn belül lebomlanak a poli-ADP-ribóz glikohidroláz (PARG), az ADP-ribózil hidroláz 3 (ARH3) és az ADP-protein liáz enzimek működése által [119] [120] (5. ábra).

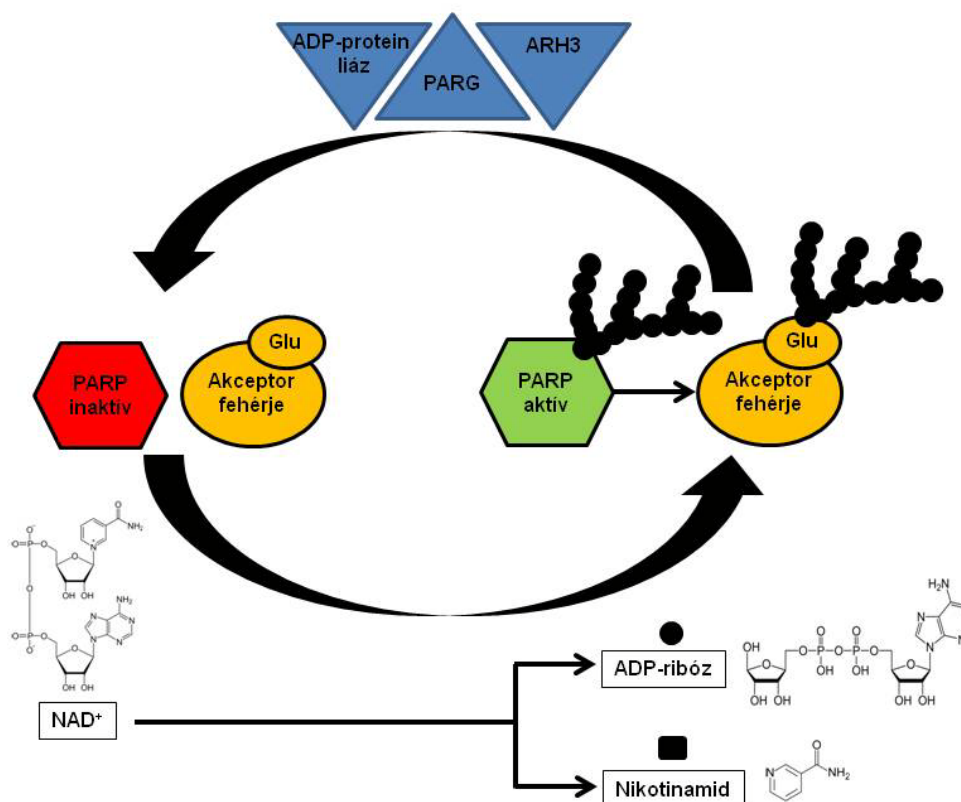
A PARP-1 enzim aktivációjának első lépését, melynek során az enzim egyik Zn-ujj doménje a DNS-hez kötődik, a DNS – kötő és a katalitikus doménnek a kölcsönhatása illetve az enzim dimerizációja teszi lehetővé, valamint segíti elő [121]. A kialakult kölcsönhatás megnöveli az enzim affinitását, annak szubsztátja a NAD^+ iránt, melynek következtében a PARP automodifikációja játszódik le az automodifikációs domén egyes oldalláncain [122].

Az enzim aktivációját követően szintetizálódott polimert 1'-2' glikozidos kötéssel összekapcsolt ADP-ribóz egységek alkotják. A polimerek hosszúsága változó, néhány egységnytől 200 egységig is terjedhetnek, 20-50 egységenként létrejövő elágazásokkal vagy anélkül [123]. A PARiláció, vagyis az ADP-ribóz egységek mérete illetve a negatív töltése, megváltoztatja az akceptor fehérjék fizikai-kémiai tulajdonságait, mellyel befolyásolja azok stabilitását, aktivitását és az általuk esetlegesen kialakított kölcsönhatásokat [124].

A poli-ADP-riboziláció célpontjai különböző fehérjék lehetnek. Habár a folyamat főleg a glutamát, az aszpartát és a lizin oldalláncon történik, az irodalom szerint ennél több aminosav is lehet a PARiláció célpontja [125] [126]. *In vivo* körülmények között a legnagyobb mennyiségben előforduló PARilált fehérje az maga a PARP-1 enzim. Az auto-poli-ADP-ribozilációnak szabályozó szerepe van, mely végső soron az enzim gátlását eredményezi [127].

Az *in vitro* kutatások már több, mint 200 sejtmagi fehérjét azonosítottak, melyekhez kovalensen kapcsolódhat PAR polimer [128]. Ezek között olyan célpontok szerepelnek, mint a hisztonok [129], különböző transzkripciós faktorok [130], DNS replikációban [131] és hibajavításban [132] szereplő fehérjék, jelátvitelben résztvevő fehérjék, mint az NF κ B (nukleáris faktor kappa-B) [133], a topoizomeráz I és II [134] és DNS függő protein kinázok [135].

A sejtek alap PAR polimer szintje, mely valamilyen stimulus hiányában detektálható, az adott sejt típusától függően ugyan, de általában rendkívül alacsony. Mitotikus stressz illetve DNS törés hatására, a PARP aktivációt követően a polimer mennyisége akár 10 vagy 500 – szorosára is megnőhet, miközben a szintézis szubsztátjaként szolgáló NAD^+ szintje illetve a szintézishez szükséges ATP (adenozin-trifoszfát) szintje erősen lecsökken [109] [136].



5. ábra. A PARP enzimek által katalizált PARiláció mechanizmusa

A PARP enzimek aktív állapotban a NAD^+ -ot nikotinamidra és ADP-ribózra bontják. Az ADP-ribóz egységekből felépülő egyenes vagy elágazó polimert az enzim kovalensen köti az akceptor fehérjéhez, annak is legtöbbször a glutamát, aszpartát vagy lizin oldalláncához. A polimer féléletideje rövid, eliminációjáról főleg a PARG enzim, de emellett az ADP-protein liáz és az ARH3 enzimek gondoskodnak. A PARP enzim, működése során az akceptor fehérjéhez hasonlóan, szintén PARilálódik, majd inaktívulódik az említett enzimek által irányított PAR polimert lebontó folyamatok révén.

2.6.3. Az DNS törés és a PARP aktiváció kapcsolata

A PARP aktiváció és az ezzel együtt járó PAR polimer termelődés legfőbb kiváltója az egyszeres DNS törés [137], amely olyan genotoxikus stressz hatására következhet be, mint az UV sugárzás [138], radioaktív sugárzás [139], reaktív oxigén vagy nitrogén gyökök által kiváltott oxidatív stressz [140] vagy DNS alkilálószerrek [141]. A reaktív oxigén és nitrogén gyökök közvetlenül okoznak DNS törést és ebből kifolyólag PARP aktivációt. Ezek közül az irodalom leginkább a hidrogén-peroxid, a hidroxil gyök és a peroxinitrit szerepét említi [142].

A DNS alkilálószerrek, melyek DNS törést okoznak a daganat ellenes kemoterápiában elterjedtek [141]. A sejtekbe való bejutásukat követően azáltal aktiválják a PARP enzimet, hogy metilálják a DNS bázisait, melyeket a DNS hibajavító rendszer enzimei kivágnak, egy úgynevezett *nick*-et, vagyis egy egyszálú törést hagyva maguk után [143].

Több munkacsoport is kimutatta azonban, hogy a génexpresszióval kapcsolatos kromatin szerkezeti átrendeződések során PARP-1 aktiváció figyelhető meg, akár DNS törés hiányában is [144].

Protein kinázok általi foszforiláció is szabályozhatja a PARP-1 aktivitását, mely szabályozás lehet aktiváló jellegű, mint az ERK1/2 (extracelluláris szignál által regulált kináz) és a JNK1 (c-Jun N-terminális kináz) esetében [145] [146], vagy gátló hatású, mint a PKC (protein-kináz C) esetében [147]. Az irodalom említést tesz a PARP-1 acetiláció [148] illetve mono-ADP-ribosiláció általi aktivációról is [149]. A jelátviteli útvonalakban résztvevő fehérjék közvetlen fehérje-fehérje kölcsönhatás révén, kovalens módosítás nélkül is befolyásolhatják a PARP-1 aktivitását [150]. Az egyéb poszttranszlációs módosítások pedig a PARP-1 enzimek a más fehérjékkel történő kölcsönhatását módosíthatják [148].

2.6.4. A PARP-1 szerepe a különböző DNS hibajavító mechanizmusokban

2.6.4.1. Bázis kivágásos DNS hibajavítás (BER)

A DNS lánc bázisai deaminálódás, alkilálódás vagy oxidatív hatás révén módosulhatnak. A BER az egyik elsődleges mechanizmus a sérült bázisok és az egyszálú DNS törések javításában. A módosításra specifikus DNS glikozilázok felismerik a sérülést és eltávolítják a hibás bázist. Az így kialakuló bázismentes helyen egy apurin/apirimidin endonukleáz hasítja a szálát a hiba 5' végén és endonukleáz aktivitással eltávolítja, vagy csak bázismentes nukleotidot (*short-patch repair*), vagy néhány szomszédos nukleotiddal együtt (*long –patch repair*) 3' irányban [151]. A PARP-1 enzim, több, a BER rendszer tagjaként nyilvántartott fehérjével alakíthat ki kölcsönhatást (XRCC [*X-ray repair cross-complementing protein*], aprataxin) [152] [153]. Számos munkacsoport kimutatta, hogy aktivitása befolyásolja a BER hatékonyságát olyan enzimek működésének szabályozása által, mint a DNS polimeráz- β [154], a DNS ligáz III [155], a kondenzin [156] vagy a 8-oxoguanin DNS glikoziláz (OGG1) [157]. Ennek ellenére vannak olyan munkacsoportok, melyek vizsgálatai szerint a PARP-1 hiánya nem csökkenti közvetlenül a BER mechanizmus hatékonyságát - véleményük szerint - inkább a csökkent PAR polimer szintézis egyéb sejtfolyamatokra tett hatása az, ami érzékenyíti a sejteket a genotoxikus stresszre [158].

2.6.4.2. Homológ rekombináció (HR) és nem homológ DNS végek összekapcsolása (NHEJ)

A kétszálú DNS törések kijavítása történhet homológ rekombinációval vagy a nem homológ DNS végek összekapcsolásával. A PARP-1 szerepét mind a két folyamatban leírták [143].

A homológ rekombináció esetében azt mutatták ki, hogy a PARP-1 enzim működése során aktiválja az ATM (ataxia telangiectasia mutated) kinázt [159], amely a hibajavító rendszer egyes fehérjéinek a foszforilációjáért felelős [160]. A DNS törés következtében felhalmozódott PAR polimer vagy fokozza az ATM aktivitását vagy befolyásolja az ATM funkcióját a célfehérjék hozzáférhetőségének elősegítése által. A PARP-1 enzim hiánya vagy gátlása azt eredményezte, hogy csökkent a p53, az SMC és a H2AX fehérjék ATM kináz általi foszforilációja [161]. Továbbá az ATM / PARP-1 dupla knockout egerek már embrionális korban elpusztultak [162].

A klasszikus NHEJ mechanizmus (C-NHEJ) során a Ku fehérje és a PARP-1 verseng a szabad DNS végekhez való kötődés lehetőségéért. Ugyanakkor kimutatható, hogy a Ku nagyobb affinitással kötődik a DNS -hez, mint a PARP-1, tehát az enzimnek ebben a folyamatban gyakorlatilag nincsen szerepe. Amennyiben a C-NHEJ útvonal faktora, 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 a DNS függő protein kináz [163] [164].

2.6.4.3. Nukleotid kivágásos DNS hibajavítás (NER)

A NER egyik jelentősége, hogy ez az a DNS hibajavító mechanizmus, amely az UV sugárzás következtében létrejött fototermékeket eliminálja. A NER hibajavító apparátusának nincsenek specifikus hibafelismerő enzime, inkább a DNS lánc torzulását érzékeli. Főleg az UVC és UVB sugárzás által előidézett CPD-k és (6-4)-PP-k vágódnak ki ilyen módon a DNS láncból. A hibás nukleotid kihasítása mellett, mindig megtörténik a kétoldali 20-30 nukleotidnyi szakasz eltávolítása is, melynek pótlása az ép szál segítségével történik [26] [9].

A NER hibajavító mechanizmuson belül két alaptípust különíthetünk el: az úgynevezett transzkripcióhoz kapcsolt NER, mely az átírássra kerülő régiók esetleges hibáit javítja ki, és a teljes genomra kiterjedő NER hibajavító rendszert [165]. UVC sugárzással és DNS

károsodással kapcsolatos kutatások kimutatták, hogy a PARP-1 enzim *in vitro* képes kötődni viszonylag nagy, sugárzás által károsított oligonukleotid-szakaszokhoz, valamint *in vivo* timin-dimer léziókhoz [166]. 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 [167] [168], 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 [169]. 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 [166]. A PARP-1 farmakológiai gátlása csökkentette a hibajavítás hatékonyságát, több munkacsoport által elvégzett kísérletben is [170], igazolva a PARP-1 enzim aktív szerepét ebben a DNS hibajavító mechanizmusban is.

2.6.5. A PARP-1 enzim és a különböző sejthalál típusok kapcsolata

A PARP-1 enzim szerepe a genotoxikus stressz során a DNS szerkezetét ért károsodás mértékétől függ. Viszonylag kismértékű DNS károsodás esetén a PARP-1, a hibajavító rendszerben betöltött szerepe révén, hozzájárul a sikeres hibajavításhoz, ezáltal fokozva egyrészt a sejt túlélésének esélyét, másrészt akadályozva a stabil mutációk kialakulását [171].

A PARP-1 enzim aktív közreműködése a kijavíthatatlan mértékű DNS károsodás esetében is megfigyelhető, ahol a PARP-1 enzim lényegében túlaktiválódik. A túlaktiválódás következménye a sejten belüli NAD^+ és ATP készletek erőteljes csökkenése. A NAD^+ hiányában az attól függő metabolikus utak is kárt szenvednek, mint a glikolízis és a mitokondriális elektron transzportlánc. Az ATP raktárak kimerülése pedig lényegében a sejt energiakészletének depléciójához vezet. A folyamat végső kimenetele a nekrotikus sejthalál [172]. Ennek a PARP-1 függő sejthalál útvonalnak a kimenetele befolyásolható extracelluláris NAD^+ vagy a citromsav ciklus szubsztrátjainak hozzáadásával, mely által javul a sejt energetikai állapota [173] [174].

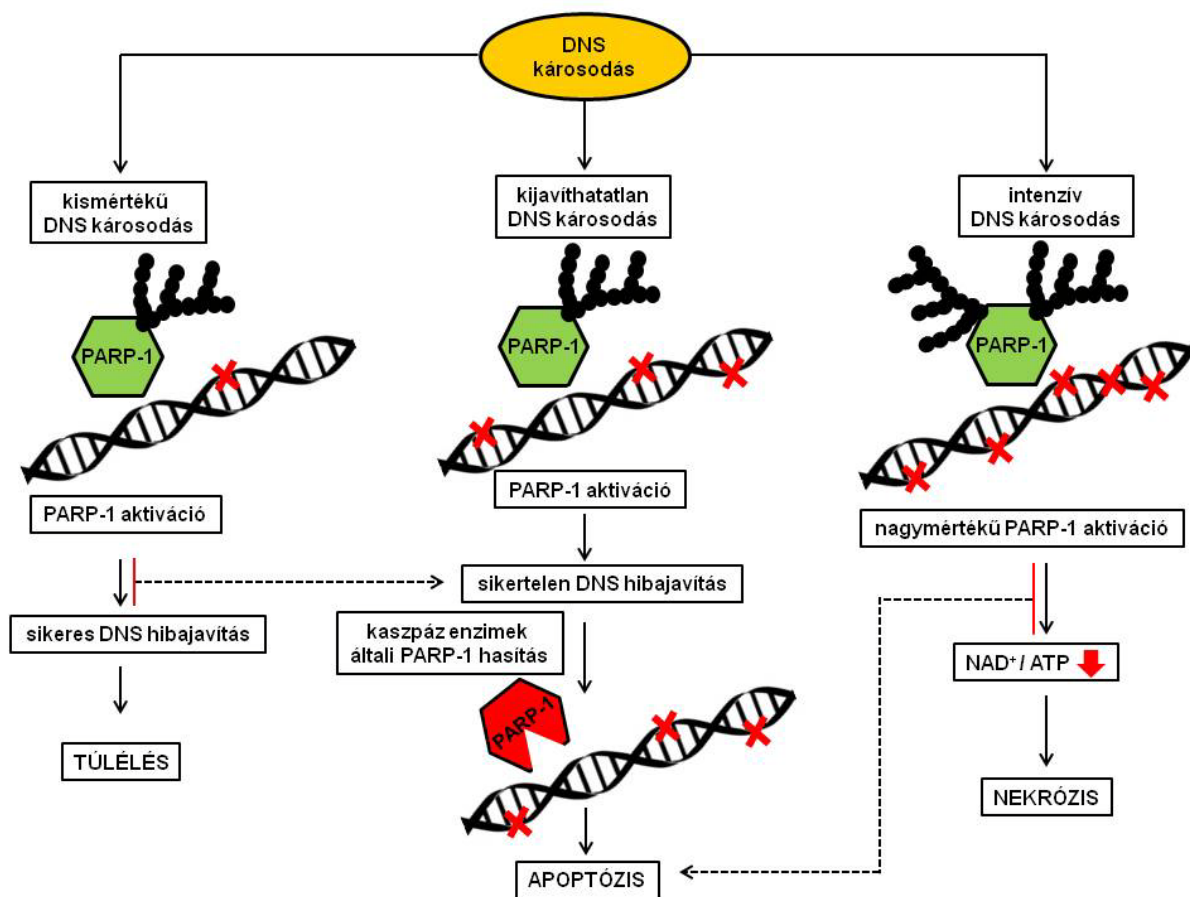
Habár a PARP-1 túlaktiváció következtében fellépő NAD^+ és ATP depléciónak a nekrotikus sejthalál fő oka, a folyamat során több szabályozott útvonal is bekapcsolódik. A NAD^+ szint csökkenése RIP1 (*receptor-interacting protein 1*), TRAF2 (*tumor necrosis factor receptor-associated factor 2*) majd JNK1/2 aktiválódást indukál, mely végső soron mitokondriális depolarizációt és apoptózist indukáló faktor transzlokációt eredményez [175] [176].

A nagymértékű DNS károsodás továbbá kiválthat apoptózist is [177], mely útvonalban a PARP-1 enzimnek passzív, de jelentős szerepe van. Az apoptotikus sejthalál egyik detektálható markere, a 89 kDa és egy 24 kDa nagyságú fragmentumra hasított PARP-1 enzim. A PARP-1 hasítását az apoptotikus útvonal jellemző proteáz enzimek a kaspázok végzik, azok közül is a kaspáz-3 illetve a kaspáz-7 esetében bizonyították ezt a specifitást [178] [179]. A kisebb fragmentum az N-terminális szakasznak felel meg, mely a DNS kötő domént tartalmazza, míg a nagyobb a C-terminális szakasz egésze. A hasítás következménye az enzim inaktiválódása, melyet a katalitikus és a DNS kötő domén eltávolodása okoz. Az N-terminális rész megtartja a DNS kötő képességét, de egyben gátolja a hasítatlan PARP-1 katalitikus aktivitását, lehetetlenné téve, ezáltal az enzim funkcionális aktivációját [178]. Ugyan a PARP-1 hasítása egy passzív szerep, de az egészséges szöveti egyensúly fenntartása szempontjából igen fontos, mivel így elkerülhető a PARP-1 túlaktiválódása és az abból következő nekrozis, mely a környező szövetekre is igen káros hatással lehet [180].

A lehetséges útvonalak természetesen nincsenek élesen elválasztva egymástól, a PARP-1 farmakológia vagy egyéb módon történő gátlása vagy depléciója lehetőséget biztosít az egyik útvonallról a másikra történő átkapcsolásra [106] (6. ábra).

Többek között Virág és mtsai. is kimutatták, hogy a nagy koncentrációban adott oxigén és nitrogén intermedierek nekrotikus sejthalált váltanak ki, amely PARP inhibitorok alkalmazásával vagy a PARP-1 génjének kiütése által apoptózis irányába tolható el [181, 182].

Az apoptózis esetében a különböző irányú kutatások nem hoztak egyértelmű eredményt: a PARP-1 gátlása bizonyos esetekben fokozta az apoptózist [183], más esetekben pedig vagy gátolta [184], vagy nem volt rá szignifikáns hatással [185]. Azt azonban több munkacsoport is igazolta, hogy a PARP-1 knockout egerek nem mutattak különbséget a vad típusú egerekhez képest az apoptotikus sejthalálban, sem a belső, sem a külső útvonalak lefolyása tekintetében [186] [187].



6. ábra. A PARP-1 enzim szerepe a különböző sejthalál típusokban

Kismértékű DNS károsodás esetén a PARP-1 enzim, a DNS hibajavító rendszerben betöltött szerepe révén 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 nekrozis következik be, melyet a PARP-1 túlzott aktivitásból eredő NAD^+ és ATP deplécio okoz. A PARP enzim farmakológiai és egyéb módszerrel történő gátlása apoptózishoz vezethet az első és a harmadik útvonal lejátszódása során (szaggatott nyíl).

2.7. A PARP gátlószerek és kemoterápiás szerek kapcsolata

A PARP-1 enzimmel foglalkozó kutatások kezdetben csak a DNS hibajavításban betöltött szerepére helyezték a hangsúlyt, ugyanakkor ezzel párhuzamosan felmerült a lehetősége annak is, hogy a PARP-1 enzim funkciójánál fogva a daganat ellenes terápia fontos eleme lehetne [188] [189].

Már igen korán kimutatták, hogy a 3-aminobenzamid (3-AB) a PARP-1 gátlása révén csökkentette a dimetil-szulfát DNS alkilálószer hatására keletkező DNS törések kijavításának határfokát, ezáltal növelve a dimetil-szulfát citotoxicitását [190].

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 gátlószerekre való érzékenysége nagymértékben megnőtt [191] [159]. A PARP enzim aktivitásának gátlása kromoszóma instabilitást, sejt ciklus összeomlást, apoptózist eredményezett, mely jelenségek a DNS károsodások elégtelen javítására és akkumulációjára vezethetők vissza.

Ettől a felfedezéstől kezdve a PARP gátlószerek fejlesztése rohamosan elindult, azzal a céllal, hogy az újonnan felfedezett és optimalizált PARP gátlószerek a daganatellenes terápia szerves részévé váljanak.

A fent említett folyamat a szintetikus letalitás jelenségének körébe tartozik, amely tulajdonképpen azt jelenti, hogy egy DNS hibajavító rendszerben fontos szerepet betöltő enzim gátlószereinek alkalmazásával és egy adott DNS hibajavító rendszert érintő mutáció által, fokozható egy exogén DNS károsodást okozó ágensnek a citotoxikus hatása [192] [193]. A jelenséget a tumor sejtek elleni harcban, elméletben és most már gyakorlatban jól ki lehet használni, mivel a tumorsejtek proliferációjuk során gyakran szenvednek el olyan mutációkat, melyek a DNS hibajavító rendszer egyes útvonalait érintik [194] [195].

A BRCA1/2 mutáció mellett, több olyan DNS hibajavítást érintő defektus is van, mely kombinálva PARP gátlószerekkel és DNS károsító kemoterápiás szerrel nagyfokú citotoxicitást eredményez. Az ATM útvonal deficienciáját és ezzel együtt a DNS kettős törés kijavításához szükséges homológ rekombináció csökkent működését a többiek között a krónikus limfoid leukémia esetek 25 %-ban figyelték meg [196] [197]. Az ilyen mutációval rendelkező sejtek szintén érzékenyek voltak az alkalmazott PARP gátlószerekre [198].

A PTEN (*phosphatase and tensin homolog*) tumorszupresszor gén mutációja az emlő daganatok 1-4%-ban megfigyelhető annak altípusától függően [199], ugyanakkor több más tumor típusban is kimutatták [200], hogy mutációja a homológ rekombináció csökkenéséhez vezet. Az ilyen mutációval rendelkező sejtek szintén érzékenyek voltak a PARP gátlószerekre [201].

A klinikai kipróbálás alatt álló és a már használatban lévő PARP gátlószerek többsége a PARP család tagjai közül az PARP- 1 és -2 enzimeket gátolják főleg, azonban vannak törekvések arra vonatkozóan, hogy a család többi 15 tagja ellen is fejlesszenek gátlószereket

terápiás célzattal, mivel ezeknek is szerepe van többek között a DNS hibajavításban és egyéb folyamatokban [202] [203].

A szintetikus letalitás során a PARP-1 enzimnek a HR-ben betöltött szerepe az, amely a gátlószereinek a hatékonyságát adja. Ugyanakkor fontos megemlíteni, hogy ehhez a citotoxicitáshoz hozzájárul még - másodlagos mechanizmusként- a PARP -1 enzimnek a BER-ben és az NHEJ-ben betöltött funkciójának gátlása is [204].

A szintetikus letalitás jelenségén kívül egyes PARP gátlószereknek egy további tulajdonsága is indokolja a tumor ellenes terápiában való alkalmazását. Ez a tulajdonság pedig az hogy néhány gátlószer képes „csapdába ejteni” a PARP-1 és a PARP-2 enzimet DNS-lánc törés felőli oldalán, egy olyan komplexet képezve mely végkimenetelét tekintve sokkal toxikusabb mint maga az egyszeres DNS törés [205] [206] [207].

A kutatásban vagy klinikumban alkalmazott különböző PARP gátlószerek hatékonyságukat és specifitásukat tekintve nyilván különbözőek, ugyanakkor abban megegyeznek, hogy mindegyik NAD^+ - analóg, mely által képesek a PARP katalitikus alegységéhez kötődni és így gátolni annak működését (7. ábra).

A disszertáció alapját képező két publikációban a következő PARP gátlószereket alkalmaztuk:

3-AB:

Az egyik legrégebbi PARP gátlószer. Annak ellenére, hogy későbbi gátlószerekkel összehasonlítva sokkal kevésbé specifikus és hatékonysága is csak viszonylag nagy koncentrációban érvényesül (1 mM- 5mM) napjainkban is gyakran alkalmazzák [208]. A 3-AB gátlószerről többek között kimutatták, hogy PARP gátló hatásának köszönhetően telomer rövidülést okoz és stimulálja az angiogenezist [209, 210]. Valamint alkalmazták olyan kutatások során melyben a PARP szerepét tanulmányozták az arterioszklerózisban a neurogenesisben és különböző tumorokban [211] [212]. Állatkísérletben is gyakran alkalmazott szer [213, 214].

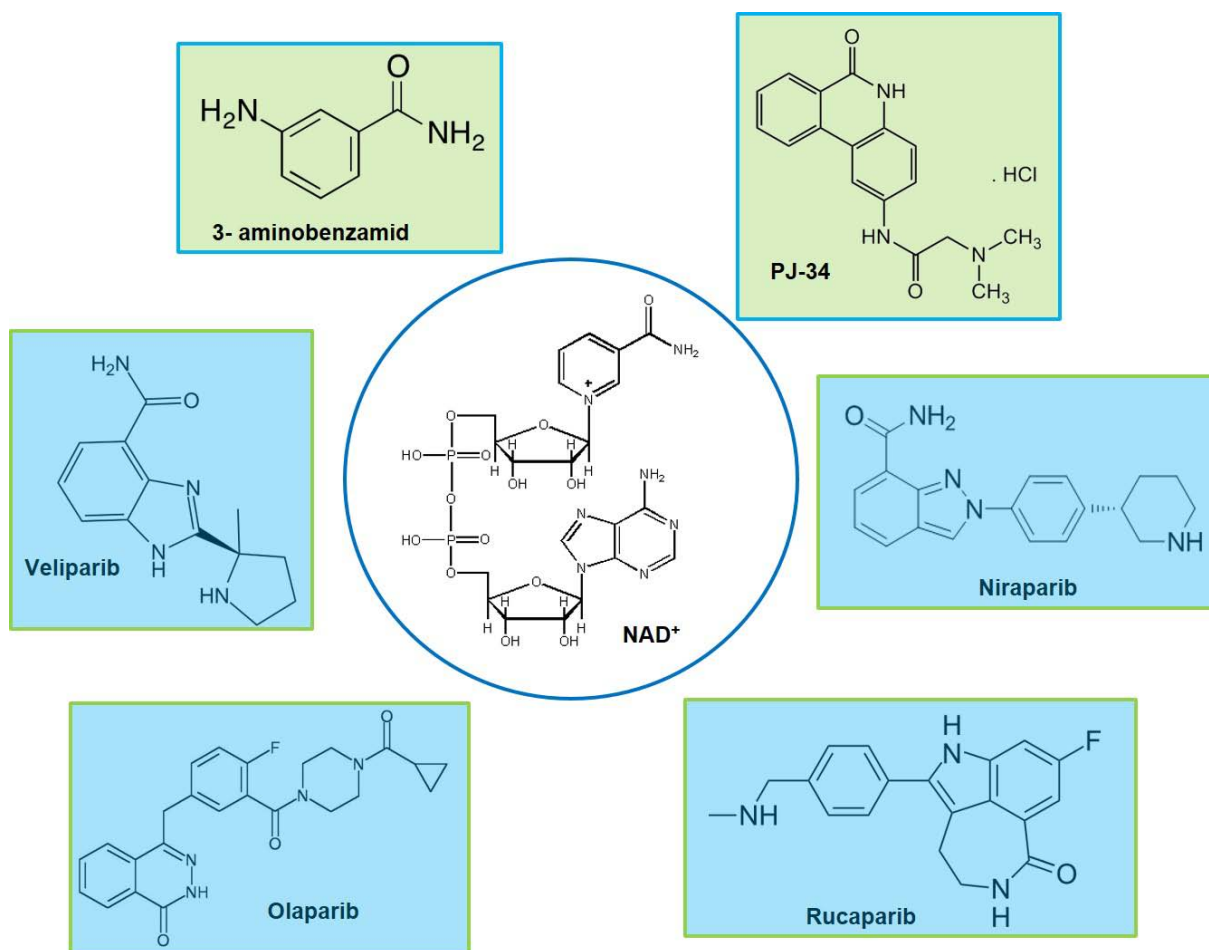
PJ-34:

Sokkal hatékonyabb PARP gátlószer, mint a 3-AB. Gyakorlati szempontból sokkal kisebb koncentrációban hatékony, természetesen sejttípustól függően (1-20 μM). Több esetben mutatták ki használatával a PARP enzim jelentőségét neuro-protektív folyamatokban például [215], illetve gyakran kombinálják kemoterápiás szerekekkel is tumor sejtvonalakon végzett kísérletekben [216] [217]. A PJ-34 PARP enzimtől függetlenül aktiválja a p21 gén

expresszióját ezáltal mitotikus katasztrófát okozva néhány sejtvonal esetében történt megfigyelés alapján [218].

Veliparib:

A 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 [219]. Különböző rák fajták esetében került már kipróbálásra, legtöbbször valamilyen kemoterápiás szerrel vagy ionizáló sugárzással kombinálva [220] [221]. A szer kipróbálás alatt áll többek között máj és prosztataraák esetében (ABT-888/Temozolomid) [222] [223], HER-2 (*human epidermal receptor 2*) - negatív metasztatikus emlő daganatban (ABT-888/karboplatin) [224], és metasztatikus hasnyálmirigy rák kezelése során (ABT-888/5-fluorouracil) [225] a zárójelben jelzett kombinációban.



7. ábra. Különböző PARP gátlók szerkezete

3- aminobenzamid

PJ-34: N-(6-Oxo-5,6-dihydrophenanthridin-2-il)-(N,N-dimetilamino)acetamid hidroklorid

Niraparib: (S)-2-(4-(piperidin-3-il) phenil)-2H-indazol-7-karboxamid

Rucaparib: 8-Fluoro-2- 4-[(methilamino) metil]phenil -1,3,4,5-tetrahidro-6H-azepino[5,4,3-cd]indol-6-one)

Olaparib: 4-[[3-[4-(ciklopropanekarbonil) piperazine-1-carbonil]-4-fluorofenil]metil]-2H-ftalazin-1-one)

Veliparib: 2-[(2R)-2-metilpirrolidin-2-il]-1H-benzimidazol-4-karboxamide

3. 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 epidermális keratinociták (NHEK) UVB dózis függésének összehasonlítása.
2. A PARP-1 - csendesítés hatásának vizsgálata az UVB sugárzás által kiváltott sejthalál során HaCaT sejtvonalon.
3. Különböző PARP gátlók 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 gátlók hatásának vizsgálata PUVA kezelés következtében fellépő sejthalál során.

4. ANYAGOK

Az L-glutamint, a főtális borjúsavót (FBS) és a molekulaméret markereket a Biocentertől (Szeged, Magyarország) vásároltuk.

A dimetil-szulfoxidot (DMSO), a Triton X-100 oldatot, az etanolt, a metanolt, a Trist, a Tris-HCl-t, a glicerolt, a maratott tárgylemezeket, a NaCl-ot, a laktát-dehidrogenáz (LDH) felszabadulás mérésére szolgáló kitet, a 2-merkaptotetanolt, a KCl-t, a NaCl-t, $MgCl_2$ -t a VWR cégtől (Debrecen, Magyarország) szereztük be. A May-Grünwald és a Giemsa oldatot és a hematoxilint a Finomvegyszer Szövetkezettől (Budapest, Magyarország) vettük. A formaldehid a Molar Chemicals-tól (Budapest, Magyarország) szereztük be. A β -aktin elleni antitestet, az anti-H2AX és anti-(foszforilált)-H2AX antitesteket, az anti-nyúl IgG-HRP másodlagos antitestet, az anti- hasított PARP-1 és a humán PARP-1 antitestet a Cell Signaling (Danvers, MA, USA) cégtől rendeltük. A PAR polimer elleni monoklonális antitestet a Debreceni Egyetem Orvosi Vegytani Intézetében, az ADP-riboszilációs munkacsoportban dolgozó Dr. Bakondi Edina készítette, 10H hibridóma sejtek felülúszójából telített ammónium-szulfát oldattal történő tisztítása által. A Super Signal West Pico reagenset, az anti-nyúl IgG - Alexa Fluor 488 konjugátumot, az Amplex Redet, és a TO-PRO sejtmagfestéket a Life Technologies-től (Budapest, Magyarország) vásároltuk. Az agarózt, a poliakrilamidot és a nitrocellulóz membránt a Bio-Rad-tól (Budapest, Magyarország) szereztük be.

A Tripszin-EDTA oldatot, a nátrium-dodecil-szulfátot (SDS), a 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromidot (MTT), a brómfenol-kéket, a proteáz inhibitorokat, a fenilmetilszulfonil-fluoridot (PMSF), a DMEM sejtenyészítő médiumokat, az antibiotikum-antimikotikum oldatot, kaszpáz-szubsztrátokat és a kaszpáz-gátlószereket, az aszkorbinsavat, a troloxot, az 1,4-ditiotreitolt (DTT), az anti-egér IgG-HRP másodlagos antitestet, a proteináz-K és az RNáz-A enzimeket valamint a tetrametilrodamin-etilészter (TMRE) és H2DCFDA (2',7'-diklorodihidrofluorescein diacetát) fluoreszcens festékeket, a 8-metoxipszoralént, az etídium-bromidot, a 3-aminobenzamidot, a torna-peroxidáz enzimet, a digitonint, a MOPS-ot, CHAPS-ot, a HEPES-t, Na_2HPO_4 -t, KH_2PO_4 -t, a Sigma Aldrich-től (St. Louis, MO, USA) vásároltuk.

A csendesítéshez használt siRNS-ek (non-target és PARP-1 specifikus) és a transzfekciós reagens (DharmaFECT2) a Thermo Fisher Scientific (Vantaa, Finland) cégtől származnak.

A PJ-34 PARP gátlószer az Inotek Pharmaceuticals (Beverly, MA, USA) cégtől származik. A Veliparib PARP gátlószert pedig a Selleckchem (Houston, TX, USA) cégtől rendeltük.

5. MÓDSZEREK

5.1. Sejttenyésztés

A normál humán epidermális kerationcitákat (NHEK) a CELLnTEC (Bern, Svájc) cégtől vásároltuk. A sejteket a cégtől beszerzett epidermális keratinociták tenyésztéséhez kifejlesztett tápfolyadékban tartottuk, melyet 100 U/ml penicillinnel és 100 µg/ml sztreptomocinnal egészítettünk ki. A sejteket az előírásnak megfelelően a második és a negyedik passzálás között használtuk fel kísérletek elvégzésére.

A HaCaT immortalizált keratinocita sejtvonalat a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) cégtől szereztük be. A sejteket alacsony glükóz tartalmú (1000 mg/l) DMEM tápfolyadékban tartottuk, melyet 10% FBS-sel (főtális borjúsérum), 2 mM L-glutaminnal, 100 U/ml penicillinnel és 100 µg/ml sztreptomocinnal egészítettünk ki.

A humán laphámsejtes bőr karcinóma sejteket (A431) a Sigma-Aldrich cégtől (St. Louis, MO, USA) vásároltuk, és a leírásnak megfelelően magas glükóz tartalmú (4500 mg/l) DMEM tápfolyadékban tenyésztettük, amelyet 10% FBS-sel, 2 mM L-glutaminnal, 100 U/ml penicillinnel és 100 µg/ml sztreptomocinnal egészítettünk ki.

A primer sejteket illetve a két sejtvonalat a tenyésztés során 37 °C-on, 5% CO₂ tartalom mellett tartottuk sejtenyésztő inkubátorban. A passzálás során mind a három esetben tripszin-EDTA oldatot alkalmaztunk.

5.2. A sejtek kezelése és az UV sugárzás alkalmazása

A sejteket a szélesztést követően, másnap használtuk fel. A sejtproliferációs vizsgálat kivételével, minden esetben közel konfluens sejt kultúrával dolgoztunk, minden sejtvonal illetve az NHEK esetében is. A kísérletek 96-24-6 lyukú tenyésztőedényben történtek.

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 3-AB esetében 3 mM-os végkoncentrációban. Az előkezelés és a sugárzás az NHEK sejtek esetében annak médiumában, HaCaT sejtek esetében pedig fenolvörös indikátor - mentes DMEM -ben történt.

Az A431 sejteknél a PJ-34 (törzsoldat: 10 mM vízben oldva) és a Veliparib (törzsoldat: 50 µM DMSO-ban oldva) PARP gátlószerek végkoncentrációja egyaránt 10 µM volt, melyet 50 perccel az UVA sugárzást megelőzően adtunk a sejtekhez, hasonlóan a 8-MOP (törzsoldat:

100 mM kloroformban oldva) fényérzékenyítő szerhez, melynek végkoncentrációja 800 nM volt. Az antioxidánsokat (aszcorbinsav 500 μ M, trolox 200 μ M) az előkezelésekkel együtt, az adott ábrán jelölt kombinációban, a különböző specifitású kaspáz gátlószereket (z-VAD-fmk, z-DEVD-fmk, z-IETD-fmk 50-50 μ M) pedig az UVA sugárzás után, sejttenyésztő médiumban adtuk a sejtekhez.

Az előkezelés és a sugárzás is PBS pufferben (8g NaCl, 1,4 g Na_2HPO_4 , 0,2 g KH_2PO_4 , 0,2 g KCl /1 l, pH 7,4) történt. Az UVA és UVB besugárzást számítógéppel vezérelt *Bio-Sun* UV besugárzó készülékkel (Wilber Lourmat, Marne-la-Vallée, Franciaország) végeztük. A készülék hullámhossza nem állítható, az UVB esetén 312 az UVA 365 nm hullámhosszon sugároz. A hőmérséklet állandó (körülbelül 37° C). A használni kívánt dózist (J/cm^2) a készülék beállításával lehet megadni. Az alkalmazott UVB vagy UVA dózisok az eredmények fejezetben, illetve az ábra leírásoknál minden esetben jelölve vannak.

A sejteket a tenyésztő edényben, annak teteje nélkül sugaraztuk. A folyadékréteg vastagsága hozzávetőlegesen megegyezett minden kísérletben (7-9 mm). A sötét kontrollok olyan területek voltak a tenyésztő edényen melyet gondosan letakartunk a sugárzás ideje alatt.

5.3. Szferoid kultúra létrehozása

A 96 lyukú sejttenyésztő edényt a kísérletet megelőzően 0,5 % agar-agar oldattal kezeltük. Az A431 sejtekből egy 1×10^4 sejt/ml denzitású szuszpenziót készítettünk, melyből 50-50 μ l térfogatot tettünk egy-egy lyukba. A stabil szferoid képződése az agar-agar felszínén 48 óra alatt játszódott le. A szferoidokat ezt követően a fent leírtak szerint kezeltük és sugaraztuk be. 16 órás inkubációt követően a szferoidok állapotáról fotókat készítettünk Leica DM IL LED mikroszkóp rendszer segítségével. A szferoidok átmérőjét Image J szoftver segítségével határoztuk meg.

5.4. 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 sejttenyésztő 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, mely során a tenyésztő edényeket termosztátban tartottuk. Az MTT oldatot tartalmazó médium eltávolítása után az élő sejtek mitokondriumában átalakult formazán kristályok kioldásához

100 µl DMSO-t használtunk. Az így keletkező homogén oldat abszorbanciáját 590 nm-en mértük le Multiskan MS Plate olvasóval (Labsystems, Vantaa, Finnország) segítségével. Az életképességet minden esetben a kezeletlen kontrollhoz viszonyított százalékban adtuk meg.

5.5. **Reaktív oxigén gyökök detektálása**

A reaktív oxigén gyökök detektálása az A431 sejtek esetében UVA sugárzást követően H2DCFDA festék segítségével történt 96 lyukú tenyésztő edényben. A H2DCFDA olyan sejtmembrán-permeabilis festék, mely intracelluláris észterázok által hasítódik, illetve reaktív oxigén gyökök valamint hidrogén-peroxid által oxidálódik, melynek hatására fluoreszcens jelet bocsát ki, mely arányos a sejten belüli reaktív oxigén gyökök mennyiségével.

A H2DCFDA 10 µM végkoncentrációban került hozzáadásra az A431 sejteket borító PBS-be az előkezelésekkel (10 µM PJ34, 10 µM Veliparib) és a negatív kontrollként alkalmazott aszkorbinsavval (500 µM) és troloxszal (200 µM) együtt az adott ábrán jelölt kombinációban. A detektálás közvetlenül az UVA sugárzás után történt, Fluoroskan Ascent FL plate olvasó (Thermo Scientific, Vantaa, Finnország) segítségével 580_{Ex}/590_{Em} nm hullámhosszon. Az eredményeket AFU (*arbitrary fluorescence unit*) egységekben adtuk meg.

5.6. **Hidrogén-peroxid (H₂O₂) detektálása**

Az UVB sugárzás hatására intracellulárisan termelődő hidrogén-peroxidot Amplex Red festék segítségével detektáltuk az NHEK sejtek esetében. A mérés alapjául az Amplex Red reakciója szolgál a hidrogén-peroxiddal tormaperoxidáz enzim jelenlétében, mely során reakció termékként rezorufin keletkezik, melynek fluoreszcenciája mérhető. Az NHEK sejteket 96 lyukú tenyésztőedényben 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 plate olvasó segítségével határoztuk meg 530_{Ex}/590_{Em} nm hullámhosszon. Az eredményeket AFU egységekben adtuk meg.

5.7. **Géncsendesítés**

Specifikus szekvenciával rendelkező siRNS általi géncsendesítést a HaCaT és az A431 sejtvonalak esetében végeztünk. A csendesítés során alkalmazott transzfekciós reagens (DharmaFECT 2 transzfekciós 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 transzfekció kivitelezésének protokollja azonban eltért egymástól.

A HaCaT sejteket a transzfekciót megelőző napon 24 lyukú (2×10^4 sejt/lyuk) illetve 96 lyukú (5000 sejt/lyuk) sejttenyésztő edénybe raktuk antibiotikumot nem tartalmazó tápfolyadékban. Másnap hozzáadtuk a sejtekhez transzfekciós 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 transzfekciós reagenst 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, melynek során a tripszin-EDTA oldattal kezelt sejteket centrifugálást (1500 RPM 3 perc) követően összegyűjtöttük antibiotikum- és FBS- mentes tápfolyadékban. A transzfekciós reagens és a kontroll siRNS illetve a transzfekciós reagens és a PARP-1 siRNS keverékét fél órán át inkubáltuk a sejtekkel, majd kiegészítettük a médiumot 10 % FBS-sel, és 24 lyukú (2×10^4 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 transzfekciót követő 48. órában kezeltük a sejteket adott hullámhosszúságú UV sugárzással és kezeléstől függően inkubáltuk őket további az UVB sugárzás esetében 24, az UVA sugárzást követően 16 órán át. A Western blot analízishez a mintavétel abban az időpontban történt, amikor az adott kísérlet véget ért.

5.8. Western blot analízis

A HaCaT és az A431 sejtek esetében az siRNS általi csendesítés sikerességét Western blot módszerrel ellenőriztük, melynek során mind a PARP-1 fehérje mennyiségének csökkenését detektáltuk, mind a hidrogén-peroxid kezelés (1 mM 5 perc illetve 7 perc) által kiváltott PAR akkumuláció csökkenését igazoltuk a csendesített sejtekben, PARP-1 enzimre illetve PAR polimerre specifikus antitest segítségével. Az A431 sejtek esetében a hasított – PARP-1 és a H2AX fehérje foszforilációjának kimutatása szintén Western blot módszerrel történt.

A sejteket 24 lyukú tenyésztő edényben növesztettük. A transzfekció illetve a kezelések után egyszer mostuk a sejteket hideg PBS pufferrel, majd 100 µl hideg lízis pufferben [62.5 mM Tris-HCl (pH 6,8), 2% SDS, 10% glicerol, 1 mM PMSF, proteáz inhibitorok] kapartuk

fel őket. Szonikálást, centrifugálást és BCA reagenssel történő fehérjemérést követően 2-mertkaptoetanolt (50 µl/ml) adtunk a lizátumokhoz és 10 percig forraltuk őket 95° C -on. Minden mintából 35 µg fehérjét vittünk fel 8% illetve 12% SDS-poliakrilamid gélre. Elektroforézist követően a gélben lévő mintákat nitrocellulóz membránra transzferáltuk [transzfer puffer: 25 mM Tris/HCl (pH 8,3), 192 mM glicin, 0,02% (m/v) SDS és 20% (v/v) metanol] 100V feszültségen 90 percig. A membrán aspecifikus kötőhelyeit 5% zsírszegény tejpor oldattal vagy 5% BSA oldattal blokkoltuk az első antitestet gyártó cég szerinti leírásától függően, melyet 0,01% Tween 20 tartalmú PBS-ben (PBSTw) vagy TBS-ben (TBSTw) oldottunk. PBSTw vagy TBSTw oldattal történő mosást követően a membránt primer ellenanyaggal inkubáltuk egy éjszakán át 4°C -on. Az ellenanyagot 1% tejport tartalmazó PBSTw-ben vagy 5% BSA tartalmú TBSTw-ben oldottuk, 1:500 hígításban a PAR antitest esetében, 1:2000 a többi – a Cellsignaling Technology cégtől származó - antitest esetében. Három PBSTw illetve TBSTw -nel történő mosást követően a membránt 1 óráig inkubáltuk a torna-peroxidázzal jelölt második antitesttel (anti-egér IgG, 1:5000 hígításban, 1% tejpor tartalmú PBSTw-ben oldva; anti-nyúl IgG 1:5000 hígításban 1% BSA tartalmú TBSTw-ben oldva). Végül PBSTw vagy TBSTw majd PBS vagy TBS pufferrel mostuk a membránt legalább háromszor, hogy eltávolítsuk a nem kötődött ellenanyagot. A Western blot kísérletekben vagy a foszforilálatlan fehérje vagy a β-aktin szolgált belső kontrollként. A β-aktin kimutatása során a fent leírtak szerint jártunk el, azzal a különbséggel, hogy primer antitesttel (1:5000 hígításban 1% tejpor tartalmú PBSTw-ben oldva) való inkubálási idő csak 2 óra volt szobahőmérsékleten.

Supersignal West- Pico kemilumineszcens szubsztrát hozzáadása után a kemilumineszcens jelet FluorChem FC2 Imager készülék segítségével detektáltuk. A kapott jeleket Image J szoftver használatával denzitometráltuk illetve kvantáltuk.

5.9. Comet assay

Az egyszeres DNS törés kimutatása alkalikus comet assay segítségével történt. A módszer alapja az, hogy a törést szenvedett DNS szál a törés mentén elektromos erőterben elmozdul az ép DNS – hez képest, és az elektroforézist követően jellegzetes üstökös struktúrát mutat. Maratott felszínű tárgylemezre 1% normál olvadáspontú agarózt rétegeztünk. Az előkezelést és az UVA sugárzást követően a sejteket *mincing solution* – ben [HBSS W/O Ca, Mg; 200 mM EDTA; 10% (v/v) DMSO] kapartuk fel, majd ezt követően a sejteket 0,5 % alacsony olvadáspontú agarózba kevertük és a tárgylemezre rétegeztük (körülbelül 10⁵

sejt/lemez). A gél megszilárdulása után lízis következett 1 órán át 4 °C-on [lízis puffer: 2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 10% (v/v) DMSO, 1% Triton X-100 (v/v), pH 10,0]. Az elektroforézist alkalikus oldatban (300 mM NaOH, 1 mM EDTA) végeztük 25 percig 380 mA áramerősséggel. Ezt követően a tárgylemezeket 10 percig ekvilibráltuk 0,4 M Tris pufferben (pH 7,4), majd a sejtmagokat 10 µg/ml TO-PRO-val festettük. Leica TCS SP8 konfokális mikroszkóp és kamera segítségével készítettünk felvételeket a mintákról, majd a kvantitatív kiértékelést CometScore szoftver segítségével végeztük el.

5.10. Kaszpáz- enzim aktivitás mérése

Az A431 sejteket a kísérletet megelőző napon 24 lyukú sejtenyészítő 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 lízis puffert (10 mM HEPES, 0,1% CHAPS, 5 mM DTT, 2 mM EDTA, 1 mM proteáz-inhibítor koktél, 1 mM PMSF, pH 7,25) adtunk a sejtekhez és 10 percre jégen hagytuk őket.

A lizátumot 1:1 arányban kevertük össze a reakció pufferrel, amely a kaszpáz -3 (100 mM HEPES, 10 % szaharóz, 5 mM DTT, 0,1% CHAPS pH 7,25) és a kaszpáz-8 (75 mM Na⁺ MOPS, 10 % glicerol, 1 mM DTT, 0,25 mM EDTA pH 7,5) aktivitás mérés esetében különböző volt. A reakció puffer mind a két esetben tartalmazta az AMC-vel konjugált szubsztrátot (100 µM), melynek lehasadásából eredő fluoreszcens jel arányos az adott kaszpáz aktivitásával. 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 1:1 arányú keverékét 1 órán át inkubáltuk 37°C-on, a fluoreszcenciát pedig Fluoroskan Ascent FL plate olvasó segítségével határoztuk meg 355_{Ex}/460_{Em} nm hullámhosszon. Az eredményeket AFU egységekben adtuk meg.

5.11. A DNS fragmentáció kimutatása

Az internukleoszómális DNS fragmentációt az Eastman és munkacsoportja által leírt módszerrel mutattuk ki agaróz gélelektroforézissel [226]. Két százalékos agaróz gélét készítettünk, melyről megszilárdulás után a fésűk feletti részt eltávolítottuk. Az eltávolított rész helyére egy 1% -os agaróz gél került, melyet kiegészítettünk 2 % SDS-sel és 64 µg/ml proteináz K-val. Az előkezelés, a sugárzás illetve az inkubációs idők lejártával az A431 sejteket (2*10⁵ db) 20 µl DNS mintapufferben (5 % v/v glicerol, 10 mM Tris, pH 8,0, 0,05

% brómfenolkék, 5 mg/ml RNáz A) vettük fel, melyből 15 µl mennyiséget vittünk fel a gélre. Az elektroforézis 35 V feszültség mellett 10 órán át folyt, majd a gél 2 µg/ml etídium-bromiddal festettük meg (20 min). A felesleges festék eltávolítása három lépésből álló desztillált vízzel való mosással történt. A sávokat FluorChem FC2 Imager készülék segítségével detektáltuk. A kapott jelet Image J szoftver segítségével denzitometráltuk.

5.12. Laktát-dehidrogenáz enzim felszabadulásának mérése

Az UVB és az UVA sugárzás hatására bekövetkező LDH felszabadulást az NHEK sejtek esetében a VWR cégtől vásárolt kit segítségével mértük. A mérés alapja az, hogy a nekrotikus sejthalál következtében sérült sejtmembránon keresztül felszabaduló és a sejtek felülúszójában megtalálható laktát-dehidrogenáz enzim reakcióján keresztül a tetrazólium só formazánná alakul mely piros színű és ennek intenzitása arányos a felülúszóban található LDH mennyiségével. Az előkezeléseket és a sugárzást követően az MTT sejtéletképességi vizsgálatokkal párhuzamosan a sejtek felülúszójából 50 -50 µl mennyiséget kevertünk össze a kit leírásának megfelelően előállított reagenssel, melynek abszorbanciáját 20 perc elteltével mértük 490 nm hullámhosszon Multiskan MS Plate olvasó segítségével. Az adatok kiértékelése a kit leírásában javasolt módon történt.

5.13. Sejtproliferációs vizsgálat

A sejtek proliferációs képességének mérését a már korábban leírt kolónia képző affinitás mérésére szolgáló módszer (Erdélyi et al., 2009) módosított változatával végeztük. Az NHEK sejteket 2500 sejt/lyuk sejtszámban tettük ki 6 lyukú sejtenyésző edényben. Másnap a fent leírtak szerint elvégeztük az előkezeléseket (PJ-34 10 µM, 3-AB 3 mM) és az UVB sugárzást (0,0125 – 0,05 J/cm²). 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, Germany) 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.

5.14. 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. A hasított PARP-1 enzim kimutatását a következő lépések szerint végeztük. Az NHEK sejteket 24 lyukú tenyésztő edényben növesztettük fedőlemezen. A különböző dózisu UVB sugárzást követően, PBS-sel történő mosás után a sejteket jéghideg metanollal fixáltuk -20°C-on 10 percig. Az endogén peroxidáz enzimek blokkolása céljából 15 percig inkubáltuk a sejteket 5 % (v/v) metanolban hígított hidrogén-peroxiddal. PBS pufferrel történő mosás után a sejteket 1 % BSA oldattal (PBS-TritonX-100-ban oldva) blokkoltuk 1 órán át szobahőmérsékleten, majd 2 órán át a blokkoló oldatban hígított primer ellenanyaggal inkubáltuk. A hasított PARP-1 ellenanyagot 1:100 hígításban alkalmaztuk. PBS pufferrel történő, háromszor 5 perces mosást követően peroxidázzal konjugált nyúl másodlagos ellenanyagot tartalmazó reagenst (REAL Envision Detection System Dako Glostrup, Dánia) adtunk a sejtekhez mellyel 30 percig inkubáltuk a sejteket szobahőmérsékleten. A peroxidáz reakció végbemeneteléhez az inkubálási idő lejártá után, a kit részét képező DAB szubsztrátot hozzáadtuk a sejtekhez, mely által a pozitív reakció 5 percen belül láthatóvá vált. A fedőlemezek Mowiolal történő fedése után a képeket Zeiss Axiolab mikroszkóp (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) illetve Zeiss AxioCam digitális kamera segítségével készítettük.

Az A431 sejtek esetében a PAR polimer detektálást hidrogén –peroxid kezelést (1mM 7perc) követően hasonló protokoll szerint végeztük, azzal a különbséggel, hogy a peroxidázzal-konjugált második antitest helyett fluoreszcens detektálást alkalmaztunk. Az anti-PAR primer ellenanyagot és a szekunder ellenanyagot (anti-egér IgG - Alexa Fluor 488 konjugátum) is 1:400 hígításban használtuk 1% BSA tartalmú PBS-TritonX-100-ban illetve PBS pufferben oldva, a sejtmag festésére alkalmas TO-PRO festéket pedig 1:1000 hígításban alkalmaztuk a szekunder ellenanyaggal egy időben. A második antitest esetében az inkubálási idő 45 perc volt szobahőmérsékleten. A mosási lépéseket követően a fedőlemezeket Mowiol-dabco segítségével fedtük, melynek megkötése után a képeket Leica TCS SP8 konfokális mikroszkóp és kamera segítségével készítettük.

5.15. May-Grünwald-Gielmsa 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 4% formaldehiddel fixáltuk szobahőmérsékleten 15 percig. A fixálást követően a sejteket desztillált vízzel mostuk három alkalommal, 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

5.16. Mitokondriális membrán potenciál mérése

Az NHEK sejteket fekete 96 lyukú, sejttenyésztésre alkalmas tenyésztő edényben növesztettük 2×10^6 /ml sejtszámban. Az UVB sugárzás után 24 órával a sejtekhez TMRE festéket adtunk 100 nM végkoncentrációban, mely lépést 20 perc 37°C-on történő inkubálás követett sejttenyésztő termosztátban. 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 segítségével 530_{Ex}/590_{Em} nm hullámhosszon. Az eredményeket AFU egységekben adtuk meg.

5.17. PARP aktivitásmérés

A PARP aktivitás mérése a $^3\text{H-NAD}^+$ beépülésének meghatározásán alapul a TCA-val kicsapható fehérjefrakcióban. Az A431 sejteket 5 percig kezeltük 1 mM töménységű hidrogén-peroxiddal, majd a tenyésztő médiumot aktivitásmérő pufferre cseréltük (56 mM HEPES, pH 7,5, 28 mM KCl, 28 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 0,01% digitonin, 0,125 uM NAD⁺ és 0,5 µCi/ml 3H-NAD⁺) 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 (1000 RPM 10 perc) a keletkező csapadékot kétszer mostuk 5%-os TCA-val, majd 37°C –on történő szolubilizálás következett 2% SDS/0,1 N NaOH oldatban egy éjszakán át. A csövek tartalmát 6,5 ml Scintisafe Plus szcintillációs folyadékhoz mértük (Fisher Scientific, Pittsburg, PA, USA) és a radioaktivitást Wallac márkájú (Gaithersburg, MD, USA) folyadékszcintillációs számlálóval mértük meg.

5.18. NMR spektroszkópia

Az NMR vagyis a mágneses magrezonancia spektroszkópia (*Nuclear Magnetic Resonance*) olyan vizsgálati módszer, melynek segítségével az adott anyag kémiai

szerkezetéről kaphatunk információt, annak károsítása nélkül csupán a fizikai tulajdonságai alapján. A mérés kivitelezéséhez a PJ-34 gátlószert 2 mg/ml -es koncentrációban deuterált oldószerben oldottuk fel (DMSO-d6). A mérést Bruker AVANCE II (500,13 MHz) spektrométeren 298 K hőmérsékleten végeztük el. A mérés elvégzéséért köszönet illeti Dr. Kövér Katalint a Debreceni Egyetem Szerves és Analitikai Kémiai Tanszékének munkatársát.

5.19. Statisztikai analízis

Minden egyes kísérletet legalább három alkalommal egymástól független időpontban ismételtünk meg. Az egyes kísérletek során triplikátumban dogoztunk. 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.

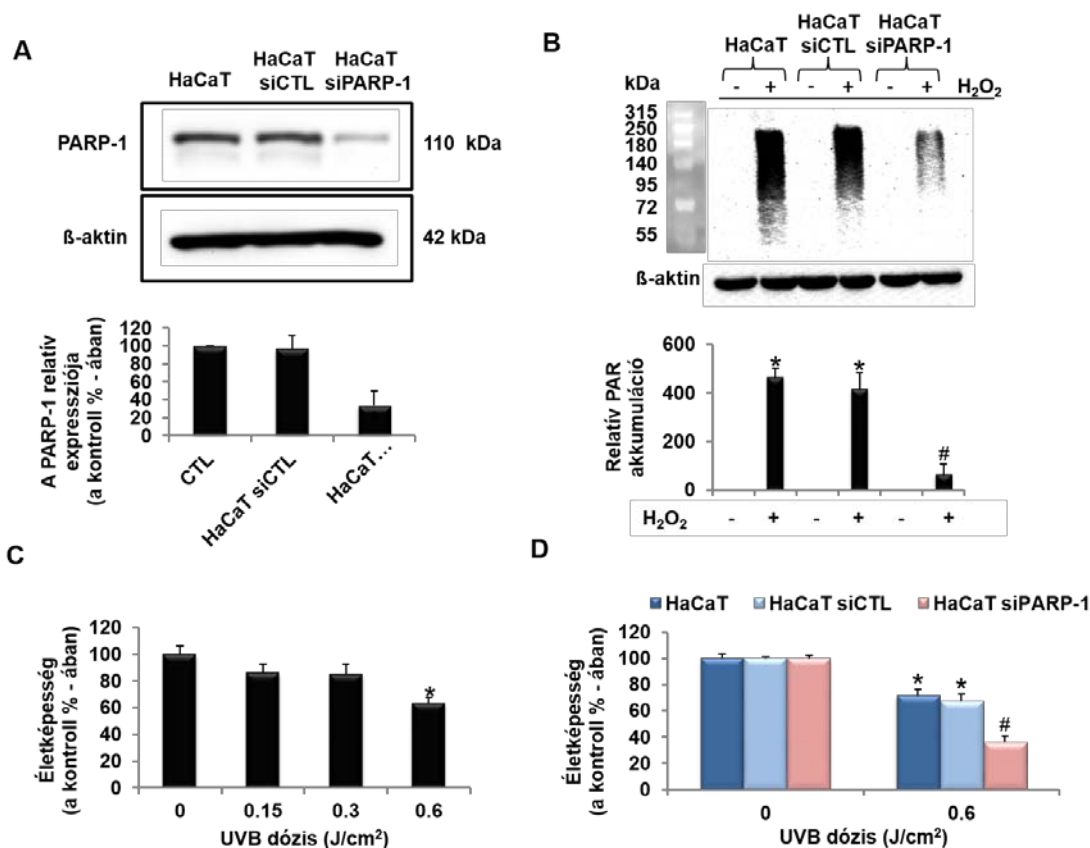
6. EREDMÉNYEK

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

6.1.1. A PARP-1 csendesítése érzékenyítette a HaCaT sejteket az UVB sugárzás okozta sejthalálra

A PARP-1-t siRNS segítségével csendesítettük HaCaT keratinocita sejtvonalban. A csendesítés eredményességét kétféleképpen ellenőriztük: Western blot módszerrel detektáltuk a PARP-1 fehérje expresszióját illetve funkciókiesését (8. ábra A és B panel). Ez utóbbi során a nem transzfektált és a transzfektált sejteket hidrogén-peroxiddal (1 mM, 5 perc) kezeltük, ami PARP-1 aktivációt és ennek következtében PAR polimer felhalmozódást eredményez. A két kísérlet eredménye alapján elmondható, hogy az siRNS általi PARP-1 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 $0,6 \text{ J/cm}^2$ dózisú UVB sugárzás az, amely szignifikánsan csökkenti a sejtek életképességét (8. ábra C panel). A PARP-1 csendesítése az UVB toxikus hatását szignifikánsan növelte (8. ábra D panel).



8. ábra. A PARP-1 csendesítése növelte az UVB sugárzás toxicitását HaCaT sejteken

A csendesítés hatásfokát az alapján találtuk megfelelőnek, hogy a specifikus PARP-1 csendesítésre szolgáló siRNS –sel transzfektált sejtekben a fehérje mennyisége szignifikánsan kevesebb volt, összehasonlítva a kontroll siRNS-sel transzfektált és a kezeletlen sejtekkel (A). A funkciókiesés vizsgálat is hasonló eredményt mutatott, vagyis a PARP-1 csendesített sejtekben jelentősen kevesebb volt a hidrogén-peroxid hatására keletkezett PAR polimer a kontrollokhoz viszonyítva (B). Mind a két esetben egy-egy reprezentatív Western blot kép látható, amelyekhez tartozó denzitometrálnálási ábrák három független kísérlet eredményeit tükrözik (H₂O₂ kezelés hatása *P<0,05; HaCaT siCTL + H₂O₂ kezelés vs. HaCaT siPARP-1 + H₂O₂ kezelés #P<0,05). A citotoxicitás UVB dóziszfüggését a HaCaT sejteken (C) és a PARP-1 csendesítés hatását az UVB sugárzás által előidézett sejthalálra (D) MTT életképesség vizsgálattal határoztuk meg a sugárzást követő 24. órában. A grafikonokon 3 kísérlet átlaga van feltüntetve (± SE; (C) 0 J/cm² vs. 0,6 J/cm² *P<0,05; (D) HaCaT 0 J/cm² vs. HaCaT 0, 6 J/cm², HaCaT siCTL 0 J/cm² vs. HaCaT siCTL 0, 6 J/cm² *P<0,05; HaCaT siCTL 0, 6 J/cm² vs. HaCaT siPARP-1 0, 6 J/cm² #P<0,05)

6.1.2. A PJ-34 és a 3-AB PARP gátlók hatásának az UVB sugárzás által kiváltott sejthalál során

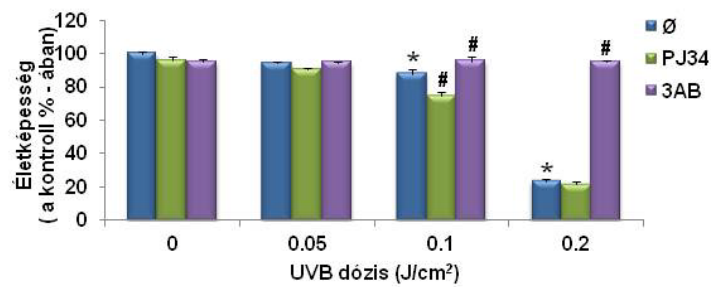
Sejt életképességi vizsgálat segítségével meghatároztuk az UVB sugárzás toxikus dózisát humán primer epidermális keratinocitákon. Erre azért volt szükség, mert valószínűsítettük, hogy a primer sejtek érzékenyebben reagálnak az UVB sugárzásra HaCaT sejtekkel összehasonlítva. A kísérlet eredménye alapján elmondható, hogy az NHEK sejtek életképességét már $0,1 \text{ J/cm}^2$ UVB dózis is szignifikánsan csökkenti szemben a HaCaT sejteknél tapasztalt $0,6 \text{ J/cm}^2$ -es dózissal.

A PARP-1 enzim illetve a PARiláció szerepének tanulmányozása céljából a sejteket 30 percen keresztül PARP gátlószerekkel kezeltük az UVB sugárzást megelőzően. Az általunk alkalmazott két gátlószer a 3-AB (3 mM) és a PJ-34 (10 μM) gátlók voltak. Mind a két szer esetében hatékony PARP gátló koncentrációt alkalmaztunk. Az életképességi vizsgálat eredményéből látható, hogy amíg a PJ-34 kezelés esetében szignifikánsan csökkent az NHEK sejtek életképessége UVB sugárzást követően, addig a 3-AB teljes mértékben védett az UVB okozta toxicitás ellen 24 órával a sugárzást követően (9. ábra A panel).

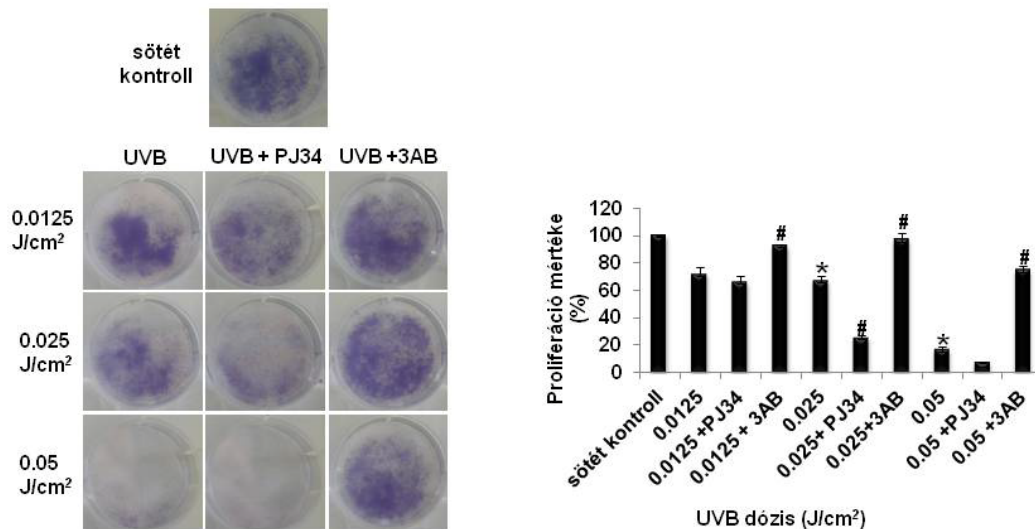
A 3-AB hatása UVB sugárzással szemben nem csak rövid távú (24 óra) védelemben nyilvánult meg, hanem eredményeink alapján az UVB okozta proliferáció csökkenés ellen is védelmet nyújtott. A 10 nappal az UVB sugárzást követően elvégzett proliferációs vizsgálat eredménye alapján a következő állításokat tehetjük: (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 gátlószerekkel kezelt sejtek mind a három UVB dózis esetén a kezeltlen sötét kontroll sejtekhez hasonlatos proliferációs rátát mutattak (9. ábra B panel).

A PJ-34 PARP gátlószer, a siRNS transzfekció általi PARP-1 csendesítéshez hasonlóan, érzékenyíti a sejteket az UVB okozta sejthalálra, valamint az UVB sugárzás által kiváltott proliferáció csökkenést is fokozza. A 3-AB kevésbé specifikus PARP gátlószerek viszont az UVB sugárzással szemben rövid és hosszú távú védő hatása is van NHEK sejtek esetében.

A



B



9. ábra. Két különböző PARP gátlószer ellentétes hatása az UVB sugárzás által kiváltott sejthalál és proliferációs képesség csökkenés során

Az NHEK sejtek egy részét előkezeltük a két PARP gátlószer megfelelő koncentrációjú oldatával, mely a PJ-34 esetében 10 μ M a 3-AB esetében 3 mM volt. Huszonnégyszer órával a különböző nagyságú UVB sugárzást (0,05 – 0,2 J/cm²) követően a sejtek életképességét MTT vizsgálattal határoztuk meg (A). A grafikonon három független időpontban elvégzett kísérlet eredményének az átlaga látható ($\pm$ SE; NHEK 0 J/cm² vs. NHEK 0,1 J/cm² NHEK 0 J/cm² vs. NHEK 0,2 J/cm² *P<0,05; NHEK vs. NHEK + PJ-34 vagy 3-AB #P<0,05). Az NHEK sejtek proliferációs kapacitását az úgynevezett klonogén assay módosított változatával vizsgáltuk (B). Az előkezelést és az alacsony dózisú UVB sugárzást (0,0125 – 0,05 J/cm²) követően a sejteket 10 napon át inkubáltuk sejtenyészítő termosztátban. Az inkubációs idő lejártá után a párhuzamosok egy részét hematoxilinnel festettük meg a fotók elkészítéséhez, a másik részét pedig MTT sejtelétképességi vizsgálatnak vetettük alá az eredmények kvantifikálása végett. A kísérleteket három független időpontban megismételtük, az ábrán ezek átlaga látható az MTT assay esetében ($\pm$ SE; sötét kontroll

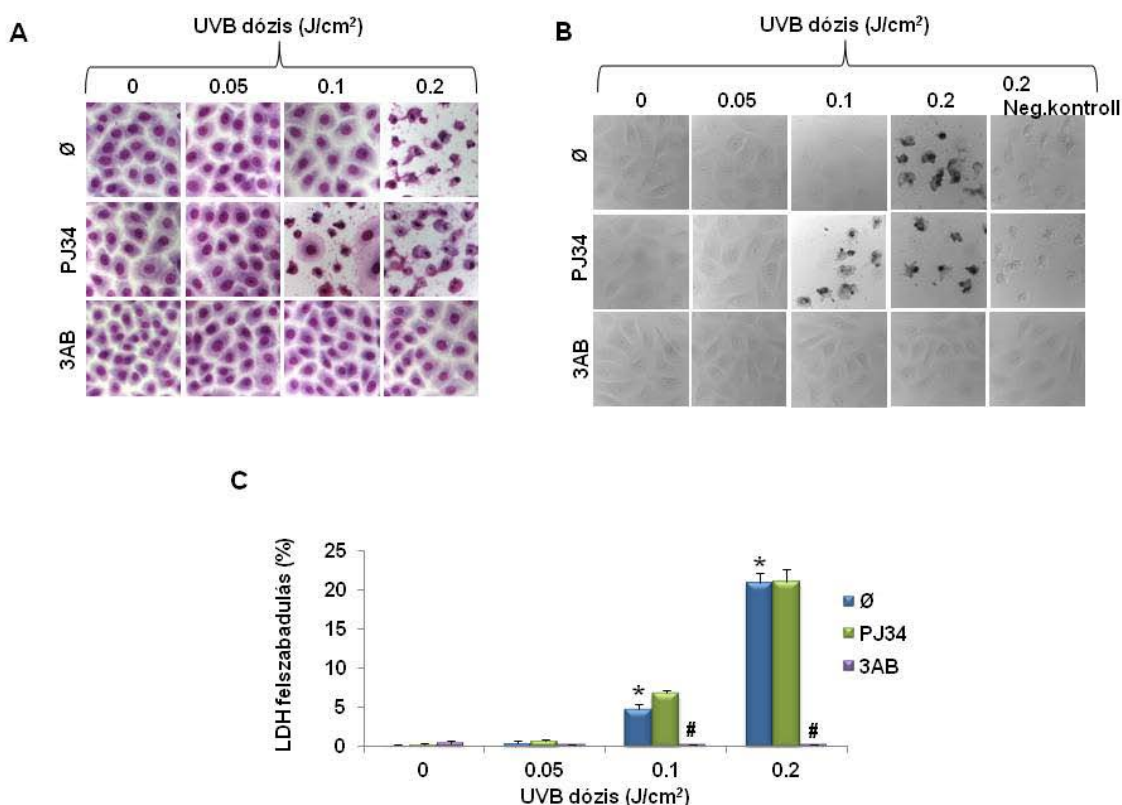
vs. $0,025 \text{ J/cm}^2$ vagy $0,05 \text{ J/cm}^2$ * $P < 0,05$; UVB dózisok ($0,0125 - 0,05 \text{ J/cm}^2$) vs. PJ-34 vagy 3-AB kezelés [#] $P < 0,05$).

6.1.3. A 3-AB védi a normál humán epidermális keratinocitákat 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, mely a sejtek változatlan morfológiájában nyilvánult meg a kontroll sejtekhez viszonyítva (10. ábra A panel).

Apoptózis markerként immunfestés segítségével detektáltuk a hasított PARP-1 mennyiségét. Az eredmények azt mutatták, hogy a csak UVB sugárzást kapott keratinocitákhoz ($0,2 \text{ J/cm}^2$) képest a PJ-34 gátlószerezrel 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 a keresett fehérje (10. ábra B panel).

Nekrózis markerként LDH enzim felszabadulást mértünk, ahol azt az eredményt kaptuk, hogy a PJ-34 szignifikánsan nem fokozta ennek a markernek a mennyiségét UVB sugárzással egyidejűleg alkalmazva, a csak besugarazott sejtekhez képest, ugyanakkor a 3-AB kezelés estében a LDH felszabadulás a sugárzást követően nagyon alacsony mértékű volt. A kapott eredmények jól tükrözik a 3-AB-nek a sejttéletképesség mérésnél kimutatott védő hatását a sugárzást követően (10. ábra C panel).

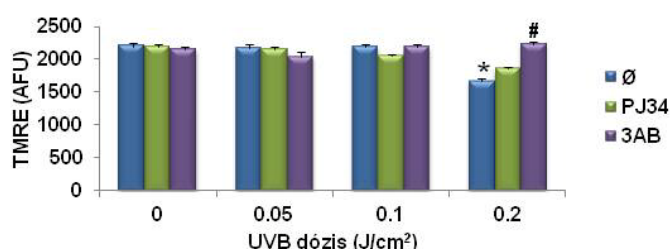


10. ábra. A 3-AB mind, az apoptózis, mind a nekrosis ellen véd az UVB sugárzás által kiváltott sejthalál során

Az NHEK sejtek morfológiai változását May-Grünwald-Giemsa festéssel vizualizáltuk a PARP gátlószerekkel (10 µM PJ-34, 3 mM 3-AB) történő előkezelés, illetve 24 órával az UVB sugárzást (0,05 – 0,2 J/cm²) követően (A). Az apoptotikus sejthalál markereként szolgáló hasított PARP-1 enzimet immunfestés segítségével mutattuk ki a PARP gátlókkal történő előkezelések és 24 órával a különböző dózisokkal történő UVB sugárzást (0,05 – 0,2 J/cm²) követően (B). A képek az A és B panel esetében reprezentatív jellegűek, ugyanakkor a kísérleteket három egymástól független időpontban megismételtük. A nekrotikus sejthalált jelző LDH enzim felszabadulást a sejtek felülszójából mutattuk ki 24 órával az előkezelések és az UVB sugárzás (0,05 – 0,2 J/cm²) után (C). A grafikon három független kísérlet eredményének az átlagát mutatja (± SE; NHEK 0 J/cm² vs. NHEK 0,1 J/cm² vagy 0,2 J/cm² *P<0,05; UVB dózisok (0,1– 0,2 J/cm²) vs. 3-AB kezelés #P<0,05).

6.1.4. A 3-AB premitokondriálisan fejti ki az UVB sugárzással szembeni védő hatását

Az UVB sugárzás az általunk alkalmazott legmagasabb dózis (0,2 J/cm²) esetében mitokondriális membrán depolarizációt okozott, melyet egy TMRE nevű membrán potenciál változás mérésére szolgáló fluoreszcens festékkel mutattunk ki. A mérést 24 órával a különböző dózisokkal (0,05 – 0,2 J/cm²) történő UVB sugárzás után végeztük el. A PJ-34 gátlószerrel történő kezelés nem befolyásolta szignifikánsan az UVB sugárzás indukálta depolarizációt. A 3-AB előkezelés esetében a mitokondriális membrán nem mutatott depolarizációt, vagyis a 3-AB védett az UVB sugárzás által kiváltott mitokondriális diszfunkció ellen (11. ábra).

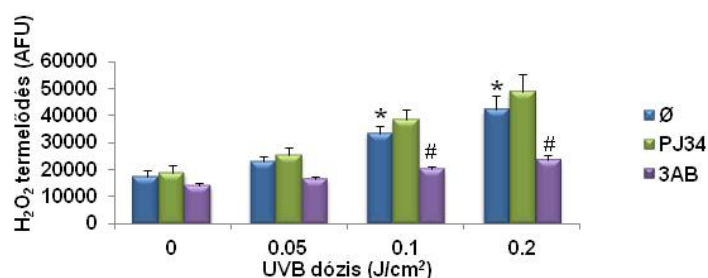


11. ábra. A 3-AB gátolta az UVB sugárzás által kiváltott mitokondriális depolarizációt

Az NHEK sejtekben esetlegesen létrejövő a mitokondriális membrán potenciálváltozást PARP gátlókkal (10 µM PJ-34, 3 mM 3-AB) történő előkezelés és UVB sugárzást (0,05 – 0,2 J/cm²) követően TMRE fluoreszcens festék segítségével mutattuk ki. A TMRE festéket a sugárzás után 24 óráig inkubált sejtekhez adtuk, majd mértük a fluoreszcens jelet. A mérést három független időpontban megismételtük, ezek átlagai láthatók a grafikonon ($\pm$ SE; NHEK 0 J/cm² vs. NHEK 0,2 J/cm² *P<0,05; NHEK 0,2 J/cm² vs. NHEK 0,2 J/cm² + 3-AB #P<0,05).

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

Az UVB sugárzás, ahogyan azt közvetlenül a sugárzás után Amplex Red festék segítségével kimutattuk, szignifikáns mértékű hidrogén-peroxid képződést eredményezett. A 3-AB gátlószerrel történő kezelés esetében a hidrogén-peroxid 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 (12. ábra).



12. ábra. Az UVB sugárzás dózisfüggő hidrogén-peroxid termelődést okozott NHEK sejtekben, melyet a 3-AB kezelés szignifikánsan csökkentett

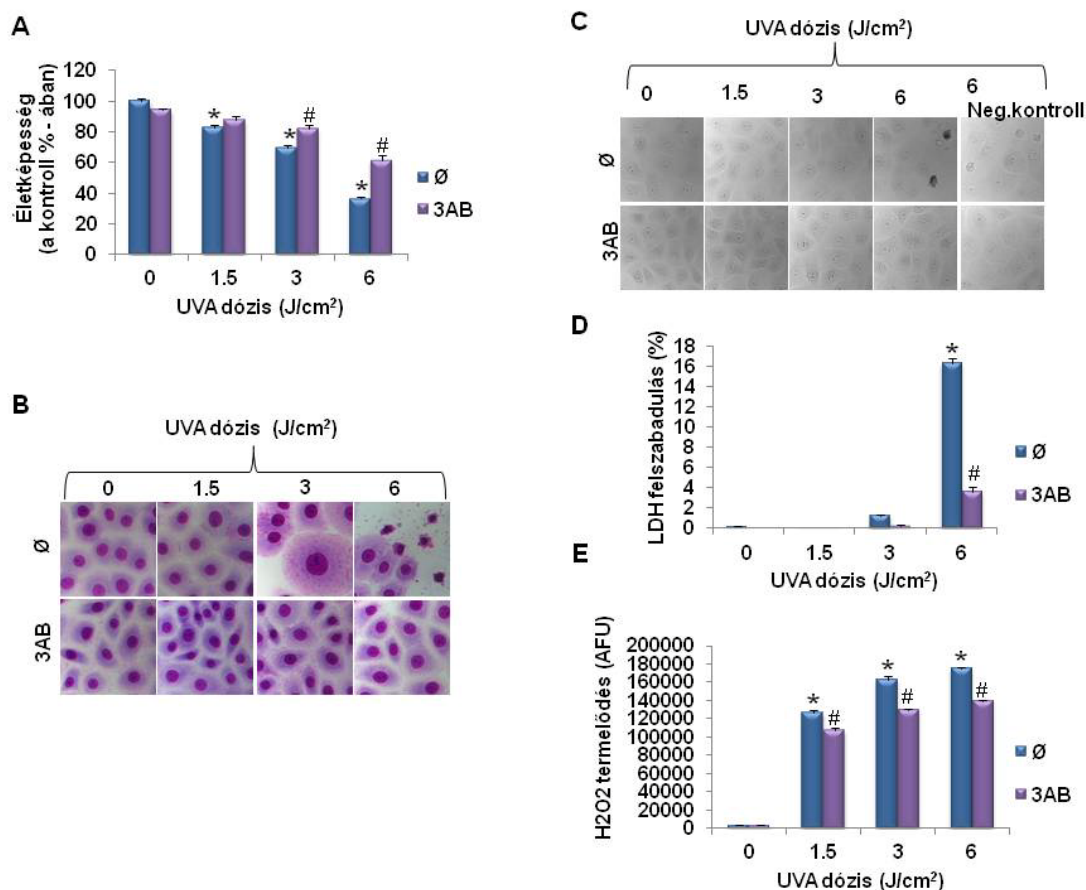
Az NHEK sejteket előkezeltük a PARP gátlószerekkel (10 μ M PJ-34, 3mM 3-AB), majd növekvő dózisú UVB sugárzással (0,05 – 0,2 J/cm²) sugarasztuk őket. Az irradiáció végén a sejtekhez Amplex Red festéket adtunk, mely a hidrogén –peroxid specifikus kimutatására képes. 30 perc inkubálást követően mértük a fluoreszcens jelet, mely arányos a sejten belül keletkező hidrogén-peroxid mennyiségével. A grafikon három függetlenül elvégzett kísérlet átlagát mutatja ($\pm$ SE; NHEK 0 J/cm² vs. NHEK 0,1 J/cm² 0,2 J/cm² *P<0,05; UVB dózisok (0,1– 0,2 J/cm²) vs. 3-AB kezelés #P<0,05).

6.1.6. A 3-AB védő hatása normál humán epidermális keratinociták esetében UVA sugárzás során is érvényesül

Az UVA sugárzás dózisfüggően kiváltja az NHEK sejtek életképességének csökkenését, mely 24 órával a sugárzás után kimutatható volt életképességi vizsgálat segítségével. A 3-AB védő hatása UVA sugárzást követően is megnyilvánul primer epidermális keratinocitákon végzett kísérletek eredményei alapján. A kísérletek kimutatták, hogy a 3-AB gátlószerekkel kezelt sejtek életképessége szignifikánsan magasabb a csak UVA sugárzással kezelt sejtekhez képest, főleg magasabb UVA dózisok esetében (6 J/cm²). May-Grünwald-Giemsa festéssel is hasonló eredményeket kaptunk, mely szerint, a csak UVA sugárzással kezelt sejtek esetében csak magasabb UVA dózisonál (3 J/cm²), a 3-AB gátlószerekkel kezelt sejtek esetében, egyik dózisonál sem figyelhető meg morfológiai változás (13. ábra A és B panel).

Apoptózis (hasított PARP-1) és nekrosis (LDH-felszabadulás) markerek szignifikáns megjelenését csak a magasabb dózisú UVA sugárzás (6 J/cm²) váltotta ki, ugyanakkor a 3-AB kezelés mind az apoptotikus mind a nekrotikus sejthalált gátolta UVA sugárzást követően az NHEK sejtek esetében (13. ábra C és D panel).

Amplex Red fluoreszcens festék segítségével hidrogén-peroxid termelődést vizsgáltunk az NHEK sejtekben UVA sugárzást követően (13. ábra E panel). A hidrogén-peroxid szint minden általunk alkalmazott UVA dózis esetében szignifikánsan magasabb volt, a sötétben tartott kontroll sejtekhez viszonyítva, ugyanakkor a 3-AB gátlószerezrel történő kezelés nem drasztikusan ugyan de csökkentette az UVA sugárzás hatására termelődő hidrogén-peroxid mennyiségét.



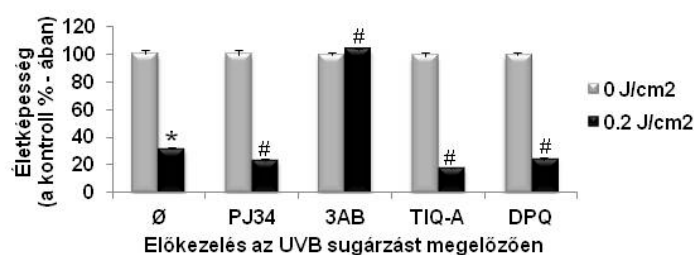
13. ábra. A 3-AB PARP gátlószer hatékonyan csökkenti az UVA sugárzás okozta sejthalált és a hidrogén – peroxid termelődés mértékét

Az NHEK sejtek életképességét MTT sejtéletképességi vizsgálattal határoztuk meg 24 órával a 3-AB gátlószerrel (3mM) történő kezelés és a különböző dózisokkal történő (1,5 – 6 J/cm²) UVA sugárzást követően (A). A sejtek morfológiai változását 24 órával a sugárzás után May-Grünwald – Giemsa festéssel követtük nyomon (B). Apoptózis markerként hasított PARP-1 enzimet (C), nekrozis markerként LDH enzim felszabadulást (D) mértünk szintén 24 órával az kezelés és a sugárzás után. Az UVA sugárzás által kiváltott hidrogén-peroxid termelődést Amplex Red festéssel vizsgáltuk, közvetlenül a sugárzás után (E). A képek a C és B panel esetében reprezentatívak, de a kísérletet legalább három független időpontban elvégeztük. Az A D és E paneleken szereplő grafikonok három egymástól független időpontban elvégzett kísérletek átlagait ábrázolják ($\pm$ SE; NHEK 0 J/cm² vs. NHEK + UVA dózisok (1,5 – 6 J/cm²) *P<0,05; NHEK + UVA dózisok (1,5 – 6 J/cm²) vs. 3-AB kezelés #P<0,05).

6.1.7. A 3-AB védő hatása valószínűleg független a szer PARP gátló hatásától

Mivel a kísérleteink során alkalmazott két PARP gátlószer ellentétesen viselkedett az UVB sugárzás által kiváltott sejthalál során, célszerűnek találtuk két másik PARP gátlószer tesztelését a modellünkben (14. ábra).

Kimutattuk, hogy a TIQ-A (10 μ M) és a DPQ (10 μ M) PARP gátlószer - a PJ-34 – hez és a PARP-1 csendesítéshez hasonlóan - érzékenyítették az NHEK sejteket az UVB okozta sejthalálra. Ezen eredmények alapján elmondható, hogy a 3-AB UVB sugárzással szembeni védő hatása a PARP-1 enzimtől független folyamat eredménye.



14. ábra. A TIQ-A és a DPQ PARP gátlószer a PJ-34 gátlószerhez hasonlóan érzékenyítették az NHEK sejteket az UVB sugárzás által kiváltott sejthalálra

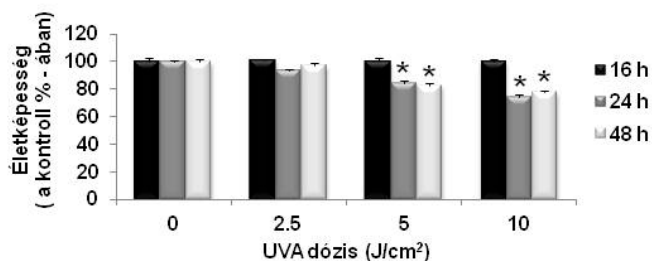
Az NHEK sejteket a sugárzást megelőzően előkezeltük a PARP gátlószerekkel (3-AB 3mM. PJ-34, TIQ-A, DPQ 10 μ M) 30 percen át. Az UVB sugárzás során csak az általunk használt legmagasabb dózist alkalmaztuk, vagyis a 0,2 J/cm²- t. Az életképességet MTT vizsgálattal határoztuk meg 24 órával a sugárzást követően. A grafikon három független kísérlet eredményének az átlagát ábrázolja ($\pm$ SE; NHEK 0 J/cm² vs. NHEK 0,2 J/cm² *P<0,05; NHEK vs. NHEK + PJ-34, 3-AB, TIQ-A, DPQ kezelés #P<0,05).

6.2. A PJ-34 PARilációtól független fotogenotoxikus hatásának jellemzése

6.2.1. Az alacsony dózisú UVA sugárzás nem csökkenti az A431 sejtek életképességét

Az A431 laphámsejtes bőrkarcinóma sejtvonala esetében első lépésként megállapítottuk a nem letális UVA dózist. Ennek céljából sejtleletképességi vizsgálatot végeztünk, ahol különböző dózisokkal sugárztuk a sejteket ($2,5 - 10 \text{ J/cm}^2$) és különböző időken határoztuk meg a sejtek életképességét (16 – 24 – 48 h) (15. ábra).

Az eredmények azt mutatták, hogy a választott dózisok közül csak a $2,5 \text{ J/cm}^2$ UVA dózis nem volt szignifikáns mértékben hatással a sejtek életképességére még 48 órával a besugárzást követően sem. További kísérleteinkben ezt az alacsony UVA dózist ($2,5 \text{ J/cm}^2$) alkalmazzuk a PUVA modellben.



15. ábra. Az alacsony dózisú UVA sugárzásnak nincsen letális hatása az A431 laphámsejtes karcinóma sejtekre

A különböző dózisokkal ($2,5 - 10 \text{ J/cm}^2$) történő UVA sugárzást követően, 16-24-48 óra múlva MTT sejtleletképességi vizsgálattal megállapítottuk az A431 sejtek életképességének változását. A grafikonon három kísérlet átlaga van feltüntetve ($\pm \text{SE}$; A431 0 J/cm^2 vs. A431 + UVA dózisok ($2,5 \text{ J/cm}^2 - 10 \text{ J/cm}^2$))* $P < 0,05$).

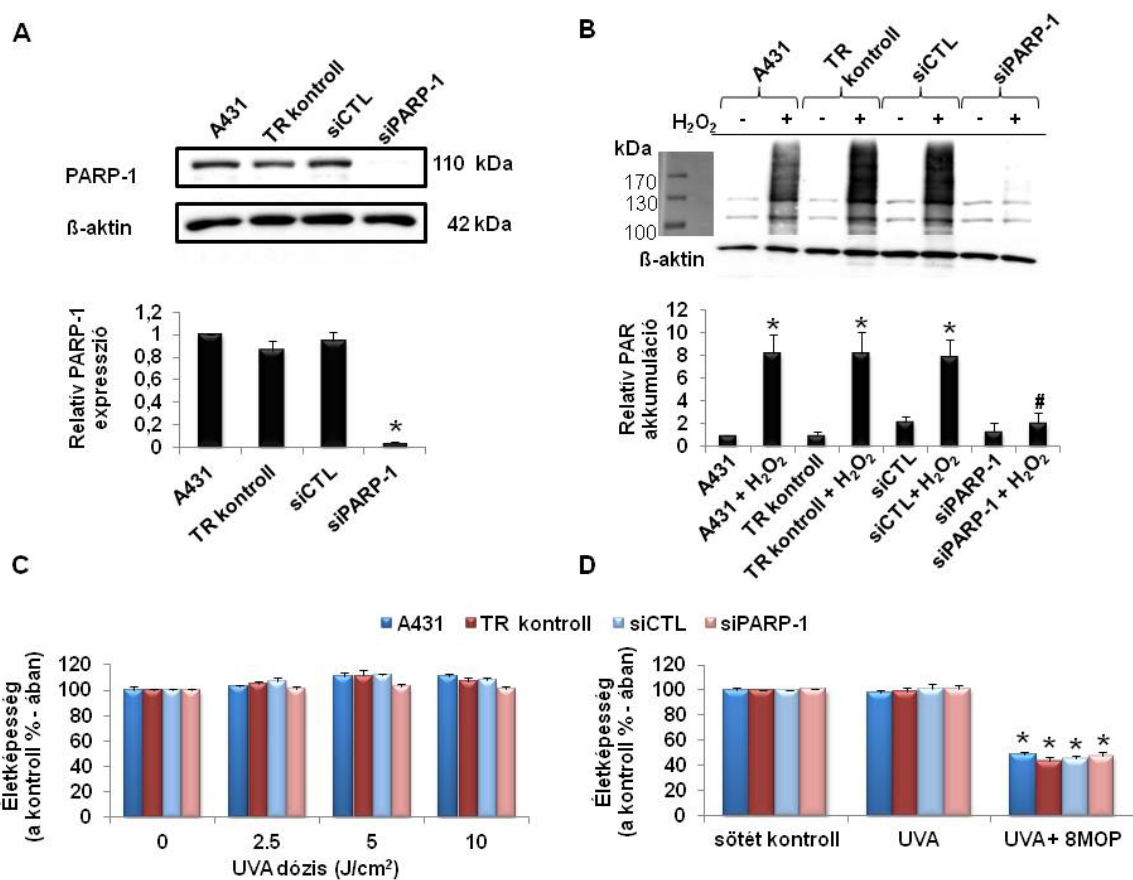
6.2.2. A PARP-1 csendesítés nem érzékenyítő hatású sem az UVA sugárzás sem a PUVA modell alkalmazása során

Specifikus szekvenciájú siRNS általi transzfekció segítségével gátoltuk a PARP -1 kifejeződését az A431 sejtekben. A csendesítés sikerességét kétféle módon erősítettük meg, egyrészt Western blot módszerrel ellenőriztük a fehérje mennyiségét, másrészt úgynevezett funkciókiesés vizsgálatot végeztünk melynek során erős PARP-1 aktivációt kiváltó hidrogén –peroxid kezelést alkalmazzunk, majd a PAR polimer akkumulációját detektáltuk az oxidatív stresszrel kezelt és a kontroll sejtekben.

Mindkét kísérletben pozitív eredményt kaptunk olyan tekintetben, hogy a PARP-1 fehérje expressziója és a PAR polimer mennyisége is szignifikánsan kisebb volt a csendesített sejtekben (16.ábra A és B panel).

A továbbiakban sejtleletképességi vizsgálatokat végeztünk a korábbiakkal azonos protokoll szerint előállított PARP-1 csendesített sejtekkel. Különböző nagyságú UVA sugárzást ($2,5 - 10 \text{ J/cm}^2$) követően 16. óránál mértük az A431 sejtek életképességét. A kontroll sejtek életképessége nem csökkent szignifikánsan az UVA sugárzás hatására, illetve a PARP-1 csendesítésnek sem volt érzékenyítő hatása egyik UVA dózis esetében sem, 16 órával a sugárzást követően vizsgálva (16.ábra C panel).

Következő lépésben a PARP-1 csendesítés hatását vizsgáltuk PUVA modellben. A sejteket a sugárzást megelőzően előkezeltük 8-MOP nevű fényérzékenyítő szerrel, majd az előző kísérletekben kiválasztott $2,5 \text{ J/cm}^2$ UVA sugárzással kezeltük őket. Az életképesség vizsgálat szerint, melyet szintén 16 órával a sugárzás után végeztünk el, a PARP-1 csendesítés nem volt szignifikáns hatással a PUVA kezelés fototoxikus hatására. A PARP-1 depléciónak sem érzékenyítő hatással nem volt a sejtekre, sem nem fokozta az életképességet (16. ábra D panel).



16. ábra. A PARP-1 csendesítése nem befolyásolta az A431 sejtek életképességét UVA sugárzás és PUVA kezelés során

A PARP-1 csendesítést specifikus szekvenciájú siRNS általi transzfekcióval értük el. A módszer hatékonyságát az enzim kifejeződésének detektálásával (A) (siCTL vs. siPARP-1 * $P < 0,05$) és funkciókiesés vizsgálattal határoztuk meg (B) (H_2O_2 kezelés hatása * $P < 0,05$; siCTL + H_2O_2 kezelés vs. siPARP-1 + H_2O_2 kezelés # $P < 0,05$). Mindkét esetben Western blot analízist végeztünk. A funkciókiesés vizsgálat során a sejteket hidrogén peroxiddal (1 mM, 7 perc) kezeltük, majd detektáltuk a keletkező PAR polimert. A PARP-1 csendesítés és az UVA sugárzás együttes hatását MTT sejtéletképesség méréssel határoztuk meg, mely kísérletek során egyrészt UVA dózisfüggést vizsgáltunk (C), másrészt PUVA modellt (8-MOP előkezelés) alkalmaztunk (D) (sötét kontroll vs. UVA + 8-MOP kezelés * $P < 0,05$). Az életképességet mind a két esetben 16 órával a sugárzást követően mértük meg. A grafikonok mind a négy panel esetében három egymástól független időpontban elvégzett kísérlet

eredményének átlagát mutatják ($\pm$ SE), míg a Western blot analízisek membrán-képei reprezentatív jellegűek.

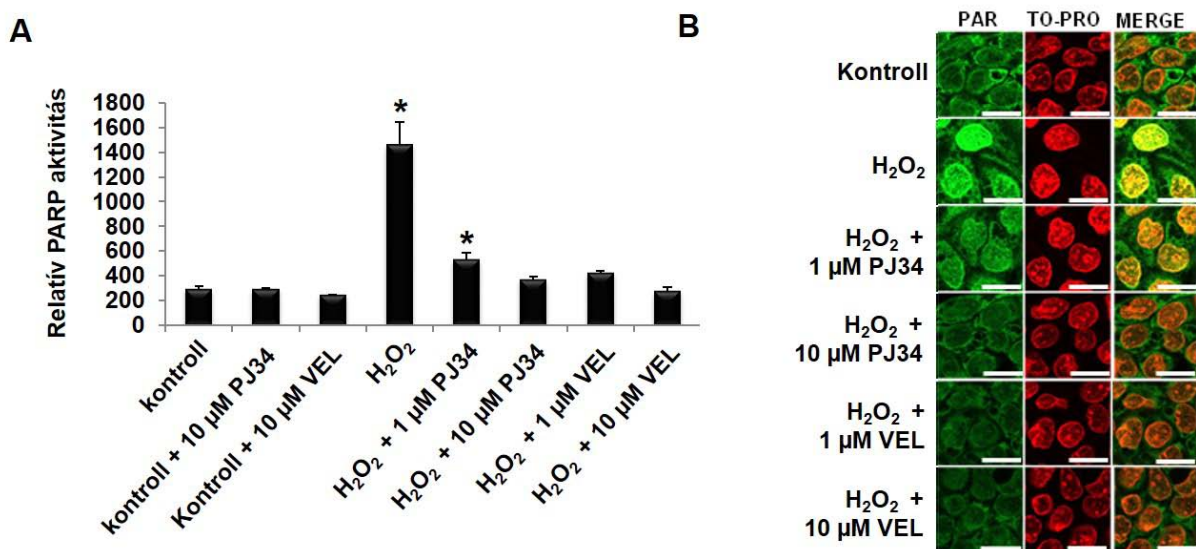
6.2.3. A PJ- 34 és a Veliparib gátlószerek összehasonlítása

Annak ellenére, hogy mind a PJ-34, mind a Veliparib sejtes kísérletekben alkalmazott dózisa ismert az irodalomból, szeretnénk volna behatárolni a továbbiakban alkalmazni kívánt koncentrációkat az általunk használt A431 sejtvonalon. Erre vonatkozólag két kísérletet végeztünk el, melynek során hidrogén-peroxid kezelést követően detektáltuk egyrészt a PARP aktivitást, másrészt a PAR polimer felhalmozódását.

Az első esetben $^3\text{H-NAD}^+$ beépülésén alapuló enzimaktivitás mérést végeztünk, melynek eredményéből kiderült, hogy 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 csak a legmagasabb (10 μM) koncentrációt tekinthetjük hatásosnak, mivel a legalacsonyabb (1 μM) koncentrációban a PARP aktivitás szignifikánsan a kezeletlen kontroll értéke felett maradt a hidrogén-peroxid kezelés után (17. ábra A panel).

Az PAR polimer elleni antitesttel végzett immunfestés is hasonló eredménnyel zárult, vagyis a PJ-34 gátlószer alkalmazott koncentrációi közül csak a legmagasabb (10 μM) gátolta jóformán teljesen a hidrogén-peroxid kezelés hatására keletkező PAR polimer akkumulációt, ellentétben a Veliparibbal, melynek mindkét alkalmazott koncentrációja hatékonyan gátolta a PARP aktivitást (17. ábra B panel).

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



17. ábra. A PJ-34 és a Veliparib különböző hatásfokú PARP gátlószerek

A gátlószerek hatásfokának megállapítása $^3\text{H-NAD}^+$ beépülésén alapuló enzimaktivitás méréssel (A), illetve immunfluoreszcens festéssel (B) történt. A PARP enzim aktiválódását, majd az ezt követő PAR polimer képződést, mind a két esetben hidrogén-peroxid (1 mM 7 perc) kezelés váltotta ki. Az immunfestés során a zöld szín (Alexa-488) a PAR polimert jelöli, mely legnagyobb mennyiségben a sejtmagban található, a piros szín (TO-PRO) a sejtmagot festi. A mikroszkópos képeken a méretvonal 25 µm-t jelöl. A kísérleteket három egymástól független időpontban elvégeztük, a B panel képei reprezentatívak, az A panel grafikonja a különböző kísérletek eredményeinek átlagát mutatja ($\pm$ SE; H₂O₂ kezelés hatása önmagában és PJ-34 kezeléssel kombinálva a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva *P<0,05).

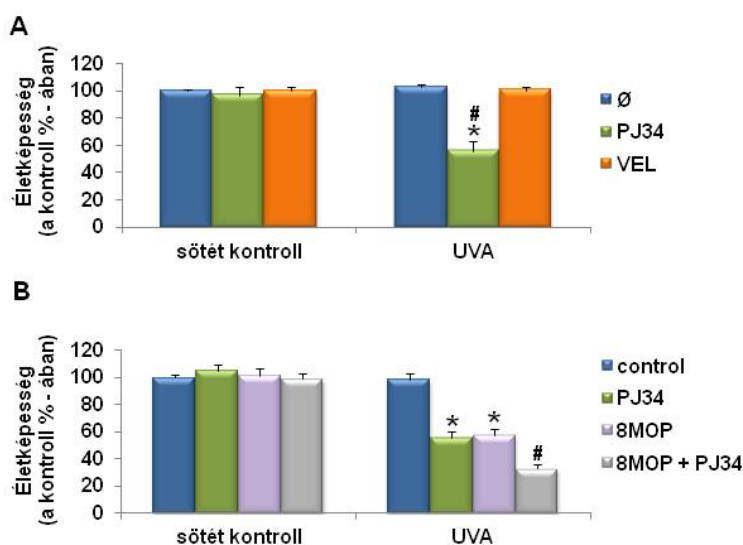
6.2.4. A PJ-34 PARP gátlószert érzékenyítette az A431 sejteket az alacsony dózisú UVA sugárzással szemben, illetve fokozta a PUVA kezelés fototoxicitását.

A PARP-1 siRNS általi csendesítése során kapott eredményeket meg akartuk erősíteni PARP gátlószerek alkalmazásával is. Az A431 sejteket tehát előkezeltük PJ-34 és Veliparib (10 µM) gátlószerekkel és a 2,5 J/cm² UVA sugárzást követő 16. órában vizsgáltuk a sejtek

életképességét (18. ábra A panel). Mind a PJ-34, mind a Veliparib gátlószer jelen volt a sejtek környezetében a besugárzás ideje alatt is.

Csak a PJ-34 mutatott fényérzékenyítő hatást, tehát 16 órával a sugárzást követően a sejtek ± 50 %-nak a halálát okozta UVA sugárzással egyidejűleg alkalmazva. A fényérzékenyítő képességét az is alátámasztja, hogy a sötét kontrollban, ahol a sejteken, többek között, csak a PJ-34 kezelést alkalmaztuk UVA sugárzás nélkül, a PJ-34 kezelés nem csökkentette a sejtek életképességét. A Veliparibnak semmilyen érzékenyítő hatását nem tapasztaltuk az elvégzett kísérlet során.

Hasonlóan meglepő eredményt kaptunk az PUVA kezelés után is, ahol a PJ-34 PARP gátlószerrel történő kezelés fokozta a PUVA kezelés önmagában is toxikus hatását (18. ábra B panel). Mivel az itt kapott eredmények, ellentétesek a korábban a PARP csendesítés során bemutatottaktól, ezért azt feltételezhetjük, hogy a PJ-34 fényérzékenyítő hatása a PARP gátlástól független mechanizmusra vezethető vissza. Ezt a feltételezést támasztja alá az a tény is, hogy a hasonlóan potens Veliparibnak nem volt érzékenyítő hatása az A431 sejtekre nézve a nem letális dózisu UVA sugárzással együtt alkalmazva.



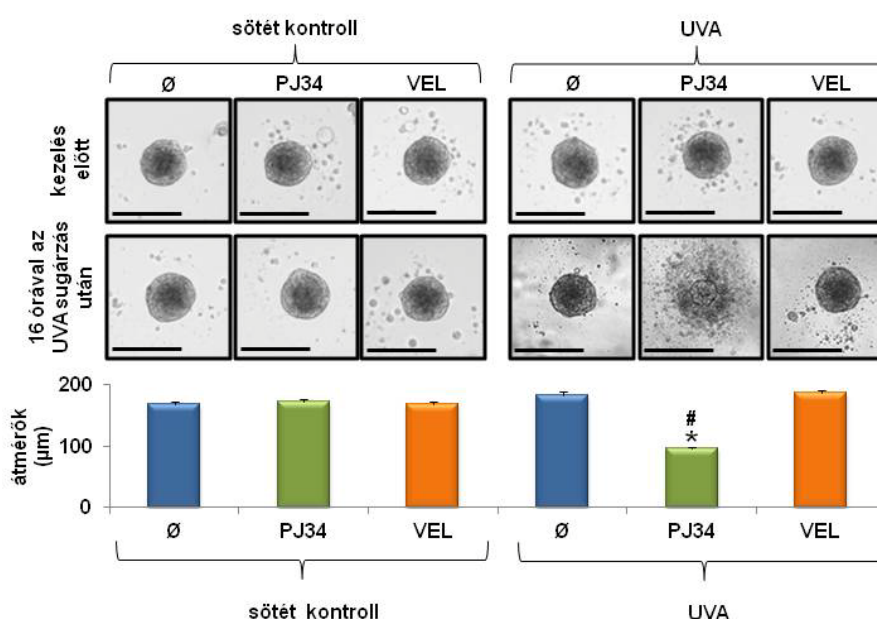
18. ábra. A PJ-34 PARP gátlószer fényérzékenyítő hatású UVA sugárzással kezelt A431 sejtekben

Az A431 sejteket a sugárzást megelőzően előkezeltük a PARP gátlószerekkel (10 μ M PJ-34, Veliparib) (A) illetve a fényérzékenyítő szerrel (800 nM 8-MOP) és a PARP gátlószerekkel (B). Az előkezelés lejárta után a sejtek 2,5 J/cm² UVA sugárzást kaptak. A sugárzás ideje alatt, mind a PARP gátlószerek, mind a 8-MOP jelen volt a sejtek környezetében. Az életképesség meghatározása MTT redukciós módszerrel, 16 órával a sugárzást követően

történt. A grafikonok három független kísérlet eredményeinek az átlagát mutatják ($\pm$ SE; sötét kontroll vs. UVA * $P < 0,05$; (A) UVA vs. UVA + PJ-34, (B) UVA + 8-MOP vs. UVA + PJ-34 # $P < 0,05$.)

6.2.5. A PJ-34 fényérzékenyítő hatása szferoid kultúrában is kimutatható

Megfelelő körülmények között az A431 sejtek képesek 3D szferoid kultúrába rendeződni. A 2D kultúrához hasonlóan, az A431 sejtekből kialakult szferoidokat is előkezeltük illetve kezeltük a PARP gátlószerekkel (10 μ M PJ-34 és Veliparib) és 2,5 J/cm² 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 gátlószerral mely UVA sugárzással egyidejűleg alkalmazva a szferoidok méretének körülbelül a felére való csökkenését eredményezte. A PJ-34 fényérzékenyítő hatása tehát, nem csak monolayer kultúrában, hanem úgynevezett mikrotumor modellben is érvényesült (19. ábra).



19. ábra. A PJ-34 a 3D szferoid kultúrában is fényérzékenyítő hatással rendelkezik

Az A431 sejtekből körülbelül 24 óra alatt képződött stabil szerkezetű szferoidokat a PARP gátlószerekkel (10 μ M PJ-34 és Veliparib) és UVA sugárzással (2,5 J/cm²) kezeltük. 16 óra inkubálást követően a morfológiai változásokat mikroszkóppal detektáltuk, majd Image J szoftver segítségével megmértük a szferoidok átmérőjét. A mikroszkópos képeken a méretvonal 200 μ m nagyságot jelöl. Az ábrán feltüntetett mikroszkópos képek reprezentatív

jellegűek, a kiértékelés során kezelésként legalább 50 szferoidot mértünk meg, ezek átlagai láthatók az alsó grafikonon ($\pm$ SE; sötét kontroll vs. UVA * $P < 0,05$; UVA vs. UVA + PJ-34 # $P < 0,05$.)

6.2.6. A PJ-34 fényérzékenyítő hatását az antioxidánsok nem befolyásolták

Mivel szeretnénk volna tisztázni, hogy a PJ-34 gátlószer fényérzékenyítő hatásának mechanizmusát, első lépésként a ROS jelenlétét próbáltuk kimutatni a PJ-34+UVA által előidézett sejthalál során. A sejteket a PJ-34 és Veliparib (10 μ M) gátlószerekkel párhuzamosan előkezeltük illetve kezeltük antioxidánsokkal is, aszkorbinsavval (500 μ M) és troloxszal (200 μ M), majd 16 órával az UVA sugárzást követően mértük a sejtek életképességét (20. ábra A panel).

Az alacsony dózisú UVA sugárzásnak (2,5 J/cm²) illetve az UVA+Veliparibnak sem volt semmilyen életképesség csökkentő illetve fényérzékenyítő hatása az előző kísérleteink alapján, ezekben a kondíciókban az antioxidánsok alkalmazása sem okozott semmilyen szignifikáns változást a sejtek életképességében, sem pozitív, sem negatív irányban.

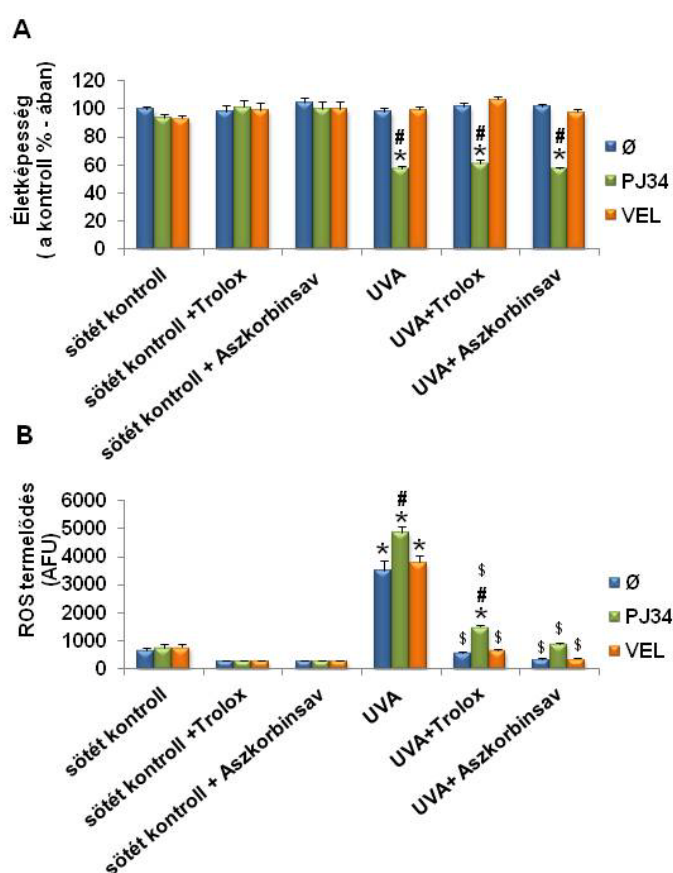
Meglepő módon azonban, az UVA + PJ-34 kezelés által kiváltott körülbelül 50% mértékű sejt pusztulást egyik, viszonylag nagy dózisban alkalmazott antioxidáns sem tudta csökkenteni.

A ROS mennyiségét közvetlenül a kezelések és az UVA sugárzás után ROS érzékeny H2DCFDA festékkel mértük meg (20. ábra B panel). Az eredmények - az irodalmi adatokkal összhangban - azt mutatták, hogy UVA sugárzással kezelt sejtekben közvetlenül a sugárzás után jelentősen megnő a ROS termelődés. A Veliparib gátlószer ezt a ROS mennyiséget szignifikánsan nem befolyásolta. Az UVA+PJ-34 sugárzással kezelt sejtekben viszont a ROS mennyisége szignifikánsan, habár nem jelentős mértékben, de magasabb volt, mint a csak UVA sugárzást kapott sejtekben.

Az alkalmazott antioxidánsok, hatékonyan csökkentik a ROS mennyiségét a csak UVA sugárzással illetve az UVA + Veliparib sugárzással kezelt sejtekben is. Az UVA+PJ-34 kezelésnél az antioxidánsok alkalmazása, a fentiekhez hasonlóan, szignifikánsan csökkentette a ROS mennyiségét, bár a trolox esetében az alkalmazott magas koncentráció ellenére sem sikerült a kezdeti, vagyis a sötét kontrollban mért ROS mennyiségét elérni. Az aszkorbinsav esetében viszont hiába volt a ROS mennyisége körülbelül ugyanannyi, mint a sötét kontrollban, ez azonban mégsem eredményezett védelmet az UVA+PJ-34 indukált sejthalál ellen.

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

Ennek ellenére nem szabad teljes mértékben kizárnunk a ROS esetleges szerepét az UVA+PJ-34 kezelés által kiváltott sejthalál mechanizmusában. Lehetséges ugyanis, hogy az UVA+PJ-34 sugárzás indukálta sejthalál mégis ROS függő, de nem a mennyiségét tekintve, hanem annak lokalizáltságával összefüggésben, melyet a jelen kísérlettel kimutatni nem lehet.



20. ábra. A PJ-34 fototoxikus hatását nem befolyásolják a nagy koncentrációban alkalmazott antioxidánsok

Az A431 sejteket mind a két kísérlet során előkezeltük a PARP gátlószerekkel (10 μ M PJ-34 és Veliparib) és az antioxidánsokkal (500 μ M aszkorbinsav és 200 μ M trolox) egyidejűleg. 16 órával az UVA sugárzást (2,5 J/cm²) követően MTT vizsgálattal határoztuk meg a sejtek életképességét (A) (sötét kontroll vs. UVA * P <0,05; UVA vs. UVA + PJ -34 P <0,05.) A

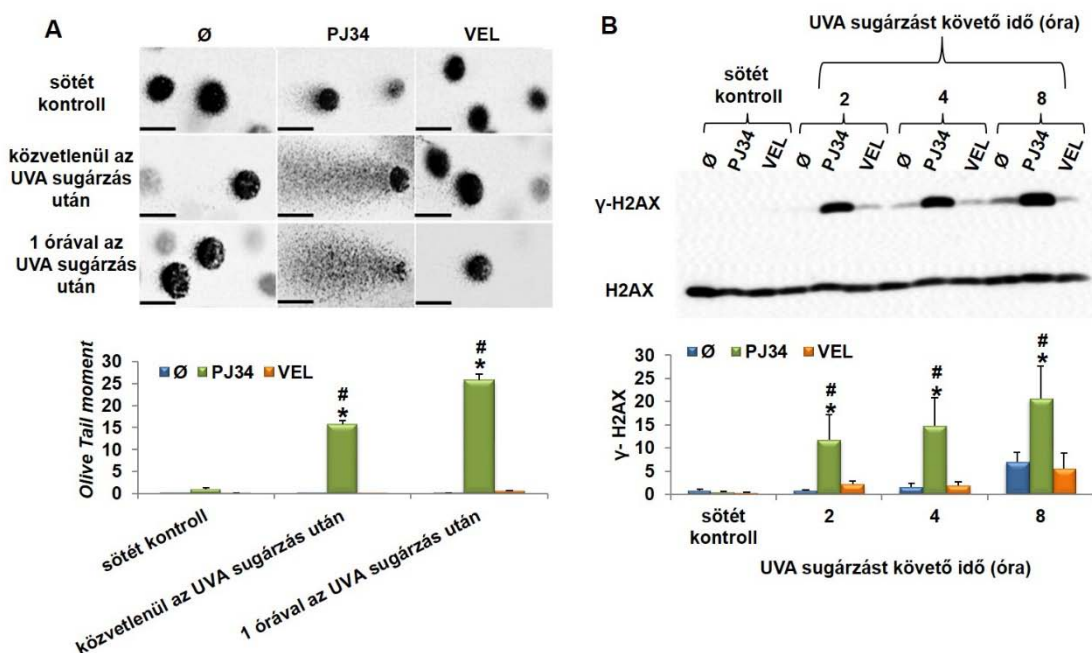
ROS mérése (B) (sötét kontroll vs. UVA * $P < 0,05$; UVA vs. UVA + PJ-34 [#] $P < 0,05$; UVA vs. UVA + PARP gátlók és/vagy antioxidánsok ^{\$} $P < 0,05$) H2DCFDA festék segítségével történt, melyet már az előkezelések alkalmával a sejtekhez adtunk. A fluoreszcencia meghatározása közvetlenül a sugárzást követően történt. A kísérleteket három egymástól független időpontban megismételtük, a grafikonok pedig ezeknek az eredményeknek az átlagait mutatják ($\pm$ SE).

6.2.7. Az UVA+PJ-34 kezelés együttesen DNS károsodást okoz mely, mind egyszálú, mind kétszálú DNS törésként kimutatható

A UVA+PJ-34 kezelés hatására bekövetkező sejthalál mechanizmusának tanulmányozása során a DNS szerkezetét ért esetleges károsodásokat a következő kísérletekkel kívántuk kimutatni.

Alkalikus comet assay-t végeztünk, mely módszer az egyszeres DNS törés kimutatására alkalmas (21. ábra A panel). A PARP gátlószerekkel való előkezelés (10 μ M PJ-34 és Veliparib) és UVA sugárzás (2,5 J/cm²) után, azonnal illetve 1 órával végeztük el a comet assay-t. Az UVA sugárzás önmagában nem okozott egyszeres DNS törést szignifikáns mértékben, hasonlóan az UVA + Veliparib kezeléshez. Az UVA+PJ-34 kezelés esetében azonban, már azonnal a sugárzást követően tudtunk egyszeres DNS törést detektálni, amelynek mértéke 1 óra elteltével nem csökkent. Habár a PJ-34 gátlószerezellel kezelt és sötétben tartott kontroll sejtekben is látható a képeken némi DNS károsodás ez azonban nem szignifikáns a kezeletlen kontroll sejtekhez viszonyítva.

A γ -H2AX (foszforilált-H2AX) detektálása egy jól jellemzett módszere a DNS kettős törés kimutatásának például fényérzékenyítő szerek esetében [227] [228]. A fent említett előkezeléseket és a sugárzást követően Western blot analízist végeztünk az ábrán jelzett időpontokban vett mintából (2-4-8 h) (21. ábra B panel). A γ -H2AX jelét ebben az esetben, sem a sötét kontrollokban sem a csak UVA sugárzással kezelt sejtekben, sem az UVA + Veliparib sugárzással kezelt mintákban nem detektáltuk szignifikáns mértékben egyik vizsgált időpontban sem (2-4-8 h). Az UVA+PJ-34 sugárzással kezelt sejtekben azonban, már 2 órával a sugárzást követően γ -H2AX fehérjét mutattunk ki, melynek mértéke a további két vizsgált időpontban (4-8 h) is detektálható maradt. A két kísérlet eredménye alapján elmondhatjuk, hogy a PJ-34 UVA sugárzás hatására egyszeres DNS törést indukál, közvetlen vagy közvetett (pl. ROS által közvetített) módon, mely törés - legalábbis az általunk vizsgált időpontokban - nem kerül kijavításra,



21. ábra. A PJ-34 UVA sugárzással együttesen alkalmazva egyszeres és kétszeres DNS töréseket okoz, melyek már rövid idővel a sugárzást követően kimutathatók

Az A431 sejtek előkezelései a PARP gátlószerekkel (10 µM PJ-34 és Veliparib), majd az azt követő UVA sugárzás (2,5 J/cm²), mind az egyszeres, mind a kétszeres DNS törések kimutatása során azonos protokoll szerint zajlott. Az egyszeres DNS töréseket alkalikus comet assay–vel mutattuk ki (A), mely során közvetlenül a sugárzás után majd egy órával a sugárzást követően monitoroztuk a DNS törések kialakulását. A képeket konfokális mikroszkóppal készítettük. A mikroszkópos képeken a méretvonal 25 µm nagyságot jelöl. Az Olive tail moment-et vagyis a DNS károsodás mértékét kvantifikáló értéket Comet Score nevű szoftverrel állapítottuk meg, melyhez kezelésenként legalább 50 sejtről készült képet vettünk alapul. A mikroszkópos képek reprezentatívak, a grafikon az analízisből származó átlag értékeket mutatja (± SE; sötét kontroll vs. UVA *P<0,05; UVA vs. UVA + PJ -34 [#]P<0,05.)

A kettős szálú DNS törés markereként szolgáló foszforilált-H2AX kimutatásához a sugárzást követően (2-4-8 h) készítettünk mintákat, melyekből Western-blot analízissel detektáltuk a γ-H2AX-t. Belső kontrollnak a foszforilálatlan H2AX-t tekintettük (B). A denzitometráltást Image J szoftverrel végeztük, melyhez 3 függetlenül elvégzett Western-blot analízis eredményét használtuk fel és az átlag értékeket ábrázoltuk a grafikonon (± SE; sötét kontroll vs. UVA *P<0,05; UVA vs. UVA + PJ-34 [#]P<0,05).

6.2.8. A PJ-34 + UVA kezelés által kiváltott sejthalál főként apoptózis jegyeit mutatja

A korábbiakban kimutattuk, hogy az UVA +PJ-34 kezelés az adott sejtpopuláció több mint felének a halálát okozza, valószínűleg DNS törés előidézése által. Kíváncsiak voltunk azonban, hogy a sejthalál lefolyását tekintve milyen mechanizmusról beszélhetünk.

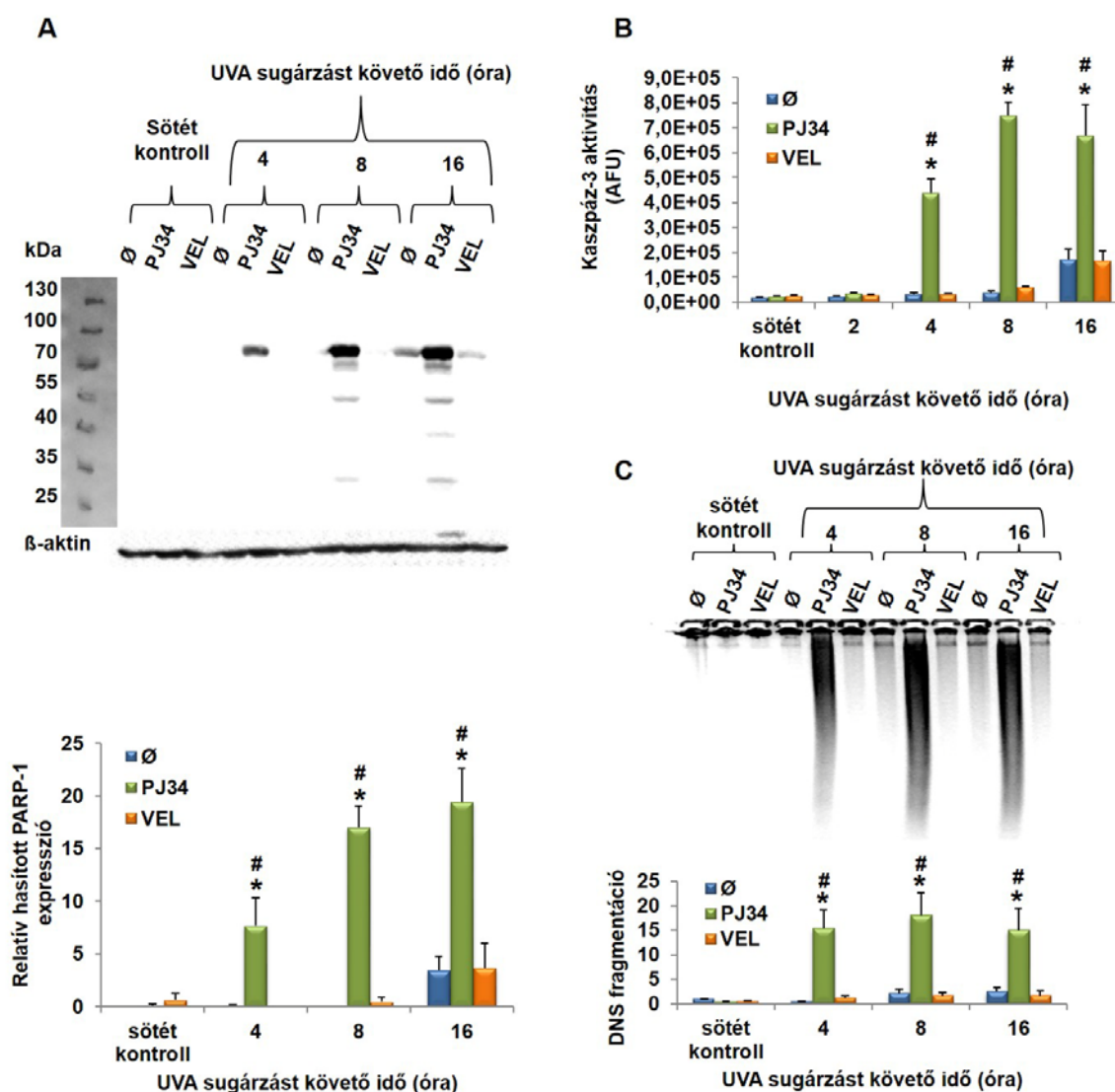
A PARP gátlószerekkel való előkezelés (10 μ M PJ-34 és Veliparib) és UVA sugárzás (2,5 J/cm²) után 16 órával LDH enzim felszabadulást mértünk. A kísérlet eredménye szerint, mely jelen disszertációban nem kerül bemutatásra, csak az UVA +PJ-34 kezelés esetén volt körülbelül 8 % LDH felszabadulás, mely alapján nem állíthatjuk, hogy a sejthalál főleg nekrotikus jellegű lenne.

Figyelmünk ezért inkább az apoptózis felé irányult a továbbiakban, melyet az UVA +PJ-34 kezelés által előidézett DNS károsodás is indokolttá tett. Első lépésként kaszpáz-3 enzim aktivitást mértünk a PARP gátlószerekkel történő előkezelés (10 μ M PJ-34 és Veliparib) és UVA sugárzás (2,5 J/cm²) után különböző, az 22. ábrán (B) feltüntetett időpontokban. Szignifikánsan magasabb kaszpáz-3 enzim aktivitást csak az UVA +PJ-34 kezelésnél tapasztaltunk majdnem az összes mintavételi időpontban (4-8-16 h). A sötét kontroll sejtekben, a csak UVA sugárzással kezelt sejtekben illetve az UVA +Veliparib kezelés esetében egyik vizsgált időpontban (2-4-8-16 h) sem tapasztaltunk szignifikáns mértékű kaszpáz-3 aktivitásemelkedést. Az UVA +PJ-34 gátlószerekkel kezelt sejtekben a kaszpáz-3 aktivitás szignifikáns növekedése először 4 órával az UVA sugárzást követően volt mérhető, annak ellenére, hogy egyszeres DNS törést comet-assay segítségével már közvetlenül az UVA sugárzás után, kétszeres DNS törést pedig két órával az UVA sugárzás után detektáltunk a PJ-34 gátlószerekkel és UVA sugárzással kezelt mintákban. Ezek alapján nem valószínű, hogy a detektált egyszeres és kétszeres DNS törés a kaszpáz-3 megnövekedett aktivitásából eredő DNS fragmentáció kezdeti megnyilvánulása volna. Sokkal valószínűbb, hogy az UVA +PJ-34 által közvetlenül vagy közvetett módon előidézett DNS károsodás indukálja az apoptózist.

A kaszpáz-3 aktív formájában hasítja a PARP-1 enzimet. Ennek kimutatása céljából Western blot analízist végeztünk a PARP-1 89 kDa fragmentumára specifikus antitest segítségével, mely a kaszpáz - 3 enzim általi hasítás terméke (22. ábra A panel). Az eredmény összhangban van a kaszpáz- 3 aktivitás mérése során kapott eredményekkel: egyrészt a sötét kontroll, a csak UVA sugárzással kezelt sejtekben és az UVA+ Veliparib kezelés esetében nem detektáltuk szignifikáns mértékben hasított PARP-1 enzimet, másrészt a sejtek UVA

+PJ-34 gátlószerrel való kezelése már 4 órával a sugárzást követően hasított PARP-1 fragmentum megjelenését eredményezte.

Továbbá kimutattuk azt is, hogy az UVA +PJ-34 kezelés hatására DNS fragmentáció mutatható ki legalább 4 órával a sugárzás után (22. ábra C panel). Sem a sötét kontroll, sem a csak UVA sugárzással kezelt, sem az UVA+Veliparibbal kezelt sejtek esetében nem detektáltunk szignifikáns mértékben DNS fragmentációt, egyik vizsgált időpontban sem (4-8-16 h). Mivel DNS fragmentációt legkorábban 4 órával a sugárzás után tudtunk detektálni az UVA +PJ-34 kezelés esetében, ezért feltételezhetjük, hogy ez DNS fragmentáció a kaszpáz - 3 enzim által közvetített apoptotikus DNS fragmentációnak felel meg. Nem zárható ki azonban sem, hogy a detektált DNS fragmentáció az UVA +PJ-34 kezelés által indukált és perzisztáló DNS törések eredménye.



22. ábra. Az UVA +PJ-34 kezelés által kiváltott sejthalál apoptózis formájában zajlik

A hasított PARP-1 fragmentumot Western blot módszerrel detektáltuk, 4-8-16 órával az előkezeléseket (10 μ M PJ-34 és Veliparib) és a sugárzást (2,5 J/cm²) követően. Belső kontrollként β -aktint használtunk. A denzitometrált Image J szoftverrel végeztük, melyhez három függetlenül elvégzett Western-blot analízis eredményét használtuk fel (A) (sötét kontroll vs. UVA *P<0,05; UVA vs. UVA + PJ-34 #P<0,05).

Az A431 sejteket előkezeltük a PARP gátlószerekkel (10 μ M PJ-34 és Veliparib) majd az azt követő UVA sugárzás (2,5 J/cm²) után 2-4-8-16 órával mértük a kaszpáz-3 enzim aktivitását ((B) sötét kontroll vs. UVA *P<0,05; UVA vs. UVA + PJ-34 #P<0,05). A grafikonok az A és B panel esetében a különböző kísérletek eredményeinek átlagát mutatják ($\pm$ SE).

Az A431 sejtekből PARP gátlószerekkel történő előkezelés és UVA sugárzást követően a 4-8-16 órában mértük a DNS fragmentáció mértékét. A DNS futását etídium-bromiddal történő festéssel tettük láthatóvá, melyet lefotóztuk, majd a denzitometrált Image J szoftverrel végeztük, melyhez három függetlenül elvégzett DNS fragmentációs assay eredményét használtuk fel és azok átlagait ábrázoltuk (C)($\pm$ SE; sötét kontroll vs. UVA *P<0,05; UVA vs. UVA + PJ-34 #P<0,05).

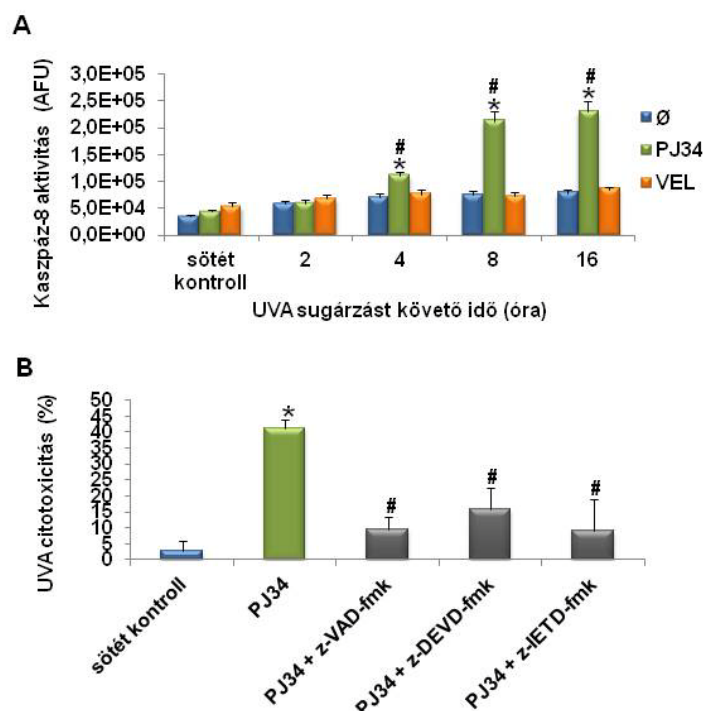
6.2.9. A PJ-34+UVA kezelés által kiváltott sejthalál mértéke különböző specifitású kaszpáz-gátlószerekkel csökkenthető

Miután az effektor kaszpáz -3 enzim aktivitásának növekedését kimutattuk az UVA+PJ-34 kezelés hatására bekövetkező sejthalál folyamatban figyelmünk az iniciátor kaszpáz enzimek felé irányult.

A kaszpáz-3 enzimaktivitás méréshez hasonlóan elvégzett kísérlet eredménye szerint megnövekedett kaszpáz-8 enzim aktivitás 4 órával az előkezeléseket (10 μ M PJ-34 és Veliparib) és az UVA sugárzást (2,5 J/cm²) követően volt először szignifikáns mértékű a PJ-34 +UVA sugárzással kezelt sejtekben, míg a sötét kontroll, a csak UVA sugárzással kezelt sejtekben és az UVA+Veliparib kezelés esetében nem tapasztaltunk ilyen irányú változást (23. ábra A panel). Mivel a kaszpáz-8 az iniciátor enzime az *extrinsic* vagyis a sejtfelszíni sejthalál receptorokból kiinduló apoptózis útvonalnak ezért, aktivitásának emelkedése utalhat arra, hogy ilyen útvonalon is zajlik sejthalál az UVA+PJ-34 kezelt sejtekben. A PJ-34 gátlószert tehát, egyrészt DNS törést indukál UVA sugárzással egyidejűleg alkalmazva, másrészt, mivel jelen van az UVA sugárzás ideje alatt a sejteket körülvevő PBS-ben is, ezért lehetséges, hogy az UVA sugárzás általi esetleges szerkezeti módosulás következtében

sejtfelszíni sejthalál receptorokat képes aktiválni mely által elindul az *extrinsic* apoptózis útvonala.

A továbbiakban megvizsgáltuk, hogy a különböző specifikus kaspáz gátlók mennyiben változtatják meg az A431 sejtek életképességét PJ-34+UVA kezelés során (23. ábra B panel). Az UVA+PJ-34 kezelés okozta citotoxicitás az eddigi kísérletekhez hasonlóan magas volt, ehhez képest a kaspáz inhibitorok szignifikánsan csökkentették a kezelés által kiváltott sejthalál mértékét. Mind a pan kaspáz inhibitor z-vad-fmk, mind a kaspáz-3 inhibitor z-DEVD-fmk, valamint a kaspáz-8 inhibitor z-IETD-fmk is szignifikánsan csökkentette az UVA+PJ-34 kezelés által kiváltott citotoxicitást. A kísérlet egyrészt igazolta, hogy a PJ-34+UVA sugárzás által előidézett sejthalál főleg apoptotikus jellegű, másrészt, sejtfelszíni sejthalál receptorok aktiválódása is szerepet játszhat benne. Mivel az inhibitorok nem nyújtottak 100%-os védelmet az UVA+PJ-34 indukálta citotoxicitás ellen, és a nekrotikus sejthalálra jellemző marker (LDH felszabadulás) nem volt jelentős mértékben kimutatható ezekben a sejtekben a sugárzást követő 16. órában, ezért valószínűsíthető, hogy kaspáz –független és egyéb nem apoptotikus útvonalak is szerepet játszhatnak a sejthalál végbemenetelében, melyeket ebben a kísérlet sorozatban nem vizsgáltunk.



23. ábra. A különböző specifitású kaspáz-gátlószerek csökkentik a PJ-34 + UVA sugárzás által kiváltott sejthalál mértékét

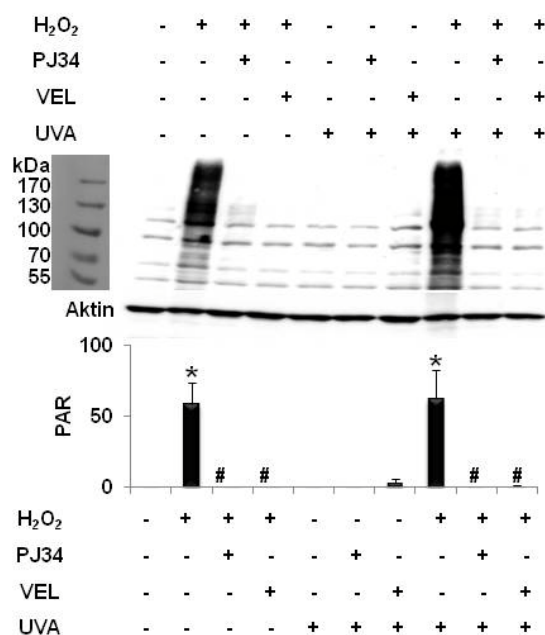
A kaspáz-8 enzim aktivitásának változását specifikus szubsztrát segítségével határoztuk meg 2-4-8-16 órával a PARP gátlószerekkel (10 μ M PJ-34 és Veliparib) történő előkezelés majd az azt követő UVA sugárzás (2,5 J/cm²) után (A) (sötét kontroll vs. UVA * $P < 0,05$; UVA vs. UVA + PJ-34 [#] $P < 0,05$). A kaspáz gátlószerek hatását az UVA+PJ-34 kezelés által kiváltott sejthalál során MTT életképesség méréssel vizsgáltuk. Az előkezelés (10 μ M PJ-34) és az UVA sugárzás (2,5 J/cm²) ugyanúgy zajlott, mint az „A” panelen szereplő kísérletben. A sugárzás végeztével azonban, a PBS eltávolítása után a friss tápfolyadékkal együtt a sejtekhez adtuk az általunk alkalmazni kívánt kaspáz inhibitorokat, melyek közül a z-vad-fmk (50 μ M) általános kaspáz gátló, a z-DEVD-fmk (50 μ M) kaspáz -3 gátlószert, a z-IETD-fmk (50 μ M) pedig a kaspáz-8 enzimre specifikus gátlószert. Az életképességet 16 órával a sugárzást követően mértük meg, és az ebből számolt citotoxicitásként ábrázoltuk (B) (sötét kontroll vs. UVA * $P < 0,05$; UVA + PJ -34 vs. UVA + PJ-34 + kaspáz-inhbitorok [#] $P < 0,05$). A kísérleteket három egymástól független időpontban megismételtük, és az ábrákon ezeknek az eredményeknek az átlaga látható ($\pm$ SE).

6.2.10. A PJ-34 és a Veliparib UVA expozíciót követően is megőrzik PARP gátló tulajdonságukat

Az alapján, hogy a specifikus PARP-1 csendesítés és a Veliparib nevű PARP gátlószer nem érzékenyítette a sejteket az amúgy nem letális dózisú UVA sugárzásra, de a PJ-34 igen, azt a következtetést vontuk le, hogy ez a fényérzékenyítő hatás független a PJ-34 PARP gátlásától. Ahhoz, hogy felderítsük a PJ-34 fényérzékenyítő mechanizmusát, meg kellett bizonyosodnunk arról, hogy a gátlószerek, különösen a PJ-34, megőrzik – e hatékonyságukat PARP gátlás szempontjából az UVA sugárzás ideje alatt is.

A PARP enzim aktiválásának legbiztosabb módja a hidrogén-peroxid kezelés által kiváltott oxidatív stressz. Ilyen formán PAR polimer akkumulációt váltottunk ki A431 sejtekben, melyeket vagy sötétben tartottunk, vagy párhuzamosan a hidrogén-peroxiddal UVA sugárzással ($2,5 \text{ J/cm}^2$) kezeltünk. Mind a két esetben volt olyan kombináció, ahol előkezeltük a sejteket a PARP gátlószerekkel (10 μM PJ-34 és Veliparib) a sugárzás és/vagy a hidrogén-peroxid kezelést megelőzően (24. ábra).

A Western blot analízis eredményéből a következő következtetéseket vonhattuk le: (i) a kísérleteinkben alkalmazott alacsony dózisú UVA sugárzás nem okoz PARP aktivációt, ennél fogva 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.



24. ábra. A PJ-34 PARP gátló képességét nem veszíti el az UVA sugárzás hatására

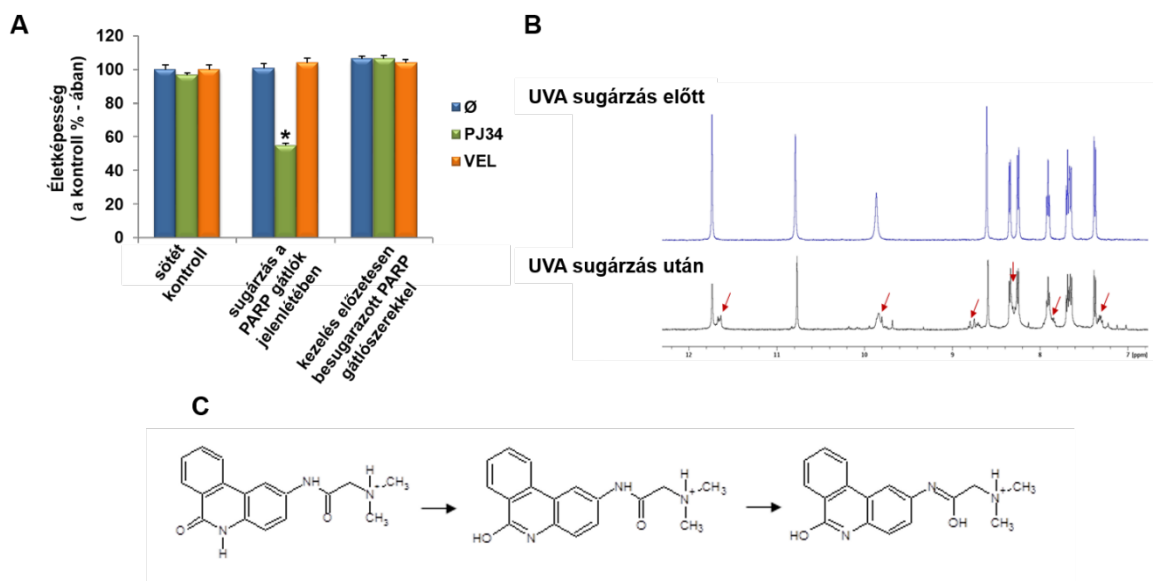
Hidrogén – peroxid (1 mM 7 perc) kezelés által PARP aktivációt idéztünk elő A431sejtekben, mely PAR polimer felhalmozódásával járt, mind a sötét kontroll, mind az UVA sugárzással kezelt sejtekben (A). Annak céljából, hogy megállapítsuk az általunk alkalmazott PARP gátlószerek hatásfokát az UV sugárzás (2,5 J/cm²) ideje alatt, a hidrogén –peroxid kezelés előtt előkezeltük a sejteket a PJ-34 és a Veliparib (10 µM) megfelelő koncentrációjú oldatával. A hidrogén-peroxid kezelés végeztével illetve az UVA sugárzás befejezése után, mely mind a két esetben 7 perc időtartamot jelentett, elkészítettük a Western-blot mintákat. A PAR polimert arra specifikus antitesttel mutattuk ki. Belső kontrollként β-aktint használtunk. A denzitometrált Image J szoftverrel végeztük, melyhez három függetlenül elvégzett Western blot analízis eredményét használtuk fel és az átlag értékeket ábrázoltuk (± SE; H₂O₂ kezelés hatása *P<0,05; PARP gátlószerek hatása a H₂O₂ kezelés által kiváltott PAR akkumulációra #P<0,05).

6.2.11. PJ-34 szerkezete megváltozik az UVA sugárzás következtében

A PJ-34 gátlószer fényérzékenyítő tulajdonságát tovább kutatva, azt az eredményt kaptuk, hogy a fototoxikus hatás csakis abban az esetben nyilvánul meg, ha a PJ-34 és az UVA sugárzás egyidejűleg jelen vannak a sejtek környezetében. Ez a tény azáltal nyert bizonyítást, hogy a két gátlószert (10 µM PJ-34 és Veliparib) egyrészt, a korábban leírt előkezelés formájában, illetve előzetesen megsugárzott oldatként is a sejtekhez adtuk, majd

megmértük a sejtek életképességét 16 órával a sugárzás, illetve a korábban besugárzott vegyületek hozzáadása után. Korábbi eredményeinkkel összhangban a Veliparibnak nem volt semmilyen érzékenyítő hatása, sem előzőleg besugárzott formában sem UVA sugárzással együtt alkalmazva, ellentétben a PJ-34 gátlószerrel, mely UVA sugárzással egyidőben alkalmazva citotoxikus hatású, ugyanakkor a besugárzott PJ-34 semmilyen toxikus hatással nem rendelkezett az A431 sejtek esetében (25. ábra A panel).

NMR spektroszkópia segítségével megvizsgáltuk a PJ-34 szerkezetét az UVA besugárzás előtt, és azt követően (25. ábra B és C panel). A módszer segítségével kimutatható volt, hogy az általunk alkalmazott alacsony dózisú 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 pí-elektron rendszer kialakulásában nyilvánul meg.



25. ábra. A PJ-34 gátlószér és az UV sugárzás kapcsolata

Az A panelen látható életképesség mérés előtt 16 órával a sejteket vagy előkezeltük a PARP gátlószerekkel majd UVA –val sugaraztuk őket, vagy olyan PARP gátlószereket adtunk hozzájuk, amelyeket előzőleg PBS-ben hígítva sejtmentes közegben már UVA sugárzással kezeltünk, ez esetben további sugárzás nem történt. A kísérletet három egymástól független időpontban elvégeztük, és ezeknek az eredményeknek az átlaga látható a grafikonon ($\pm$ SE; sötét kontrol vs. UVA * $P < 0,05$). A PJ-34 gátlószér UV spektruma az $2,5 \text{ J/cm}^2$ nagyságú UVA sugárzás előtt és után is felvételre került (B). A PJ-34 szerkezetének UVA sugárzás hatására bekövetkező változása a (C) panelen látható.

7. MEGBESZÉLÉS

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

A PARP-1 enzim szerepe már sokféle DNS hibajavító mechanizmus esetében ismerté vált. Az UV sugárzás okozta DNS léziók kijavítása során működő fő mechanizmus a NER. A PARP-1 enzimnek ebben való szerepét Sha és mtsai. mutatták ki többek között [166]. Az általuk alkalmazott modellben UVC sugárzást alkalmaztak a DNS károsodás indukciójához. Az UVC és az UVB okozta DNS károsodások nagymértékben hasonlítanak egymáshoz, ugyanakkor biológiailag relevánsabb az UVB sugárzás hatásait vizsgálni bőr sejteken, mivel ideális esetben az UVC sugárzást az ózonréteg hatékonyan kiszűri.

Az első részben felvázolt kísérletsorozat célja tehát, 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.

Humán keratinocita sejtvonalban (HaCaT) siRNS segítségével sikeresen csendesítettük a PARP-1 enzimet (8. ábra). A növekvő nagyságú UVB sugárzással történő kezelés után, azt az eredményt kaptuk, hogy a HaCaT sejtek $0,6 \text{ J/cm}^2$ nagyságú UVB sugárzás esetén pusztulnak szignifikánsan (8. ábra). Ugyanezt a dózisu UVB sugárzást alkalmazva kimutattuk, hogy az ebben a tartományban fellépő sejthalál mértékét a PARP-1 siRNS általi csendesítése szignifikánsan fokozta (8. ábra). Ez alapján elmondhatjuk, hogy a HaCaT sejtek UVB sugárzásra való érzékenységet a PARP-1 hiánya fokozza.

További kísérleteinket humán primer epidermális keratinocitákon végeztük növelve a kutatás biológiai relevanciáját. Első lépésben ebben az esetben is megállapítottuk az UVB dózis tartományt amelyben dolgozhattunk a továbbiakban. Eredményeink szerint, az NHEK sejtek életképessége már $0,1 \text{ J/cm}^2$ UVB dózis esetében szignifikánsan csökken (9. ábra). Mivel a primer sejteket általában nehézkes siRNS segítségével csendesíteni, ebben az esetben a PARP enzim farmakológia gátlásával próbáltuk vizsgálni a PARP-1 enzim szerepét. A gátláshoz kétféle PARP gátlószert használtunk, melyeknek hatásmechanizmusa azonos, vagyis NAD^+ -hoz hasonló szerkezetük révén képesek a PARP enzimek katalitikus alegységéhez bekötődni és gátolni azt. A 3-AB egy régebbi típusu PARP gátlószer melynek specifikálása és hatékonysága messze 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 (9. ábra). Ugyanakkor a 3-AB PARP gátlószer nagyon jó hatásfokkal védte az NHEK sejteket az UVB által kiváltott sejthalál ellen, valamint a 3-AB kezelés megelőzte az alacsony dózisú UVB sugárzás ($0,0125-0,05 \text{ J/cm}^2$) proliferációt gátló hatását is, vagyis képes volt hosszútávú védelmet kifejteni (9. ábra). Mivel a PARP-1 csendesítés és a specifikus gátlószer hasonló eredményt adott kísérleteink során, vagyis érzékenyítették a sejteket az UVB sugárzás amúgyis toxikus hatására, arra a következtetésre jutottunk, hogy a 3-AB védő hatása egy, a PARP gátló hatásától független folyamat eredménye. Ezt a feltételezést támasztja alá továbbá az is, hogy két másik a PJ-34-hez hasonló hatásfokú gátlószer (TIQ-A, DPQ) szintén érzékenyítette az NHEK sejteket, a PARP-1 csendesítéshez hasonlóan, az UVB sugárzás citotoxikus hatására (14. ábra).

Az NHEK sejtek UVB sugárzást követő morfológiai vizsgálatából és a PARP-1 hasított formájának immuncitokémiai reakcióval történő, 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 a PARP-1 enzim kaszpáz -3 általi hasításának eredménye. Elmondható tehát, hogy a 3-AB gátolja az UVB sugárzás ($0,05 - 0,2 \text{ J/cm}^2$) által kiváltott apoptózist NHEK sejtek esetében.

Hasonló eredményt kaptunk az LDH felszabadulás vizsgálata során, mely egy jellemző nekrotikus marker: a 3-AB előkezelés szignifikánsan csökkentette az UVB sugárzás által kiváltott LDH felszabadulás mértékét. A PJ-34 gátlószernek nem volt befolyása a nekrotikus sejthalált jellemző marker változására (10. ábra).

Az UVB sugárzás hatására fellépő mitokondriális diszfunkciót jelző mitokondriális membrán depolarizációt a PJ-34 általi PARP gátlás nem befolyásolta, ugyanakkor a 3-AB szignifikánsan akadályozta ennek a jelenségnek a létrejöttét, tovább erősítve azt a feltételezést, hogy védi az NHEK sejteket az UVB által kiváltott sejthalál ellen (11. ábra).

A nagyfokú ROS képződést elsősorban az UVA sugárzásnak tulajdonítja az irodalom jelentős része [229]. Az UVB sugárzás során fellépő sejthalál esetében azonban, az oxidatív stresszt, mint másodlagos mechanizmust, a DNS károsodások kialakulása mellett mégis gyakran említik manapság [230]. Kísérleteink is ezt igazolták mivel az UVB sugárzást követően, nem nagymértékben ugyan, de szignifikánsan fokozódott a hidrogén-peroxid termelődése az NHEK sejtekben az UVB dózisok növekedésével arányosan (12. ábra). A 3-AB előkezelés esetében ez a hidrogén-peroxid produkció szignifikánsan alacsonyabb volt,

mint a csak UVB sugárzással kezelt sejtekben. Az irodalom szerint a 3-AB rendelkezik gyökfogó képességgel [231], és bár nekünk ezt nem sikerült igazolni, mégis azt feltételezzük, hogy ez áll a háttérben. A PJ-34 gátlószer nem befolyásolta a hidrogén -peroxid termelődés mértékét az UVB sugárzás során.

Az NHEK sejteken végzett kísérleteink szerint a – 3-AB nem - csak az UVB sugárzás által kiváltott sejthalál ellen nyújtott védelmet, hanem az UVA sugárzás során fellépő sejtlethéptesség csökkenés esetén is. A 3-AB kezelés minden szempontból szignifikáns védelmet nyújtott ebben az esetben is, vagyis, növelte az életképtességet, gátolta az apoptózist a nekrozist és a csökkentette a hidrogén- peroxid termelődést az UVA sugárzás során. A 3-AB kezelés által nyújtott védelem nem volt olyan nagyfokú, mint az UVB sugárzás esetében, de még így is szignifikáns mértékben kifejeződött (13. ábra).

Melanoma és fibroblaszt sejtvonalakon már kimutatták korábban, hogy a 3-AB a sejtek adhéziós tulajdonságainak megváltoztatásával képes védeni a sejteket az apoptotikus sejthalállal szemben UVB sugárzást követően. A jelenséget a szerzők ugyanakkor a 3-AB PARP gátló hatásának tulajdonították, miszerint a NAD^+ és az ATP raktárak védelme hozzájárul a sejthalállal szembeni küzdelemhez, így a stabil citoszkeleton struktúra fenntartásához [232].

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 háttérében valószínűleg a PARP gátlás következtében 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 jelen értekezésben nem prezentált tény, mely szerint képes elnyelni az UVB és kisebb mértékben az UVA sugárzás egy részét, ezáltal fizikai fényvédőként is funkcionál.

A 3-AB védő mechanizmusának minden részletét nem sikerült felgöngyölíteni teljes mértékben a kísérletsorozat alatt, ugyanakkor kétségtelenül újabb információval bővítettük az róla szóló irodalmi adatokat.

7.2. A PJ-34 PARilációtól független fotogenotoxikus hatásának jellemzése

Habár a PDT és a PUVA mechanizmusa, mely szerint egy fényérzékenyítő és az annak megfelelő hullámhosszúságú fény találkozásának eredménye citotoxikus hatású lehet az adott sejtre vagy szövetre nézve hasonló, azonban az aktivált sejthalál útvonalak eltérnek egymástól. Amíg a PDT során a DNS károsodása, a fokozott ROS termelődés következtében esetlegesen fellépő, másodlagos hatás, addig a PUVA fő sejthalált kiváltó elsődleges oka a kialakult DNS léziók [233]. Ezek közé tartoznak a DNS és az aktivált fényérzékenyítő között létrejött keresztkötések, a fényérzékenyítő esetleges interkalációja a DNS kettős szálába, az egyszeres vagy kétszeres DNS törések valamint általában az UV sugárzás által amúgyis előidézett módosulások [234]. Másodlagos sejtkárosító mechanizmusként ebben az esetben is hozzájárul a fototoxicitáshoz a ROS képződése, ugyanakkor a letalitáshoz nem elengedhetetlenül szükséges a molekuláris oxigén jelenléte [235]. Habár már több munkacsoport is kimutatta, hogy a PARP-1 szerepet játszik az UVC sugárzás által kiváltott DNS károsodások kijavításában, a NER hibajavító rendszeren keresztül, a PUVA által kiváltott sejthalálban ezidáig még nem tanulmányozták a szerepét.

Az általunk választott PUVA modellben a pszoralén típusú vegyület a 8-MOP volt, melyet hosszú hullámhosszúságú UVA sugárzással kombináltunk.

Eredeti elképzelésünk szerint a PARP gátlása fokozta volna a PUVA kezelés citotoxicitását a DNS hibajavítás gátlása által. Az alaphipotézisünk már a kísérleti kivitelezés korai szakaszában megdőlt, ugyanis a PARP-1 siRNS általi 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 PUVA kezelés által kiváltott sejthalál mértékét (16. ábra). 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. Az eredmény olyan szempontból nem okozott meglepetést, hogy a Veliparib, a PARP-1 csendesítéshez hasonlóan, nem volt semmilyen befolyással a PUVA kezelés által kiváltott sejthalál mértékére. Ugyanakkor a PJ-34 PARP gátlószerrel végzett kísérletek eredménye szerint a szer nem csak, hogy a 8-MOP fototoxicitását növelte, de alacsony dózissal ($2,5 \text{ J/cm}^2$) UVA sugárzással kombinálva önmagában is toxikus hatású volt, melynek mértéke vetekedett a pszoralén vegyület citotoxicitásával (18. ábra). Fontos volt a kísérletek helyes kiértékelése szempontjából az a tény, hogy habár a Veliparib már alacsonyabb koncentrációban is hatásosnak bizonyult a PARP enzim gátlása során, szemben a PJ-34

gátlószerrel, de ebben a kísérletsorozatban mégis azonos koncentrációban alkalmaztuk őket (10 μ M) (17. ábra).

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 (24. ábra).

Kimutattuk továbbá, hogy a PJ-34 nem csak monolayer sejtkultúrában citotoxikus hatású UVA sugárzással kombinálva, hanem úgynevezett szferoid kultúrában is szignifikáns sejtpusztulást okoz (19. ábra). A szferoid modell egy olyan 3D sejtkultúra, melyet gyakran alkalmaznak többek között fényérzékenyítők hatásának tanulmányozására. A szferoid egy avaszkuláris mikrotumornak feleltethető meg, mellyel például fényérzékenyítők olyan jellemzőit lehet vizsgálni, mint a sejt általi felvételük, a penetráció hatékonysága több sejtrétegen keresztül, vagy a folyamat oxigénfüggése a sejtpusztulás lokalizációja alapján (a perifériás területek vagy mélyebb rétegek is érintve vannak-e)[236]. Annak érdekében, hogy megvilágítsuk, hogy a PJ-34 fényérzékenyítő hatása fotodinámias jellegű-e, megvizsgáltuk a ROS szerepét az általa kiváltott sejthalál során.

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, vagyis a ROS mennyiségét a sötét kontrollok szintjére redukálták. Ennek ellenére, ezek a hatékonyan működő antioxidánsok nem befolyásolták az UVA+PJ-34 kezelés hatására bekövetkező életképesség csökkenés mértékét (20. ábra). A kísérlet eredménye alapján arra következtethetünk, hogy az UVA+PJ-34 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 [237].

Továbbiakban kimutattuk, hogy a PJ-34, 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 az UVA + Veliparib kezelés estében egyáltalán nem detektálható. Az egyszeres DNS törést követően Western blot analízis segítségével 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 szignifikáns mértékű foszforilációját (21. ábra). 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 [227]. 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 [238] [239]. 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.

A PUVA és főleg a PDT az irodalom szerint a sejthalál formák szinte minden típusát képesek aktiválni, akár több folyamatot is elindíthatnak egy időben ezzel fokozva saját citotoxicitásukat [240]. Az UVA+PJ-34 kezelés hatására alacsony LDH felszabadulást mértünk, tehát a nekrozist, mint fő sejthalál formát korán elvetettük. Az apoptózis markerek vizsgálata azonban pozitív eredménnyel zárult. A csak UVA sugárzás vagy az UVA+ Veliparib kezelés egyik, alább részletezett, apoptotikus marker szignifikáns emelkedését sem váltotta ki, ahogy korábban életképesség csökkenést és DNS károsodást sem indukáltak.

Az UVA+PJ-34 kezelés hatására megnőtt a kaszpáz -3 enzim aktivitása, ebből következően sikerült hasított PARP-1 enzimet detektálni, mely szintén egy gyakorlatban alkalmazott apoptotikus marker. 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 (22. ábra). Az iniciátor kaszpázok 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 sejthalál-receptorokból kiinduló útvonal is része lehet a fototoxicitásnak. Az UVA sugárzás önmagában és az UVA+Veliparib kezelés nem volt hatással a kaszpáz-8 enzim aktivitására. A kaszpázgátlószerek alkalmazása, melyek vagy általános gátlószerek, 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 (23. ábra).

NMR spektroszkópia segítségével kimutattuk, hogy az UVA sugárzás módosulást indukál a PJ-34 szerkezetében, melynek nagy valószínűséggel szerepe van a felsorolt fototoxikus hatások létrejöttében (24. ábra). Habár arra vonatkozóan nincsenek információink, hogy a PJ-34 PARP gátlószer pontosan hogyan vált ki 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 az UVA sugárzás alatt a szerkezet módosulás ellenére sem veszíti el PARP gátló hatását, hozzájárulhat ahhoz, hogy az általa kiváltott DNS károsodások végő soron apoptózist váltanak ki, azok kijavíthatása helyett.

8. KONKLÚZIÓK

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 gátlószerrel 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 apoptózis, mind a nekrosis markerek csökkenését eredményezi, valamint csökkenti az UV sugárzás hatására keletkező hidrogén-peroxid mennyiségét

A PJ-34 PARilációtól független fotogenotoxikus hatásának jellemzése

1. A PARP-1 csendesítése vagy a PARP Veliparibbal történő farmakológiai gátlása, 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 specifitású kaspáz gátlószerekkel csökkenthető.
5. A PJ-34 szerkezete változik az UVA sugárzás alatt, ugyanakkor PARP gátló hatása változatlan marad.

9. ÖSSZEFOGLALÁS

A poli-ADP-ribóz polimeráz – 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 pszorálen 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.

10. SUMMARY

Poly(ADP-ribose) polymerase – 1 (PARP-1) has diverse biological functions including has an important role in different types of DNA repair mechanisms: base excision repair, nucleotid excision repair, homologous recombination and in non-homologous recombination system. In these mechanisms the role of PARP has been investigated, but it is still not fully elucidated.

The sunlight of different wavelength can cause many types of DNA damage in the exposed cells. These DNA photolesions can be starting points of different types of skin cancer if the DNA repair is not complete. In the first part of the project we aimed to investigate the possible role of PARP-1 or PARylation in UVB-induced cell death. We found that specific silencing or pharmacological inhibition of PARP-1 sensitized HaCaT cells or normal human epidermal keratinocytes to UVB irradiation. This sensitizing effect likely stems from the decreased DNA repair caused by PARP silencing or inhibition. We showed that the PARP inhibitor 3-aminobenzamide (3-AB) has a PARP independent protective effect against UVB or UVA irradiation. It provides short- and long-term protection to primary keratinocytes against UV-induced necrosis and apoptosis as well. Moreover, our findings indicate that the protective effect of 3-AB has a PARP independent mechanism and data suggest that a sunscreen-like effect or presumable radical scavenger activity of 3-AB contributes to the protection.

A combination of a psoralen (P) with light of matching wavelength (UVA) is a common treatment modality in various diseases including psoriasis. PUVA treatment can be mutagenic due to PUVA-induced DNA damage. The silencing of PARP-1 and pharmacological inhibition by Veliparib had no significant effect to the cell viability during UVA irradiation or PUVA treatment. Surprisingly, PJ-34 triggered the phototoxic effect of PUVA and it acts as a photosensitizer when combined with low dose of UVA. This phototoxic effect includes DNA single and double strand breaks and induction of apoptosis. Specific caspase inhibitors significantly but not completely decreased the phototoxic effect of PJ-34+UVA treatment. Irradiation of PJ-34 with UVA caused changes both in the UV absorption and in the ¹H NMR spectra of the compound. These structural changes do not influence the PARP inhibitory ability of PJ-34 but probably it increases its phototoxic effect.

11. IRODALOMJEGYZÉK

1. Henriksen, T., et al., *Ultraviolet-radiation and skin cancer. Effect of an ozone layer depletion*. Photochem Photobiol, 1990. **51**(5): p. 579-82.
2. Tran, T.T., J. Schulman, and D.E. Fisher, *UV and pigmentation: molecular mechanisms and social controversies*. Pigment Cell Melanoma Res, 2008. **21**(5): p. 509-16.
3. Nair, R. and A. Maseeh, *Vitamin D: The "sunshine" vitamin*. J Pharmacol Pharmacother, 2012. **3**(2): p. 118-26.
4. Rittie, L. and G.J. Fisher, *UV-light-induced signal cascades and skin aging*. Ageing Res Rev, 2002. **1**(4): p. 705-20.
5. D'Orazio, J., et al., *UV radiation and the skin*. Int J Mol Sci, 2013. **14**(6): p. 12222-48.
6. Svobodova, A.R., et al., *Acute exposure to solar simulated ultraviolet radiation affects oxidative stress-related biomarkers in skin, liver and blood of hairless mice*. Biol Pharm Bull, 2011. **34**(4): p. 471-9.
7. Ichihashi, M., et al., *UV-induced skin damage*. Toxicology, 2003. **189**(1-2): p. 21-39.
8. Besaratinia, A., et al., *Wavelength dependence of ultraviolet radiation-induced DNA damage as determined by laser irradiation suggests that cyclobutane pyrimidine dimers are the principal DNA lesions produced by terrestrial sunlight*. FASEB J, 2011. **25**(9): p. 3079-91.
9. 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.
10. Mitchell, D.L., J. Jen, and J.E. Cleaver, *Sequence specificity of cyclobutane pyrimidine dimers in DNA treated with solar (ultraviolet B) radiation*. Nucleic Acids Res, 1992. **20**(2): p. 225-9.
11. Mukhopadhyay, P., et al., *Murine melanomas accelerated by a single UVR exposure carry photoproduct footprints but lack UV signature C>T mutations in critical genes*. Oncogene, 2016. **35**(25): p. 3342-50.
12. Barak, Y., O. Cohen-Fix, and Z. Livneh, *Deamination of cytosine-containing pyrimidine photodimers in UV-irradiated DNA. Significance for UV light mutagenesis*. J Biol Chem, 1995. **270**(41): p. 24174-9.

13. 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.
14. Wurtmann, E.J. and S.L. Wolin, *RNA under attack: cellular handling of RNA damage*. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2009. **44**(1): p. 34-49.
15. Polimova, A.M., et al., *[Antioxidants as aromatic amino acid oxidation products]*. Biofizika, 2011. **56**(4): p. 581-6.
16. Neves-Petersen, M.T., et al., *High probability of disrupting a disulphide bridge mediated by an endogenous excited tryptophan residue*. Protein Sci, 2002. **11**(3): p. 588-600.
17. Pamplona, R., *Membrane phospholipids, lipoxidative damage and molecular integrity: a causal role in aging and longevity*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1777**(10): p. 1249-62.
18. Cadet, J. and T. Douki, *Oxidatively generated damage to DNA by UVA radiation in cells and human skin*. J Invest Dermatol, 2011. **131**(5): p. 1005-7.
19. Perdiz, D., et al., *Distribution and repair of bipyrimidine photoproducts in solar UV-irradiated mammalian cells. Possible role of Dewar photoproducts in solar mutagenesis*. J Biol Chem, 2000. **275**(35): p. 26732-42.
20. Gaboriau, F., et al., *Membrane damage induced in cultured human skin fibroblasts by UVA irradiation*. Photochem Photobiol, 1993. **58**(4): p. 515-20.
21. Bose, B., S. Agarwal, and S.N. Chatterjee, *UV-A induced lipid peroxidation in liposomal membrane*. Radiat Environ Biophys, 1989. **28**(1): p. 59-65.
22. Redmond, R.W., et al., *Melanocytes are selectively vulnerable to UVA-mediated bystander oxidative signaling*. J Invest Dermatol, 2014. **134**(4): p. 1083-90.
23. Greinert, R., et al., *UVA-induced DNA double-strand breaks result from the repair of clustered oxidative DNA damages*. Nucleic Acids Res, 2012. **40**(20): p. 10263-73.
24. Kvam, E. and R.M. Tyrrell, *Induction of oxidative DNA base damage in human skin cells by UV and near visible radiation*. Carcinogenesis, 1997. **18**(12): p. 2379-84.
25. De Zio, D., V. Cianfanelli, and F. Cecconi, *New insights into the link between DNA damage and apoptosis*. Antioxid Redox Signal, 2013. **19**(6): p. 559-71.
26. Sinha, R.P. and D.P. Hader, *UV-induced DNA damage and repair: a review*. Photochem Photobiol Sci, 2002. **1**(4): p. 225-36.

27. Sugasawa, K., *Xeroderma pigmentosum genes: functions inside and outside DNA repair*. Carcinogenesis, 2008. **29**(3): p. 455-65.
28. Daya-Grosjean, L., *Xeroderma pigmentosum and skin cancer*. Adv Exp Med Biol, 2008. **637**: p. 19-27.
29. Yeeles, J.T., et al., *Rescuing stalled or damaged replication forks*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2013. **5**(5): p. a012815.
30. Artiukhov, V.G., et al., *[Apoptosis and necrosis of lymphocytes induced by UV-radiation in the presence of autological plasma]*. Tsitologiya, 2014. **56**(1): p. 77-83.
31. Bayerl, C., et al., *Characterization of sunburn cells after exposure to ultraviolet light*. Photodermatol Photoimmunol Photomed, 1995. **11**(4): p. 149-54.
32. Lee, C.H., et al., *Molecular Mechanisms of UV-Induced Apoptosis and Its Effects on Skin Residential Cells: The Implication in UV-Based Phototherapy*. Int J Mol Sci, 2013. **14**(3): p. 6414-35.
33. Assefa, Z., et al., *Ultraviolet radiation-induced apoptosis in keratinocytes: on the role of cytosolic factors*. Biochim Biophys Acta, 2005. **1755**(2): p. 90-106.
34. Takahashi, H., A. Ishida-Yamamoto, and H. Iizuka, *Ultraviolet B irradiation induces apoptosis of keratinocytes by direct activation of Fas antigen*. J Investig Dermatol Symp Proc, 2001. **6**(1): p. 64-8.
35. Smith, M.L. and Y.R. Seo, *p53 regulation of DNA excision repair pathways*. Mutagenesis, 2002. **17**(2): p. 149-56.
36. Bang, B., et al., *In vivo UVB irradiation induces clustering of Fas (CD95) on human epidermal cells*. Exp Dermatol, 2003. **12**(6): p. 791-8.
37. Waring, P. and A. Mullbacher, *Cell death induced by the Fas/Fas ligand pathway and its role in pathology*. Immunol Cell Biol, 1999. **77**(4): p. 312-7.
38. Aragane, Y., et al., *Ultraviolet light induces apoptosis via direct activation of CD95 (Fas/APO-1) independently of its ligand CD95L*. J Cell Biol, 1998. **140**(1): p. 171-82.
39. Qin, J.Z., et al., *Pathways involved in proliferating, senescent and immortalized keratinocyte cell death mediated by two different TRAIL preparations*. Exp Dermatol, 2002. **11**(6): p. 573-83.
40. Qin, J.Z., et al., *Low-dose UV-radiation sensitizes keratinocytes to TRAIL-induced apoptosis*. J Cell Physiol, 2004. **200**(1): p. 155-66.

41. Sitailo, L.A., S.S. Tibudan, and M.F. Denning, *Activation of caspase-9 is required for UV-induced apoptosis of human keratinocytes*. J Biol Chem, 2002. **277**(22): p. 19346-52.
42. Naik, E., et al., *Ultraviolet radiation triggers apoptosis of fibroblasts and skin keratinocytes mainly via the BH3-only protein Noxa*. J Cell Biol, 2007. **176**(4): p. 415-24.
43. Zheng, J., et al., *Photo-protective effect of americanin B against ultraviolet B-induced damage in cultured human keratinocytes*. Environ Toxicol Pharmacol, 2014. **38**(3): p. 891-900.
44. Hemann, M.T. and S.W. Lowe, *The p53-Bcl-2 connection*. Cell Death Differ, 2006. **13**(8): p. 1256-9.
45. Shindo, Y. and T. Hashimoto, *Time course of changes in antioxidant enzymes in human skin fibroblasts after UVA irradiation*. J Dermatol Sci, 1997. **14**(3): p. 225-32.
46. 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.
47. Ananthaswamy, H.N. and W.E. Pierceall, *Molecular mechanisms of ultraviolet radiation carcinogenesis*. Photochem Photobiol, 1990. **52**(6): p. 1119-36.
48. Ravanat, J.L., T. Douki, and J. Cadet, *Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components*. J Photochem Photobiol B, 2001. **63**(1-3): p. 88-102.
49. Anna, B., et al., *Mechanism of UV-related carcinogenesis and its contribution to nevi/melanoma*. Expert Rev Dermatol, 2007. **2**(4): p. 451-469.
50. Nakazawa, H., et al., *UV and skin cancer: specific p53 gene mutation in normal skin as a biologically relevant exposure measurement*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(1): p. 360-4.
51. Yin, Y. and T.D. Petes, *Recombination between homologous chromosomes induced by unrepaired UV-generated DNA damage requires Mus81p and is suppressed by Mms2p*. PLoS Genet, 2015. **11**(3): p. e1005026.
52. Roschke, A.V. and E. Rozenblum, *Multi-layered cancer chromosomal instability phenotype*. Front Oncol, 2013. **3**: p. 302.
53. Kato, M., et al., *Ultraviolet light induces redox reaction-mediated dimerization and superactivation of oncogenic Ret tyrosine kinases*. Mol Biol Cell, 2000. **11**(1): p. 93-101.

54. Roddey, P.K., et al., *Ultraviolet irradiation induces c-fos but not c-Ha-ras proto-oncogene expression in human epidermis*. J Invest Dermatol, 1994. **102**(3): p. 296-9.
55. Takahashi, Y., et al., *Decreased gene expression responsible for post-ultraviolet DNA repair synthesis in aging: a possible mechanism of age-related reduction in DNA repair capacity*. J Invest Dermatol, 2005. **124**(2): p. 435-42.
56. Moan, J., et al., *The relationship between UV exposure and incidence of skin cancer*. Photodermatol Photoimmunol Photomed, 2015. **31**(1): p. 26-35.
57. Venza, M., et al., *Cellular Mechanisms of Oxidative Stress and Action in Melanoma*. Oxid Med Cell Longev, 2015. **2015**: p. 481782.
58. Zhao, B., et al., *Distinct Role of Sesn2 in Response to UVB-Induced DNA Damage and UVA-Induced Oxidative Stress in Melanocytes*. Photochem Photobiol, 2016.
59. Jhappan, C., F.P. Noonan, and G. Merlino, *Ultraviolet radiation and cutaneous malignant melanoma*. Oncogene, 2003. **22**(20): p. 3099-112.
60. Budden, T., et al., *Repair of UVB-induced DNA damage is reduced in melanoma due to low XPC and global genome repair*. Oncotarget, 2016.
61. Bowden, N.A., et al., *Nucleotide excision repair gene expression after Cisplatin treatment in melanoma*. Cancer Res, 2010. **70**(20): p. 7918-26.
62. Kim, Y. and Y.Y. He, *Ultraviolet radiation-induced non-melanoma skin cancer: Regulation of DNA damage repair and inflammation*. Genes Dis, 2014. **1**(2): p. 188-198.
63. Drouin, R. and J.P. Therrien, *UVB-induced cyclobutane pyrimidine dimer frequency correlates with skin cancer mutational hotspots in p53*. Photochem Photobiol, 1997. **66**(5): p. 719-26.
64. Berman, B. and C.J. Cockerell, *Pathobiology of actinic keratosis: ultraviolet-dependent keratinocyte proliferation*. J Am Acad Dermatol, 2013. **68**(1 Suppl 1): p. S10-9.
65. Fuchs, A. and E. Marmur, *The kinetics of skin cancer: progression of actinic keratosis to squamous cell carcinoma*. Dermatol Surg, 2007. **33**(9): p. 1099-101.
66. Zheng, W., et al., *Evidence-based review of photodynamic therapy in the treatment of acne*. Eur J Dermatol, 2014. **24**(4): p. 444-56.
67. Dalla Via, L. and S. Marciani Magno, *Photochemotherapy in the treatment of cancer*. Curr Med Chem, 2001. **8**(12): p. 1405-18.

68. Biel, M.A., *Photodynamic therapy in head and neck cancer*. Curr Oncol Rep, 2002. **4**(1): p. 87-96.
69. Tandon, Y.K., M.F. Yang, and E.D. Baron, *Role of photodynamic therapy in psoriasis: a brief review*. Photodermatol Photoimmunol Photomed, 2008. **24**(5): p. 222-30.
70. Valkova, S. and A. Velkova, *UVA/UVB phototherapy for atopic dermatitis revisited*. J Dermatolog Treat, 2004. **15**(4): p. 239-44.
71. Robertson, C.A., D.H. Evans, and H. Abrahamse, *Photodynamic therapy (PDT): a short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT*. J Photochem Photobiol B, 2009. **96**(1): p. 1-8.
72. Ethirajan, M., et al., *The role of porphyrin chemistry in tumor imaging and photodynamic therapy*. Chem Soc Rev, 2011. **40**(1): p. 340-62.
73. Gorman, S.A., S.B. Brown, and J. Griffiths, *An overview of synthetic approaches to porphyrin, phthalocyanine, and phenothiazine photosensitizers for photodynamic therapy*. J Environ Pathol Toxicol Oncol, 2006. **25**(1-2): p. 79-108.
74. Allison, R.R. and K. Moghissi, *Photodynamic Therapy (PDT): PDT Mechanisms*. Clin Endosc, 2013. **46**(1): p. 24-9.
75. Kolarova, H., et al., *Production of reactive oxygen species after photodynamic therapy by porphyrin sensitizers*. Gen Physiol Biophys, 2008. **27**(2): p. 101-5.
76. Triesscheijn, M., et al., *Photodynamic therapy in oncology*. Oncologist, 2006. **11**(9): p. 1034-44.
77. Moserova, I. and J. Kralova, *Role of ER stress response in photodynamic therapy: ROS generated in different subcellular compartments trigger diverse cell death pathways*. PLoS One, 2012. **7**(3): p. e32972.
78. Separovic, D., K.J. Mann, and N.L. Oleinick, *Association of ceramide accumulation with photodynamic treatment-induced cell death*. Photochem Photobiol, 1998. **68**(1): p. 101-9.
79. Kessel, D. and R.D. Poretz, *Sites of photodamage induced by photodynamic therapy with a chlorin e6 triacetoxymethyl ester (CAME)*. Photochem Photobiol, 2000. **71**(1): p. 94-6.
80. Reiners, J.J., Jr., et al., *Assessing autophagy in the context of photodynamic therapy*. Autophagy, 2010. **6**(1): p. 7-18.

81. Moan, J. and Q. Peng, *An outline of the hundred-year history of PDT*. Anticancer Res, 2003. **23**(5A): p. 3591-600.
82. Reginato, E., P. Wolf, and M.R. Hamblin, *Immune response after photodynamic therapy increases anti-cancer and anti-bacterial effects*. World J Immunol, 2014. **4**(1): p. 1-11.
83. Engbrecht, B.W., et al., *Photofrin-mediated photodynamic therapy induces vascular occlusion and apoptosis in a human sarcoma xenograft model*. Cancer Res, 1999. **59**(17): p. 4334-42.
84. Qiao, L., et al., *ALA-PDT inhibits proliferation and promotes apoptosis of SCC cells through STAT3 signal pathway*. Photodiagnosis Photodyn Ther, 2016. **14**: p. 66-73.
85. Quirk, B.J., et al., *Photodynamic therapy (PDT) for malignant brain tumors--where do we stand?* Photodiagnosis Photodyn Ther, 2015. **12**(3): p. 530-44.
86. Huang, Z., et al., *Photodynamic therapy for treatment of solid tumors--potential and technical challenges*. Technol Cancer Res Treat, 2008. **7**(4): p. 309-20.
87. Almutawa, F., et al., *Systematic review of UV-based therapy for psoriasis*. Am J Clin Dermatol, 2013. **14**(2): p. 87-109.
88. Bickers, D.R., et al., *The effect of psoralens on hepatic and cutaneous drug metabolizing enzymes and cytochrome P-450*. J Invest Dermatol, 1982. **79**(3): p. 201-5.
89. Pathak, M.A. and P.C. Joshi, *The nature and molecular basis of cutaneous photosensitivity reactions to psoralens and coal tar*. J Invest Dermatol, 1983. **80**(1 Suppl): p. 66s-74s.
90. Couve-Privat, S., et al., *Psoralen-induced DNA adducts are substrates for the base excision repair pathway in human cells*. Nucleic Acids Res, 2007. **35**(17): p. 5672-82.
91. Frobel, S., et al., *DNA Intercalated Psoralen Undergoes Efficient Photoinduced Electron Transfer*. J Phys Chem Lett, 2015. **6**(7): p. 1260-4.
92. Sastry, S.S., B.M. Ross, and A. P'Arraga, *Cross-linking of DNA-binding proteins to DNA with psoralen and psoralen furan-side monoadducts. Comparison of action spectra with DNA-DNA cross-linking*. J Biol Chem, 1997. **272**(6): p. 3715-23.
93. Briganti, S., et al., *Small molecular antioxidants effectively protect from PUVA-induced oxidative stress responses underlying fibroblast senescence and photoaging*. Free Radic Biol Med, 2008. **45**(5): p. 636-44.

94. Stern, R.S. and P.F.-U. Study, *The risk of squamous cell and basal cell cancer associated with psoralen and ultraviolet A therapy: a 30-year prospective study*. J Am Acad Dermatol, 2012. **66**(4): p. 553-62.
95. Gaspar, L.R. and P.M. Maia Campos, *Evaluation of the photostability of different UV filter combinations in a sunscreen*. Int J Pharm, 2006. **307**(2): p. 123-8.
96. Stephens, T.J., et al., *The impact of natural sunlight exposure on the UVB-sun protection factor (UVB-SPF) and UVA protection factor (UVA-PF) of a UVA/UVB SPF 50 sunscreen*. J Drugs Dermatol, 2011. **10**(2): p. 150-5.
97. Serpone, N., et al., *An in vitro systematic spectroscopic examination of the photostabilities of a random set of commercial sunscreen lotions and their chemical UVB/UVA active agents*. Photochem Photobiol Sci, 2002. **1**(12): p. 970-81.
98. Smijs, T.G. and S. Pavel, *Titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles in sunscreens: focus on their safety and effectiveness*. Nanotechnol Sci Appl, 2011. **4**: p. 95-112.
99. Newman, M.D., M. Stotland, and J.I. Ellis, *The safety of nanosized particles in titanium dioxide- and zinc oxide-based sunscreens*. J Am Acad Dermatol, 2009. **61**(4): p. 685-92.
100. Wong, T. and D. Orton, *Sunscreen allergy and its investigation*. Clin Dermatol, 2011. **29**(3): p. 306-10.
101. Lademann, J., et al., *Synergy effects between organic and inorganic UV filters in sunscreens*. J Biomed Opt, 2005. **10**(1): p. 14008.
102. Korac, R.R. and K.M. Khambholja, *Potential of herbs in skin protection from ultraviolet radiation*. Pharmacogn Rev, 2011. **5**(10): p. 164-73.
103. Carducci, M., et al., *Comparative Effects of Sunscreens Alone vs Sunscreens Plus DNA Repair Enzymes in Patients With Actinic Keratosis: Clinical and Molecular Findings from a 6-Month, Randomized, Clinical Study*. J Drugs Dermatol, 2015. **14**(9): p. 986-90.
104. Vyas, S., et al., *A systematic analysis of the PARP protein family identifies new functions critical for cell physiology*. Nat Commun, 2013. **4**: p. 2240.
105. Ame, J.C., C. Spenlehauer, and G. de Murcia, *The PARP superfamily*. Bioessays, 2004. **26**(8): p. 882-93.
106. Kim, M.Y., T. Zhang, and W.L. Kraus, *Poly(ADP-ribosyl)ation by PARP-1: 'PAR-laying' NAD⁺ into a nuclear signal*. Genes Dev, 2005. **19**(17): p. 1951-67.

107. Agarwal, A., et al., *Potential biological role of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) in male gametes*. Reprod Biol Endocrinol, 2009. **7**: p. 143.
108. Eustermann, S., et al., *Structural Basis of Detection and Signaling of DNA Single-Strand Breaks by Human PARP-1*. Mol Cell, 2015. **60**(5): p. 742-54.
109. D'Amours, D., et al., *Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions*. Biochem J, 1999. **342 (Pt 2)**: p. 249-68.
110. Langelier, M.F., et al., *Crystal structures of poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) zinc fingers bound to DNA: structural and functional insights into DNA-dependent PARP-1 activity*. J Biol Chem, 2011. **286**(12): p. 10690-701.
111. Rajiah, I.R. and J. Skepper, *Differential localisation of PARP-1 N-terminal fragment in PARP-1(+/+) and PARP-1(-/-) murine cells*. Mol Cells, 2014. **37**(7): p. 526-31.
112. Decker, P., D. Isenberg, and S. Muller, *Inhibition of caspase-3-mediated poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) apoptotic cleavage by human PARP autoantibodies and effect on cells undergoing apoptosis*. J Biol Chem, 2000. **275**(12): p. 9043-6.
113. Langelier, M.F., et al., *A third zinc-binding domain of human poly(ADP-ribose) polymerase-1 coordinates DNA-dependent enzyme activation*. J Biol Chem, 2008. **283**(7): p. 4105-14.
114. Eustermann, S., et al., *The DNA-binding domain of human PARP-1 interacts with DNA single-strand breaks as a monomer through its second zinc finger*. J Mol Biol, 2011. **407**(1): p. 149-70.
115. Huen, M.S., S.M. Sy, and J. Chen, *BRCA1 and its toolbox for the maintenance of genome integrity*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010. **11**(2): p. 138-48.
116. Loeffler, P.A., et al., *Structural studies of the PARP-1 BRCT domain*. BMC Struct Biol, 2011. **11**: p. 37.
117. Langelier, M.F. and J.M. Pascal, *PARP-1 mechanism for coupling DNA damage detection to poly(ADP-ribose) synthesis*. Curr Opin Struct Biol, 2013. **23**(1): p. 134-43.
118. Burkle, A. and L. Virag, *Poly(ADP-ribose): PARadigms and PARadoxes*. Mol Aspects Med, 2013. **34**(6): p. 1046-65.
119. Oka, S., J. Kato, and J. Moss, *Identification and characterization of a mammalian 39-kDa poly(ADP-ribose) glycohydrolase*. J Biol Chem, 2006. **281**(2): p. 705-13.
120. Steffen, J.D. and J.M. Pascal, *New players to the field of ADP-ribosylation make the final cut*. EMBO J, 2013. **32**(9): p. 1205-7.

121. Pion, E., et al., *DNA-induced dimerization of poly(ADP-ribose) polymerase-1 triggers its activation*. Biochemistry, 2005. **44**(44): p. 14670-81.
122. Mansoorabadi, S.O., et al., *Conformational activation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 upon DNA binding revealed by small-angle X-ray scattering*. Biochemistry, 2014. **53**(11): p. 1779-88.
123. Alvarez-Gonzalez, R. and M.K. Jacobson, *Characterization of polymers of adenosine diphosphate ribose generated in vitro and in vivo*. Biochemistry, 1987. **26**(11): p. 3218-24.
124. Realini, C.A. and F.R. Althaus, *Histone shuttling by poly(ADP-ribosylation)*. J Biol Chem, 1992. **267**(26): p. 18858-65.
125. Leung, A.K., *Poly(ADP-ribose): an organizer of cellular architecture*. J Cell Biol, 2014. **205**(5): p. 613-9.
126. Teloni, F. and M. Altmeyer, *Readers of poly(ADP-ribose): designed to be fit for purpose*. Nucleic Acids Res, 2016. **44**(3): p. 993-1006.
127. Virag, L. and C. Szabo, *The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors*. Pharmacol Rev, 2002. **54**(3): p. 375-429.
128. Hassa, P.O., et al., *Nuclear ADP-ribosylation reactions in mammalian cells: where are we today and where are we going?* Microbiol Mol Biol Rev, 2006. **70**(3): p. 789-829.
129. Panzeter, P.L., C.A. Realini, and F.R. Althaus, *Noncovalent interactions of poly(adenosine diphosphate ribose) with histones*. Biochemistry, 1992. **31**(5): p. 1379-85.
130. Ko, H.L. and E.C. Ren, *Functional Aspects of PARP1 in DNA Repair and Transcription*. Biomolecules, 2012. **2**(4): p. 524-48.
131. Sugimura, K., et al., *PARP-1 ensures regulation of replication fork progression by homologous recombination on damaged DNA*. J Cell Biol, 2008. **183**(7): p. 1203-12.
132. Wei, H. and X. Yu, *Functions of PARylation in DNA Damage Repair Pathways*. Genomics Proteomics Bioinformatics, 2016. **14**(3): p. 131-9.
133. Martin-Oliva, D., et al., *Crosstalk between PARP-1 and NF-kappaB modulates the promotion of skin neoplasia*. Oncogene, 2004. **23**(31): p. 5275-83.
134. Ray Chaudhuri, A., et al., *Topoisomerase I poisoning results in PARP-mediated replication fork reversal*. Nat Struct Mol Biol, 2012. **19**(4): p. 417-23.

135. Hsu, F.M., S. Zhang, and B.P. Chen, *Role of DNA-dependent protein kinase catalytic subunit in cancer development and treatment*. Transl Cancer Res, 2012. **1**(1): p. 22-34.
136. Wielckens, K., et al., *Stimulation of poly(ADP-ribosyl)ation during Ehrlich ascites tumor cell "starvation" and suppression of concomitant DNA fragmentation by benzamide*. J Biol Chem, 1983. **258**(7): p. 4098-104.
137. Dantzer, F., et al., *Poly(ADP-ribose) polymerase-1 activation during DNA damage and repair*. Methods Enzymol, 2006. **409**: p. 493-510.
138. Lankinen, M.H., L.M. Vilpo, and J.A. Vilpo, *UV- and gamma-irradiation-induced DNA single-strand breaks and their repair in human blood granulocytes and lymphocytes*. Mutat Res, 1996. **352**(1-2): p. 31-8.
139. Ostling, O. and K.J. Johanson, *Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells*. Biochem Biophys Res Commun, 1984. **123**(1): p. 291-8.
140. Sundaram, K. and K.S. Panneerselvam, *Oxidative stress and DNA single strand breaks in skeletal muscle of aged rats: role of carnitine and lipoic acid*. Biogerontology, 2006. **7**(2): p. 111-8.
141. Kondo, N., et al., *DNA damage induced by alkylating agents and repair pathways*. J Nucleic Acids, 2010. **2010**: p. 543531.
142. Andreone, T.L., et al., *Poly(ADP-ribose) polymerase-1 regulates activation of activator protein-1 in murine fibroblasts*. J Immunol, 2003. **170**(4): p. 2113-20.
143. Metzger, M.J., B.L. Stoddard, and R.J. Monnat, Jr., *PARP-mediated repair, homologous recombination, and back-up non-homologous end joining-like repair of single-strand nicks*. DNA Repair (Amst), 2013. **12**(7): p. 529-34.
144. Lonskaya, I., et al., *Regulation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 by DNA structure-specific binding*. J Biol Chem, 2005. **280**(17): p. 17076-83.
145. Kauppinen, T.M., et al., *Direct phosphorylation and regulation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 by extracellular signal-regulated kinases 1/2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(18): p. 7136-41.
146. Zhang, S., et al., *c-Jun N-terminal kinase mediates hydrogen peroxide-induced cell death via sustained poly(ADP-ribose) polymerase-1 activation*. Cell Death Differ, 2007. **14**(5): p. 1001-10.

147. Hegedus, C., et al., *Protein kinase C protects from DNA damage-induced necrotic cell death by inhibiting poly(ADP-ribose) polymerase-1*. FEBS Lett, 2008. **582**(12): p. 1672-8.
148. Hassa, P.O., et al., *Acetylation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 by p300/CREB-binding protein regulates coactivation of NF-kappaB-dependent transcription*. J Biol Chem, 2005. **280**(49): p. 40450-64.
149. Loseva, O., et al., *PARP-3 is a mono-ADP-ribosylase that activates PARP-1 in the absence of DNA*. J Biol Chem, 2010. **285**(11): p. 8054-60.
150. Ba, X. and N.J. Garg, *Signaling mechanism of poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) in inflammatory diseases*. Am J Pathol, 2011. **178**(3): p. 946-55.
151. Robertson, A.B., et al., *DNA repair in mammalian cells: Base excision repair: the long and short of it*. Cell Mol Life Sci, 2009. **66**(6): p. 981-93.
152. Pleschke, J.M., et al., *Poly(ADP-ribose) binds to specific domains in DNA damage checkpoint proteins*. J Biol Chem, 2000. **275**(52): p. 40974-80.
153. Harris, J.L., et al., *Aprataxin, poly-ADP ribose polymerase 1 (PARP-1) and apurinic endonuclease 1 (APE1) function together to protect the genome against oxidative damage*. Hum Mol Genet, 2009. **18**(21): p. 4102-17.
154. Masaoka, A., et al., *DNA polymerase beta and PARP activities in base excision repair in living cells*. DNA Repair (Amst), 2009. **8**(11): p. 1290-9.
155. Leppard, J.B., et al., *Physical and functional interaction between DNA ligase IIIalpha and poly(ADP-Ribose) polymerase 1 in DNA single-strand break repair*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(16): p. 5919-27.
156. Heale, J.T., et al., *Condensin I interacts with the PARP-1-XRCC1 complex and functions in DNA single-strand break repair*. Mol Cell, 2006. **21**(6): p. 837-48.
157. Noren Hooten, N., et al., *Poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP-1) binds to 8-oxoguanine-DNA glycosylase (OGG1)*. J Biol Chem, 2011. **286**(52): p. 44679-90.
158. Vodenicharov, M.D., et al., *Base excision repair is efficient in cells lacking poly(ADP-ribose) polymerase 1*. Nucleic Acids Res, 2000. **28**(20): p. 3887-96.
159. Aguilar-Quesada, R., et al., *Interaction between ATM and PARP-1 in response to DNA damage and sensitization of ATM deficient cells through PARP inhibition*. BMC Mol Biol, 2007. **8**: p. 29.
160. Marechal, A. and L. Zou, *DNA damage sensing by the ATM and ATR kinases*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2013. **5**(9).

161. Haince, J.F., et al., *Ataxia telangiectasia mutated (ATM) signaling network is modulated by a novel poly(ADP-ribose)-dependent pathway in the early response to DNA-damaging agents*. J Biol Chem, 2007. **282**(22): p. 16441-53.
162. Huber, A., et al., *PARP-1, PARP-2 and ATM in the DNA damage response: functional synergy in mouse development*. DNA Repair (Amst), 2004. **3**(8-9): p. 1103-8.
163. Wang, M., et al., *PARP-1 and Ku compete for repair of DNA double strand breaks by distinct NHEJ pathways*. Nucleic Acids Res, 2006. **34**(21): p. 6170-82.
164. Fattah, F., et al., *Ku regulates the non-homologous end joining pathway choice of DNA double-strand break repair in human somatic cells*. PLoS Genet, 2010. **6**(2): p. e1000855.
165. de Laat, W.L., N.G. Jaspers, and J.H. Hoeijmakers, *Molecular mechanism of nucleotide excision repair*. Genes Dev, 1999. **13**(7): p. 768-85.
166. Purohit, N.K., et al., *Characterization of the interactions of PARP-1 with UV-damaged DNA in vivo and in vitro*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 19020.
167. Fischer, J.M., et al., *Poly(ADP-ribose)-mediated interplay of XPA and PARP1 leads to reciprocal regulation of protein function*. FEBS J, 2014. **281**(16): p. 3625-41.
168. Maltseva, E.A., et al., *Poly(ADP-ribose) Polymerase 1 Modulates Interaction of the Nucleotide Excision Repair Factor XPC-RAD23B with DNA via Poly(ADP-ribosylation)*. J Biol Chem, 2015. **290**(36): p. 21811-20.
169. Pines, A., et al., *PARP1 promotes nucleotide excision repair through DDB2 stabilization and recruitment of ALC1*. J Cell Biol, 2012. **199**(2): p. 235-49.
170. 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.
171. Carrozza, M.J., et al., *PARP inhibition during alkylation-induced genotoxic stress signals a cell cycle checkpoint response mediated by ATM*. DNA Repair (Amst), 2009. **8**(11): p. 1264-72.
172. Ha, H.C. and S.H. Snyder, *Poly(ADP-ribose) polymerase is a mediator of necrotic cell death by ATP depletion*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(24): p. 13978-82.
173. Alano, C.C., et al., *NAD⁺ depletion is necessary and sufficient for poly(ADP-ribose) polymerase-1-mediated neuronal death*. J Neurosci, 2010. **30**(8): p. 2967-78.
174. Erdelyi, K., et al., *Dual role of poly(ADP-ribose) glycohydrolase in the regulation of cell death in oxidatively stressed A549 cells*. FASEB J, 2009. **23**(10): p. 3553-63.

175. Chavez-Valdez, R., L.J. Martin, and F.J. Northington, *Programmed Necrosis: A Prominent Mechanism of Cell Death following Neonatal Brain Injury*. Neurol Res Int, 2012. **2012**: p. 257563.
176. Douglas, D.L. and C.P. Baines, *PARP1-mediated necrosis is dependent on parallel JNK and Ca(2)(+)/calpain pathways*. J Cell Sci, 2014. **127**(Pt 19): p. 4134-45.
177. Roos, W.P. and B. Kaina, *DNA damage-induced cell death by apoptosis*. Trends Mol Med, 2006. **12**(9): p. 440-50.
178. Chaitanya, G.V., A.J. Steven, and P.P. Babu, *PARP-1 cleavage fragments: signatures of cell-death proteases in neurodegeneration*. Cell Commun Signal, 2010. **8**: p. 31.
179. Boucher, D., V. Blais, and J.B. Denault, *Caspase-7 uses an exosite to promote poly(ADP ribose) polymerase 1 proteolysis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(15): p. 5669-74.
180. Ditsworth, D., W.X. Zong, and C.B. Thompson, *Activation of poly(ADP)-ribose polymerase (PARP-1) induces release of the pro-inflammatory mediator HMGB1 from the nucleus*. J Biol Chem, 2007. **282**(24): p. 17845-54.
181. Virag, L., A.L. Salzman, and C. Szabo, *Poly(ADP-ribose) synthetase activation mediates mitochondrial injury during oxidant-induced cell death*. J Immunol, 1998. **161**(7): p. 3753-9.
182. Virag, L., et al., *Peroxynitrite-induced thymocyte apoptosis: the role of caspases and poly (ADP-ribose) synthetase (PARS) activation*. Immunology, 1998. **94**(3): p. 345-55.
183. Payne, C.M., et al., *The stress-response proteins poly(ADP-ribose) polymerase and NF-kappaB protect against bile salt-induced apoptosis*. Cell Death Differ, 1998. **5**(7): p. 623-36.
184. Shiokawa, D., H. Maruta, and S. Tanuma, *Inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase suppress nuclear fragmentation and apoptotic-body formation during apoptosis in HL-60 cells*. FEBS Lett, 1997. **413**(1): p. 99-103.
185. Watson, A.J., J.N. Askew, and R.S. Benson, *Poly(adenosine diphosphate ribose) polymerase inhibition prevents necrosis induced by H₂O₂ but not apoptosis*. Gastroenterology, 1995. **109**(2): p. 472-82.
186. Wang, Z.Q., et al., *PARP is important for genomic stability but dispensable in apoptosis*. Genes Dev, 1997. **11**(18): p. 2347-58.

187. Oliver, F.J., et al., *Importance of poly(ADP-ribose) polymerase and its cleavage in apoptosis. Lesson from an uncleavable mutant*. J Biol Chem, 1998. **273**(50): p. 33533-9.
188. Weltin, D., et al., *Effect of 6(5H)-phenanthridinone, an inhibitor of poly(ADP-ribose) polymerase, on cultured tumor cells*. Oncol Res, 1994. **6**(9): p. 399-403.
189. Griffin, R.J., et al., *The role of inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase as resistance-modifying agents in cancer therapy*. Biochimie, 1995. **77**(6): p. 408-22.
190. Durkacz, B.W., S. Shall, and J. Irwin, *The effect of inhibition of (ADP-ribose)n biosynthesis on DNA repair assayed by the nucleoid technique*. Eur J Biochem, 1981. **121**(1): p. 65-9.
191. Farmer, H., et al., *Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy*. Nature, 2005. **434**(7035): p. 917-21.
192. Kaelin, W.G., Jr., *The concept of synthetic lethality in the context of anticancer therapy*. Nat Rev Cancer, 2005. **5**(9): p. 689-98.
193. Luo, J., N.L. Solimini, and S.J. Elledge, *Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction*. Cell, 2009. **136**(5): p. 823-37.
194. Peltomaki, P., *DNA mismatch repair gene mutations in human cancer*. Environ Health Perspect, 1997. **105 Suppl 4**: p. 775-80.
195. Muller, P.A. and K.H. Vousden, *p53 mutations in cancer*. Nat Cell Biol, 2013. **15**(1): p. 2-8.
196. Zhang, L., et al., *Alteration of the ATM gene occurs in gastric cancer cell lines and primary tumors associated with cellular response to DNA damage*. Mutat Res, 2004. **557**(1): p. 41-51.
197. Guarini, A., et al., *ATM gene alterations in chronic lymphocytic leukemia patients induce a distinct gene expression profile and predict disease progression*. Haematologica, 2012. **97**(1): p. 47-55.
198. Weston, V.J., et al., *The PARP inhibitor olaparib induces significant killing of ATM-deficient lymphoid tumor cells in vitro and in vivo*. Blood, 2010. **116**(22): p. 4578-87.
199. Cancer Genome Atlas, N., *Comprehensive molecular portraits of human breast tumours*. Nature, 2012. **490**(7418): p. 61-70.
200. Bonneau, D. and M. Longy, *Mutations of the human PTEN gene*. Hum Mutat, 2000. **16**(2): p. 109-22.

201. Mendes-Pereira, A.M., et al., *Synthetic lethal targeting of PTEN mutant cells with PARP inhibitors*. EMBO Mol Med, 2009. **1**(6-7): p. 315-22.
202. Helleday, T., *The underlying mechanism for the PARP and BRCA synthetic lethality: clearing up the misunderstandings*. Mol Oncol, 2011. **5**(4): p. 387-93.
203. Ekblad, T., et al., *PARP inhibitors: polypharmacology versus selective inhibition*. FEBS J, 2013. **280**(15): p. 3563-75.
204. Patel, A.G., J.N. Sarkaria, and S.H. Kaufmann, *Nonhomologous end joining drives poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitor lethality in homologous recombination-deficient cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(8): p. 3406-11.
205. Murai, J., et al., *Trapping of PARP1 and PARP2 by Clinical PARP Inhibitors*. Cancer Res, 2012. **72**(21): p. 5588-99.
206. Shen, Y., M. Aoyagi-Scharber, and B. Wang, *Trapping Poly(ADP-Ribose) Polymerase*. J Pharmacol Exp Ther, 2015. **353**(3): p. 446-57.
207. Hopkins, T.A., et al., *Mechanistic Dissection of PARP1 Trapping and the Impact on In Vivo Tolerability and Efficacy of PARP Inhibitors*. Mol Cancer Res, 2015. **13**(11): p. 1465-77.
208. Song, H., S.P. Yoon, and J. Kim, *Poly(ADP-ribose) polymerase regulates glycolytic activity in kidney proximal tubule epithelial cells*. Anat Cell Biol, 2016. **49**(2): p. 79-87.
209. Beneke, S., et al., *Rapid regulation of telomere length is mediated by poly(ADP-ribose) polymerase-1*. Nucleic Acids Res, 2008. **36**(19): p. 6309-17.
210. Rajesh, M., et al., *Poly(ADP-ribose)polymerase inhibition decreases angiogenesis*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **350**(4): p. 1056-62.
211. Xie, J.J., et al., *Poly (ADP-Ribose) polymerase inhibition attenuates atherosclerotic plaque development in ApoE^{-/-} mice with hyperhomocysteinemia*. J Atheroscler Thromb, 2009. **16**(5): p. 641-53.
212. Madinier, A., et al., *Microglial involvement in neuroplastic changes following focal brain ischemia in rats*. PLoS One, 2009. **4**(12): p. e8101.
213. El-Hamoly, T., et al., *3-aminobenzamide, a poly (ADP ribose) polymerase inhibitor, enhances wound healing in whole body gamma irradiated model*. Wound Repair Regen, 2015. **23**(5): p. 672-84.

214. Meng, X., et al., *3-aminobenzamide, one of poly(ADP-ribose)polymerase-1 inhibitors, rescues apoptosis in rat models of spinal cord injury*. Int J Clin Exp Pathol, 2015. **8**(10): p. 12207-15.
215. Abdelkarim, G.E., et al., *Protective effects of PJ34, a novel, potent inhibitor of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) in in vitro and in vivo models of stroke*. Int J Mol Med, 2001. **7**(3): p. 255-60.
216. Huang, S.H., et al., *PJ34, an inhibitor of PARP-1, suppresses cell growth and enhances the suppressive effects of cisplatin in liver cancer cells*. Oncol Rep, 2008. **20**(3): p. 567-72.
217. Chevanne, M., et al., *Inhibition of PARP activity by PJ-34 leads to growth impairment and cell death associated with aberrant mitotic pattern and nucleolar actin accumulation in M14 melanoma cell line*. J Cell Physiol, 2010. **222**(2): p. 401-10.
218. Madison, D.L., D. Stauffer, and J.R. Lundblad, *The PARP inhibitor PJ34 causes a PARP1-independent, p21 dependent mitotic arrest*. DNA Repair (Amst), 2011. **10**(10): p. 1003-13.
219. Kummar, S., et al., *Phase I study of PARP inhibitor ABT-888 in combination with topotecan in adults with refractory solid tumors and lymphomas*. Cancer Res, 2011. **71**(17): p. 5626-34.
220. Donawho, C.K., et al., *ABT-888, an orally active poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor that potentiates DNA-damaging agents in preclinical tumor models*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(9): p. 2728-37.
221. Barazzuol, L., et al., *Evaluation of poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor ABT-888 combined with radiotherapy and temozolomide in glioblastoma*. Radiat Oncol, 2013. **8**: p. 65.
222. Gabrielson, A., et al., *Phase II study of temozolomide and veliparib combination therapy for sorafenib-refractory advanced hepatocellular carcinoma*. Cancer Chemother Pharmacol, 2015. **76**(5): p. 1073-9.
223. Hussain, M., et al., *Targeting DNA repair with combination veliparib (ABT-888) and temozolomide in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer*. Invest New Drugs, 2014. **32**(5): p. 904-12.
224. Karginova, O., et al., *Efficacy of Carboplatin Alone and in Combination with ABT888 in Intracranial Murine Models of BRCA-Mutated and BRCA-Wild-Type Triple-Negative Breast Cancer*. Mol Cancer Ther, 2015. **14**(4): p. 920-30.

225. Bhalla, A. and M.W. Saif, *PARP-inhibitors in BRCA-associated pancreatic cancer*. JOP, 2014. **15**(4): p. 340-3.
226. Eastman, A., *Assays for DNA fragmentation, endonucleases, and intracellular pH and Ca²⁺ associated with apoptosis*. Methods Cell Biol, 1995. **46**: p. 41-55.
227. Toyooka, T., M. Ishihama, and Y. Ibuki, *Phosphorylation of histone H2AX is a powerful tool for detecting chemical photogenotoxicity*. J Invest Dermatol, 2011. **131**(6): p. 1313-21.
228. Ibuki, Y. and T. Toyooka, *Evaluation of chemical phototoxicity, focusing on phosphorylated histone H2AX*. J Radiat Res, 2015. **56**(2): p. 220-8.
229. de Gruijl, F.R., *Photocarcinogenesis: UVA vs UVB*. Methods Enzymol, 2000. **319**: p. 359-66.
230. Yin, Y., et al., *Quercitrin protects skin from UVB-induced oxidative damage*. Toxicol Appl Pharmacol, 2013. **269**(2): p. 89-99.
231. Pacher, P., et al., *Activation of poly(ADP-ribose) polymerase contributes to development of doxorubicin-induced heart failure*. J Pharmacol Exp Ther, 2002. **300**(3): p. 862-7.
232. Malorni, W., et al., *3-Aminobenzamide protects cells from UV-B-induced apoptosis by acting on cytoskeleton and substrate adhesion*. Biochem Biophys Res Commun, 1995. **207**(2): p. 715-24.
233. Cruz, L.A., et al., *Relationships between chromatin remodeling and DNA damage repair induced by 8-methoxypsoralen and UVA in yeast Saccharomyces cerevisiae*. Genet Mol Biol, 2012. **35**(4 (suppl)): p. 1052-9.
234. Demaret, J.P., et al., *Geometry of intercalation of psoralens in DNA approached by molecular mechanics*. Photochem Photobiol, 1989. **50**(1): p. 7-21.
235. Yang, H., et al., *8-Methoxypsoralen Induces Intrinsic Apoptosis in HepG2 Cells: Involvement of Reactive Oxygen Species Generation and ERK1/2 Pathway Inhibition*. Cell Physiol Biochem, 2015. **37**(1): p. 361-74.
236. Anbil, S., et al., *Impact of treatment response metrics on photodynamic therapy planning and outcomes in a three-dimensional model of ovarian cancer*. J Biomed Opt, 2013. **18**(9): p. 098004.
237. Grimm, S., et al., *The outcome of 5-ALA-mediated photodynamic treatment in melanoma cells is influenced by vitamin C and heme oxygenase-1*. Biofactors, 2011. **37**(1): p. 17-24.

238. Mogi, S. and D.H. Oh, *gamma-H2AX formation in response to interstrand crosslinks requires XPF in human cells*. DNA Repair (Amst), 2006. 5(6): p. 731-40.
239. Bonner, W.M., et al., *GammaH2AX and cancer*. Nat Rev Cancer, 2008. 8(12): p. 957-67.
240. Panzarini, E., V. Inguscio, and L. Dini, *Timing the multiple cell death pathways initiated by Rose Bengal acetate photodynamic therapy*. Cell Death Dis, 2011. 2: p. e169.

12. TÁRGYSZAVAK/ KEY WORDS

UV sugárzás / *UV irradiation*

PARP gátlók / *PARP inhibitors*

DNS károsodás / *DNA damage*

DNS hibajavítás / *DNA repair*

Apoptózis / *Apoptosis*

Nekrózis / *Necrosis*

13. 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 Mihálynénak (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 Szerves 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

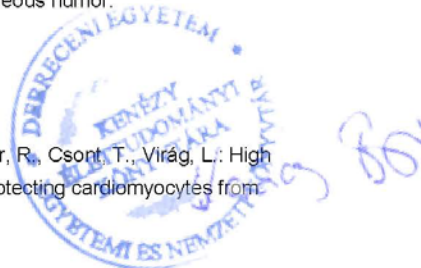
Jelölt: Lakatos Petra
Neptun kód: CKG17B
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Lakatos, P.**, Hegedűs, C., Salazar Ayestarán, N., Juarranz, Á., Kövér, 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.

Cím: 4032 Debrecen, Egyetem tér 1. □ Postacím: 4010 Debrecen, Pf. 39. □ Tel.: (52) 410-443
E-mail: publikaciok@lib.unideb.hu □ Honlap: www.lib.unideb.hu

14. FÜGGELÉK

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények teljes szövege: