

EGYETEMI DOKTORI (PHD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**Az UVB sugárzás által előidézett celluláris folyamatok vizsgálata
humán keratinocitákban, *in vitro* szintetizált ciklobután pirimidin
dimer-specifikus fotoliáz fehérjét kódoló mRNS alkalmazásával**

Boros Gábor

Témavezető: Dr. Emri Gabriella



DEBRECENI EGYETEM

EGÉSZSÉGTUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

DEBRECEN, 2015

**Az UVB sugárzás által előidézett celluláris folyamatok vizsgálata
humán keratinocitákban, *in vitro* szintetizált ciklobután pirimidin
dimer-specifikus fotoliáz fehérjét kódoló mRNS alkalmazásával**

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

Írta: **BOROS GÁBOR**
okleveles molekuláris biológus

Témavezető: Dr. Emri Gabriella, PhD

Egészségtudományok Doktori Iskola
Debreceni Egyetem

A doktori szigorlati bizottság:

elnök:

Prof. Dr. Ádány Róza, az MTA doktora

tagok:

Prof. Dr. Wikonkál Norbert, az MTA doktora

Dr. Balajthy Zoltán, PhD

A doktori szigorlat időpontja:

Debreceni Egyetem, Népegészségügyi Kar,

Megelőző Orvostani Intézet Tárgyalóterme

2015. december.02. 11 óra

Az értekezés bírálói:

Dr. Ádám Balázs, PhD

Dr. Kinyó Ágnes, PhD

A bírálóbizottság:

elnök:

Prof. Dr. Ádány Róza, az MTA doktora

tagok:

Prof. Dr. Wikonkál Norbert, az MTA doktora

Dr. Ádám Balázs, PhD

Dr. Balajthy Zoltán, PhD

Dr. Kinyó Ágnes, PhD

Az értekezés védésének időpontja:

Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar,

Belgyógyászati Intézet "A" épület Tanterme

2015. december 02. 13 óra

Bevezetés

Az ultraibolya B (UVB) (280-315 nm) sugárzás a legfőbb környezeti kockázati tényezője a napégés, a bőröregeedés és a bőrrák kialakulásának. Az UVB sugárzás által indukált ártalmas biológiai hatások közvetítéséért elsősorban a ciklobután pirimidin dimerek (CPD) felelősek, amelyek a leggyakoribb és egyben a legkárosabb UVB-okozta DNS károsodások. Az UVB által előidézett CPD fotoproduktumok hosszan tartó jelenléte a bőr sejteiben gyulladásos folyamatok indukálásához, immunszuppresszióhoz, illetve mutációhoz, ezáltal bőrtumorok és egyéb bőrbetegségek kialakulásához vezethet. A CPD-k hozzájárulása a sejtek génexpressziós és funkcióbeli változásaihoz még nem teljesen tisztázott. Ezidáig nem volt olyan megfelelő kísérleti eljárás, amely képes lett volna specifikusan azonosítani a CPD-függő géneket humán sejtekben, ezáltal elkülöníteni a CPD-k által szabályozott celluláris folyamatokat más, UVB indukálta molekuláris eseményektől.

A CPD-specifikus fotoliáz fehérje képes gyorsan és hatékonyan felismerni és kijavítani a CPD-ket egy gyors, fényfüggő reakcióban, amelyet “fotoreaktivációnak” nevezünk. Mivel a méhlepényes emlősök, beleértve az embert is, ilyen DNS-javító enzimmel nem rendelkeznek, a CPD károsító hatásaival szemben kizárólag a nukleotid excíziós reparációs (NER) rendszer lassú és kevésbé hatékony működésére számíthatnak. A hipotézisünk az volt, hogy a CPD-specifikus fotoliáz fehérjét expresszáló humán keratinociták jó modellrendszerként használhatók az UVB indukálta celluláris folyamatok tanulmányozására. A vizsgálni kívánt nem humán fehérje tranziens expresszálására *in vitro* szintetizált mRNS-alapú génterápiás módszert alkalmaztunk. Ezen kísérleti eljárás segítségével az UVB által előidézett pirimidin dimerek reparációjának tanulmányozása mellett, lehetőség nyílt a CPD-függő és -független molekuláris mechanizmusok elkülönítésére is.

Az ultraibolya sugárzás biológiai hatásai a bőrben

Patogenetikai szempontból a bőrt érő egyik legáltalánosabb környezeti tényező a napfény ultraibolya sugárzása, amely számos biológiai mechanizmust negatívan befolyásol. Káros folyamatokat, például lipid- és fehérje-módosításokat, fotokémiai reakciókat és DNS károsodásokat indukál, minek következtében elsőként teszik felelőssé az akut napégés, a bőröregedés és a bőrtumorok kialakulásáért. A genomiális DNS biológiai jelentőségénél és nagy UV fénylenyelő képességénél fogva központi szerepet játszik az UV sugárzás káros hatásainak megvalósulásában. Az UVB sugárzás a DNS-ben közvetlenül elnyelődve ciklobután pirimidin dimereket (CPD) és 6-4 fotoproduktumokat (6-4PP) indukál. Emellett különböző gének aktivációjának vagy szuppressziójának indukálásán keresztül számos biológiai folyamatot befolyásol a bőrben, például az apoptózist, a DNS-reparációt és sejtciklus-szabályozó mechanizmusokat. Az UVB sugárzás okozta DNS károsodás a genetikai mutációk képződése által kritikus szerepet tölt be a bőrtumorok kialakulásában is.

Az UVB által előidézett DNS károsodások fő típusai

Ciklobután pirimidin dimerek

A ciklobután pirimidin dimerek a leggyakoribb és egyben a legkárosabb UV okozta DNS károsodások. Az UV sugárzás hatására keletkeznek úgy, hogy a DNS molekula két szomszédos pirimidin bázisa egy ciklobután gyűrű létrehozásával kovalensen összekapcsolódik. Az UVA sugárzás által indukált CPD-k száma nem számottevő, azonban az UVB és UVC sugárzás hatására nagy mennyiségben képződnek, leggyakrabban timin dimereket (TTs) létrehozva. Az UV sugárzás sejtkárosító és mutagén hatásának közvetítéséért elsősorban ezeket a fototermékeket teszik felelőssé. A reparációjuk lassú és inkomplett. Hosszan tartó jelenlétük a sejtek genomjában a sejtciklus időleges késleltetéséhez, vagy apoptotikus szignálok aktiválódásához, végső esetben a sejt halálához vezet. A CPD-k felhalmozódása kromoszóma aberrációk vagy mutációk kialakulásához, ezáltal genomi

instabilitáshoz is vezethet, amely elősegíti a karcinogenezis folyamatát. A legmutagénebb hatással a CC és CT dimerek rendelkeznek. Ennek fő oka, hogy a citozin, vagy 5-metilcitozin csoportjuk dezaminálásának következtében nem kerül sor a DNS károsodás javítására.

Pirimidin (6-4) pirimidon fototermékek

Az UVB sugárzás által indukált DNS károsodások másik fő típusa a pirimidin (6-4) pirimidon, vagy röviden (6-4) fototermék. Ezek a fototermékek nagyobb torzulást okoznak a DNS kettős-hélix szerkezetében, mint a CPD-k. Jelentős szerepet játszanak az UV sugárzás sejtkárosító és premutagén hatásának kialakításában. Mindazonáltal a (6-4) fototermékek reparációja az emlősök genomjában jóval gyorsabb, mint a CPD-k reparációja. Különböző tudományos megközelítésben számos magyarázat született a két fő típusú fototermék javítási hatékonyságának értelmezésére. Fő szempontként a differens mutagén és DNS-torzító hatásuk, a különböző felismerési szignáljuk és a DNS-javító enzimekhez való eltérő hozzáférhetőségük szerepelt.

A sérült DNS időben történő reparációja rendkívül kritikus annak érdekében, hogy a sejt megakadályozza az UV sugárzás káros biológiai hatásait. Minden élő szervezet, a prokariótáktól az eukariótákig, kialakított olyan mechanizmusokat, amelyek az UV indukálta DNS károsodások javításáért felelősek.

Az UVB indukálta DNS fotoléziók reparációja

Nukleotid excíziós reparáció

Az UV indukálta fotoléziók károsító hatásával szemben a humán genomiális DNS-t kizárólag a nukleotid excíziós reparáció (NER) védi. A NER egy többlépéses DNS-reparációs mechanizmus, amely több mint 30 fehérje közreműködésével valósul meg. Igen sokoldalú, hiszen számos, szerkezetileg eltérő DNS károsodás javításában vesz részt. Ismert, hogy a NER enzimek fő szubsztrátjai az UV indukálta DNS fotoléziók, azonban a DNS keresztkötéseket létrehozó kemoterápiás ágensek, gomba alkaloidok és policiklikus aromás

szénhidrogének által okozott DNS károsodások javításában is szerepet vállal. Emellett a NER mechanizmus bizonyos komplexei a hibás DNS kijavítása céljából szorosan együttműködnek más celluláris folyamatokban, például DNS replikációban, transzkripcióban, sejtciklus szabályozásában és bázis excíziós reparációban részt vevő fehérjékkel, ezáltal a NER nélkülözhetetlen szerepet játszik a sejt homeosztázisának fenntartásában.

A NER rendszernek két almechanizmusa ismert. A globál genom reparáció (GG-NER) és a transzkripció-kapcsolt reparáció (TC-NER) a DNS károsodást felismerő lépésekben és a károsodás helyére toborzott fehérjék minőségében tér el egymástól. A GG-NER mechanizmus aktivációja nem a károsodás típusának azonosítására, hanem a károsodás által okozott DNS konformáció-változás felismerésére történik. Ezt a folyamatot az XPC/HR23B enzimkomplex irányítja, amely önmagában nem képes az UV indukálta CPD-ket felismerni. A 6-4 PP-k azonosítása gyorsabban és hatékonyabban történik, köszönhetően a két fotoproduktum eltérő DNS-torzító hatásának. A GG-NER mechanizmusban a CPD-k felismeréséhez a DDB (DNA damage binding) fehérje közreműködése elengedhetetlen. A TC-NER mechanizmus az aktív gének átíródo szálában keletkező károsodásokat javítja, amelynek során a DNS károsodás (pl. CPD, 6-4 PP) létrejöttének első szignálját az RNS polimeráz II enzim megakadása jelenti. A két almechanizmusban történő további folyamatok már megegyeznek. A többlépcsős NER mechanizmus egymással szorosan összefüggő lépései a következők: 1) a DNS károsodás felismerése, 2) a DNS fotolézisok verifikálása, 3) a DNS szálak szétválasztása, 4) a DNS lánc incíziója, 5) a károsodást tartalmazó DNS szakasz kivágása, és végül 6) a kijavított DNS szál összekapcsolása.

A NER-ben involválódó gének genetikai eltérései örökletes rendellenességeket eredményeznek (Xeroderma pigmentosum, Cockayne's szindróma, trichothiodisztrófia), amelyek erős UV-fényérzékenységgel és a bőrdaganatok és/vagy a korai bőröregedés kialakulására való fokozott hajlammal járnak.

Fotoreaktiváció

Az UVB indukálta DNS léziók (CPD, 6-4 PP) javítását a fotoliáz fehérjék is képesek elvégezni. Ezek olyan DNS javító enzimek, amelyek a fotoreaktivációnak nevezett fényfüggő reakcióban a DNS szekvencia megváltoztatása nélkül specifikusan felismerik és kijavítják a káros fotoproduktumokat. A fotoliáz két kromofórt tartalmaz. Az egyik egy flavin adenin dinukleotid (FAD), amely elektron donorként és katalitikus kofaktorként funkcionál meghatározva a fotoliáz fehérje enzimatiszus aktivitását. A másik egy folát-típusú (5,10-metiléntetrahidrofolát; MTHF), vagy egy deazaflavin-típusú (8-hidroxi-5-deazaflavin; 8-HDF) kromofór, az élő szervezettől függően. Ezek a kromofórok fénygyűjtő kofaktorként működnek, amelyek több mint százszorosára képesek növelni a fotoliáz fehérje fényabszorbeáló képességét. A fotoliáz enzimek egy fényfüggő ciklikus redoxireakcióban igen gyorsan képesek elhasítani az UV indukálta pirimidin dimereket, biztosítva a genom integritását. A fotoliáz enzim a legtöbb élő szervezetben működik, azonban hiányzik a méhlepényes emlősökből, így az emberből is.

Az *in vitro* szintetizált mRNS-alapú génterápiás módszer előnyei és nehézségei

A géntranszfer technológia nagy fejlődésen ment keresztül az utóbbi időben. A különböző génterápiára irányuló eljárások közül az *in vitro* szintetizált mRNS használata tűnik a legalkalmasabbnak a terápiás fehérjék expresszáására, enzimdefektusok javítására. Ezt a virális vektor- és plazmid DNS-alapú géntranszfer módszerekkel szembeni előnyös tulajdonságai indokolják. Sokkal biztonságosabb, mert nem integrálódik a genomba, továbbá az mRNS-nek funkciója betöltéséhez nincs szüksége sejtmagi lokalizációra, transzkripcióra. Nagy hatékonysággal transzfektálható primer és nem osztódó sejtekbe is. Kizárólag a kódolt fehérje gyors és hatékony szintézise történik meg a citoplazmában, ellentétben a plazmidalapú vektorokkal, amelyek nemcsak a kódolt fehérje szekvenciáját hordozzák, vagy a vírusalapú vektorokkal, amelyek virális fehérjéket kódoló géneket is tartalmaznak. Az említett előnyös

tulajdonságok ellenére az *in vitro* szintetizált mRNS sikeres *in vivo* alkalmazása korlátozott, hiszen különböző RNS szenzorok aktiválása révén erős immunválasz-reakciókhoz vezet. Ezen szenzorok legismertebb képviselői a Toll-like receptorok (TLR3, TLR7, TLR8). További problémát jelent labilis szerkezete, ami szintén nem teszi alkalmassá génterápiás alkalmazását. Az mRNS szerkezetébe uridin helyett beépített pseudouridin (Ψ), és az így nyert mRNS HPLC (high-performance liquid chromatography) segítségével történő tisztítása teljes mértékben megszünteti az mRNS immunogén természetét, emellett növeli az mRNS stabilitását és transzlációs hatékonyságát. A HPLC alapú tisztítási eljárás kritikus lépés az mRNS *in vitro* transzkripciója során. Segítségével küszöbölhető ki az RNS szenzorokat aktiváló rövid RNS –és duplaszálú RNS fragmentumok, amihez az mRNS nukleozid-módosítása önmagában nem elegendő. A nukleozid-módosított, *in vitro* szintetizált mRNS-t egyre szélesebb körben használják különböző biológiai területeken, például tumor immunterápiában, vakcina készítmények fejlesztésére, géndítálásra, gének átprogramozására és terápiás fehérjék expresszáására.

A módosított mRNS *in vivo* bőrsejtekbe juttatásának kidolgozását jelentősen hátráltatják olyan tényezők, mint a *stratum corneum*, az RNázok jelenléte és a bőr lipidgazdag természete. A fotoliáz mRNS *in vivo* alkalmazásának bevezetése új fényvédelmi stratégiát jelenthetne, amely az akut napfénykárosodás és a bőrdaganatok kialakulásának kockázatát csökkenthetné, valamint modellként szolgálhatna különböző bőrbetegségekhez kapcsolt, terápiás fehérjéket kódoló mRNS-ek klinikai alkalmazásához.

Célkitűzések

Jól ismert, hogy a ciklobután pirimidin dimerek az UVB sugárzás káros hatásainak fő mediátorai. Ezeket a fotoproduktumokat a CPD-specifikus fotoliáz fehérje gyorsan és hatékonyan javítja, azonban ez az enzim nem található meg az emberi szervezetben. A CPD-specifikus fotoliáz fehérjét expresszáló humán keratinocitákat alkalmazó *in vitro* szintetizált mRNS-alapú eljárás jó modellrendszernek ígérkezik az UVB indukálta celluláris folyamatok részletes tanulmányozására, valamint a CPD-függő és -független molekuláris mechanizmusok elkülönítésére.

Az itt bemutatott tanulmány célkitűzései a következők:

1. Az *in vitro* szintetizált és nukleozid-módosított mRNS transzfekció körülményeinek optimalizálása humán keratinocitákban a kódolt CPD-specifikus fotoliáz fehérje magas fokú expresszálása érdekében.
2. Az UVB sugárzás hatásának vizsgálata az mRNS transzfekció és transzlációs hatékonyság tekintetében.
3. A CPD-specifikus fotoliáz fehérje funkciójának igazolása, vagyis az UVB indukálta CPD-k gyors reparációjának kimutatása fotoreaktivációt követően a kódoló mRNS-sel transzfektált humán keratinocitákban.
4. CPD-függő és -független celluláris mechanizmusok karakterizálása CPD-specifikus fotoliáz fehérjét expresszáló humán keratinociták microarray elemzésével.
5. Annak tanulmányozása, hogy milyen jelátviteli útvonalak játszanak szerepet az UVB indukálta CPD-függő transzkripcionális válaszokban.

Anyagok és módszerek

A pszeudouridin-módosított, CPD-specifikus fotoliáz fehérjét kódoló mRNS *in vitro* transzkripciója

A *Potorous tridactylus* fotoliáz génjét kódoló mRNS-t *in vitro* transzkripcióval hoztuk létre. A gén szintézisét az Entelechon biotechnológiai cég végezte. A szekvencia kodon-optimalizálását, amely a kódoló szekvencia (GenBank azonosító: D26020) GC arányát 51.8%-ról 65.0%-ra emelte, a magas transzlációs hatékonyság elérése céljából végeztük el. A CPD-fotoliázt és az eGFP-t (enhanced green fluorescent protein) kódoló mRNS *in vitro* transzkripciójához linearizált plazmidok (pTEV-CPD-PL-A101 és pTEV-eGFP-A101) szolgáltak templákként. A transzkripcióhoz a “Megascript T7 RNA polymerase” kit-et (Ambion) használtuk. Az UTP nukleozidok helyett pszeudouridin trifoszfátot (TriLink) alkalmaztunk. A DNS templát eltávolításához Turbo DNáz enzimet (Ambion) használtunk. A pszeudouridin-módosított mRNS-t HPLC tisztításnak vetettük alá. Az mRNS 5' végét cap1 struktúrával láttuk el m7G capping enzim és 2'-O-metiltranszferáz (CellScript) segítségével, míg 3' végét még ~200 nukleotid hosszúságú poli(A) farokkal, amihez poli(A) polimerázt (USB) használtunk. Az RNS minták minőség-ellenőrzését agaróz gél elektroforézissel végeztük. A mintákat szilikonizált csövekben -20°C-on tároltuk. Az *in vitro* szintetizált mRNS-t Dr. Karikó Katalin (University of Pennsylvania, Philadelphia) bocsátotta rendelkezésünkre.

***In vitro* transzláció**

Az mRNS-ek által kódolt fehérjék meghatározásához nyúl retikulocita lizátumot tartalmazó *in vitro* transzlációs assay-t (Promega) alkalmaztunk ³⁵S izotóppal jelzett metionin és cisztein jelenlétében. A kísérlet kivitelezését Dr. Karikó Katalin és munkatársai végezték, a gyártó utasításai szerint.

Keratinocita sejt kultúra

Minden kísérlethez immortalizált humán keratinocita sejtvonalat (HaCaT) használtunk. A sejteket 10% FBS-sel (Biowest) kiegészített DMEM (Lonza) médiumban tartottuk, 4.5 g/L glükóz, 2 mM L-Glutamin és 0.5% antibiotikum / antimikotikum oldat (Sigma-Aldrich) jelenlétében. A sejtenyészeteket 5% CO₂ mellett 37°C hőmérsékleten tartottuk fenn.

Tranziens transzfekció

A HaCaT sejteket 2×10^4 sejt / well koncentrációban osztottuk le 96-lyukú sejtenyésző plate-re a transzfekció előtt egy nappal. A transzfekciót Lipofectamine LTX-PLUS (Life Technologies) transzfekciós reagens segítségével végeztük. Az RNS mintákhoz (0.25 µg) 1.0 µl transzfekciós reagenst adtunk, és 100 µl-re egészítettük ki EpiLife (Life Technologies) médiummal. Két óra múlva a lipofektamin-RNS komplexet tartalmazó elegyet friss, komplettált sejtmédiumra cseréltük.

UVB kezelés és fotoreaktiváció

A transzfekciót követő 12 óra múlva a sejteket lefedtük 50 µl DPBS oldattal (Life Technologies), majd 20 mJ/cm² UVB dózissal tettük ki két széles spektrumú UVB fénycső (Philips) segítségével. Az UVB kezelést követően a sejteket rögtön fotoreaktiváltuk (aktív CPD-fotoliáz) két nappali fénycső (Havells-Sylvania) alkalmazásával, vagy sötétben tartottuk (inaktív CPD-fotoliáz) egy órán át. A sejteket tovább tenyésztettük komplett DMEM médiumban a mintagyűjtés idejéig.

Annak vizsgálatához, hogy az UVB sugárzás milyen hatással van az mRNS transzfekcióra és az mRNS transzlációs hatékonyságára, a HaCaT sejteket először UVB (20 mJ/cm²) sugárzásnak tettük ki, majd 90 perces inkubációt követően transzfektáltuk őket lipofektamin-komplexált CPD-fotoliáz mRNS-sel. A transzfekció után a sejteket azonnal fotoreaktiváltuk (aktív CPD-fotoliáz), vagy sötétben tartottuk (inaktív CPD-fotoliáz) egy órán át. A sejteket tovább tenyésztettük komplett DMEM médiumban a mintagyűjtés idejéig.

Fluoreszcens mikroszkópia

A HaCaT sejteket üveg fedőlemezen növesztettük, majd a CPD-fotoliáz mRNS transzfekciót követően 20 mJ/cm^2 UVB dózissal tettük ki őket, vagy kezeletlenek maradtak. A sejteket 4% paraformaldehid (Sigma-Aldrich) hozzáadásával fixáltuk, majd 1%-os Triton X-100 (Amresco) oldattal permeabilizáltuk. 20%-os FBS oldattal történő blokkolást követően a CPD-fotoliázra specifikus poliklonális antitesteket megfelelő hígításban (1:500; Prof. Gijssbertus van der Horst – Erasmus University Medical Center, Rotterdam – bocsátotta rendelkezésünkre) hozzáadtuk a sejtekhez, és a mintákat egy éjszakán át 4°C hőmérsékleten tartottuk. Háromszori $1 \times \text{PBS}$ -sel történő mosást követően anti-nyúl IgG Alexa Fluor 555 (Life Technologies) másodlagos antitesteket adtunk a sejtekhez 1:2000 hígításban, és szobahőmérsékleten 2 órán át inkubáltuk őket. A sejtmagvak festése DAPI-val (Vector Laboratories) történt. A specifikus festődést Zeiss Axiovert 100 típusú fluoreszcens mikroszkóp segítségével vizsgáltuk.

A CPD-k kvantitatív vizsgálatához, a blokkolás előtt, a mintákat 2 M HCl (VWR) oldattal denaturáltuk szobahőmérsékleten 30 percig. A CPD-k specifikus kimutatására monoklonális anti-CPD elsődleges antitesteket (TDM-2, Cosmo Bio) használtunk 1:1500 hígításban 37°C hőmérsékleten 30 percig. Háromszori $1 \times \text{PBS}$ -sel történő mosást követően anti-egér IgG Alexa Fluor 568 (Life Technologies) másodlagos antitesteket adtunk a sejtekhez 1:2000 hígításban, és 37°C hőmérsékleten 30 percen át inkubáltuk őket. A specifikus festődést fluoreszcens mikroszkóp segítségével vizsgáltuk.

A pszeudouridin-módosított mRNS által kódolt eGFP expressziójának vizsgálata epifluoreszcens Zeiss Axiovert 100 típusú mikroszkóp, Zeiss AxioCam MRC 5 digitális kamera és AxioVision képanalizáló szoftver segítségével történt.

Abban a kísérletben, ahol a sejteket az UVB kezelést követően transzfektáltuk, a kódolt CPD-fotoliáz fehérje expresszióját egy 60× olaj-immersiós objektívvel felszerelt Olympus FV1000S fluoreszcens konfokális mikroszkóp segítségével vizsgáltuk.

Enzimhez kapcsolt immunoszorbens teszt (CPD-specifikus ELISA)

Genomi DNS-t izoláltunk QIAamp DNA mini kit (Qiagen) segítségével, a gyártó leírása alapján. A denaturált DNS mintákat (15 ng/well) 0.003% protamin szulfát oldattal (50 µl/well, Sigma-Aldrich) bevont (coat-olt) 96-lyukú sejtenyésző plate-en inkubáltuk 37°C hőmérsékleten egy éjszakán át. PBS oldattal történő mosást követően a mintákat 2% FBS oldattal blokkoltuk 37°C-on 30 percig. A CPD-k kvantitatív méréséhez monoklonális anti-CPD elsődleges antitesteket (TDM-2, Cosmo Bio) használtunk 1:1000 hígításban 37°C hőmérsékleten 30 percig. Háromszori 1 × PBS-sel történő mosást követően tormaperoxidázzal konjugált anti-egér IgG (BioRad) másodlagos antitesteket adtunk a mintákhoz 1:3000 hígításban és 37°C hőmérsékleten 30 percen át inkubáltuk. Háromszori 1 × PBS-sel történő mosás után mindegyik mintához 150 µl ekvilibráló puffert (citrát-foszfát puffer: 51.4 mM Na₂HPO₄, 24.3 mM citromsav monohidrát, pH 5.0) adtunk. A frissen elkészített szubsztrát oldatból ((74 nM o-feniléndiamin (OPD; Sigma-Aldrich) és 60 nM H₂O₂ citrát-foszfát pufferben oldva)) mindegyik mintához 100 µl mennyiséget adtunk. Tizenöt perc múlva az enzimreakciót 2 M-os kénsav (50 µl/well) (VWR) oldattal állítottuk le. Az abszorbancia értékeket 492 nm-es hullámhosszon mértük ELISA mikroplate olvasó segítségével.

Sejtéletképességet vizsgáló módszer

A CPD-fotoliáz fehérjét kódoló mRNS-sel transzfektált sejteket 20 és 60 mJ/cm² UVB sugárzásnak tettük ki, majd azonnal fotoreaktiváltuk, vagy sötétben tartottuk őket egy órán át. A sejtek életképességét EZ4U kit (Biomedica Gruppe) segítségével vizsgáltuk, a gyártó utasításai alapján.

Microarray analízis

Totál RNS-t izoláltunk TRI reagenssel (VWR). Ezt követően a mintákat DNáz I (Fermentas) kezelésnek vetettük alá. A microarray kísérletek kivitelezését a ChromoScience Kft. (www.chromoscience.hu) végezte Agilent 4x44 K Whole Human Genome Oligo (Agilent Technologies) típusú array-ek alkalmazásával. Az adatok analízise Feature Extraction 9.5 (Agilent Technologies) és GeneSpring GX 11.5 szoftver (Agilent Technologies) alkalmazásával történt. A nyers és a normalizált adatok teljes egészében elérhetőek a GEO adatbázisban (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) a GSE65034 azonosító szám alatt. A szignifikáns expressziós eltérést mutató gének (fold change >2) további elemzéséhez IPA (Ingenuity Pathway Analysis) (www.ingenuity.com) online szoftvert használtunk.

Real-time kvantitatív PCR (RT-qPCR)

Totál RNS-t izoláltunk TRI reagenssel (VWR). Ezt követően a mintákat DNáz I (Fermentas) kezelésnek vetettük alá. A cDNS szintézist High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies) segítségével végeztük, reakciónként 500 ng RNS mintát felhasználva, a gyártó utasításai szerint. A microarray adatok alapján kiválasztott kandidáns gének expressziós szintjének meghatározása a következő TaqMan assay-ek (Life Technologies) felhasználásával történt: *ATF3* (Hs00231069_m1), *CCNE1* (Hs01026536_m1), *CDKN2B* (p15INK4b) (Hs00793225_m1), *EGR1* (Hs00152928_m1), *ID2* (Hs04187239_m1), *IL-6* (Hs00985639_m1), *PTGS2* (más néven *COX-2*) (Hs00153133_m1), *RUNX1* (Hs00231079_m1), *SNAI2* (Hs00950344_m1). A *SNAI1* esetében saját tervezésű génspecifikus primereket és próbát használtunk: forward primer: 5'-ACT ATG CCG CGC TCT TTC-3'; reverse primer: 5'-GCT GGA AGG TAA ACT CTG GAT-3'; és a próba: 5'-[6-karboxifluoreszcein (FAM)] AAT CGG AAG CCT AAC TAC AGC GAG C [tetrametilrodamin (TAMRA)]-3'. A kvantitatív PCR ABI 7900 HT Sequence Detection System (Life Technologies) típusú real-time PCR készüléken történt. A relatív génexpresszió

mértékét az összehasonlító $2^{-\Delta\Delta Ct}$ módszer segítségével határoztuk meg, *SDHA* (Hs00188166_m1) és *PGK1* (Hs00943178_g1) génekre történő normalizálást követően.

Western blot

A sejteket proteáz inhibitor (Sigma-Aldrich) tartalmazó RIPA pufferben (Sigma-Aldrich) lizáltuk. 10 µg teljes sejt fehérjeextraktum elválasztása történt 10%-os (CPD-fotoliáz) vagy 12%-os (CCNE1 and p15INK4b) poliakrilamid gélen, majd a mintákat nitrocellulóz membránra (BioRad) transzferáltuk. A membránokat 5%-os zsírszegény tejporoldattal blokkoltuk, majd a megfelelő elsődleges antitesteket tartalmazó oldattal 4°C hőmérsékleten egy éjszakán át inkubáltuk. A fehérjék kimutatása anti-CPD-fotoliáz (1:500, Prof. Dr. Gijbertus van der Horst – Erasmus University Medical Center, Rotterdam – bocsátotta rendelkezésünkre), anti-CCNE1 (1:750, Cell Signaling Technology), anti-CDKN2B (1:750, Thermo Fisher Scientific) és anti-β-actin (1:1000, Cell Signaling Technology) antitestek felhasználásával történt. Másodlagos antitestként tormaperoxidázzal konjugált anti-egér vagy anti-nyúl IgG antitesteket (BioRad) használtunk. A fehérjék detektálása ECL Prime Western blotting kit (GE Healthcare) segítségével történt, a gyártó leírása alapján.

Protein kinázok *in vitro* gátlása

A HaCaT keratinocitákat 85% konfluencia eléréséig növesztettük, majd specifikus kináz inhibitorokkal kezeltük egy órán át. Ezt követően a sejteket UVB (20 mJ/cm²) sugárzásnak tettük ki. Mintagyűjtés az UVB kezelést követő 6. és 24. óránál történt. A vizsgálatainkhoz felhasznált kináz inhibitorok a következő forrásból származtak: JNK (SP600125), p38 MAPK (SB203580), AKT (MK-2206) (Selleck Chemicals). A liofilizált formában kapott termékeket DMSO-ban (Sigma-Aldrich) oldottuk, a gyártó utasításait követve. Az elkészített törzsoldatokat –20°C hőmérsékleten tároltuk.

Statisztikai elemzés

A microarray kísérlet során a változó gének meghatározása páratlan t-teszt és Benjamini-

Hochberg-féle korrekció alkalmazásával történt. Az RT-qPCR adatok statisztikai elemzéséhez GraphPad Prism 5 programot (GraphPad Software Inc.) használtunk. Az egyes mintákból ((1. kezeletlen; 2. UVB kezelt, de nem fotoreaktivált (inaktív CPD-fotoliáz); 3. UVB kezelt és fotoreaktivált (aktív CPD-fotoliáz)) származó adatok statisztikai megjelenítéséhez kétmintás, páratlan t-próbát alkalmaztunk. Az eredményeket minden kísérletben $p \leq 0.05$ érték mellett tekintettük szignifikánsnak. A méréseket minden kísérlet esetében három egymástól független biológiai párhuzamoson végeztük, mintánként háromszor megismételve.

Eredmények

CPD-specifikus fotoliáz fehérje expresszálása humán keratinocitákban, *in vitro* szintetizált és pszeudouridin-módosított mRNS transzfekciója segítségével

A HaCaT keratinocitákat CPD-fotoliáz fehérjét kódoló Ψ -mRNS-sel, vagy a kontrollként felhasznált eGFP fehérjét kódoló Ψ -mRNS-sel transzfektáltuk lipofektamin segítségével. Az eGFP expressziója már az mRNS transzfekciót követő egy óránál kimutatható volt, 6 és 12 óra között érte el csúcspontját, majd szintje fokozatosan csökkent, de még 48 óra után is detektálható volt. Jelentős mennyiségű, mRNS által kódolt CPD-fotoliáz fehérje volt kimutatható mind a kezeletlen, mind az UVB fénnel előkezelt HaCaT keratinocitákban, már az mRNS transzfekciót követő első órában. A kódolt CPD-fotoliáz a keratinociták sejtmagjában volt megfigyelhető. Az mRNS transzfekciót követően a CPD-specifikus fotoliáz erős expressziós szignálja először a sejtek citoplazmájában volt detektálható. Az idő előrehaladtával, az egyre erősödő fluoreszcens jel a sejtek magjában volt megfigyelhető, míg a citoplazmatikus jel fokozatosan csökkent.

Ezek az eredmények bizonyítják, hogy az alkalmazott UVB dózis (20 mJ/cm^2) nem befolyásolta sem az mRNS-transzfekció hatékonyságát, sem az exogén mRNS-ről transzlálódó CPD-fotoliáz fehérje mennyiségét. A konfokális mikroszkópos vizsgálatok demonstrálták a keletkezett CPD-fotoliáz fehérje felhalmozódását a sejtek magjában, amely nagy jelentőséggel bír az UVB indukálta CPD-k javításának tekintetében.

UVB indukálta CPD-k gyors javítása humán keratinocitákban CPD-specifikus fotoliáz mRNS transzfekciójával

Annak vizsgálatára, hogy a CPD-fotoliáz funkcionálisan aktív-e, az mRNS transzfektált sejteket 20 mJ/cm^2 UVB dózissal kezeltük ki, majd rögtön fotoreaktiváltuk, vagy sötétben tartottuk egy órán át. Immuncitokémiai módszer felhasználásával azt figyeltük meg, hogy a fotoreaktivált sejtekben a CPD-k száma jelentősen csökkent, a fotoliáz aktivációjához

szükséges energiaforrást nélkülöző sejtekhez képest.

A CPD fotoproduktumok javításának kvantitatív méréséhez CPD-specifikus ELISA technikát használtunk. Az UVB-kezelést követően több, mint kilencszerezes CPD-csökkenést mértünk a fotoreaktivált sejtekben, a sötétben tartott sejtekhez képest. Minden UVB fénnel kezelt mintában a CPD-k számának csökkenését figyeltük meg a kezelést követő 24. órában, a 0. és a 6. órában mért adatokhoz képest, amely a NER mechanizmus lassú működésével magyarázható.

Annak céljából, hogy össze tudjuk hasonlítani a természetesen előforduló nukleotid reparációs rendszer és az *in vitro* szintetizált mRNS által kódolt CPD-specifikus fotoliáz fehérje reparációs hatékonyságát, még az mRNS transzfekció előtt fiziológiás dózisu UVB (20 mJ/cm²) fénnel kezeltük a sejteket. Az UVB-kezelést követően már a 6. órában 90%-os CPD-csökkenést mértünk a fotoreaktivált sejtekben, a sötétben tartott, ezáltal inaktív CPD-fotoliáz tartalmazó sejtekhez képest. Összehasonlítás-képpen, a NER mechanizmusnak több, mint 48 órára volt szüksége ahhoz, hogy 90%-kal csökkentse a CPD-k számát az UVB-kezelt HaCaT sejtekben.

A CPD-k gyors javítása növeli a sejtek életképességét

A CPD-fotoliáz fehérjét kódoló Ψ -mRNS-sel, vagy az eGFP-t kódoló Ψ -mRNS-sel transzfektált sejteket 20 és 60 mJ/cm² UVB sugárzásnak tettük ki a transzekciót követő 12. órában, majd azonnal fotoreaktiváltuk, vagy sötétben tartottuk őket egy órán át. Egy, a sejtek életképességét vizsgáló módszer segítségével kimutattuk, hogy a fotoreaktiváció szignifikánsan csökkentette az UVB sugárzás antiproliferatív hatását a kezelést követő 24. órában. Ez a hatás a sötétben tartott, vagy eGFP-t kódoló mRNS-sel transzfektált sejteknél nem volt megfigyelhető.

UVB indukálta, CPD-függő génexpressziós mintázat feltérképezése humán keratinocitákban

A CPD-függő génexpressziós profil tanulmányozásának céljából oligonukleotid microarray analízist végeztünk, aminek alapját CPD-fotoliáz mRNS-sel transzfekált sejtek képezték. A vizsgálat eredményeként, 41,000 humán génből 2,370 UVB-szabályozott gént azonosítottunk a kezelést követő 6. és 24. órában. Az UVB hatására eltérő expressziós szintet mutató gének közül 1,334 (56%) CPD-függő gént szűrtünk ki. Ezeknek a géneknek az UVB kezelésre megváltozott expressziója a kezeletlen mintákban mért expressziós szintre állt vissza a fotoreaktivációt követően. A microarray eredmények kimutatták, hogy az UVB irradiációt követő 6. órában háromszor több gén (1,008) mutatott eltérő expressziós szintet, mint a 24. órában (326). Az UVB-szabályozott gének több mint fele ((1,743 génből 1,008 (58%) az UVB kezelést követő 6. órában, és 627 génből 326 (52%) a 24. órában)) CPD-függőnek bizonyult a kezelést követően vizsgált mindkét időpontban.

A CPD-függő gének szerepe az UVB indukálta celluláris stresszválaszokban

A CPD-függő gének biológiai szerepének és a gének közötti jelátviteli hálózatok meghatározása az Ingenuity Pathway Analysis (IPA) online szoftver segítségével történt.

A normalizált microarray adatok alapján a szoftver felfedte, hogy a CPD-függő gének többségének UVB indukálta expresszió-változása szoros összefüggést mutat a sejtek életképességének csökkenésével, a sejtciklus gátlásával, valamint az apoptózis aktivációjával a kezelést követő 6. és 24. órában. Amikor ugyanezt az elemzést elvégeztük a CPD-független gének expressziós adataival, ellentétes eredményeket kaptunk az UVB kezelést követő 24. órában. Ezen predikciós elemzés fejleményei teljesen összhangban vannak a sejtek életképességére irányuló vizsgálatok eredményeivel.

A génkapcsolati hálózatok elemzéséből kiderült, hogy az UVB által indukált CPD-k jelentős hatással bírnak a génexpressziót és a sejtciklust szabályozó mechanizmusokra 6 órával a

besugárzást követően, míg 24 órával az irradiáció után a sejtkárosodást követő regenerációt szabályozó folyamatok, mint az apoptózis, a sejtnövekedés és a sejtproliferáció aktivációja került előtérbe. A CPD-függő gének közötti legszorosabb hálózati kapcsolat vonatkozásában több olyan transzkripciós szabályozó fehérjét is azonosítottunk, ideértve a *c-Jun*, *c-Myc*, *TP53*, *Smad4* faktorokat, amelyekről jól ismert, hogy központi szerepet töltenek be a celluláris stresszválaszok szabályozásában.

E molekulák mRNS expressziós szintje a *c-Jun* kivételével nem változott az UVB irradiációt követően a CPD-fotoliáz mRNS transzfektált keratinocitákban, míg célgénjeik többségének az UVB irradiáció utáni génexpressziós mintázata CPD-függő módon változott. A CPD-függő célgének közül tízet választottunk ki további vizsgálatokra, amelyek között sejtciklus-szabályozó gének (*CCNE1*, *CDKN2B*), transzkripciós faktorok (*ATF3*, *EGR1*, *ID2*, *RUNX1*), epitéliális mezenhimális tranzícióban (*SNAI1*, *SNAI2*) és gyulladásos folyamatokban (*IL-6*, *PTGS2*) részt vevő molekulák találhatók.

A microarray adatok elemzése alapján kiválasztott 10 gén CPD-függésének megerősítése RT-qPCR technikával

A microarray adatok validálása céljából real time kvantitatív RT-PCR analízist végeztünk. Az UVB sugárzásra adott sejtválasz kapcsán igazolni tudtuk az *ATF3*, *CCNE1*, *CDKN2B*, *EGR1*, *ID2*, *IL-6*, *PTGS2*, *SNAI1* és *SNAI2* jelentős upregulációját, valamint a *RUNX1* nagymértékű downregulációját humán keratinocitákban. A fotoreaktivációt követően azonban, egyik gén esetében sem volt megfigyelhető az UVB expozíció után bekövetkező génexpresszió-változás, megerősítve a microarray elemzés eredményeit.

A CPD fototermékek és a JNK jelátviteli útvonal szerepe a ciklin E1 (*CCNE1*) és a p15INK4b (*CDKN2B*) UVB indukálta emelkedett expressziójában HaCaT sejtekben

Ismert, hogy a ciklin E1 és a p15INK4b a sejtciklus szabályozásában vesznek részt, azonban az UVB okozta stresszválaszokban betöltött szerepük kevésbé tisztázott. Western blot analízis

segítségével kimutattuk a ciklin E1 és a p15INK4b fehérje jelentős upregulációját az UVB kezelést követő 24. órában, amely változás nem volt megfigyelhető a CPD-k gyors fotoreparációját követően.

Annak vizsgálatára, hogy meghatározzuk milyen jelátviteli útvonalak vesznek részt a CPD-függő ciklin E1 és p15INK4b UVB indukálta overexpressziójában, a HaCaT keratinocitákat JNK, p38 MAPK és AKT kináz-specifikus gátlószerekkel kezeltük az UVB irradiációt megelőzően. A JNK-specifikus inhibitorral kezelt sejtek western blot analízise bizonyítékot szolgáltatott, hogy mindkét gén UVB indukálta overexpressziója jelentősen függ a JNK-útvonal aktivációjától, míg a p38 MAPK és az AKT jelátviteli útvonalak gátlása nem volt hatással a gének expressziójára.

Megbeszélés

Az élettanilag fontos fehérjék *in vitro* szintetizált mRNS által történő expresszálationa nagy terápiás lehetőséggel bír. Az mRNS-alapú génterápiás technológia alkalmazásával sikerült funkcionálisan aktív, nem humán szervezetből származó CPD-specifikus fotoliáz fehérjét kifejezni humán keratinocita sejt kultúrában, és mélyrehatóbb betekintést nyerni az UVB indukálta DNS károsodások patogenezisébe. A CPD-specifikus fotoliáz fehérjét kódoló mRNS humán keratinocitákba juttatása az UVB indukálta CPD léziók gyors és hatékony eltávolítását eredményezte, függetlenül attól, hogy az UVB kezelést a transzfekció előtt, vagy után végeztük. A dolgozatban bemutatott adatok demonstrálták a nukleozid-módosított mRNS által kódolt CPD-fotoliáz fehérje felhalmozódását a sejtek magjában. Emellett kimutattuk, hogy a fotoreaktivált humán keratinocitákban a CPD-k száma már a kezelést követő 6. órában több, mint 90%-kal csökkent a CPD-fotoliáz aktivációjához szükséges energiaforrást nélkülöző sejtekhez képest. Ezek az adatok bizonyítják, hogy a DNS-reparáció a transzfektált mRNS-ről átíródó CPD-fotoliáz fehérje aktív működésének eredménye. Összehasonlításképpen, a NER közel 72 órát igényelt ahhoz, hogy a CPD-k számát 90%-kal csökkentse, amely jelentős időkülönbséget jelent az mRNS által kódolt CPD-fotoliáz működéséhez képest. Ez az mRNS-alapú modellrendszer újszerű megközelítést kínál az UVB indukálta CPD-függő és -független celluláris folyamatok elkülönítésére. A CPD-fotoliáz mRNS transzfekciója humán keratinocitákba szignifikánsan növelte a sejtek életképességét, jelezve, hogy a CPD-k jelentősen hozzájárulnak az UVB sugárzás sejt károsító és antiproliferatív hatásához. A tanulmányban bemutatott eredmények alátámasztották, hogy az UVB-okozta transzkripcionális változások fő oka a CPD-képződés.

A CPD-k felhalmozódása, különösen az osztódó sejtekben, jelentős citotoxikus és mutagén hatással rendelkezik, elsődlegesen hozzájárulva az UVB indukálta karcinogenezishez. A CPD-k által szabályozott gének tanulmányozása klinikai jelentőséggel bírhat az UVB-okozta

bőrbetegségek terápiás kezelésében, hiszen új, UVB-specifikus terápiás célpontok azonosítására ad lehetőséget. Jelen tanulmányban karakterizálni tudtuk az UVB indukálta transzkripcionális válaszokat az *in vitro* szintetizált fotoliáz mRNS transzfekcióján alapuló modellrendszerünk microarray analízise segítségével. Összesen 1334 CPD-függő gént azonosítottunk, amely több, mint a felét teszi ki az UVB által szabályozott géneknek, jelezve, hogy a CPD-k elsődleges közvetítői az UVB indukálta génexpresszió-változásoknak. A CPD-függő gének többsége (UVB expozíció után 6 órával 738, 24 órával 250) downregulációt mutatott, amelyet legnagyobb valószínűséggel az UVB indukálta DNS károsodás által okozott RNS polimeráz II enzim megakadása, valamint a transzkripció elongációs fázisának leállása eredményezett. Kísérleteink bizonyítják, hogy az UVB irradiációt követő 6 órában háromszor több CPD-függő gén (1,008) mutatott eltérő expressziós szintet, mint 24 órában (326), amely a humán sejtekben természetesen is előforduló DNS-reparációs mechanizmus (NER) lassú működésének tulajdonítható.

A CPD-függő és -független gének szignifikáns expresszió-változásának összehasonlító elemzése feltárta, hogy a CPD-k az UVB sugárzás több celluláris károsító hatásának fő mediátorai. A legtöbb CPD-függő génexpresszió-változás a sejtek életképességének csökkenésével, valamint az apoptózis indukciójával hozható kapcsolatba, míg azon génexpresszió-változások esetén, amelyek függetlenek voltak az UVB indukálta CPD-k képződésétől ellentétes irányú hatást tapasztaltunk az UVB sugárzás után 24 órával. A CPD-fotoliáz mRNS transzfekciója humán keratinocitákba szignifikánsan növelte a sejtek életképességét, még erősen citotoxikus, magas dózisú UVB expozíciót követően is.

A CPD-függő gének funkcionális elemzése felfedte, hogy ezek a gének elsősorban a génexpresszióval és a sejtciklus szabályozásával összefüggő jelátviteli hálózatokhoz kapcsolódnak. A genomi DNS károsodása, ideértve az UVB okozta fotoléziókat is, időleges sejtciklus késleltetést eredményez, amely időt ad a sejtek számára a keletkezett hiba

kijavítására, még a DNS replikáció előtt. A sejtekben felhalmozódott CPD fotoproduktumok végleges sejtciklus leálláshoz és apoptózis indukálásához vezetnek, annak érdekében, hogy a sejt megakadályozza a károsodást, vagy esetleg mutációt szenvedett kromoszómák sokszorozódását. Az UVB okozta fotoléziók hosszan tartó jelenléte genomi instabilitást, kromoszómális rendellenességeket és bőrrák kialakulását is eredményezheti. A CPD-függő gének jelátviteli kapcsolatokat felderítő hálózati elemzése a *c-Jun*, *c-Myc*, *Smad4* és *TP53* molekulákat azonosította, mint fő szabályozó faktorokat a CPD fototermékek indukálta celluláris stresszválaszokban. Ezeknek a multifunkcionális transzkripciós faktoroknak a jelentősége igen jól ismert a sejtciklus progressziójában, az apoptózis és a celluláris transzformáció szabályozásában. Számos tanulmány igazolta, hogy e kulcsfontosságú szabályozó molekulák kémiai inaktiválása és a bennük előforduló mutációk a sejtciklus ellenőrző funkciók kieséséhez vezethetnek, amely szorosan összefügg a rákos sejtek kialakulásával. A microarray adataink szerint az mRNS expressziós szintjük az UVB irradiációt követően nem változott, célgénjeik többségének azonban az UVB irradiáció utáni génexpressziós mintázata CPD-függőnek bizonyult, jelezve, hogy a CPD-k jelentősen hozzájárulnak az említett kulcs szabályozó molekulák által közvetített, UVB indukálta stresszválaszok kialakításához. A célgének közül hat transzkripciós faktort, *ATF3*, *EGR1*, *ID2*, *RUNX1*, *SNAI1*, *SNAI2*, és két apoptózishoz, valamint gyulladásához kapcsolt gént, *COX-2* és *IL-6*, azonosítottunk, amelyek új diagnosztikus eszközként vagy terápiás célpontként szolgálhatnak az UVB által közvetített bőrbetegségek vagy bőrtumorok vonatkozásában. Ezek közül, az UVB indukálta celluláris folyamatok kapcsán legintenzívebben vizsgált gének a ciklooxygenáz 2 (*COX-2*) és az interleukin 6 (*IL-6*), amelyek upregulációját már számos tumorban és gyulladásos betegségben leírták predikciós biomarkerként.

Mindemellett azonosítottunk két, a sejtciklus G1 fázisának szabályozásában részt vevő gént, *CCNE1* és *CDKN2B*, amelyeknek az UVB okozta celluláris károsodásokban betöltött szerepe

kevésbé ismert. Igazolni tudtuk mindkét gén CPD-függését humán keratinocitákban UVB sugárzásra adott sejtválasz kapcsán. Mind az mRNS, mind a fehérje expressziós szintjük jelentős növekedést mutatott UVB expozíció után, amely változás a fotoreaktivációt követően nem volt megfigyelhető a fotoliáz mRNS-sel transzfektált sejtekben. Jól ismert, hogy a p15INK4b a G1 fázis korai szakaszában aktiválódik és a sejtciklus késleltetésében nélkülözhetetlen szerepet tölt be, mint ciklin-dependens kináz inhibitor (CKI). A ciklin E1 viszont a G1 fázis késői szakasza és az S fázis közti átmenetet biztosítja, elősegítve a sejtek proliferációját. Az UVB irradiációt követően mindkét gén esetén upregulációt figyeltünk meg, ami a sejtciklus szabályozásában betöltött funkciójukat tekintve meglepő eredmény. Figyelembe kell vennünk azonban azt is, hogy a sejtciklus szabályozásában részt vevő gének expressziós mintázata különösen függ egyéb szabályozó molekulák expressziós szintjétől és azok poszttranszlációs állapotától. Mindezzel együtt, a tanulmányban bemutatott adatok arra utalnak, hogy az UVB indukálta CPD-k a sejtciklus ellenőrző pontok, ezáltal a sejtciklus progresszió zavarát idézhetik elő.

A CPD-k szerepe sem az UVB indukálta génexpresszió-változásokban, sem a celluláris folyamatokban (pl. sejtciklus késleltetés vagy progresszió) nem specifikált. Az UV sugárzás számos szignáltranszdukciós-út vonal aktivációját indukálja hullámhossztól és dózistól függően. Ezek a jelátviteli útvonalak specifikus kináz enzimeken keresztül szabályozódnak. Ilyen enzimek közé tartoznak a mitogén aktivált protein kináz család (MAPK) tagjai, a protein kináz B (PKB vagy AKT) és a protein kináz C (PKC), amelyek döntő szerepet játszanak az UVB sugárzás okozta bőrkárosodásra adott stresszválaszban. Ennek megfelelően, AKT, p38 MAPK és JNK protein kinázokra specifikus inhibitorok hatását vizsgáltuk a CPD-k által kiváltott génexpresszió-változásokra. Kimutattuk, hogy ezek közül csak a JNK-specifikus inhibitornak van jelentős szerepe a ciklin E1 és a p15INK4b UVB indukálta overexpressziójában. Adataink azt sugallják, hogy a JNK által szabályozott jelátviteli

útvonalak nem kizárólagos, de fontos szerepet játszanak a CPD-függő génexpresszió-változások közvetítésében. Jól ismert, hogy különféle extracelluláris stimulusok, mint például az UV sugárzás, kiváltják a JNK aktivációját, amely ennek következtében áthelyeződik a sejt magjába, ahol több transzkripciós faktor szabályozásában részt vesz. Ilyen faktor a *c-Jun*, *c-Myc*, *Smad4* és *TP53* is, amelyeket a CPD-függő gének hálózati elemzése során az apoptózis vagy sejttúlélés regulációjában fontos szerepet betöltő központi szabályozó molekulaként azonosítottunk. Fokozott JNK aktivitás figyelhető meg keratinocita proliferáció és differenciáció során is, ennek megfelelően számos olyan tanulmányt olvashatunk, amelyben a JNK-út vonal élettani jelentőségét emelik ki a sebgyógyulás vonatkozásában, valamint egyes bőrgyógyászati betegségek, például a pikkelysömör és a szőrtüsző-eredetű tumorok kapcsán.

Összefoglalás

In vitro szintetizált és nukleozid-módosított, ciklobután pirimidin dimer (CPD)-specifkus fotoliázt kódoló mRNS-alapú géntranszfekciós modellrendszer kialakításával újszerű megközelítésben vizsgáltuk az UVB sugárzás okozta DNS károsodások hatásait tenyésztett humán keratinocitákban.

A *Potorous tridactylus* CPD-fotoliáz génjét kódoló mRNS előállítása *in vitro* transzkripcióval történt. A szekvencia kodon-optimalizálásával, pszeudouridin módosítással, valamint hosszú poly(A) farok és cap1 struktúra mRNS-be történő beépítésével magas transzlációs hatékonyság és biológiai stabilitás volt kialakítható.

Bizonyítottuk, hogy CPD-fotoliáz fehérje hatékony szintézise érhető el humán keratinocitákban a nem-humán proteint kódoló nukleozid-módosított mRNS bevitelével. A CPD-specifikus fotoliáz a vártak megfelelően a sejtek magjában lokalizálódott, és funkcionálisan aktív volt. Az UVB által indukált CPD-k gyors és hatékony kijavítódása volt kimutatható az UVB-irradiált, majd fotoreaktivált transzfektált sejtekben. A fotoreaktiváció szignifikánsan csökkentette az UVB antiproliferatív hatását.

Ez az *in vitro* modell alkalmas volt az UVB sugárzás által indukált CPD-függő és -független celluláris folyamatok elkülönítésére. Megállapítottuk, hogy az UVB-okozta transzkripcionális változások fő oka a CPD-képződés. Emellett eredményeink a JNK jelátviteli útvonal fontos szerepére mutattak rá az UVB-irradiációt követően kialakult, CPD-dependens stresszválaszokban.

Az *in vitro* szintetizált mRNS transzfekció a jövőben egy hatékony és biztonságos módját jelentheti a terápiás szempontból fontos fehérjék intracelluláris előállításának, bőrgyógyászati és más orvosi alkalmazások számára. CPD-fotoliázt kódoló, *in vitro* szintetizált mRNS keratinocitákba történő bejuttatása *in vivo* egy innovatív megoldást kínálhat a bőrdaganatok megelőzésére.



Nyilvántartási szám: DEENK/138/2015.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Boros Gábor
Neptun kód: OX480T
Doktori Iskola: Egészségtudományok Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Boros, G.**, Mikó, E., Muramatsu, H., Weissman, D., Emri, E., Szegedi, A., Horkay, I., Emri, G., Karikó, K., Remenyik, É.: Identification of Cyclobutane Pyrimidine Dimer-Responsive Genes Using UVB-Irradiated Human Keratinocytes Transfected with In Vitro-Synthesized Photolyase mRNA.
PLoS One. 10 (6), e0131141-, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0131141>
IF:3.234 (2014)
2. **Boros, G.**, Mikó, E., Muramatsu, H., Weissman, D., Emri, E., Rózsa, D., Nagy, G., Juhász, A., Juhász, I., van der Horst, G., Horkay, I., Remenyik, É., Karikó, K., Emri, G.: Transfection of pseudouridine-modified mRNA encoding CPD-photolyase leads to repair of DNA damage in human keratinocytes: A new approach with future therapeutic potential.
J. Photochem. Photobiol. B. 129, 93-99, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2013.09.010>
IF:2.803





További Közlemények

3. Emri, E., Mikó, E., Bai, P., **Boros, G.**, Nagy, G., Rózsa, D., Juhász, T., Hegedűs, C., Horkay, I., Remenyik, É., Emri, G.: Effects of non-toxic zinc exposure on human epidermal keratinocytes.
Metallomics. 7 (3), 499-507, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1039/C4MT00287C>
IF:3.585 (2014)
4. **Boros G.**, Mikó E., Horkay I., Karikó K., Emri G., Remenyik É.: Az mRNS-alapú génterápia dermatológiai alkalmazásának lehetőségei: Fényvédelem újragondolva = Dermatological application of mRNA-based gene therapy : protection from UV-radiation-caused damages.
Bőrgyógyász. Venerol. Szle. 89 (5), 119-122, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.7188/bvsz.2013.89.5.1>
5. Mikó, E., Czimmerer, Z., Csánky, E., **Boros, G.**, Buslig, J., Dezső, B., Scholtz, B.: Differentially expressed microRNAs in small cell lung cancer.
Exp. Lung Res. 35 (8), 646-664, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3109/01902140902822312>
IF:1.177

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 10,799

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 6,037

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, 2015.07.01.



Előadások és poszterek

1. **23rd World Congress of Dermatology, Vancouver, Canada**, *Changes of mRNA expression during photoprotection accomplished by mRNA transfection – an in vitro study* (first author)
2. **44th Congress of European Society for Dermatological Research, Copenhagen, Denmark**, *Effect of cyclobutane pyrimidine dimer on gene expression is mediated by activation of c-Jun kinase in UVB irradiated human keratinocytes* (oral presentation)
3. **2nd Experimental Dermatological Conference, Szeged, Hungary**, *Cyclobutane pyrimidine dimer-dependent modulation of mRNA- and protein expression in human keratinocytes following UVB exposure* (oral presentation)
4. **16th Annual Meeting of American Society of Gene and Cell Therapy, Salt Lake City, Utah, USA**, *Transfection of pseudouridine-containing mRNA encoding CPD-photolyase into UVB-irradiated human keratinocytes results in rapid repair of DNA damage* (poster presentation)
5. **43rd Congress of European Society for Dermatological Research, Edinburgh, Scotland**, *Post-UV delivery of CPD-photolyase mRNA leads to repair of DNA damage in human keratinocytes* (poster presentation)
6. **42nd Congress of European Society for Dermatological Research, Venice, Italy**, *CPD-dependent gene expression changes in photolyase mRNA-transfected human keratinocytes irradiated by UVB* (poster walk)
7. **41st Congress of European Society for Dermatological Research, Barcelona, Spain**, *Enhanced repair of UVB-induced DNA lesions in photolyase mRNA-transfected keratinocytes* (poster presentation)

Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Emri Gabriellának a sok segítséget, szakmai útmutatást és a mindenre kiterjedő figyelmet, mellyel munkámat végigkísérte a doktori időszakom alatt.

Hálámat szeretném kifejezni Prof. Dr. Remenyik Évának a munkámhoz nyújtott hasznos tanácsaiért, és amiért a Bőrgyógyászati Klinika sejtlaborjának tagja lehettem. Külön köszönet illeti Dr. Karikó Katalint, akinek szakmai tudása, kutatói látásmódja és kollegaritása a munkámban nyújtott gyakorlati segítségen túl emberileg is példaértékű számomra. Szeretném kifejezni őszinte tiszteletemet a kollégáimnak és barátaimnak, Emri Eszternek, Janka Eszter Annának, Hegedűs Csabának és Rózsa Dávidnak, akiknek szakmai tudására és odaadó segítőkészségére bármikor számíthattam. Köszönetet szeretnék mondani Toka-Farkas Tündének, Kertész Józsefné Erzsikének és Csapóné Sandrai Ildikónak a technikai asszisztenciáért és segítségért. Hálás vagyok Dr. Juhász Tamásnak a konfokális mikroszkópiához nyújtott segítségért. Ez a dolgozat nem jöhetett volna létre Prof. Dr. Horkay Irén, Prof. Dr. Gijsbertus T.J. van der Horst, Prof. Dr. Drew Weissman és Dr. Hiromi Muramatsu segítségével.

Szeretném kifejezni legmélyebb hálámat feleségemnek, Zsuzsannának és lányomnak, Bodzának, feltétel nélküli szeretetükért, támogatásukért, türelmükért, és, hogy mindig átsegítettek a nehéz időkön. Végül köszönetet mondok szüleimnek és szeretett családomnak a lelki és anyagi támogatásért, a soha el nem apadó megértésükért.