

# UVB- és plazma sugárzás által indukált celluláris folyamatok humán keratinocitákban

Ph.D. értekezés tézisei

Fazekas Barbara



Bőrgyógyászati és Allergológiai Klinika

Szegedi Tudományegyetem

Szeged

2015

# UVB- és plazma sugárzás által indukált celluláris folyamatok humán keratinocitákban

Ph.D. értekezés tézisei

Fazekas Barbara

Témavezetők:

Dr. Ádám Éva

Dr. Széll Márta

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

Bőrgyógyászati és Allergológiai Klinika

Szegedi Tudományegyetem, Szeged

Növénybiológiai Intézet

MTA Szegedi Biológiai Központ, Szeged

Szeged

2015

## KÖZLEMÉNYEK

### A dolgozat témakörébe tartozó közlemények

- I. **Barbara Fazekas**, Hilda Polyánka, Attila Bebes, Gábor Tax, Kornélia Szabó, Katalin Farkas, Ágnes Kinyó, Ferenc Nagy, Lajos Kemény, Márta Széll, Éva Ádám: UVB-dependent changes in the expression of fast-responding early genes is modulated by huCOP1 in keratinocytes.  
*Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology* 140: pp. 215-222. (2014)  
**IF: 2.803**
  
- II. Ihor Korolov, **Barbara Fazekas**, Márta Széll, Lajos Kemény, Kinga Kutasi: The effect of the plasma needle on the human keratinocytes related to the wound healing process.  
*Journal of Physics D: Applied Physics* (Accepted for publication) (2015)  
**IF: 2.721**

### Egyéb közlemények

1. Nikoletta Nagy, Katalin Farkas, Ágnes Kinyó, **Barbara Fazekas**, Kornélia Szabó, Edit Kollár, Balázs Sztano, Angéla Meszes, Dóra Beke, Lajos Kemény, László Rovó, Márta Széll: A synonymous polymorphism of APCDD1 affects translation efficacy and is associated with androgenic alopecia.  
*Journal of Life Sciences (Libertyville)* 8:(2) pp. 106-114. (2014)
  
2. Hilda Polyánka, Kornélia Szabó, Vilmos Tubak, Erzsébet Kusz, Lilla Erdei, Gábor Tax, Beáta Szilvia Bolla, **Barbara Fazekas**, Zsuzsanna Ujfaludi, Róbert Katona, Imre Boros, Zsuzsanna Bata-Csörgő, Lajos Kemény, Márta Széll: A novel immortalized keratinocyte cell line (HPV-KER) is a suitable model for in vitro analysis of UV-B-induced processes of keratinocytes.  
(Under review in *Archives of Dermatological Research*; **IF: 1.902**, 2015)

## BEVEZETÉS

### 1. UVB sugárzás által indukált folyamatok a bőrben és keratinocitákban

Az UVB fény (290 - 320 nm) az egyik legfontosabb fizikai karcinogén környezetünkben, mely káros hatásai ellen a bőr - az első és legfőbb barrier - védi testünket. Az epidermisz - első védelmi vonalunk az UV fény ellen - szenved el a fénykárosodás többségét, amely jelenthet öregedést, ráncképződést, keratózist, vagy akár daganat megjelenését is. Az UV károsodás által kiváltott klinikai és hisztológiai manifesztálódás jól ismert, azonban az elváltozást megelőző kóroki molekuláris mechanizmusok tanulmányozása csupán mostanában került a kutatások látóterébe. Bár régóta ismert, hogy a környezeti UVB károsodás fő érintettje az epidermális keratinocita, a bennük lezajló UVB által indukált celluláris folyamatokat szabályozó molekuláris útvonalak pontos ismerete a mai napig nem tisztázott.

#### 1.1. COP1, a konstitutív fotomorfogén protein 1

A konstitutív fotomorfogén protein 1 (COP1) gént lúdfüben (*Arabidopsis thaliana*) írták le először, mint a fény által regulált fejlődés központi negatív szabályozója. A gén egy E3 típusú ubiquitin ligázt kódol, mely számos transzkripció faktor proteaszóma dependens degradációjában játszik szerepet. Sőtétben a COP1 a sejtmagban lokalizálódik, ahol számos transzkripció faktor (HY5, HYH, HFR1 és LAF1) közvetlen ubiquitinációjában és proteaszómalis degradációjában játszik szerepet, ily módon kikapcsolva a fény által aktivált gének működését. A fényben azonban a COP1 a citoplazmába kerül, engedve a fényérzékeny transzkripció faktorok által aktivált molekulák működésbe lépését. A COP1 egyik szubsztrátja a HY5 protein, egy bZIP transzkripció faktor, mely a fényreguláció kulcs elemeinek egyike minden hullámhosszú fény, beleértve az UVB fény alatt.

A lúdfü, humán és egér genomok tanulmányozása során, a COP1 gén szekvencia analízise kimutatta, hogy a COP1 domén szerkezetét magas fokú evolúciós konzerváltság jellemzi a magasabb rendű növényekben és gerincesekben. Az emlős (MmCOP1) és humán (huCOP1) COP1 gének az 1-es számú kromoszómán lokalizálódnak és a magas fokú szekvencia konzerváció felveti az AtCOP1-vel való funkcionális konzerváció valószínűségét is.

Az emlős COP1 (RFWD2) szerepéről szerzett információink főként egér modelleken végzett kísérleteken alapul. A COP1 E3 ubiquitin ligáz főként a sejtmagban és kisebb mennyiségben a citoszolban fejeződik ki. A COP1 funkciója elsősorban többféle fehérje szubsztrát, köztük önmaga ubiquitinációjának közreműködésében nyilvánul meg, proteoszómális lebontást előidézve. A COP1 hozzájárul az UVB által indukált jelátviteli folyamatokhoz növényekben csakúgy, mint humán keratinocitákban.

### **1.1.1. COP1 szerepe növényi és humán sejtek UVB válaszában**

#### **1.1.1.1. A COP1 szerepe a növények UVB válaszában**

Az AtCOP1 látható fényben negatív regulátorként, míg az alacsony UVB tartományú sejtválaszban pozitív szabályozó elemként vesz részt. *Arabidopsis thaliana* cop1-4 mutáns növényeken végzett, UVB fény által gerjesztett nagy skálájú génexpresszió tanulmányozása során megfigyelték, hogy a gének kifejeződése gátlás alatt áll, továbbá a HY5 gén aktivációjához nélkülözhetetlen az AtCOP1 gén működése. Legutóbbi eredmények alapján az UVB az AtCOP1-SPA komplex fizikális és funkcionális leválását váltja ki a CUL4-DDB1 és a mostanában azonosított UVB fotoreceptort tartalmazó, UVR8 komplextől. Az UVB által indukált komplex elősegíti a HY5 transzkripciós faktor stabilitását és aktivitását.

#### **1.1.1.2. A huCOP1 szerepe a keratinociták UVB sugárzásra adott sejtválaszában és annak mechanizmusában**

Az UVB sugárzás számos gén kifejeződését változtatja meg, beleértve a p53-at, amely transzkripciós faktorként központi szerepet tölt be a sejtek stresszválaszában. A p53 egyik fő antagonistája a COP1, mely a p53 fehérje ubiquitinációján keresztül fejt ki szabályozó hatását. Kutatócsoportunk korábban kimutatta, hogy a huCOP1 UV-indukált módon fejeződik ki humán keratinocitákban és hogy a p53 molekula poszttranszlációs módosítása révén részt vesz a sejtek UV-válaszában kialakításában.

A COP1 önmaga ubiquitinációs és degradációs folyamatában is közreműködik, mely folyamatot a DNS károsodás gyorsabbá tesz. Irodalmi adatok alapján ismert, hogy a „constitutive photomorphogenesis 9 signalosome” (CSN) szerepet játszik az UV fény okozta DNS károsodás és karcinogenezis szabályozásában.

## 2. Gázkisülési plazma mint terápiás kezelésre alkalmas gázkeverék

Az atmoszférikus nyomású alacsony hőmérsékletű gázkisülési plazmák alkalmasnak mutatkoznak terápiás célokra. A plazmagyógyászat egy új, a biológiát, kémiát és fizikát átölelő interdiszciplináris kutatási terület. Fizikai értelemben a gázkisülési plazmát különböző ionok, elektronok, szabadgyökök (reaktív oxigén és nitrogén fajták), valamint UV sugárzáshoz hozzájáruló gerjesztett molekulák keveréke alkotja. Az alacsony hőmérsékletű plazma ígéretes lehetőségeket rejt bőrgyógyászati vonatkozásban mind stimuláló, mind gátló folyamatok indukálásában. Terápiás felhasználása esetén, a krónikus sebek kezelése során, antimikrobiális vagy antiszeptikus hatását szelektív módon éri el a körülölelő szövet károsodása nélkül, azonban a szövetregenerációt stimulálva. Az alacsony hőmérsékletű atmoszférikus plazma veszélytelen a felület hőmérsékletnövekedését, az UV sugárzást vagy szabadgyök képződést illetően, míg jelentősen képes csökkenteni a bőr bakteriális fertőzöttségét.

### 2.1. Plazma kezelés hatása sebgyógyulási folyamatra

A *plazmatű* egy tűhegyen keltett nem termikus atmoszférikus ködfénykisülésű plazmaforrás. A *plazmatű* kezdeti felhasználása óta számos átalakításon ment keresztül, amely egyre alkalmasabbá tette az orvosbiológia számára. Számos tanulmány vizsgálta a *plazmatű* hatását biológiai mintákon úgy, mint 3T3 egér fibroblaszt sejtek migrációját és apoptózisát, mesenchimális őssejtek proliferációját és differenciációját, vagy baktériumölő hatását. Mivel a *plazmatű* lehetővé teszi a minta közvetlen kapcsolatát az aktív plazma kisüléssel - ellentétben az atmoszférikus plazmasugárral, ahol csupán az utókisülés érintkezik a mintával – lehetővé teszi az aktív plazma és az elektromos mező sebgyógyulási folyamatokra kiváltott hatásának tanulmányozását.

## CÉLKITŰZÉSEK

Az UVB fény a legfontosabb fizikai karcinogének egyike környezetünkben, melynek káros hatásaitól a bőr – az első és legfőbb barrier – védi testünket. A huCOP1 számos celluláris folyamatban játszik szerepet, és hozzájárul az UVB okozta DNS károsodást követő celluláris stresszválaszhoz. Bár a huCOP1 a késői UV válasz poszttranszlációs regulátora organizmusok széles körében, arra vonatkozólag mindeddig nem rendelkezünk adatokkal, hogy a transzkripció szinten megvalósuló korai sejtválaszban szerepet játszik-e.

Az atmoszférikus nyomású alacsony hőmérsékletű plazmák terápiás célú alkalmazhatósága élő sejteken és szöveteken új teret nyit a gyógyításban. A sebgyógyulás folyamatában a fő elemek a keratinociták, melyek migráción keresztül igyekeznek a seb által keletkezett űrt betölteni. A *plazmatű* alkalmas eszköz a sebgyógyulási folyamatokra a plazma által gyakorolt hatások tanulmányozására.

Ezért célul tűztük ki

- keratinocita sejtvonal létrehozását és jellemzését, melyben a huCOP1 kifejeződése csendesített
- UVB sugárzás hatásának tanulmányozását a huCOP1 fehérje kifejeződésére a huCOP1-csendesített sejtekben
- huCOP1 szerepének jellemzését az UVB által indukált korai jelátviteli folyamatokban, mely keratinociták transzkripcionális válaszához vezet
- *plazmatű*-vel keltett plazma sugárzás hatásának vizsgálatát a humán keratinociták proliferációjára és migrációjára
- nem-termikus atmoszférikus nyomású plazma hatásának igazolását sebgyógyulási folyamatokban humán keratinocitákon keresztül

## ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

- HPV-KER II/15 stabil transzformációja huCOP1 csendesítő szekvenciát tartalmazó és nem tartalmazó vektorral (pSuperior puro vektor) került végrehajtásra.
- Keratinocita sejtvonalak életképességének követése impedancia mérésén alapuló eljárással, az xCELLigence rendszerrel történt (RTCA SP).
- Az elpusztult sejtek élőktől való megkülönböztetése propidium iodide festéssel történt konfokális lézer pásztázó mikroszkóp segítségével.
- A sejtek UVB sugarazása 20 mJ/cm<sup>2</sup> dózissal, 312 nm hullámhosszon (FS20 UVB forrás) történt.
- Western blott analízis során egyforma mennyiségű teljes fehérje kivonatot (1.0 millió sejt 100 µl oldatban) SDS-PAGE gélen futtattunk, majd PVDF membránra transzferáltunk. A membránokat COP1 vagy α-Actin elsődleges ellenanyagokkal, majd másodlagos ellenanyaggal (anti-rabbit IgG–HRP) inkubáltuk, majd ezt követően kemilumineszcens HRP szubsztráttal detektáltuk.
- Immunocitokémia során, a keratinociták tenyésztőlemezen növesztését követően, UVB kezelés után 24 órával immunfestést végeztünk. A minták COP1 elsődleges, majd Alexa Fluor 488-jelölt másodlagos ellenanyaggal történt inkubációját követően azokat fluoreszcens fénymikroszkóppal detektáltuk.
- Valós idejű RT–PCR elvégzéséhez, sejtekből izolált 5 µg teljes RNS tisztítását követően cDNS szintetizálása történt. A 30 UVB által regulált gén expressziós vizsgálata „custom-made StellarArray™ Gene Expression System” (Bar Harbor BioTechnology, Trenton, ME) array segítségével, ABI Prism 7300 PCR géppel hajtottuk végre. Minden egyes gén expresszióját 18S riboszómális RNS génre normalizálva határoztuk meg. A relatív mRNS expressziós szint kalkulációját  $\Delta\Delta C_t$  módszerrel végeztük.
- A valós idejű RT–PCR kísérletek validálása „Universal Probe Library” rendszerrel (F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, Svájc) történt.
- Bioinformatikai analízis az „Ingenuity Pathway Analysis” szoftverrel készült. A P-értékek számítása Fisher-féle egzakt próba alkalmazásával történt.
- Annak érdekében, hogy sejteken tanulmányozhassuk a gázkisülési plazma hatását, úgynevezett *plazmatűt*, egy tű hegyénél keltett nem-termikus atmoszférikus



ködfénykisülési plazmaforrást alkalmaztunk. A *plazmatű* konfiguráció felépítése a következő volt: a teflon tartóba épített *plazmatű* egy 0.3 mm átmérőjű kerámia borítású központi wolframszálból állt, melyet egy 4 mm belső és 6 mm külső átmérőjű üvegcsőbe helyeztünk. A kisülés keltéséhez szükséges hélium gáz a kerámia és üvegcső fala között áramlott 1-1,45 slm (standard liters per minute) hozammal. A kisülés keltése 15-30 W beviteli teljesítmény mellett történt, mely becsléseink szerint alacsonyabb, mint 500 mW elnyelt plazmateljesítményt eredményezett. A gázkisülés optikai emissziós spektruma a 250-800 nm hullámhosszú tartományban a hélium atomok dominanciájára mutatott rá az oxigén atomok, OH molekulák és kis mennyiségben  $N_2$  and  $N_2^+$  gyökök által kísérvé.

- A sebgyógyulási kísérletek során  $1 \times 10^5$  sejt/well tenyésztése történt 24 lyukú sejttenyésztő edényben. A sebet modellező karc 4 mm szélességű karcolóval készült. A karc megfigyelése inverz rutin mikroszkóppal történt. A karc szélességének mérését Gimp2 szoftverrel, míg a karcszélesség csökkenésének mértékszámítását  $t = n$  (h) időpontban mért karcszélességből a  $t = 0$  (h) időpontban mért karcszélesség való kivonása alapján végeztük.
- Humán keratinociták természetes mikrobiális környezetének modellezéséhez *Propionibacterium acnes* (ATCC 11828;  $1 \times 10^9$  cfu/ml) törzsszel kezeltük a sejteket MOI=50 (multiplicity of infection) baktériumarány mellett. A ko-kultúrán ejtett sebet modellező karc megfigyelése 24 órán keresztül történt.

## EREDMÉNYEK

### 1. Humán konstitutív fotomorfogén protein 1 szerepe a humán keratinociták fényválaszában

Az UVB fény az egyik legfontosabb fizikai karcinogén a környezetben, és a bőr az első és legfőbb barrier, mely védi testünket annak káros hatásaitól. Az UV-indukált változásokat epidermális keratinocitákban már széles körben tanulmányozták.

A Constitutive Photomorphogenic Protein 1 (COP1) fehérje konzervált magasabb rendű növényekben és gerincesekben. Növényekben a COP1 funkciója szorosan összekapcsolódik a fényjelátviteli mechanizmusokkal. A COP1 központi represszorként működik, ahol az önmaga és különböző pozitív regulátorok ubiquitinációját és degradációját idézi elő fotoreceptor komplexek közreműködésén keresztül. Legutóbbi ismereteink szerint azonban az UVB fényben a COP1 a jelátviteli útvonal pozitív regulátoraként működik. Emlősökben a celluláris kontextustól függően a COP1 mind tumor szupresszorként, mind onkogénként szerepet játszhat, ily módon terápiás célú felhasználásának lehetősége is felmerül.

Számos irodalmi adat támasztja alá, hogy a huCOP1 szerepet játszik a tumorgenezisben fontos szerepet játszó, UVB sugárzásra adott celluláris válaszreakcióban működő gének negatív szabályozásában. Mindazonáltal, a huCOP1 UVB válaszában betöltött lehetséges szerepét keratinocitákban - az UVB sugárzásnak leginkább kitett sejttípusban - mindeddig nem tanulmányozták részletesen. Ezért célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk a huCOP1 funkcióját humán keratinocitákban.

Annak érdekében, hogy ezt vizsgálni tudjuk, a huCOP1 gént stabilan lecsendesítettük HPV-vel immortalizált keratinocita sejtvonalban (siCOP1). Kimutattuk, hogy a huCOP1 csendesítése nem okoz életképesség változást. A létrehozott sejtvonalak jellemzése során kimutattuk, hogy a csökkent huCOP1 szint tovább csökken UVB hatására. A szignifikánsan csökkent huCOP1 szint hatására még hangsúlyosabb UVB által indukált génexpressziós változás következik be a sejtekben, szemben a nem-transzformált keratinocitákkal. Az eredmények igazolják, hogy a létrehozott sejtvonal alkalmas a huCOP1-függő UVB által indukált korai génexpressziós változások tanulmányozására.

A huCOP1 specifikus csendesítését követően összehasonlítottuk a kontroll és a csendesített sejtvonalak génexpressziós profilját kezeletlen és UV-besugárzott sejtekben RT-PCR módszerrel. Vizsgálati eredményeink alapján elmondható, hogy a huCOP1 csendesítése nincs hatással a vizsgált gének expressziójára az UVB-kezeletlen sejtek esetében.

Vizsgálati eredményeink arra utalnak, hogy a huCOP1 gén stabil siRNS-mediált csendesítése hatással van bizonyos gének UV válaszára kezelést követően két órával, mely arra enged következtetni, hogy a huCOP1 módosult kifejeződése érzékenyíti a sejteket UVB besugárzásra.

Molekuláris útvonal analízis segítségével azonosítottunk egy hálózatot, melyben az általunk kiválasztott 30 UVB által regulált gén közül 13 vesz részt, három centrális molekula (*ERK1/2*, *CREB* and ubiquitin) köré rendeződve. Mivel mind a 13 vizsgált gén expressziója UVB sugárzás hatására fokozott az siCOP1 sejtvonalonban, feltételezhető, hogy a huCOP1 represszor funkciót tölt be az azonosított hálózatban. Az hálózat bizonyos tagjai között korábban már funkcionális kapcsolatot véltek felfedezni. Az irodalmi adatok alapján tudjuk, hogy az azonosított hálózat néhány tagjának hiánya érzékenyíti a sejteket UVB válaszára. Valószínűsíthetően a huCOP1-mediált transzkripcionális kaszkád bizonyos elemeinek hiánya abnormális UVB válaszhoz vezet.

Az analízis azt is kimutatta, hogy az azonosított UVB hálózat upstream regulátorok szabályozása alatt áll, amelyek szintén UVB indukálhatóak. Feltételezhetően a huCOP1 fehérje represszor funkciót tölt be az azonosított hálózatban az upstream regulátorok szabályozása alatt. A huCOP1 megváltozott expressziót mutat nem-melanóma eredetű bőrtumorok esetében és az általunk azonosított hálózat több olyan tagot tartalmaz, melyek mindezen kórképek patogenezisében bizonyítottan szerepet játszanak. Ily módon a huCOP1 szerepének tisztázása mindezen kórképek esetében klinikai jelentőséggel bírhat a jövőben.

## **2. *Plazmatű*-vel keltett plazma hatásának vizsgálata a sebgyógyulási folyamatban résztvevő humán keratinocitákon**

Az atmoszférikus nyomású plazmát lehetséges terápiás célú ágensként tartják számon. A közelmúltban született tanulmányok a sebgyógyulási folyamatok modellezésével, mint a plazmapenetráció vagy a plazma által generált kémiai változások tanulmányozásával foglalkoznak. Ugyanakkor a plazmának az élő sejtekkel és

szövetekkel való kölcsönhatási mechanizmusa rendkívül komplex folyamat, ezért további kutatások szükségesek a lejátszódó fizikai és biológiai mechanizmusok feltárásához.

A *plazmatű* egy tű hegyénél keltett nem-termikus atmoszférikus ködfénykisülési plazmaforrás, mely orvosbiológiai felhasználásra alkalmas eszköz lehet a jövőben. Mivel a *plazmatű* által keltett aktív kisülési plazma közvetlen kapcsolatban lehet a kezelt mintával - ellentétben az atmoszférikus plazmasugárral, ahol csupán az utókisülés érintkezik a mintával - alkalmas eszköz az aktív plazmának a sebgyógyulási folyamatokra kiváltott hatásának tanulmányozására.

A sebgyógyulási folyamatban fő szerepet játszanak a keratinociták, melyek igyekeznek a seb által keletkezett űrt migrációval betölteni. Ezért HPV-immortalizált humán keratinociták közvetlen kezelését végeztük el hélium gázban a *plazmatű* által generált ködfénykisülési plazmával. A sejteket „phosphate buffered saline” (PBS) folyadékréteggel védtük. Sejtproliferációs, valamint sebgyógyulási modell vizsgálatokat végeztünk.

A megfelelő *plazmatű* konfiguráció - a plazma kezelési körülmények standardizálása és a kezelés alatt lévő sejteket védő PBS folyadékréteg szintjének beállítása - beállításához életképességi vizsgálatokat végeztünk. Vizsgálataink arra utaltak, hogy a tenyésztőedény mélyedéseinek méretétől függően egy minimális PBS réteg szükséges a kezelés alatt lévő sejtek védelméhez, nevezetesen a nagyobb mélyedés esetén vékonyabb PBS réteg is elegendőnek tűnik a sejtek védelméhez. Ezen adatok mutatják az arányítás bonyolultságát a kezelés körülményeit illetően.

A proliferációs vizsgálatok eredményei megmutatták, hogy a rövid idejű (5-10 s), és alacsony teljesítményű kezelés (úgy mint 18 W and 20 W beviteli teljesítmény), képes pozitívan befolyásolni a sejtek proliferációját. Demonstráltuk, hogy a tápfolyadékban kezelt sejtek érintettebbek (csökkent sejtproliferáció), mint a PBS-ben kezelt sejtek, amely arra utal, hogy a plazma-indukált folyadék kémiai tulajdonsága – azaz a keletkezett szabadgyökök, amelyek kölcsönhatásban állnak a sejtekkel – a két folyadékban eltérő volt. Ezért a megfelelő kölcsönható médium kiválasztása kiemelkedően fontos a kezelés körülményeinek beállítása során.

Annak érdekében, hogy a *plazmatű* hatását tanulmányozhassuk sebgyógyulási folyamatra, *in vitro* karcolásos vizsgálatot alkalmaztunk. A plazmakezelést követően 48 órával a karcszélesség csökkenésének monitorozása során azt tapasztaltuk, hogy egy maximum érhető el a sebszélesség csökkenésének tekintetében a beviteli teljesítmény és a kezelési idő függvényében, nevezetesen, 18 W és 5 s esetében. Mindazonáltal kedvező

feltételként mutatkozott a 18 W és 20 W beviteli teljesítményű, 5-25 s időtartamú kezelés is. Demonstráltuk továbbá, hogy a sebzáródás mértéke erősen függ a kezelt sejt - PBS rendszer kölcsönhatási idejétől.

A 96 lyukú sejtenyésző edényben végzett proliferációs vizsgálatok esetében a sejtek kölcsönhatásban voltak a teljes plazma folttal (a plazma radiális térbeli eloszlással jellemezhető), ahol a sejt kultúra ki volt téve a plazma teljes elektromos terének (mely csökkenő radiális eloszlást mutat). Ezzel szemben a karcolásos kísérlet során csupán a plazmafolt széleire jellemző alacsony elektromos tér volt hatással a sejtekre. Ezért a két típusú kísérlet során tapasztalt eltérő sejtproliferáció valószínűsíthetően az eltérő elektromos tér hatásának tulajdonítható. Fontos azonban megjegyeznünk, hogy nem tapasztaltunk pH-változásbeli különbséget a kezelt PBS kémiai változásával egyidejűleg.

Humán keratinociták természetes mikrobiális környezetének modellezéséhez *Propionibacterium acnes* ( $1 \times 10^9$  cfu/ml) törzssel kezeltük a sejteket MOI=50 baktériumarány mellett. A ko-kultúrán ejtett karcolás plazma általi kezelése sebzáródást indukált, míg a kezeletlen karcolás esetében egyáltalán nem tapasztaltunk záródást.

Eredményeink arra utalnak, hogy a keratinociták kismértékű stressz által kiváltott indukciója képes aktiválni a sebgyógyulási folyamatot, valamint hogy a kezelés során alkalmazott kölcsönható médiumot körültekintően szükséges megválasztani.

## ÖSSZEFOGLALÁS

- HuCOP1 hozzájárul a keratinociták UVB válaszának transzkripciós szabályozásához egy, három újonnan azonosított központi regulátor elem által működtető UVB indukálható hálózat down-regulációján keresztül.
- Az azonosított hálózat UVB választ produkáló upstream regulátorok szabályozása alatt áll. Feltételezzük, hogy a huCOP1 fehérje, represszor funkciót tölt be az azonosított hálózatban az upstream regulátorok szabályozása alatt.
- A huCOP1 megváltozott expressziót mutat nem-melanóma eredetű bőrtumorok esetében és az azonosított hálózat több olyan tagot tartalmaz, melyek mindezen kórképek patogenezisében bizonyítottan szerepet játszanak. Ily módon a huCOP1 terápiás célmolekulaként szolgálhat a bazálsejtes és/vagy laphám karcinóma esetében.
- Igazoltuk a nem-termikus atmoszferikus nyomású alacsony hőmérsékletű plazma hatását a sebgyógyulási folyamatra
- Eredményeink megmutatták, hogy a plazma képes pozitívan befolyásolni a sejtek proliferációját, amikor a kezelt sejteket PBS réteg védi. Demonstráltuk, hogy a tápfolyadékban kezelt sejtek érintettebbek (csökkent sejtproliferáció), mint a PBS-ben kezelt sejtek, mely igazolja, hogy a megfelelő kölcsönhatási médium kiválasztása kiemelkedően fontos a kezelés körülményeinek beállítása során.
- A seb-modell megmutatta, hogy egy maximum érhető el a sebszélesség csökkenésének tekintetében a beviteli teljesítmény és a kezelési idő függvényében, nevezetesen, 18 W and 5s esetében. Továbbá demonstráltuk, hogy a sebzáródás mértéke erősen függ a kezelt sejt - PBS rendszer kölcsönhatási idejétől.
- Humán keratinociták természetes mikrobiális környezetének modellezéséhez *Propionibacterium acnes* ( $1 \times 10^9$  cfu/ml) törzssel kezeltük a sejteket MOI=50 baktériumarány mellett. A ko-kultúrán ejtett seb plazma általi kezelése sebzáródást indukált, míg a kezeletlen seb esetében egyáltalán nem tapasztaltunk záródást.
- Eredményeink arra utalnak, hogy a keratinociták kismértékű stressz által kiváltott indukciója képes aktiválni a sebgyógyulási folyamatot, valamint hogy a kezelés során alkalmazott interakciós médiumot körültekintően szükséges megválasztani.

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretnék köszönetet mondani Kemény Lajos Professzor Úrnak a PhD programban való részvétel lehetőségért, valamint amiért lehetővé tette kísérleteim elvégzését a Szegedi Tudományegyetem, Bőrgyógyászati és Allergológiai Klinika laborjában.

Szeretném mély és őszinte hálámat kifejezni mentoraimnak és egyben tanácsadóimnak, Prof. Dr. Széll Mártának (Szegedi Tudományegyetem, MTA-SZTE Dermatológiai Kutatócsoport, Orvosi Genetika Tanszék), valamint Dr. Ádám Évának (Magyar Tudományos Akadémia Biológiai Kutató Központ, Növénybiológiai Intézet) témavezetésükért, valamint a kitartó támogatásukért és tanácsadásukért. Csodálattal tekintek széleskörű tudásukra és képességükre a tudományos kérdések elemzésében, valamint új, izgalmas ötletek előállításában. Leghálásabb a PhD tanulmányaimat végigkísérő végtelen türelmükért és ösztönzésükért vagyok.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Nagy Ferenc és Dr Michael P Carty kiváló javaslataival és felbecsülhetetlen értékű tanácsaival való támogatásáért és segítségnyújtásáért.

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Kutasi Kingának and Dr. Ihor Korolovnak, amiért betekintést nyerhettem a plazmafizika varázsába.

Hálás vagyok kollégáimnak, Tax Gábornak, Dr. Bebes Attilának, Farkas Katalinnak, Polyánka Hildának és Göblös Anikónak, amiért bevezettek a kutatási technikák rejtelseibe, valamint a gondoskodó támogatásukért a Szegedi Tudományegyetem, Bőrgyógyászati és Allergológiai Klinika laborjában lévő első lépéseim során. Hálás köszönettel tartozom minden egyes kollégámnak segítségükért, valamint a lehetőségért, hogy velük dolgozhattam.

Jelen munka a TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0012 és TÁMOP-4.2.2.A11/1/KONV-2012-0035 pályázatok finanszírozásával valósult meg.

Szintén rendkívül hálás vagyok családom minden tagjának, akik végtelen szeretetükkel, támogatásukkal és bátorításukkal szüntelen támaszként álltak mellettem.