# Az ionizáló sugárzás indukált molekuláris változások vizsgálata normál fibroblasztokban és tumor sejtekben

Doktori értekezés

# Schilling-Tóth Boglárka

Semmelweis Egyetem Patológiai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezetők: Dr. Hegyesi Hargita, Ph.D, tudományos főmunkatárs Dr. Sáfrány Géza, D.Sc, főigazgató főorvos

Hivatalos bírálók: Dr. Marcsek Zoltán, Ph.D főosztályvezető Dr. Lacza Zsombor, Ph.D, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Szilvási István, Ph.D, egyetemi tanár Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Lövey József, Ph.D, helyettes főorvos Dr. Csóka Mónika Ph.D, egyetemi docens

Budapest 2015

# 1. Tartalomjegyzék

1.	Tartalomjegyzék	2
2.	Rövidítések jegyzéke	5
3.	Bevezetés	13
3.1.	A sugárzás sejtkárosító hatása	14
3.1.1	A sugárzás hatására bekövetkező sejthalál módja	15
3.1.2	A sugárzás hatására bekövetkező sejtpusztulás időbeli lefolyása	19
3.2.	A sugárzás nem célzott hatásai	22
3.2.1	A bystander, vagy szomszédsági hatás (BE)	24
3.2.2	A genomiális instabilitás (GI)	25
3.2.3	Abszkopális effektus	26
3.2.4	A kis dózisú sugárzások hatása	27
3.2.5	Az adaptív válasz	27
3.2.6. LDR)	A kis dózisú sugárzásra kialakuló hiperérzékenység (Low-dose hypersensitiv)	ity- 28
3.3.	Mitokondriális változások sugárzás hatására	28
3.3.1	A mitokondriális genom	28
3.3.2	Az ionizáló sugárzás hatása a mitokondriális genomra	29
3.3.3	Az ionizáló sugárzás hatása a mitokondriális fehérjékre	30
3.3.4	A mitokondriális "Common" deléció	32
<i>3.4</i> .	A sugárérzékenységben szerepet játszó kandidáns gének	33
3.4.1	Növekedési differenciálódási faktor-15 (GDF-15)	36
3.4.2	. Transzformáló növekedési faktor-béta 1 (TGF-β1)	41
3.4.3	. Transzformáló növekedési faktor-béta 2 (TGF-β2)	43
4.	Célkitűzés	45
5.	Módszerek	47
5.1.	Sejtvonalak	47
5.1.1	. Humán fibroblaszt sejtvonalak	47
5.1.2	. Egér emlő tumor-sejtvonalak	47
5.2.	Sugárkezelés	<b>48</b>
5.3.	Kolónia assay	49
<i>5.4</i> .	Szemi-kvantitatív polimeráz láncreakció	50

5.5.	Kvantitatív valós idejű PCR	52
5.5.1.	Mitokondriális deléció mérése	53
5.5.1	1. Humán fibroblasztokon	53
5.5.1	2. Egér emlőtumor sejteken	54
5.5.2.	A mitokondriális "Common deléció" hosszú idejű követése	56
5.5.3.	Szomszédsági vizsgálat	57
5.5.4.	Célgének expressziójának meghatározása Real-time PCR-rel	57
5.6.	WST assay	59
5.7.	Apoptózis mérés	60
5.8.	ROS mennyiség mérése	60
<i>5.9</i> .	TGF-β1 ELISA assay	61
5.10.	Eredmények kiértékelése, statisztikai analízis	61
6.	Eredmények	62
<i>6.1</i> .	Humán fibroblasztokon végzett vizsgálatok	62
6.1.2.	Mitokondriális "Common" deléció (CD) kimutatásának optimalizálása	62
6.1.3.	Mitokondriális "Common" deléció mennyiségi analízise	63
6.1.5.	Szomszédsági vizsgálat	66
6.1.5. össze	1. A különböző szomszédsági hatást közvetítő módszerek technik hasonlítása	ák 66
6.1.6.	Sugárzás indukálta genomiális instabilitás követése	70
<i>6.2</i> .	Vizsgálatok tumorsejt vonalakon	73
6.2.1.	Az LM2 modell	73
6.2.2.	Sugárválaszt befolyásoló molekuláris hatások vizsgálata emlő tumor modellben	75
6.2.2	1. GDF-15 hatása a sugárérzékenységre	75
6.2.2	2. GDF-15 hatása a proliferációra	76
6.2.2	3. TGF-β1 gén expresszió változása sugárkezelés hatására	77
6.2.2	.4. A GDF-15 hatása a TGF-β1 szintre	78
6.2.2	5. A GDF-15 hatása a sugárzás indukálta TGF-β1 expresszióra	78
6.2.2	.6. A sugárkezelés hatása a TGF-β2 génexpresszióra	80
6.2.2	7. A GDF-15 hatása a TGF-β2 génexpresszióra	80
6.2.2	8. A GDF-15 hatása a sugárzás indukálta TGF-β2 génexpresszióra	81
6.2.2	10. GDF-15 hatása a mitokondriális deléció felhalmozódására	83

6.2.2. deléc	5.2.2.11.GDF-15 befolyása a sugárkezelés hatására indukálódó mitokondriálisdeléció felhalmozódásra84			
6.2.2.	12. GDF-15 hatása a sugárzás indukált apoptózisra			
6.2.2.	13. GDF-15 hatása az ionizáló sugárzás következtében felszabaduló ROS			
menn	yiségére			
7.	Megbeszélés			
8.	Következtetések			
9.	Összefoglalás 101			
10.	Irodalomjegyzék103			
11.	Saját publikációk jegyzéke 128			
12.	Köszönetnyilvánítás 130			

# 2. Rövidítések jegyzéke

- 53BP1 p53 kötő fehérje
- $\beta$ -AKT –Béta aktin
- ADAMTS1 ADAM metallopeptidáz thrombospondin 1 típusú motívummal 1
- AIF-Apoptózis indukált faktor
- AKTIP AKT interacting protein
- AP-1 jun proto-onkogén
- AP-2 Transzkripciós faktor AP 2
- APH-1 APH1A gamma Szekretáz alegység
- ARID5B/MRF2 AT gazdag interaktív domén 5B
- ARNO/CTH2 Citothesin 2
- APOBEC3A Apolipoprotein B mRNS editáló enzim, Katalitikus polipeptidszerű 3A
- ATF3 Aktiváló transzkripciós faktor 3
- Atg Autofágia-kapcsolt gén
- ATM Ataxia teleangiectasia mutáns fehérje
- ATR ATM-rokon fehérje
- BBC3 BCL 2 kötő komponens 3
- BE bystander vagy szomszédsági hatás
- BIG2 ADP-ribosylation factor guanine nucleotide-exchange factor 2
- $\beta$ -Gal Szeneszcencia-asszociált  $\beta$ -galaktozidáz enzim
- BMP Csont morfogén fehérje család
- BMP4 Csont morfogén fehérje 4
- BRCA1- breast cancer 1
- CASP3 kaszpáz 3
- BTG2 BTG család 2 -es tag
- CASP 3 Kaszpáz 3
- CASP5 Kaszpáz 5
- CASP8 Kaszpáz 8
- CCND1- Ciklin D1
- CCNA2 Ciklin A1
- CCNB1/CYP26B1 Ciklin B1
- CCNB2 Ciklin B2

CCNG1 - Ciklin G1

CD – Mitokondriális DNS "Common" deléció

CDC2/CDK1 - Ciklins dependens kináz 1

CDC6 - Ciklin dependens kináz 6

CDC25A - Ciklin dependens kináz 25A

CDC34 - Ciklin dependens kináz 34

CDC45 - Ciklin dependens kináz 45

CDC7L - Ciklin dependens kináz 7 Ligand

CDCR3 Ciklin dependens kináz receptor 3

CDK2 – Ciklin dependens kináz 2

CDK5 – Ciklin dependens kináz 5

CDK6 – Ciklin dependens kináz 6

CDK8 – Ciklin dependens kináz8

CDK 9 - Ciklin dependens kináz9

CEA/PSG1 - carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule

C-FOS - FBJ egér oszteoszarkóma vírus gén homológ

Chk1 - DNS törés ellenőrző fehérje 1

CLK1 - CDC-szerű kináz 1

COIL – Koilin

COL1A1 – Kollagén 1 A 1

COL5A1- Kollagén 5 A 1

COX2/PTGS2 - prosztaglandin-endoperoxid szintáz 2

CREBBP – CREB kötő fehérje

CREBL - CREB Ligand fehérje

CSF-1 – Kolónia stimuláló faktor 1

CTGF - Kötőszöveti növekedési faktor

CTSD – Katepsin D

CXCL2 – C-X C motívum kemokin ligand 2

CXCL12 – C-X C motívum kemokin ligand 12

CXCL35 - C-X C motívum kemokin ligand 35

CXCR1 - C-X C motívum kemokin receptor 1

CXCR2 – C-X C motívum kemokin receptor2

- DARP ankyrin repeat domain 23
- DEGS1 delta(4)-deszaturáz, sfingolipid 1
- DEVD Asp-Glu-Val-Asp szekvencia, kaszpáz 3 hasító hely
- DDB2 Károsodás specifikus DNS kötő fehérje
- DDR DNS károsodásra adott válasz
- DISC- Halált kiváltó szignalizációs komplex
- DKK1 dickkopf WNT szignál inhibítor 1
- DNA-PK DNS-függő fehérje kináz
- DNAJB6 DnaJ (Hsp40) homológ, B alcsalád, tag 6
- DUSP-1/MKP kettős specificitású foszfatáz 1
- DUSP10 kettős specificitású foszfatáz 10
- E2F5 E2 Transzkripciós faktor 5
- EFNB1 Ephrin B1
- EGR Korai növekedési válasz gén1
- EPB72 Stromatin
- EPOX Epoxid hidroláz 1
- ERK 1/2 Extracelluláris Regulált kináz 1/2
- FACS fluoreszcens áramlási citométer
- FANCE Fanconi anemia, complementation group E
- FAS- Fas sejt felszíni halál receptor
- FBLN1 Fibulin 1
- FBXW7 F-box and WD repeat domain containing 7, E3 ubiquitin protein ligase
- FDX-Ferredoxin
- FDX2 Ferredoxin 2
- FDXR -Ferredoxin receptor
- FGF Fibroblaszt növekedési faktor
- FPR1 Formil peptid receptor 1
- FOS FBJ murine osteosarcoma vírus onkogénhomológ
- GADD45 növekedés gátlás és DNS sérülés gén
- GAS1 Növekedés gátlás specifikus gén 1
- GDF15 növekedési differenciálódási faktor 15
- GI genomiális instabilitás

GPX4/MCSP - Glutation peroxidáz 4

GZMB/CTLA1 – Granzim B

GSTA1- Glutation S- transzferáz alfa 1

GSTM3 - Glutation S- transzferáz mu3

γH2XA –H2A hiszton X

HDAC4 - hiszton deacetiláz

HEC - NDC80 kinetochore complex component

HIF-1 – hipoxia indukált faktor 1

HNF4/TCF - hepatocita magi faktor 4,

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - hidrogén peroxid

HR-homológ rekombináció

H-RAS – Humán Ras szarkóma gén

HSC – fucosyltranszferáz 1

HSPA8 – Hősokk 70kDa protein 8

HSPBP1 – HSPA kötő protein 1

IER5 – Azonnali korai válasz gén1

IGF2 – Inzulin szerű növekedési faktor 2

IL - interleukin

IL-1B - Interleukin 1B

IL 6 – Interleukin 6

IL10-Interleukin 10

IL-33 – Interleukin 33

IR - ionizáló sugárzás

KRPS - Krebs-Ringer foszfát oldat

KRT7 - LC3 - microtubule-associated protein 1 light-chain subunit 3

LNT - linearis küszöb nélküli modell

LTC4S – Lukotrién 4 szintáz

MAPK - mitogén aktivált protein kináz

MDM2 - proto-onkogén, E3 ubiquitin protein ligáz

MIC-1 - Makrofág inhibítor citokin-1

MMP1 - Mátrix metalloproteináz 1

MMP3 - Mátrix metalloproteináz 3

- MP mofrogén fehérje
- MSH2 mutS homológ 2
- MTCH Mitochondrial carrier genes
- mtDNS mitokondriális örökítőanyag

MT1F-metallothionein 1F

MTND1 – Mitokondriális DNSben kódolt NADH dehidrogenáz 1

MTND2 - Mitokondriális DNSben kódolt NADH dehidrogenáz 2

MTND3 - Mitokondriális DNSben kódolt NADH dehidrogenáz 3

MTND4- Mitokondriális DNSben kódolt NADH dehidrogenáz 4

MYO10 – Miozin X

NAG-1 - nem-szterotid gyulladásgátlószer aktivált gén-1

NCSTN - Nicastrin

NHEJ - nem homológ végragasztás

NINJ1 – Ninjurin1

NTE – a sugárzás nem célzott hatásai

OAG-open angle glaucoma

p16/CDKN2A- cyclin-dependens kináz inhibítor 2A

p21waf1/cip1- cyclin-dependens kináz inhibítor 1A

p53- protein 53

P2RX2 – purinerg receptor P2X, ligand-kötő ion csatorna 2

PA28 – Proteaszóma aktivátor alegység 3

PAK3 - p21 protein (Cdc42/Rac)-aktivált kináz 3

PBS- foszfát puffer

PCR- polimeráz láncreakció

PCNA – proliferáló sejt nukleáris antigén

PDCD 4- Programozott sejthalál fehérje gén 4

PDCD 6- Programozott sejthalál fehérje gén 6

PDCD10- Programozott sejthalál fehérje gén 10

PDCD6IP - Programozott sejthalál 6 kölcsönható fehérje gén

PE- plate-képző hatékonyság

PDF - placentából származó faktor

PI3KR - phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase receptor

- PLAB placentából származó csont morfogén fehérje
- PLK2/SNK- polo-like kinase 2
- PLK3 polo-like kinase 3
- PMN polimorfonukleáris leukociták
- PPM1D protein foszfatáz, Mg2+/Mn2+ dependens, 1D
- pRB retinoblasztóma fehérje
- PRKCB1 Protein kináz béta 1
- PSMA2 Proteaszóma alegység kódoló gén 2
- PSMA6 Proteaszóma alegység kódoló gén 6
- PSMB1 Proteaszóma alegység kódoló gén B1
- PTEN Foszfatáz és tenzin homológ gén
- PTGF-β placentából származó transzformáló növekedési faktor béta
- PTGS2 prostaglandin-endoperoxid szintáz 2
- RAI17 zinc finger, MIZ-type containing 1
- Rad3 DNS hibajavító fehérje Rad3
- Rad4 DNS hibajavító fehérje Rad4
- Rad18 DNS hibajavító fehérje Rad18
- Rad50 DNS hibajavító fehérje Rad50
- Rad51- DNS hibajavító fehérje Rad51
- RAS Rat sarcoma gén
- RAP1A Ras rokon fehérje 1A
- RB1 Retinoblasztóma gén 1
- RFC Replikációs faktor 1 gén
- RFX Regulációs faktor X 1
- ROS reaktív oxigén gyökök
- RTK Receptor tirozin kináz
- RT-PCR- valós idejű láncreakció
- SA-βGal Szeneszcencia asszociált béta galaktozidáz
- SCARA3 Scavenger receptor osztály A, 3
- SF túlélő sejtek frakciója
- SESN1 sestrin 1
- SERTAD1 SERTA domén tartalmazó 1-es gén

- SH2D2A SH2 domain containing 2A
- SLIC1 sorting nexin 20
- Smad-4 Smad családtag 4
- SMARCE1 SWI/SNF rokon, mátrix assziciált, aktinfüggő kromatin regulátor,

alcsalád e, 1-es tag

SMUG/UNG – egy-szálú DNS szelektív monofunkcionális uracil-DNA glikoziláz 1

SOD2 – Szuperoxid diszmutáz 2

SOD3 – Szuperoxid diszmutáz 3

- SUI1/EIF1- eukaryotic transzláció iniciáló faktor 1
- SULT2A1 szulfotranszferáz család, citoszolikus 2A, dehydroepiandroszteron

(DHEA)-preferáló, 1-es tag

TE puffer - Tris-EDTA puffer

TF12/ZNF92 - zinc finger protein 92

TGF-β1 – Transzformáló növekedési faktor béta 1

TGF-β2 – Transzformáló növekedési faktor béta 2

THS1 - teashirt zinc finger homeobox gén 1

TIMP3 - TIMP metallopeptidázinhibítor 3

TM1 – Tropomiozin gén 1

TNFα - tumor nekrózis faktor alfa

TNFRSF10B – TNF receptor 10 B

TNFRSF11B - TNF receptor 11 B

TP53 – Tumor protein 53

TP53INP1 – TP53 indukált magi fehérje 1

TRAF - TNF receptor-associated factor

TXNL2 - glutaredoxin 3

UBE2C- Ubiquitin konjugáló enzim E2C

UBE4A- Ubiquitin konjugáló enzim E4A

UV - ultraibolya sugárzás

USP30 – Ubiquitin specifikus enzim 30

XRCC1 – X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 1

XRCC4 – X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 4

XRCC5 – X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 5

XRCC6- X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 6

VCL – vinculin gén

WNT2 - wingless-type MMTV integration site family member 2

## 3. Bevezetés

A sugárbiológia több évtizedes kutatásai alapján ma már sok mindent megismertünk az ionizáló sugárzásról, aminek következtében sokat finomodtak a terápiás és az egyéb alkalmazási módszerek. Azonban mind a mai napig számos kérdés van ezen témában, ami még tisztázásra vár.

Régóta ismert, hogy az ionizáló sugárzás okozta sejtkárosodások a sejt típusától, a sugárzási körülményektől és a sugárzás nagyságától függően, különböző mértékűek és jelentőségűek lehetnek (Blank és mtsai, Hendry és West; Olive és Durand 1997; Meng és mtsai 1998). Vezethetnek a sejt halálához letális mutációkon keresztül, okozhatnak olyan szubletális sérüléseket, melyek összeadódva hosszabb idő elteltével eredményezhetik a sejt halálát, vagy elindíthatnak olyan károsító folyamatokat, melyeken keresztül a sugársérülést nem szenvedett egészséges sejtek, szövetek is sérülhetnek. Attól függően, hogy milyen sejteket talál el a sugárzás, a letális hatás is különböző sejthalál útvonalakon keresztül valósulhat meg.

A sugárzást követő különböző szöveti és a sugárterápia során fellépő egyéni reakciók, amik befolyásolhatják az alkalmazott kezelést is már régóta ismeretesek (Bentzen és Overgaard 1994). Az olyan specifikus markerek keresése, amelyek előre jeleznék a kialakuló egyéni különbségeket és károsodásokat, mind a mai napig tart (Andreassen és Alsner, 2009), hiszen a tényleges hatást egyelőre csak becsülni tudjuk a dózis és a sejttípus ismeretében, a sugárterápia során is alkalmazott modellekkel. A sugárválaszban és az egyéni sugárérzékenységben szerepet játszó gének felderítése, illetve hatásának vizsgálata közelebb vihet minket ennek a folyamatnak a pontos megismeréséhez.

A terápiás dózisok alkalmazása mellett számolnunk kell a szöveteket ért sugárterheléssel az egyes orvosdiagnosztikai vizsgálatok során, melyeknek a dózisa az úgynevezett kis dózis tartományba esik, és amelyeknek a hatásáról mind a mai napig nem egységes az irodalom.

Mind a nagy, mind a kis dózisú expozíció esetén figyelembe kell venni a sugárzás úgynevezett nem célzott káros hatásait is, mint a szomszédsági hatás, illetve a genomiális instabilitás, melyek köztudottan nem követik a dózis-hatás modelleket (Kadhim és mtsai 2013), ezért a következményeik nehezen prediktálhatók.

Nagyon fontos olyan biomarkerek és biológiai folyamatok megismerése, melyek ezekre előre nem meghatározható folyamatokra irányulnak, és segítik az azok bekövetkezésének valószínűségét megállapítani. Mivel akár egy sejten belül is többfajta jelátviteli útvonal aktiválódhat egyszerre és vezethet a károsodáshoz, nem elég, ha csak megfigyeljük a sejtek pusztulásának bekövetkeztét, azt is tudnunk kell melyik útvonalak a legérzékenyebbek a sugárzásra, az egyes molekulák hogyan befolyásolják ezeket az útvonalakat, érvényes-e ez törvényszerűen minden sejtre, illetve milyen egyéb körülmények kellenek az egyes változások biztos bekövetkeztéhez. Jelen munkámban olyan biomarkereket vizsgáltam, melyek közelebb vihetnek ezek megválaszolásához. Ezek a molekulák, illetve molekuláris változások szerepet játszanak a sejtek sugárzásra kialakított válaszában, a sugárérzékenységben, a nem célzott hatások, mint a genomiális instabilitás, szomszédsági hatás és a sejthalál bekövetkeztében.

#### 3.1. A sugárzás sejtkárosító hatása

A sugárzás károsító hatása úgy alakul ki, hogy az ionizáló sugárzás elnyelődik a sejtben és annak energiát ad át. Az átadott energia gerjesztett állapotba hoz egy molekulát, atomot. Az energia átadás lehet direkt, vagyis az elnyelődés és a hatás ugyanazon molekulán következik be, illetve indirekt energiaabszorpció, mikor a hatás más molekulákra közvetítődik, például reaktív oxigéngyök képződés következtében (Pesznyák és Sáfrány, 2013).

A sugárzás direkt és indirekt hatásai együttesen a sejt hibajavítási mechanizmusainak beindítását, vagy a sejt halálát eredményezik (Spitz és mtsai 2004). A sugárexpozíciót követő oxidatív változások még hosszú ideig fennmaradhatnak, ismételt reaktív gyökképződést indukálva, ami hosszútávon egészségkárosító mechanizmusok beindulásához vezet (Azzam és mtsai 2012).

A sugárzás következtében kialakuló károsodásról az úgynevezett target teória kimondja, hogy a hatás eléréséhez, a sugárzásnak el kell találnia a sejtet (Kiefer 1971). A sejten belül az ionizáló sugárzás elsődleges célpontja a DNS molekula (Warters és Hoffer, 1977), aminek sérülése vezethet a sejt halálához. Az örökítő anyagon kívül azonban a mitokondrium és a sejtmembrán is szolgálhat célpontként, de ezek a folyamatok mechanizmusai kevésbé tisztázottak (Pesznyák és Sáfrány, 2013). A DNS kettősspirál sérülése nagyon sokfajta lehet. Előfordul mindkét láncot érintő kettős láncszakadás, illetve csak az egyik láncot érintő bázistörés, báziscsere, lánc denaturáció, létrejöhetnek a láncok között illetve a láncok és a környező fehérjék között kémiai keresztkötések. A kétláncú DNS törés tipikusan a sugárexpozicíó jellegzetessége, jelentőségét növeli, hogy a hibajavítása eukarióta sejtekben nehézkes, és a javítás során is gyakran előfordulnak hibák. Prokariótákban a homológ rekombináció (HR) (Shinohara és Ogawa 1995), míg eukariótákban a HR mellett (Frankenberg-Schwaber és mtsai 2009) a "nem-homológ végragasztás", a non-homologous end joining (NHEJ) mechanizmusa felelős a kettős DNS lánc törések kijavításáért (Göttlich és mtsai 1998). A DNS károsodások létrejöttét a szövet sugárérzékenysége nem befolyásolja, számuk a dózissal arányos. A sugárérzékenységben a sejt típusa, osztódási képessége, a hibajavítási mechanizmusok hatékonysága, a környezet oxigénellátottsága és egyéb mechanizmusok játszanak szerepet (Joiner és van der Kogel, 2009).

#### 3.1.1. A sugárzás hatására bekövetkező sejthalál módja

A sugárzás hatására bekövetkező sejthalál módja eltérő lehet az egyes sejtekre nézve. Az irodalmi adatok nem egységesek maguknak a sejthalál típusoknak a csoportosítását tekintve sem.

Kroemer és munkatársai 2009-ben publikált munkájukban (Kroemer és mtsai 2009) megkülönböztetnek tipikus sejthalál formákat, mint az apoptózis, az autofágia, a nekrózis és a szemlencsében előforduló kornifikáció, valamint atipikus formákat, mint a mitotikus katasztrófa, az anoikis, az excitotoxicitás, paraptózis, piroptózis, pironekrózis, entózis, és az idegsejtekre jellemző walleri degeneráció. Okada és Mak egy korábbi munkájukban még a tipikus formákhoz sorolják a sugárzás hatására kialakuló szeneszcenciát (Okada és Mak 2004). Egy másik fajta csoportosítás szerint a nekrózison kívül az apoptózis, autofágia, necroptózis, piroptózis mind a programozott sejthaláltípusokhoz tartoznak (Inoue és Tani, 2014).

#### 3.1.1.1. Nekrózis

A nekrózis a sejthalál legáltalánosabb formája. A sejt és organellumai a folyamat során megduzzadnak (oncosis) belső szerkezetük szétesik, mitokondriális változások

következnek be, a DNS-e degradálódik, a sejt szétesik. A szervezetben a nekrotikus reakciókat gyulladásos reakciók kísérik (Kim és mtsai 2007).

A sugárkezelés hatására bekövetkező nekrotikus sejtpusztulás régóta ismert, de továbbra is kutatott terület mind in vitro (Akagi és mtsai 1993; Grasso és mtsai 2014), mind in vivo körülmények között (Cronin és Brauer, 1949; és Parvez és mtsai 2014). Megemlítendő, hogy nem csak magas dózisú sugárkezelés hatására ( $\geq$  32–50 Gy) tudtak nekrózist indukálni in vitro körülmények között például neuronokban (Gobbel és mtsai 2001) és MOLT-4 leukémiás sejtvonalban (Akagi és mtsai 1993), de humán immortalizált keratinocita HaCaT sejtvonalban alacsony, 0,5 Gy dózisú gamma besugárzás hatására is leírtak már nekrózist (Jella és mtsai 2012). Sokáig irányítatlan folyamatnak hitték, amely a sejt nagyon súlyos sérülése következtében történik meg. Ma már tudjuk, hogy az apoptózishoz hasonlóan, szabályozott útvonalakon keresztül történik a tumor nekrózis alfa (TNF $\alpha$ ), és a poli-ADP-ribóz polimeráz indukcióján keresztül (Sosna és mtsai 2014), bár sok folyamat még nem teljesen tisztázott (Pesznyák és Sáfrány, 2013).

#### 3.1.1.2. Apoptózis

Az apoptózis, vagy más néven programozott sejthalált specifikus sejten belüli változások kísérik. A sejt gömb alakúvá válik, a kromatin kondenzálódik, a DNS fragmentálódhat. A sejt állománya membránnal burkolt testecskékre, apoptoszómákra hasad (ez az ún. blebbing, vagy levélhullatás), melyeket a szervezetben a környező sejtek fagocitálnak, de gyulladási reakciókat nem indítanak el. Jellemző még rá a proteolitikus enzimek, kaszpáz-kaszkád aktivációja. A folyamat igen heterogén lefolyású, aktiválódhat külső (extrinsic) és belső (intrinsic) jelre, mitokondriális útvonalon. Általában gyors, adott esetben órák alatt bekövetkező sejthalál. (Panganiban és mtsai 2013)

Az extrinsic útvonal elindítása halál receptorokon keresztül történik, amik kialakítják a "halált kiváltó szignalizációs komplexet" (DISC) és elindítják a kaszpáz enzimkomplexen keresztül az apoptotikus folyamatokat (Yoshida és mtsai 2009).

Az intrinsic útvonal elindításának jele a sugárzás következtében az ATM fehérje által kiváltott DNS törés (Xiao és mtsai 2009; Surova és mtsai 2013). A DNS törést a fehérjék egy csoportja érzékeli, mint például a DNS törés ellenőrző fehérje 1 (Chk1), a

DNS-függő fehérje kináz (DNA-PK), a p53-kötő fehérje 1 (53BP1), a Rad50 fehérje. Ezek a fehérjék a DNS-hez kötődve a DNS károsodás válasz-reakcióiért (DNA damage response-DDR) felelős enzimeket aktiválnak, például az az ATR kinázt (Verheij és mtsai 2002; Kwon és mtsai 2002; Surova és mtsai 2013). Az enzimek aktiválják az intinsic úton végbemenő apoptózis legfőbb irányítóját, a p53 fehérjét (Srinivasula és mtsai 1998, Lippens és mtsai 2009). A p53 fehérjét a genom testőreként is emlegetik, mert ez multifunkcionális fehérje felel a DNS-t ért károsodás válaszaiért, és elindíthat többek között apoptotikus, a sejt túléléséért felelős, vagy a sejtciklust befagyasztó folyamatokat (Chow és Tron, Assefa és mtsai 2005; Escribano-Díaz és mtsai 2013). Az apoptotikus folyamatok elindításakor a p53 fehérje a mitokondriumban lokalizálódva pro- apoptotikus fehérjéket szabadít fel, amik végül elvezetnek a sejt halálához (Mancini és Moretti 2009). Sok kutatás fókuszában áll olyan szerek azonosítása, amik növelik a p53 apoptózis indukáló hatékonyságát, és ez által a tumoros sejtek érzékenységét a sugárterápiára (Vaseva és mtsai 2009), mint például a mi általunk is vizsgált GDF-15 fehérje (Growth Differentiation Factor-15, Növekedési és differenciálódási faktor-15), ami szintén egy ilyen érzékenyítő molekula szerepét töltheti be.

Sokfajta tumoros sejtvonalra jellemző a moderált, vagy nagy (1-20 Gy) dózisú sugárzást követő irányított sejthalál, például tüdő (Han és mtsai 2009), prosztata (Rödel és mtsai 2003), vastagbélrák (Kyprianou és Rock 1998) sejtvonalban. A rákos sejtvonalak mellett immortalizált simaizom sejtvonalakban és timocitákban (Suciu, 1983), valamint normál primer sejtvonalakban is leírtak már sugárexpozíciót követő apoptózist, például tüdőartériából származó endothél sejtekben (Panganiban és mtsai 2012), illetve neuronokban (Gobbel és mtsai 2001). Nagy dózisú sugárkárosodás mellett a kis dózisú sugárzás hatására (10–200 mGy) is megfigyeltek már irányított sejtpusztulást egér bőrben epidermiszből származó sejtekben (Waters és mtsai 2013).

#### 3.1.1.3. Autofágia

A sejthalál során a sejt morfológiai változásokon megy keresztül, a citoplazma vakuolizálódik, de az apoptózisra jellemző DNS kondenzáció nem figyelhető meg. A citoplazmában az önemésztésben szerepet játszó lizoszómák, vakuolumok jelennek meg, a lebontás nem köthető a fagocitákhoz, az apoptózisra jellemző kaszpázoktól független (Dodson és mtsai 2013).

Normál körülmények között a sejtben lejátszódó úgynevezett mikroautofágia során a sejt a saját sérült struktúráit távolítja el, ami nem vezet a sejt halálához. Azonban extrém körülmények között, mint az ionizáló sugárzás hatására bekövetkező makroautofágia során a sejt önmagát emészti meg, saját intracelluláris enzimei segítségével (Denton és mtsai 2012). Mivel a mikroautofágia a sejt túlélését, a makroautofágia pedig a sejt halálát indukálja, az autofágia útvonalak aktiválása sugárzás hatására a szöveti környezettől függően eredményezheti a sejt túlélését és halálát is (Panganiban és mtsai 2013). Az autofagoszóma partikulumok létrejöttében két fehérje komplex játssza a kulcsszerepet, az autophagy-related gene (Atg) fehérjék, és a microtubule-associated protein 1 light-chain subunit 3 (LC3) (Campisi 2005, Campisi és d'Adda di Fagagna 2007).

Számos tumoros sejtvonalban kimutatták a sugárzás következményeként kialakuló autofágiát (Kim és mtsai 2011; Yu és mtsai; Chiu és mtsai 2012).

#### 3.1.1.4. Szeneszcencia

A sejtek osztódási képességének in vitro körülmények között is határa van. Ez az úgynevezett Hayflick-limit már az 1960-as évek óta ismert (Hayflick, 1962). A normál nyugvó sejtekkel ellentétben, amelyek bizonyos stimuláció hatására újra visszanyerhetik osztódó képességüket, a szeneszcens sejtekben ez a sejtciklus gátlás irreverzibilis (Campisi J és d'Adda di Fagagna F, 2007). A szeneszcenciának számos kiváltó oka lehet, közéjük tartozik az oxidatív stressz, a kemoterápia, vagy besugárzás következtében kialakuló DNS sérülés. Különböző citokineken keresztül aktiválódik, mint interferon-alfa (IFN $\alpha$ ) és transzformáló növekedési faktor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (Campisi J, 2005).

Az ionizáló sugárzás hatására bekövetkező öregedés (szeneszcencia) során a sejtek megnagyobbodnak, citoplazmájuk "keskenyedik", bár osztódási képességüket elvesztik, életben maradnak. Jellemző rájuk a szeneszcencia-asszociált β-galaktozidáz enzim (SAβ-Gal) megjelenése, felszaporodása (te Poele és mtsai 2002).

A legtöbb sejttípusban a DNS sérülést követően a p53 indítja be a szeneszcens választ, aminek célgénje és irányítója a p21waf1/cip1, gátolja a sejtciklus G1-S átmenetének beindításáért felelős Retinoblasztóma fehérje (pRb) foszforilációjának gátlását. Ezen

kívül a p21 a felelős a DNS sérülés következtében kialakuló növekedés gátlásért (Surova és mtsai 2013).

#### 3.1.2. A sugárzás hatására bekövetkező sejtpusztulás időbeli lefolyása

Csoportosítás szempontjából sugárzás hatására kialakuló sejthalálnak nem csak a típusa, hanem az időpontja is lényeges. Ennek megfelelően megkülönböztetnek korai, a sugárzást követően néhány órán belül bekövetkező, és késői sugárzás okozta sejthalált (1. ábra).



1. ábra A sugárzás hatására bekövetkező sejtpusztulás időbeli lefolyásának sematikus ábrája. Megkülönböztethetünk korai pre-mitotikus, a sugárzást követően néhány órán belül bekövetkező, és késői, osztódás utáni mitotikus katasztrófának nevezett sejthalált. A sugárzás okozta sejthalál minden típusa előfordul az időben elkülönülten lejátszódó sejtpusztulás során.

#### 3.1.2.1. Pre-mitotikus sejthalál

A sejtek egy kis hányadára jellemző a sugársérülés következtében kialakuló sejtpusztulás tekintetében megkülönböztethető a korai, néhány órán belül bekövetkező sejthalál típust, az úgynevezett pre-mitotikus sejthalált (Endlich és mtsai 2000). Ez

jellemző a timocitákra, limfocitákra, gyorsan osztódó sejtekre és egyes ráktípusokra, ami magyarázata lehet az egyes tumorok sugárkezelésének nagy hatékonyságára. Szolid tumorokban azonban ritkán megfigyelhető, inkább limfómákban gyakori. A DNS-t károsító hatásra kialakuló válasz (DNA damage response-DDR) percekkel a sugárkezelés után kialakul, pro- apoptotikus és túlélő (hibajavítási, illetve a sejtciklust beindító) szignálokat közvetít egyszerre. Mivel a pre-mitotikus sejthalálnál az apoptotikus szignál aktiválódása visszafordíthatatlan, a sejt biztosan elpusztul a hibajavítási mechanizmus beindulása ellenére. Emiatt a p53 fehérje által meghatározott apoptotikus jelátviteli útvonalat befolyásoló molekulák nagy szerepet játszanak a sugárérzékenységben (Joiner és van der Kogel, 2009). Így például a munkám során vizsgált egyik kandidáns gén, a GDF-15 is befolyásolhatja ezt a mechanizmust. Hasonló korai sejthalál aktiváció megfigyelhető nagy dózis hatására más sejttípusokon is, például endothél sejteken (Garcia-Barros és mtsai 2003).

#### 3.1.2.2. Mitotikus katasztrófa

A késői sejthalál normál proliferáló sejtekre és tumor sejtekre jellemző, többszöri osztódás után, a sugárzás után hosszabb idő elteltével. Mitotikus sejthalálnak is nevezik, mert a sejt osztódik még, mielőtt elpusztulna, illetve osztódás nélkül nem is következhet be a sejtpusztulás (Forrester és mtsai 1999). Azokban a sejtekben, ahol a sejthalál késői időpontban következik be, a pro- apoptotikus útvonalak mellett aktiválódnak a sejtciklus és a hibajavítási mechanizmusokért felelős útvonalak, melyek segítik a sejtek túlélését, ezért azokban a betegekben, ahol a hibajavítási mechanizmus sérült, nagymértékben növekszik a sugárérzékenység. A sejthalál akkor következik be, amikor a hibajavítás már lezajlott, ez normál körülmények között pár óra, és a sejtciklus szabályozó molekulák már nem aktívak. Ekkor a sugárzás indukálta kezdeti DNS sérülésekből már csak nagyon kevés lelhető fel a sejtekben, a sejtpusztulás okai a sejtosztódás során fellépő hibák. A mitotikus katasztrófa az osztódó sejtek sajátja, ahol a sugárzás okozta sérüléseknek a nagy részét a sejt kijavítja, de nem tudja megakadályozni, hogy olyan sejtek is proliferáljanak, amik kromoszómasérülést hordoznak, és ez által bekövetkezzen a mitotikus katasztrófa. Tehát a károsodást nem közvetlenül maga a sugárzás, hanem annak következménye, a kromoszóma aberráció váltja ki. A sejtosztódás során fellépő hibák jól megfigyelhetők a kromoszóma-osztódás metafázisában. A sugárzás során jellemző formákat öltenek, mint például a dicentrikus,

acentrikus, gyűrű alakú kromoszómák, a kizáródott mikronukleuszok, anafázisos hidak, transzlokációk (Joiner és van der Kogel, 2009). Ezek közül a sejt a reciprok transzlokációt, illetve a dicentrikus kromoszóma létrejöttét bizonyos körülmények között túlélheti, az acentrikus kromoszóma mutációk azonban letálisak, hiszen a centroméra megléte létfontosságú a kromoszómák kettéválásához. A dicentrikus kromoszómát hordozó sejtek is elpusztulnak rövid időn belül, ha nem azonnal, a mitotikus katasztrófa következményeképp. Ezért korrelál jól a dicentrikus kromoszómák, és a mikronukleuszok száma az elpusztult sejtek számával, és egy általánosan elfogadott módszer a sugárkárosodás mérésére (Doherty, 2012). A transzlokáció ezzel szemben nem okoz problémát a metafázis során, a mutációk évekkel később is megfigyelhető a sugárzást elszenvedett emberek sejtjeiben.

A sejt a mitotikus katasztrófa eredményeként tehát pusztulásra van ítélve. A sejthalál bekövetkezte előtt azonban osztódhat, utódsejtjei bármilyen időpontban elpusztulhatnak a sugárzás után (Minafra és Bravata 2014). A sejthalál típusa lehet apoptózis, autofágia, nekrózis, illetve szeneszcencia. Mitotikus sejthalál esetében azonban a sejt pusztulásának módja és kiváltó oka közt nincs ok-okozati összefüggés. A leánysejtek bármilyen fajta sejthalál következtében elpusztulhatnak. Ez megkérdőjelezné az egyes sejthalál típusok, mint például az apoptózis sugárérzékenységben játszott szerepét. Wouters és Skarsgard elmélete szerint erre az a magyarázat, hogy az apoptózist indukáló gének eltérően változnak a sejtekben, annak túlélési valószínűségét nem változtatják meg, ellenben befolyásolhatják a pusztulási rátát, azaz hogy milyen sebességgel halnak meg a sejtek (Wouters és Skarsgard 1997). Így a sejthalál módjának mégis jelentősége van, mert azon ráktípusoknak, amelyek sejtjei képesek az apoptózisra, sugárterápia következtében jóval gyorsabban csökken a méretük, korábban reagálnak a kezelésre, mint akár a hasonló sugárérzékenységű, de apoptózisra nem képes tumorok (Joiner és van der Kogel, 2009).

#### 3.2. A sugárzás nem célzott hatásai

Több mint húsz éve kutatják a sugárbiológiában a sugárzás okozta nem célzott hatásokat (non- targeted effects-NTE), és vannak még a mai napig nem tisztázott mechanizmusok, melyek ehhez a csoporthoz tartoznak (2. ábra). A nem célzott hatások definíció szerint azokban a sejtekben bekövetkező válasz reakciók, amelyeket a sugárzás közvetlenül nem talált el. Az ionizáló sugárzáson kívül kémiai anyagok (Asur és mtsai 2009), dioxinok (Korkalainen és mtsai 2012) is kiválthatják a NTE hatásokat.



2. ábra A sugárzás nem célzott hatásainak sematikus ábrája. A nem-célzott hatások közé tartozik a szomszédsági, vagy Bystander hatás, az utódsejtekben kialakuló genomiális instabilitás, a sugárterületen kívül eső területeket érintő abszkopális hatás, valamint a kis dózisú előkezelés következtében nagydózisú sugárexpozíció hatását csökkentő adaptív választ (az ábra Morgan WF 2003-as publikációjának felhasználásával készült).

Kadhim és munkatársai egy 2013-ban megjelent összefoglaló cikkben a következő tulajdonságokkal jellemzik a nem célzott hatásokat: ezeknek a hatásoknak a megnyilvánulásához nem szükséges a sugárzás hatására bekövetkező DNS sérülés, általában kis dózisok hatására (100 mSv alatt) nyilvánulnak meg, és nincs lineáris összefüggés a dózis és a hatás között. A nem célzott hatások bekövetkezése eszerint nem mond ellent a target teóriának, csak annak a "kiterjesztése", mert ugyan a sejtet nem találja el közvetlen a sugárzás, de elég akár egy sejt eltalálása is, és a sugárhatás kiterjed a többi sejtre (Kadhim és mtsai 2013).

A változásoknak két fő csoportja létezik: a szomszédsági hatások (bystander effect-BE) és genomikai instabilitás, genomic instability- (GI), ide sorolják még az adaptív választ (Adaptive Response-AR) és az abszkopális hatást (Abscopal effect-AE) (Morgan és Sowa 2015; Campa és mtsai 2015).

Irodalmi források gyakran kezelik a genomiális instabilitást a szomszédsági hatás következményeként (Karotki és Baverstock 2012), de az első nem célzott hatást tanulmányozó munkában a genomikai instabilitást a direkt besugárzott sejtekben bekövetkező változásként írták le (Kadhim és mtsai 1992), vagyis a szomszédsági hatástól függetlenül is létezik.

A hatások mechanizmusára több in vitro és in vivo körülmények között is tesztelt elmélet is létezik.

- Az egyik szerint a NTE kiváltó oka a mitokondriális sérülés következtében megemelkedett reaktív oxigéntermelés, aminek következtében gyulladás is kialakulhat. Az elmélet legfőbb problémája, hogyan valósulhat meg egyedül a ROS molekulák által a generációkon keresztül átadódó sérülés genomiális instabilitás esetén (Morgan, 2003)
- Azzam és munkatársainak elmélete szerint a sérülés a sugárzás után kialakuló p53 tumor szuppresszor gén által indukált jelátvitel következménye, és a sejtek közti intercelluláris kommunikációban, a gap-junction kapcsolatain keresztül valósulhat meg (Azzam és mtsai 1998, 2002).
- Létezik egy feltevés, ami szerint a szöveti extracelluláris mátrix sérülésének "bevésődésében", perzisztens átrendeződésében, nagy szerepe van a TGF-β

molekulának, ami az extracelluláris mátrix átalakulások egyik szabályozója, és rajta keresztül megváltozik a sejt funkciója is (Barceloss-Hoff és mtsai 2001).

- Egy 2008-as tanulmányban Maxwell és munkatársai egy olyan mechanizmus következményeként írják le a genomiális instabilitást, amely a DNS telomereket érinti. Ennek az osztódásban fontos szerepet játszó résznek a sérülése okozhat nagyobb DNS szakaszokat is érintő kromoszóma-változásokat, akár a heterozigóta jelleg elvesztését is (Maxwell és mtsai 2008)
- Több irodalmi adat is alátámasztja a legutolsó hipotézist, miszerint a nem-célzott hatások a DNS epigenetikai változásának következményei, mint a DNS metiláció és hiszton acetiláció, vagy a nem kódoló szakaszban létrejövő változások, amik megváltoztathatják az egyes fehérjék expressziós mintázatát (Raynaud és mtsai 2000).

A továbbiakban részletesen kifejtem a nem-célzott hatások jellemzőit, a kísérleteink tekintetében.

#### 3.2.1. A bystander, vagy szomszédsági hatás (BE)

A direkt károsodás mellett tehát a sejtben felléphetnek a sugárzás hatására úgynevezett nem-célzott hatások is. Ilyen például a besugárzott sejtek melletti szomszéd, vagy más néven "bystander" sejtek károsodása, halála. Ez esetben a sejteket nem éri közvetlen sugárzás, nem érvényesül a target-teória, a sejtek mégis olyan biológiai károsodásokat mutatnak, például DNS károsodást, kromoszóma aberrációkat, mutációkat és génexpressziós mintázatot, mintha direkt sugárzás érte volna őket. Magas LET (lineáris energia transzfer) értékű α sugárzást, illetve röntgen-sugárzást alkalmazva a szomszédos sejtek halálát tudták előidézni. Ezt a hatást nem csak nagy, kis dózis (100 mGy) hatására is már képesek voltak detektálni szomszédsági típusú sejthalált mikronukleusz assay-jel (Belyakov és mtsai 2001). Irodalmi adatok utalnak rá, hogy kis dózisoknál érvényesülhet jobban is a károsító mechanizmus (Kadhim és mtsai 2013). A kis dózisok jelentős következményeit főleg ezeknél a szomszédsági hatásoknál valószínűsítik, ahol kevés sejt érintett a közvetlen károsodásban, de a hatásuk annál kiterjedtebb lehet a környező sejtekre (Joiner és van der Kogel, 2009), mivel a szomszédsági hatások nem függenek a dózistól és a sugárézékenységtől.

Sok kísérlet eredménye utal arra, hogy azokban a sejtekben következik be a szomszédsági hatás, melyek szorosan illeszkednek, gap-junction kapcsolattal rendelkeznek (Prise és O'Sullivan 2009), és az így kialakított kommunikációs híd, melyen a jelátvivő molekulák is közlekedhetnek, hozhatja létre a környezetet, amelynek károsító hatása akkor is megmutatkozik, ha a sejteket nem érte direkt sugárzás (Azzam és mtsai 2002, Yang és mtsai 2005). Ezeknek ellentmondanak azok a kísérletek, ahol a sejtekben érintkezés-mentesen értek el szomszédsági hatást (Mothershill és mtsai 2006). Ezeknek az ellentmondásos adatoknak az eredménye, hogy bár maga a szomszédsági hatás már régóta ismert, a károsító folyamatokért felelős molekuláris mechanizmus a mai napig nem teljesen tisztázott.

Murphy és mtsai egy 2005-ben bemutatott tanulmányukban úgy találták, hogy a mitokondriális DNS-ben történő pontmutációknak szerepe van a szomszédsági hatásban (Murphy és mtsai 2005), és hasonlóan fontos szerepet tulajdonítanak a folyamatban a mitokondrium szám emelkedésének a sejtekben (Nugent és mtsai 2007).

Szerepet játszhat továbbá a szomszédsági hatásban a szérum szerotonin szint is (Mothershill és mtsai 2010). A szerotonin a sejtekben ionizáló sugárzás hatására a szerotonin receptor 3A receptorokhoz kötődik (Poon és mtsai 2007). A szerotonin kötődés hatására a receptorok, melyek kálciumcsatornák is egyben (Ferriere és mtsai 1997), a kálcium beáramlását serkentik, ami egyike a szomszédsági hatás következtében kialakuló sejthalál első megismert mechanizmusainak (Lyng és mtsai 2002).

#### 3.2.2. A genomiális instabilitás (GI)

A genomiális instabilitás (GI) a sugárzás hatására az utódgenerációkban létrejövő károsodásként definiálják. A károsodás létrejöhet a direkt sugárkezelés és a szomszédsági hatás következményeképpen. A GI kialakulására a szomszédsági hatáshoz hasonlóan több elmélet létezik, amelyeket már a nem-célzott hatásainál kifejtettem.

Karotki és Baverstock egy 2012-es összefoglaló tanulmányukban leírják, hogy a sugárzás indukálta genomiális instabilitás (Radiation induced genomic instability-RIGI) általános jellemzője, hogy generációkon keresztül, és sejtről sejtre átadódhat, perzisztensen fennmaradhat anélkül, hogy az egész sejtet érintő molekuláris károsodás megjelenne, aztán végül egy utolsó DNS mutációban manifesztálódik (Karotki és Baverstock 2012), ami a sejt halálához vezethet.

A GI kialakulásának végpont alapján megkülönböztethetünk korai időpontban és késleltetett, vagy késői genomiális instabilitást (Karotki és Baverstock 2012). A késői károsodásokat általában pont mutációk (Chang és Little 1992), a koraiakat inkább deléciók (Grosovsky és mtsai 1996; Little és mtsai 1997) kialakulása jellemzi. Más károsító ágensekkel, mint például kémiai mutagénekkel (Vilarino-Guell és mtsai 1992), nehézfémekkel (Glaviano és mtsai 2006), vagy akár baktériumfertőzéssel (Cuevas-Ramos 2010) is előidézhető genomiális instabilitás.

Kadhim és munkatársai egy 2013-as összefoglaló munkájukban a genomiális instabilitást egy dinamikusan változó génhálózat szabályozásában bekövetkező visszafordíthatatlan változásként írják le, ami ugyan nagyon általános megfogalmazás (Kadhim és mtsai 2013), de ebből levont következtetésük viszont az általam is osztott nézet, hogy a genomikai instabilitás végpontja nem biztos, hogy a sejt halála, és nem is csak ezen a szinten megfigyelhető változásokat kell figyelembe venni ennél a folyamatnál.

#### 3.2.3. Abszkopális effektus

A sugárzásnak azon tulajdonságát, hogy a sugárkezelt régiókban kialakulhatnak daganatok, már az 1960-as években leírták. Létezik azonban egy úgynevezett abszkopális hatás, a sugárexpozíciót követően a sugárkezelt régión kívül találták ezt a hatást (Siva és mtsai 2015). Az abszkopális effektus szorosan köthető a sugárkezeléshez (Morgan és Sowa 2015), amely során a tumorszövet egy nagy dózisú körülbelül 50-70 Gy (Joiner és van der Kogel, 2009), míg a körülötte található, de még a terápiás ablakba eső normál szövet egy kisebb, 4-6 Gy nagyságrendű, végül az egész test egy alacsony dózisú sugárexpozíciót szenved el (Chofor és mtsai 2012).

Irodalmi adatok alapján többféle hatású is lehet az abszkopális effektus. Lehet a normál szövetben okozott károsodás eredménye, a sugárzás hatására a sugárnyalábtól távol eső területeken kemokinek és citokinek felszabadulását eredményezheti (Schubert és mtsai 2007, Bower és mtsai 2009), amely később akár karcinogén folyamatok beindulását vonja maga után (Mac Manus és mtsai 2005, Hall 2009), vagy aktiválja az eredeti tumor távoli metasztázisát (Solinas és mtsai 2010). Ezzel szemben leírtak olyan pozitív abszkopális hatást is, amely növelte a terápia hatékonyságát, és regressziót vált ki

ellenoldali tumorban is (Ishiyama és mtsai 2012), vagy a metasztázisok (Wersäll és mtsai 2006) esetében.

#### 3.2.4. A kis dózisú sugárzások hatása

Kis dózisú sugárzás alatt a 100 mSv alatti dózisokat értjük. Kérdés, melyek a következményei és a jelentősége az alacsony dózisú, és dózisteljesítményű sugárexpozíciónak. Ilyen sugárzás érheti a szervezetet az orvosi vizsgálatok során, vagy környezeti, ipari forrásból származó sugárzás következményeképp.

Alacsony dózisú sugárzás hatására (0,3 Gy felett 1 Gy-ig) mérhető egy emelkedett rezisztencia (increased radioresistance - IRR) (Marples és mtsai 1997), a pontos működése azonban ezeknek a folyamatoknak mind a mai napig nem ismert. Azonban ennek ellenkezőjét a kis dózisú hiperszenzitivitást, vagyis az alacsony dózisra extrém érzékenységű reakciót is megfigyeltek már (Lambin és mtsai 1993).

Az általánosan elfogadott LNT (linear non treshold) modell értelmében ezek a dózisok sem elhanyagolhatóak, mind sugárbiológiai és mind sugáregészségügyi szempontból, hiszen egy részecske hatása elég a károsodás eléréséhez. Már korábban említettem, hogy a sugárzás nem célzott hatásait is éppen a kis dózisú sugárzásoknál tartják fontosnak. Epidemológiai adatok is utalnak az esetleges kockázatokra. Japán atombomba túlélőkben például kis dózisú expozíció hatására is emelkedett a szívérrendszeri megbetegedések előfordulásának száma (Little és mtsai 2008).

Az elmúlt évek in vitro és in vivo kutatásai is rávilágítottak arra, hogy a sugárzás okozta következmények nem mindig illeszthetők bele a korábbi konvencionális sugárbiológiai karcinogenezis teóriákba. A rákkeltő és károsító mechanizmusok a sejten belüli környezet, szignalizációs útvonalak és gyulladási folyamatok következménye. A hatás lehet a DNS sérülésre adott válasz, mikronukleusz keletkezés, sejtproliferáció változás, hathat a sejt túlélésére, létrejöhet genomikai instabilitás, szomszédsági hatás. (Manda és mtsai 2014). Ezek a kis dózisra is megjelenő hatások nem magyarázhatók egyedül a DNS sérülésekkel.

#### 3.2.5. Az adaptív válasz

Léteznek irodalmi adatok, amik azt bizonyítják, hogy a kis dózisú besugárzás a nagy dózis előtt csökkenti annak hatását. In vivo és in vitro körülmények között is megfigyeltek már ilyen adaptív választ, ami a DNS sérülésekre, a sejtpusztulásra és a

DNS hibajavító mechanizmusaira is hatással van (Zhao és mtsai 2015). A legtöbb változás transzkripcionális jellegű és főleg a DNS hibajavításra irányul. Többszöri kis dózisú besugárzás hatására leírtak humán limfocitákban adaptív választ, ami a sokadik besugárzásra sugárrezisztenciát alakított ki (Wolff 2012). Állatkísérletekben a folyamatos kis dózisú besugárzás csökkentette a rekombinációs gyakoriságot (Day és mtsai 2007).

A kis dózisok alkalmazása azonban más kutatók szerint is kétélű fegyver, hiszen míg ez az ellenállás a normál szövetben lehet védő hatású a további besugárzásokkal szemben, a tumoros szövetben a sugárrezisztenssé válást erősíti, és a terápia hatását csökkenti, amihez hozzáadódik, hogy a kis dózisok alkalmazása nem zárja ki a szomszédsági hatás károsító mechanizmusait, ami a normál szövetekre is hat. (Selzer és Hebar 2011).

# 3.2.6. A kis dózisú sugárzásra kialakuló hiperérzékenység (Low-dose hypersensitivity-LDR)

Létezik a kis dózisú sugárexpozicíó hatására előforduló sejtpusztulás, melyet kis dózisú sugárzásra kialakuló hiperérzékenységnek (Low-dose hypersensitivity-LDR) nevezünk (Lambin és mtsai 1993). Előfordulhat, hogy a sejtek melyek kis dózisnál ezt a szenzitivitást mutatják, nagy dózisnál rezisztensebbek az egyszeri besugárzásra. Két feltételezett mechanizmus létezik. Mindkét elmélet a DNS hibajavításon alapszik, az egyik szerint az ebbe a dózisba eső sérülések hibajavítása jobban működik, míg el nem ér egy bizonyos szintet, ahol a sérülések már olyan károsodást okoznak, ami a sejt halálához vezet (Marples és mtsai 2000). A másik elmélet szerint besugárzás hatására ebben a dózistartományban az emelkedő dózis hatására folyamatosan megváltozik a DNS szerkezete, melynek hatására egy folyamatos hibajavítási mechanizmus indul be. (Joiner és mtsai 2001).

#### 3.3. Mitokondriális változások sugárzás hatására

#### 3.3.1. A mitokondriális genom

Egyre több olyan adat áll rendelkezésre, hogy a DNS károsodáson kívül a sejt egyéb alkotóelemeinek sugárzásra kialakult károsodása is fontos szerepet játszik a sejt későbbi sorsának alakulásában. Ilyen alkotóelemek a sejtmembrán, a mitokondriumok, a fehérjeszintézist végző riboszómák. Ezen elemek károsodása közvetlenül és rövid úton befolyásolja a sejt permeabilitását, a fehérjeszintézis dinamikáját, és végső soron kihat a

sejt metabolizmusára, a sejten belüli és sejt-sejt közötti kommunikációra (Somosy 2000).

Az emberi szervezetben a mitokondriumok a légzésben, az oxidatív foszforilációban játszanak szerepet. Számuk a sejt típusától, és állapotától függően változhat. A mitokondrium fehérjéi a nukleáris genomban illetve saját mitokondriális DNS-ében (mtDNS) kódoltak. А mitokondriális DNS cirkuláris genom, az egyes mitokondriumokban változó a száma, 2-10 kópia fordulhat elő. Uniparentális öröklődésű, anyai eredetű. 16 569 bázis-párból áll, 37 gént, 17 fehérjét, 22 transzfer RNS-t, a riboszóma egy kis és egy nagy alegységét (rRNS) kódolja. A mtDNS is rekombinálódik, de egy sejten belül marad, így fordulhatnak elő heteroplazmiás mitokondriumok (Bourgeron és mtsai 1993). A DNS hibajavító mechanizmusuk is lassabb ezért is magas a mutációs rátájuk (Wang és mtsai 2011). Ma már több mint 260 mutációjuk ismert (MITOMAP) és polimorfimusaik, delécióik több betegséggel is kapcsolatba hozhatóak (Holt és mtsai 1988, Wallace 1999, 2010).

A heteroplazmiás mitokondriális DNS molekulákat hordozó, illetve a sejtben előforduló több mitokondrium képes a sejtben fúzióra, illetve fisszióra. Ezzel a tulajdonságukkal ellensúlyozza, hogy hibajavításuk nem olyan hatékony, a sérülések kompenzálása a másik mitokondrium segítségével történik, a károsodás a mitokondrium aktivitásában csak a nagyon súlyos sérülések esetén jelenik meg (Scott és Joule 2010).

A sugárzás okozta nem célzott hatásoknál már említettem, hogy sugárzás hatására mitokondriális reaktív oxigéngyök felszabadulást mértek, amiről feltételezik többek között, hogy a nem-célzott hatások egyik kiváltó oka (Morgan 2003), de olyan forrás is létezik, amely arra utal, hogy az összes nem célzott hatás a mitokondrium irányítása alatt áll, és közreműködik az  $\alpha$ -sugárzás következtében kialakuló genotoxikus hatásban és a genomiális instabilitásban (Zhang és mtsai 2014).

#### 3.3.2. Az ionizáló sugárzás hatása a mitokondriális genomra

Ismert, hogy sugárkezelés hatására a citoplazma mellett mitokondriális eredetű reaktív oxigéngyökök is felszabadulnak (Leach és mtsai 2001), amik károsíthatják mind a nukleáris, mind a mitokondriális örökítő anyagot (Azzam és mtsai 2012). A hibajavítási mechanizmus beindulásához idő kell, mert az oxidatív stressz csökkenti a DNS polimeráz  $\gamma$  hatékonyságát, ezzel lassítja a hibajavítási mechanizmust, és a perzisztensen felszaporodó mitokondriális károsodás idővel elpusztíthatja a sejtet

(Graziewitz és mtsai 2002). Mivel a mitokondriális deléciók felszaporodása normál körülmények között is megtörténhet, a sugárzás hatására történő DNS károsodás a légzési lánc csökkent aktivitásának és a kialakuló perzisztensen fennálló oxidatív stressz következménye (Wang és mtsai 2011). A sugárzás okozta mitokondriális DNS károsodás az osztódás után is megmarad (Bogenhagen és Clayton 1977), és így genomiális instabilitáshoz vezethet (Azzam és mtsai 2012). A mitokondriális DNS változásai érintik a mitokondriális struktúrákat, ami a mitokondriális eredetű oxidánsok felszaporodását eredményezheti és végül a nukleáris genom sérüléséhez vezethet (Kim és mtsai 2006).

Ricchetti és munkatársai szerint a sugárkezelést követően a mitokondriális DNS bizonyos fragmentjei a sejtmagba migrálnak, és a nukleáris DNS-be inzertálódnak, és mutációkat, DNS-töréseket hoznak benne létre (Ricchetti és mtsai 1999), ezáltal genomiális instabilitást okozva. Ezt alátámasztani látszik, hogy magas dózisú γ-sugárkezelést követően egy órával már megfigyeltek mitokondriális eredetű DNS fragmenteket idegsejtek citoszoljában (Patrushev és mtsai 2006), valamint az, hogy élesztő modellben már megfigyeltek mtDNS beépülést a nukleáris genomba (Cheng és és Ivessa 2010). Amennyiben az inzerció regulátor elemeket is érint, a károsodás permanensen is fennmaradhat (Azzam és mtsai 2012). Az ionizáló sugárzás hatására kialakuló és hosszan fennálló mitokondriális oxidatív stressz tumoros elfajulásokhoz és korai öregedéshez vezethet (Shay és mtsai 1992).

#### 3.3.3. Az ionizáló sugárzás hatása a mitokondriális fehérjékre

Sugárkezelés hatására a bizonyos mitokondriális fehérjék degradálódnak, vagy funkcióik megváltoznak. A normális fehérjeműködés szükséges a túlélő folyamatok beindulásához (Nystrom 2005). Megváltoznak a transzportfolyamatok és a membránpotenciál (Ziegler 1998).

A mitokondrium már meglevő fehérjéin kívül a fehérjeképződést is érinti a sugárkezelés. A sugárzás hatására sérülhet a mitokondriumok nukleáris eredetű protein importja, ami működésükhöz szükséges. Ez nem magyarázható egyedül a membrán potenciál ( $\Delta \psi$ ) megváltozásával, de tovább növeli az oxidatív stressz reakciókat (Azzam és mtai, 2012). A protein import megváltozása előre prediktálja a sugárzás hosszú távú károsító hatásait. A normál human diploid sejtekben a membrán potenciál és a protein import eltérő mértékben változik az alacsony és magas dózisú sugárzásra (Pandey és

mtsai 2006). Az import csökkenése a sejtben stressz válasz reakciókat indukál, sugárkezelt rágcsálókban a zsírsav szintézist csökkentette (Kwak és mtsai 2002), de egyben csökkenteni igyekszik a reaktív oxigéngyökök által kiváltott metabolikus folyamatokat antioxidánsok növelésével (Kwak és mtsai 2003). A citromsav ciklusban központi szerepet játszó akonitáz (ACO2) enzim nagyon érzékeny az oxidatív károsító folyamatokra, aktivitása azonnal csökkenni kezd sugárexpozicióra, már alacsony dózis, (0,01 Gy) hatására is és hosszú ideig fennmarad (Buonanno és mtsai 2011b). Ezt az enzimaktivitás csökkenést direkt besugárzott hörcsög fibroblaszt sejtek mellett, szomszédsági sejtekben is kimutatták. Az enzimaktivitás csökkenés mellett emelkedett mikronukleusz képződés, fehérje karboniláció, lipid perixidáció és csökkent kolóniaképzés volt jellemző ezekre a hörcsög fibroblaszt sejtekre (Buonanno és mtsai 2011a).

Sugárzás hatására a mitokondriális nagy enzimkomplexek közül a II-es komplexben diszfunkcionális működést, és magas szuperoxid és hidrogénperoxid szintet mutattak ki, ami genomiális instabilitáshoz vezetett a sejtosztódás során (Dayal és mtsai 2009). Megfigyeltek magas dózisú sugárkezelés hatására mind sugárkezelt, mind szomszédsági sejtekben emelkedett 4-hydroxynonenal képződést, ami egy a fehérjéket és a DNS-t is kovalensen módosító és funkcióikat befolyásoló, igen reaktív molekula (Fang és Holmgren 2006; Autsavapromporn és mtsai 2011). Sugárkezelt egerekben még 2 évvel a magas LET-értékű sugárkezelést követően is mérhető volt hasonló fehérjemódosulás, a sugárkezelt és a nem érintett régiókban is (Azzam és mtsai 2012). Ezek a reakciók szövet specifikusak, reaktív oxigénképződéssel kezdődnek, ami oxidatív stresszt generálva hosszantartó fehérje és DNS károsodáshoz, illetve gyulladáshoz vezet (Robbins és mtsai 2004; Zhao és mtsai 2009). A sugárzás okozta késői mellékhatásoknál, mint a szívérrendszeri megbetegedések, is kimutatták a mitokondriális fehérjék szerepét (Barjaktarovic és mtsai 2011).

Régóta ismert, hogy sugárzás okozta oxidatív stresszválasz reakcióit csökkentik a mitokondriális és egyéb diszmutázok, illetve antioxidánsok (Pretkau és mtsai 1987). Ezek aktiválódása függ a sugárzás dózisától és a szöveti környezettől. Az alacsony dózisú sugárzás általában antioxidáns hatású, míg a nagy dózisú expozíció védhetetlen oxidatív stressz válaszhoz vezethet (de Toledo és mtsai 2006; McCord 2008). Az antioxidánsok alkalmazása terápiás környezetben gondos felügyeletet és körültekintést

igényel, hiszen a szuperoxid gyök kiindulási alapja is lehet a szabadgyök képződésnek és a gyulladási folyamatoknak (Kirkinezos és mtsai 2001). Magas dózisú sugárzás hatására szomszédsági sejtekben alacsony a MnSOD, Cu, ZnSOD diszmutázok, kataláz és glutation peroxidáz aktivitás, míg ugyanez nem mérhető kis dózissal kezelt sejtek melletti szomszédos sejtekben (Buonanno és mtsai 2011a).

#### 3.3.4. A mitokondriális "Common" deléció

A humán mitokondriális DNS leggyakoribb deléciója az úgynevezett "Common" deléció (CD) (Schon és mtsai 1989). Humán mintákban egy 4977 bázis nagyságrendű törés, a mitokondriális DNS-en a 8470-13446 közötti régió esik ki. Érinti az oxidatív foszforiláció génjeit, az ATPáz 6, ATPáz 8, citokróm oxidáz III géneket, a NADH-alegységeit alkotó ND3, ND4, ND4L, és ND5, valamint tRNS-eket. Oka két direkt ismétlődés a genomban, melyeknél úgynevezett mutációs forrópontok jönnek létre, ahol a DNS könnyebben törik, majd újraegyesül (Samuels és mtsai 2004). A CD emberekben több betegséggel is kapcsolatba hozható, megnövekedett előfordulási gyakoriságát több munkacsoport is leírta Kearn's Sayre szindrómánál (Zeviani és mtsai 1988, Ramírez-Miranda és mtsai 2008). További betegségekben, mint Pearson-szindrómánál (Rötig és mtsai 1989), miopátiánál (Sciacco és mtsai 1994) és egyes szívbetegeknél (Lin és mtsai 2003) is emelkedett a CD mutáns mitokondriumok száma.

Különböző tumorokban kimutatták a mutáció gyakoriságának változását, például emlőrákos betegeknél (Bianchi és mtsai 1995), pajzsmirigy rákokban (Rogounovitch és mtsai 2002).

Magasabb a mutáció előfordulása reaktív oxigéngyökök jelenlétében és UV sugárzás okozta stressz hatására is (Berneburg és mtsai 2004). Az öregedésben is szerepet játszik (Bua és mtsai 2006), több tanulmányban is találtak összefüggést a mutáció felszaporodása és a szöveti öregedés között (Eshaghian és mtsai 2006; Kaneko és mtsai 2012), valamint a szöveti öregedés következtében kialakuló betegségek, mint az Alzheimer kór (Corral-Debrinski és mtsai 2002), vagy az atherosclerosisos szívelégtelenség (Corral-Debrinski és mtsai 1992). Ennek magyarázata lehet, hogy az öregedéssel járó folyamatokban mind a reaktív oxigéngyökök mennyisége, mind a spontán mutációk száma megsokszorozódik (Chen és mtsai 2007), ami elősegítheti a deléciók, és köztük a CD kialakulását. Kimutatták, hogy ionizáló sugárzás hatására is emelkedik a deléciós mutáns mitokondriumok száma, ezáltal sugárzás mitokondriális

DNS károsító markereként is használható (Pithiviragsingh és mtsai 2004, Murphy és mtsai 2005).

Sejtvonalakban hosszú ideig fennmaradhat (Chen és mtsai 2011). Amennyiben nagy számban fordul elő a sejtben ez mitokondriális funkciókiesést, ez emelkedett ROS termelést vált ki (Peng és mtsai 2005; Majora és mtsai 2009). Mennyiségének változása könnyen követhető polimeráz láncreakcióval, a valós idejű polimeráz láncreakció pedig különösen érzékeny és számszerűsíthető eredményeket nyújt (Nicklas és mtsai 2004).

#### 3.4. A sugárérzékenységben szerepet játszó kandidáns gének

A sugárzás direkt és nem célzott hatásaiban is fontos szerepet játszanak az expozíciót követően indukálódó gének és fehérjék. Kutatásom során olyan, a TGF-β családba tartozó, kiválasztott kandidáns géneket és hatásaikat tanulmányoztam amelyek sugárválaszgéntként befolyásolják a károsító folyamatokat és kialakítják a sejtek egyéni reakcióját.

Sugárválasz génnek nevezhetjük azokat a géneket, amelyek sugárzás hatására indukálódnak, képződő fehérjéik befolyásolják a sejt, szövet válaszát az expozíció után. A sugárválasz gének azonosítására számos tanulmány született. A következőkben a fibroblaszt sejtvonalakban azonosított génekről beszélek bővebben. Ezek a vizsgálatok is igen sokrétűek az irodalomban. Irányultak a különböző fajtájú ionizáló sugárexpozíciót követő génindukció mintázatának összehasonlítására (Zhou és mtsai 2006, Kote-Jarai és mtsai, 2004, Ding és mtsai 2005, Sokolov és mtsai 2006, Antoccia és mtsai, 2009, Ghandi és mtsai, 2010), a különböző dózisteljesítmény következtében indukálódó útvonalak jellemzésére (Sugihara és mtsai 2004, Zhou és mtsai 2006). Vizsgáltak kis dózis (Sugihara és mtsai 2004, Kis és mtsai 2006, Zhang és mtsai 2009, Hou és mtsai 2015) és nagy dózis (Quarmby és mtsai 2002, Ding és mtsai 2005, Zhou és mtsai 2006, Alsner és mtsai 2007, Antoccia és mtsai 2009, Sokolov és mtsai 2006, Tsai és mtsai 2010, Mezentsev és Amundson 2011) hatására indukálódó génexpressziót. Tanulmányozták in vitro (Zhou és mtsai 2006, Kote-Jarai és mtsai, 2004, Ding és mtsai 2005, Sokolov és mtsai 2006, Zhou és mtsai 2006, Antoccia és mtsai 2009, Warters és mtsai 2009, Zhang és munkatársai 2009, Ghandi és mtsai, 2010, Hou és mtsai 2015) és ex vivo (Quarmby és mtsai 2002, Alsner és mtsai 2007).

A leggyakrabban azonosított gének közé tartoznak a sejtciklus szabályozásban, a DNS hibajavításban (SESN1, RAD51, GADD45A, PCNA), a proliferációban (CDKN2A/p16, TP53, p21Waf1/ CDKN1A), az apoptotikus (BBC3, AIF, CASP3, CASP8, TP53INP1), jelátviteli folyamatokban (FDX2, FAS, TRAF, GADD45, p21Waf1/ CDKN1A, GADD45A, PCNA, MDM2, TP53INP1, SESN1, GDF15/PTGF), és a stressz válaszban (SOD3, SSN1, CREBBP, HNF4/TCF) szerepet játszó gének. Ezek között is számos multifunkciós fehérjét kódoló gén van, melyek sokrétű szerepet töltenek be (1. Táblázat).

Kutatócsoportunk azonosította sugárválaszgénként, a GDF-15 molekulát (Kis és mtsai 2006), egy a sugárzás mechanizmusában még ismeretlen funkciójú gént, ami kutatásom későbbi tárgya lett.

Funkció		Azonosított gének Forrás
Sejtciklus	DNS	IER5, RAD4, RAD18, FANCE, Ivanov és mtsai 2001,
-	hibajavítás	MTCH, BRCA1, XRCC5, XRCC6, Ding és mtsai 2005,
		DDB2, XRCC1, XRCC2, Kis és mtsai 2006,
		XRCC3, XRCC4, MSH2, SESN1, Zhou és mtsai 2006,
		RAD51, GADD45A, PCNA, Warters és mtsai 2009,
		UNG/SMUG, Sokolov és mtsai,
		Gandhi és mtsai 2010,
		Mesentsev és mtsai
		2011, Hou és mtsai
		2015
	DNS	ARID5B/MRF2, EPB72, LTC4S, Ivanov és mtsai 2001,
	metabolizmus	Ciklin A1, CCND1, CDCR3, IER5, Kote-Jarai és mtsai
		CDC25A CDC34, CDC45, E2F5, 2004, Sugihare és mtsai
		SUI1/EIF1, FOXP1, RAI17,2004, Kis és mtsai
		CDC7L, RFC, HEC, PLK2/SNK, 2006, Sokolov és mtsai
		PLK3, SERTAD1, PPM1D,2006, Zhou és mtsai
		SMARCE1, CEA/PSG1, SMUG,2006, Zhang és mtsai
		COIL, SULT2A, BTG1, RB1,2009,
		<b>FBXW7, BBC3, CCNG1,</b> Ding és mtsai 2005,
		CCNA2, CCNB1/CYP26B1, Hou es mtsai, Antoccia
		CCNB2, CDK2, CDK5, CDK6, es mtsai 2009, Warters
		CDK8, CDK9, CDC2/CDK1, es mtsai 2009, CDC2
		COX2/PIGS2, CLKI, CDC6, Mesentsev es mtsai
		CDC45, CDKN2A/p16, TP53, 2011,
		p21Wat1/ CDKNIA,

**1. Táblázat A táblázat az ionizáló sugárzás hatására indukálódott azonosított géneket tartalmazza.** Vastaggal szedve a több forrás által is alátámasztott génindukció, színessel kiemelve a kutatási munkám során vizsgált gének

	Transzkripciós	IGF2, p53, H-RAS, C-FOS, CTGF,	Sokolov és mtsai 2006,
	faktorok	FGF	Zhang és mtsai 2009,
Jelátvitel	p53 dependens	EGR, GAS1, DDB2, DARP, PA28,	Ivanov és mtsai 2001,
		PLK/SNK, HRAS, PAK3, <b>BTG2</b> ,	Quarmby és mtsai
		FDX2, FAS, TRAF, p21Waf1/	2002, Sugihare és mtsai
		CDKN1A	2004, Ding és mtsai
		GADD45A, PCNA, MDM2,	2005, Kis és mtsai
		TP53INP1. SESN1.	2006. Zhou és mtsai
		GDF15/PTGF	2006. Zhang és mtsai
			2009. Warters és mtsai
			2009, Gandhi és mtsai
			2010. Hou és mtsai
			2015.
	p53	THS1, WNT2, PRKCB1, EFNB1,	Kis és mtsai 2006
	independens	AKTIP. PTGS2. ATF3. CREBL	Sokolov és mtsai 2006.
		MAPK. PTEN. TIMP3.	Alsner és mtsai 2007
		TNFRSF11B. $P2RX2$ .	Zhang és mtsai 2009.
		ARNO/CTH2. SLIC1. PCNA.	Warters és mtsai 2009,
		$\mathbf{PI3KR}, \mathbf{MDM2}, \mathbf{GADD45A},$	Gandhi és mtsai 2010
		GDF15	Mesentsev és mtsai
			2011. Hou és mtsai
	NF- <b>KB</b> válasz	MMP1_MMP3_CXCR1_CXCR2	Alsner és mtsai 2007
		CXCL2 $CXCL12$ $CXCL35$ AP-1	Müller és mtsai 2007,
		AP-2. CREBL	Gandhi és mtsai 2010
	notch ielátvitel	NCSTN APH-1	Hou és mtsai 2015
Stressz		GSTM3 SOD2 NINI1 DKK1	Zhou és mtsai 2006
válasz		DNAIB6 DUSP10 $TF12/ZNF92$	Warters és mtsai 2009
, unusz		HDAC4. HSPA8. HSPBP1.	Sokolov és mtsai
		SCARA3 SUI1/EIF1	Mesentsev és mtsai
		GPX4/MCSP DUSP-1/MKP	Ding és mtsai 2005
		SOD3. SSN1. CREBBP.	Hou és mtsai
		HNF4/TCF	
	immunreakció	SH2D2A ADAMTS1 II-1B II.6	Quarmby és mtsai
	gyulladás	$II_{-33}$ $II_{10}$ $GZMB/CTLA-1$	2002 Ding és mtsai
	85	FPR1. CSF-1. TNF $a$ .	2005. Kis és mtsai
			2006, Ghandi és mtsai
			2010. Ivanov és mtsai
			2010 Mesentsev és
			mtsai 2011.
Seithalál	Apoptózis	APOBEC3A HSC CTSD	Kis és mtsai 2006
~ Junun		TNFRSF10B. Fas. CASP5	Zhou és mtsai 2006
		GZMB PDCD 4 PDCD 6	Warters és mtsai 2009
		PDCD10, PDCD6IP BRC3, AIF	Ding és mtsai 2005,
		CASP3. CASP8. TP53INP1	Mesentsev és mtsai
			Sugihare és mtsai
	Szeneszcencia	wH2XA	Zhang és mtsai 2009
	Szeneszeenera	1	Antoccia és mtsai

			2009, Ghandi és mtsai
			2010
Homeosztá	Redox	MTND1, MTND2, MTND3,	Kis és mtsai 2006,
zis	homeosztázis	MTND4, GSTA1, MT1F, MT1G,	Warters és mtsai 2009,
		TXNL2/GLXR, FDX2, FDXR	Sokolov és mtsai,
			Sugihare és mtsai
	Citoszkeletális	DEGS1, MYO10, RFX, KRT7,	Sugihare és mtsai 2004,
	fehérjék	VCL, TM1, $\beta$ -AKT, COL5A1,	Alsner és mtsai 2007,
		COL1A1, FBLN1	Zhang és mtsai, 2009;
			Gandhi és mtsai 2010,
	Fehérje	USP30, UBE2C, UBE4A, PSMA2,	Ivanov és mtsai 2001,
	lebontás	PSMA6, PSMB1, EPOX,	Kis és mtsai 2006,
		FBXW7/SEL10, PA28	Sokolov és mtsai 2006
	Citokinek	CXCR1, CXCR2, IL1A, IL-8,	Ivanov és mtsai 2001,
		IL10, <b>IL-1B, IL 6</b> , <b>IL-33</b> , TNFα,	Quarmby és mtsai
		GM-CSF, <mark>GDF-15, TGF-β</mark>	2002, Müller és
			Meineke 2007, Gandhi
			és mtsai 2010
	Energia	BIG2,	
	háztartás		

#### 3.4.1. Növekedési differenciálódási faktor-15 (GDF-15)

A TGF- $\beta$  családba tartoznak a növekedési és differenciálódási faktorok, aktivinok, inhibinok, Mülleri gátló fehérjék, a Drosophilában azonosított, az embrionális fejlődés során aktív DPP (Drosophiladecapentaplegic) gén komplex, CDMP-1 (cartilage-derived morphogenetic proteinek) és a GDF-15 fehérjét is tartalmazó morfogenikus fehérjék (MP-Morphogenic Proteins). A TGF- $\beta$  családba tartozó fehérjék multifunkciós hormonok, citokinek. Szabályozó szerepük sokrétű, mint a proliferáció, gyulladás, angiogenezis, differenciáció (Moses és Serra 1996), növekedés, apoptózis. Aktívak az embrionális fejlődés során (Wall és Hogan 1994), és felnőttkorban is, valamint az adhézióban, sejtkapcsolatok építésében (Roberts és Sporn, 1993).

A GDF-15 a bone morphogenic protein alcsalád tagja (BMP). A humán gén helye a 19es kromoszóma hosszú karján található (19p12-13.1) két exont, és köztük egy körülbelül három kilobázispár nagyságú intront tartalmaz (Böttner és mtsai 1999).

A Morphogenic protein (MP) alcsaládba tartozó fehérjék szabályozó szerepet játszanak az embrionális fejlődésben és később a szöveti differenciáció során. Jellemzőjük, hogy nagy prekurzor molekulaként szintetizálódnak, és az érett formájukat egy dibázikus
(RXXR) hasító hely melletti hasítás révén érik el, mely során felszabadul a hét ciszteint tartalmazó konzervatív terminális doménjük. A biológiailag aktív fehérjék ennek a terminális karboxil doménnek a homo-vagy heterodimer formái (Kingsley 1994). A család fehérjéi konzervatívak, aminósav sorrendjük (mint az általunk vizsgált TGF-β1 és 2) 90%-ban egyezik, a GDF-15 azonban csak 70%-ban (Böttner és mtsai 1999). Az érett GDF-15 egy 224 aminósavból álló, 25 kDA nagyságú fehérje a 80 kDa nagyságú propeptid dimer RRAR furin hasító hely melletti enzimatikus emésztés után jön létre. A szekréció előtt az endoplazmatikus retikulum és Golgi apparátusban való szállítódás során a proforma tartalmaz még egy N-glikozilált helyet hetvenedik aminósavnál (Bauskin és mtsai 2000).

Az érés során átesik egy prokonvertáz enzim általi hasításon, és dimerikus formában kikerül a keringésbe (Bauskin és mtsai 2010). Bizonyos körülmények között mind az érett, mind a proaktív forma a keringésbe kerül, de az éretlen forma lassabb diffúzióra képes, és az extracelluláris membránhoz kötődik. Bauskin és munkatársai egy 2005-ös tanulmányban kimutatták, hogy az éretlen forma jelenlétének szabályozó szerepe van. Két ismert allélikus formája van, melyből a D allél egy hisztidin aszparaginsav szubsztitúciót okozó nukleotid polimorfizmust hordoz. A mutáció megváltoztathatja a fehérje működését. Homozigóta előfordulási gyakorisága körülbelül 5 % (Fairlie és mtsai 2001).

A GDF-15 gént 1997 és 2004 között több munkacsoport is azonosította, klónozta, ezért az irodalomban több néven is szerepel. Leggyakoribb elnevezése a Growth Differentiation Faktor-15 (GDF-15), Macrophage Inhibitor Citokin-1 (MIC-1) (Bootcov és mtsai 1997) és a Non-steroidal antiinflammatory drug-activated gén (NAG-1), de szerepel Placental Transforming Growth Factor beta (PTGF-β) (Lawton és mtsai 1997, Yokoyama Kobayashi és mtsai 1997), placental bone morphogenetic protein (PLAB) (Hromas és mtsai 1997) néven is. Prostate derived faktor (PDF) néven Paralkar és munkatársai 1998-ban cDNS-ből azonosították a gént és Western blot analízissel a hozzá tartozó 16 kDa nagyságú fehérjét. (Paralkar és mtsai 1998).

Normál szöveti környezetben magának a génnek alacsony az expressziója, a legnagyobb mennyiségben az embrionális fejlődés során a placentában, később a prosztatában, a bélben és a vesében mutatható ki. Megnő az expressziója gyulladás során, szerepet játszik a makrofágok szabályozásában (innen kapta az egyik nevét: Makrofág-gátló

citokin 1, MIC-1). Irodalmi adatok alapján tudható, hogy mint a p53 útvonal egyik downstream résztvevője (Osada és mtsai 2007) szerepet játszik a DNS károsodás hatására kialakuló gyulladási és stressz válasz folyamatokban. A GDF-15 hiány a nekrotikus folyamatokat csökkenti (de Jager és mtsai 2011). Ezen kívül más célgénekkel való transzaktivációban, mint p21, GADD45, és Bax fehérje szerepet játszik a sejtciklus, a DNS hibajavítás és az apoptózis szabályozásában is (Levine 1997). A p53 szerepét ismerve a tumor keletkezésének mechanizmusában, "downstream" génjeinek megismerése fontos lehet az új rákellenes terápiák kidolgozásában.

A GDF-15-nek saját receptorát nem azonosították még, a TGF- $\beta$  fehérjékhez hasonlóan a TGF- $\beta$  receptorokon keresztül fejti ki aktivitását, a II típusú receptorhoz kötődve, amellyel kereszt köt és heterodimert alkotva közvetíti az aktivációs jelet (Tan és mtsai 2000). De nem csak ezen az útvonalon keresztül fejti ki hatását. Lee és munkatársai egy későbbi tanulmányban leírták, hogy ez a fehérje a TGF- $\beta$  receptoroktól függetlenül az Extracelluláris Regulált kináz 1/ 2 (ERK 1/2) aktiválásával is indíthat jelátvitelt a Smad4-en keresztül (Lee és mtsai 2003). Anoxiás körülmények között kimutatták, hogy glioblasztóma sejtekben aktiválódik a p53 és HIF-1 fehérjétől függetlenül is, a Smad4 útvonalon keresztül (Albertoni és mtsai 2002, Xu és mtsai 2006).

A GDF-15 fehérje védő funkciója ismert a terhesség és az egyedfejődés során, magzatvédő szerepet tulajdonítanak neki. Állapotos nők szérumában magas a GDF-15 fehérje szintje, és a gesztáció előre haladtával növekszik (Moore és mtsai 2000). Emelkedett a citokin szintje a placentában és a magzatvízben is. Mivel abortált nőkben a vetélést megelőzően már három héttel csökkent a szérumszintje, és harmadára esik vissza a normál terhességű nőkhöz képest, feltételezhető, hogy a magas GDF-15 az anyától származó proinflammatorikus faktorok gátlásával védi az embriót a kilökődéstől. A szérumszint alacsony GDF-15 tartalmának nem csak prognosztikai jelentősége van, hanem maga a fehérje is szerepet játszik a vetélés megakadályozásában (Tong és mtsai 2004).

További biológiai funkciói igen változatosak, erősen függenek a szöveti környezettől. Késői makrofággátló hatását már korábban is említettem (Bootcov és mtsai 1997), de a hemopoetikus progenitorok szabályozásában is részt vesz (Hromas és mtsai 1997; Detmer és mtsai 1999). Fontos funkciója a központi idegrendszerben, hogy a

dopaminerg neuronokra neurotóf és védő hatással van (Strelau és mtsai 2000). A hipotalamuszban a GDF-15-öt stabilan túltermelő transzgenikus egerek kisebbek és vékonyabbak voltak, mint a vad típusú egerek, mert a hipotalamuszban a TGF-βRII receptoron keresztül az ERK 1/2 enzimen keresztül hat az étvágyat befolyásoló hormonokra, fehérjékre, mint a neuropeptid Y és pro-opiomelanocortin (Johnen és mtsai 2007).

A fehérje kóros folyamatokban is szerepet játszik. Különböző rákos megbetegedésekben leírták mind protektív, mind rossz előrejelzéssel járó prognosztikus faktorként. Magas koncentrációjú jelenlététét mutatták ki fej-nyak tumorokban (Wang és mtsai 2014), hasnyálmirigyrákban (Chen és mtsai 2014), méhnyak szarkómában (Trovik és mtsai 2014). Emlő tumor sejtvonalban GDF-15 inhibíciójával apoptózist tudtak a rákos sejtekben indukálni (Graichen és mtsai 2002). Prosztata rákban rossz kimenetelre utal a szérumban az emelkedett GDF-15 tartalom (Tan és mtsai 2000). Johnen és munkatársai a már korábban említett 2007-es tanulmányukban leírták, hogy GDF-15 fehérjét stabilan expresszáló prosztata tumorsejtekkel beoltott egerek szérumában az egerek testsúlyának összefüggött GDF-15 csökkenése az egerek citokin-koncentrációjával. А testsúlycsökkenést meg tudták azonban akadályozni GDF-15 gátlással, de a tumor mérete nem változott. GDF-15 KO egerekben, a citokint az állatokba injektálva, TGFβRII receptoron keresztül emelkedett Fos és STAT3 expressziót indukált. Humán vizsgálatokat is folytattak ebben a témában. Előrehaladott prosztata rákos betegekben és krónikus vesebajosokban a GDF-15 citokin szintje korrelált a páciensek súlyvesztésével, minél nagyobb volt, annál több súlyt veszítettek (Johnen és mtsai 2007). Tanno és munkatársai thalassaemiás betegeket vizsgálva megállapították, hogy a betegek szérumában sokszorosára emelkedett a GDF-15 szint, amit ők az erithroid sejttípusok és az ebből következő túlzott vaskoncentrációból adódó hepcidin gátlással magyaráztak (Tanno és mtsai 2007).

Egy 2011-es tanulmányban Kempf és munkatársai egér és humán szívvizsgálat során megállapították, hogy myocardiális infarktus során megemelkedik és néhány napig még magas marad a szöveti GDF-15 szint. Eredményeikből azt a következtetést vonták le, hogy a GDF-15 gyulladás gátló citokin, amely gátolta az integrin aktivációt és a kemokin szignált. A béta-2 integrin és a RAP1A GTPáz inhibícióján keresztül a

polimorfonukleáris leukociták (PMN) adhézióját és migrációját akadályozta. A fehérje nagy mennyiségben expresszálódik az aktivált makrofágokban.

Egy 2002-es tanulmányban felvetették a lehetséges összefüggést a magas GDF-15 szint és a kardiovaszkuláris elváltozások között (Brown és mtsai 2002), és megállapították, hogy bizonyos plazmakoncentráció felett a fehérje közel háromszorosára emeli a kardiovaszkuláris elváltozásokra való esélyt nőkben.

Felmerült, hogy a rizikófaktor a megváltozott funkció miatt a fehérje egy polimorfizmusához köthető, de a folyamat általános érvényű volt (Fairlie és mtsai 2001).

Sugárzással összefüggésben azonosították, mint a sugárválasz gént 2006-ban (Helland és mtsai 2006, Sokolov és mtsai 2006), valamint munkacsoportunk microarray analízissel kis dózisú sugárzás hatására (Kis és mtsai 2008). Az ionizáló sugárzás hatására indukálódó p53 célgénjeként azonosították (Yang és mtsai 2003; Frank és mtsai 2011; Rashi-Elkeles, 2014).

Magas szintje sugárrezisztenciát okozott emlőtumor (Graichen és mtsai 2010) és orrgarat eredetű tumoros sejtvonalakban (Chang és mtsai 2007).

A harmadik ábrán a korábbiakban bemutatott sugárválasz reakciók, és az általunk vizsgált GDF-15 feltételezett kapcsolata látható (3. ábra).



**3.** ábra A sugárzás indukálta sejtkárosító mechanizmusok és fő irányító fehérjéinek sematikus ábrája és vizsgált marker génünk ezen mechanizmusokban játszott szerepe. A Amennyiben a sejteiklus szabályozás illetve a DNS hibajavítás nem tudja kompenzálni a sugárkárosodás során keletkezett sérülést, a sejtek nekrózissal, apoptózissal, autofágiával vagy szeneszcenciával elpusztulnak.

## 3.4.2. Transzformáló növekedési faktor-béta 1 (TGF-\beta1)

A TGF- $\beta$  család legtöbbet vizsgált fehérjéje a TGF- $\beta$ 1. Emberben a 19q13.1-q13.3 kromoszóma helyen (Fujii és mtsai 1986), egérben a 7. kromoszómán található (Dickinson és mtsai 1990). A gén 7 exont és egy igen nagy intront tartalmaz. A prekurzor fehérje 391 aminósavból áll, a család többi tagjához hasonlóan az érés során átesik egy proteolitikus hasításon, és egy diszulfid híddal összekötött egyenként 112 aminósavból álló két alegységet tartalmazó dipeptiddé alakul (Derynck, és mtsai 1987). Sokfajta sejt termelheti. Multifunkcionális fehérje, mely szerepet játszik a differenciációban, proliferációban és egyéb folyamatokban. Negatív autokrin növekedési faktorként szinergikusan hathat a TNF $\alpha$ -val. (Derynck és mtsai 2001). Ismert funkciói közül szerepe van a szöveti differenciációban (Dickinson és mtsai 1990). Szerepe van az egyedfejlődésben (Jobling és mtsai 2004). Visszahat a saját

termelődésére (Blanchette és mtsai 1997). Részt vesz sejt növekedési és proliferációs szabályozásban (Heldin és mtsai 1997). Befolyásolhatja a sejten belül a foszfolipidek intracelluláris változásait (Valderrama-Carvajal és mtsai 2002). Sejtciklus szabályozó szerepe is van (Scandura és mtsai 2004). A DAP –kináz promótert aktiválja, és hiánya apoptózisba viszi a sejteket (Jang és mtsai 2002). A saját fehérjéje által irányított negatív visszacsatolás nélkül gátolja a sejtciklust és a sejteket szeneszcenciába, vagy apoptózisba viszi (Lin és mtsai 2004). Immunológiai folyamatokban is fontos szerepe van (Liu és mtsai 2006). Szerepet játszik az öregedési folyamatokban (Luo és mtsai 2010), valamint a túlsúlyosság kialakulásában (Long és mtsai 2003).

Szérumszintje meghatározó különböző fibrotikus folyamatokban (Bernasconi és mtsai 1995; Border és Noble, 1994). Szerepe van szisztematikus betegségek kialakulásában, mint a szkleroderma (Dong és mtsai 2002) és a Marfan szindróma (Habashi és mtsai 2006).

Rákos sejtekben gyakran túltermelődik, mind a tumorszuppressziós, mind a progressziós folyamatokban szerepet játszik (Derynck és mtsai 2001). Szabályozó szerepét kimutatták krónikus mieloid leukémiában (Naka és mtsai 2010). A TGF-β1 szérumszint a betegség kimenetelével korrelál hepatocelluláris karcinómában (Ito és mtsai 1991), emlő- (Ciftci és mtsai 2014), tüdő- (Liu és mtsai 2011) és prosztatarákos (Shariat és mtsai 2004) betegek vérében.

Jelátviteli folyamatairól tudhatjuk, hogy saját célgénjei negatív visszacsatolással csendesítik le a szignált (Stroschein és mtsai 1999). De saját termelődésére is hat azáltal, hogy az érésében szerepet játszó furin enzim termelődését serkenti (Blanchette és mtsai 1997). A citoplazmatikus PML fontos regulátora (Lin és mtsai 2004). TGF-β jelenléte nélkül mitokondriális úton történő apoptózisba viszi a sejteket (Jang és mtsai 2002). Negatív regulátora saját maga (Lin és mtsai 2004) és a TGF-β2 mellett (Stroschein és mtsai 1999), a Kip2 fehérje, ami a TGF-β1 által indukált ciklin dependens kináz gátló (Scandura és mtsai 2004). Több útvonalon keresztül, a SMAD 2, 3 és 4 (Jang és mtsai 2002), vagy az inhibin fehérjén keresztül (Valderrama-Carvajal és mtsai 2002), a RTK/Ras/MAPK és a p53 jelátviteli útvonalon keresztül hathat a proliferációra, sejtciklusra, apoptózisra (Kalo és mtsai 2007).

A sugárzással több szálon is kapcsolódik. Sugárválaszgénként azonosították, emelkedett szintje mérhető az expozíciót követően a kezelt páciensek szérumában (Vujaskovic és

Groen, 2000). A sugárterápia következtében kialakuló fibrózis okaként a perzisztensen magas TGF-β1 szintet és a mutációját, ami megváltoztatja a fehérje mennyiségének előfordulását a szérumban, mint kockázati tényezőt azonosították (Quarmby és mtsai 2003; Andreassen és mtsai 2006). Mellkasi besugárzásoknál alkalmazzák kiegészítő terápiaként a citokin gátlását.

A sugárzás célzott (Rodemann és Bamberg, 1995) és nem célzott hatásainál (Azzam és mtsai 2012) is azonosították, mint a károsító mechanizmusok egyik fő irányító citokin molekuláját. Multifunkciós fehérjeként a sugárzás hatására kialakuló válaszreakciókban vesz részt, a sejthalál és a sejtciklus iniciálásában is (Rodemann és Bamberg, 1995).

A sugárérzékenységben is szerepet játszik, mellrákoknál a TGF-β1 gátlás emelte a tumorsejtek érzékenységét a sugárterápiára (Bouquet és mtsai 2011). Ezzel szemben in vitro körülmények között sugárérzékeny normál csontvelői sejtvonalban magas TGF-β1 felszabadulás mellett emelkedett apoptózis volt mérhető (Irons és mtsai 2012)

### 3.4.3. Transzformáló növekedési faktor-béta 2 (TGF-β2)

A TGF- $\beta$ 2 aminósav szekvenciáját 1987-ben azonosították (Marquard és mtsai 1987). A 1q41 kromoszómahelyen található. A fehérje egy 442 aminósav nagyságú prekurzor fehérjéből proteolitikus hasítás útján keletkezik (Martin és mtsai 1987), az érett fehérje két teljesen azonos 112 bázispár nagyságú alegységből áll, melyeket egy diszulfid híd köt össze. Erősen konzervált gén, és 71.4%-ban szekvenciahomológiát mutat a TGF- $\beta$ 1el (Hanks és mtsai 1988, Barton és mtsai 1988).

Ismert funkciói között szerepel BSC-1 sejtnövekedés szabályozása, a normális retina pigment epitél sejtfejlődésben a transzglutamináz enzim szabályozása (Priglinger és mtsai 2003).

Patogén folyamatokban is szerepet játszik. Diszfunkcionális működése proliferatív vitreoretinopátiát okozhat. Mind a Smad7 gén általi szignáltranszdukciós inhibíció okozta túl alacsony, mind a túl magas TGF-β2 szint iniciálhatja a betegséget (Saika és mtsai 2007; Priglinger és mtsai 2003)

A magas TGF-β2 szint lehet az oka a szemgolyóban levő túlnyomásnak elsődleges open angle glaukómás (OAG) betegekben (Gottanka és mtsai 2004). A normális Smad szignalizációs útvonalon a BMP4 gátolja a TGF- β2 termelődését, glaukómás sejtekben azonban a BMP antagonista Gremlin szint emelkedése miatt a TGF- β2 felszabadul az

inhibíció alól, extracelluláris mátrix depozíciót és magas intraokuláris nyomást okozva ezzel (Wordinger és mtsai 2007).

Két ismert mutációját, Loeys-Dietz szindróma és Marfan szindróma betegséggel összeköthető mikrodelécióját azonosították (Lindsay és mtsai 2012) és egy szintén Loeys-Dietz szindrómával összefüggő nonszensz mutációt. (Boileau és mtsai 2012).

Jelátviteli útvonaláról tudjuk, hogy a TGF-β1-hez hasonlóan aktiválódik, annak negatív regulátora lehet (Stroschein és mtsai 1999).

Sugárzással kapcsolatban a TGF- $\beta$  egyik izoformájaként hasonló szerepet tulajdonítanak neki, mint az 1-es izoformának. Ismert, hogy sugárválasz gén, expozíciót követően hosszabb idővel emelkedett szintjét mérték sugárkezelt betegek szérumából (Epperly és mtsai 1999). Szerepet játszik a sugárkezelés következtében kialakuló enteropathyában (Wang és mtsai 1998).

## 4. Célkitűzés

Olyan egyszerű kimutatási módszerek, biomarkerek keresése és vizsgálati alkalmazása, melyek a sugárzás előre nem prediktálható hatásainak, mint a sejtek egyéni reakciója, a szomszédsági hatás vagy a genomiális instabilitás kimutatására lehetnek alkalmasak.

- 4.1. A kis és moderált dózisú sugárzás hatásainak leírása normál sejtben létrejövő mitokondriális DNS károsodáson keresztül.
  - 4.1.1. A CD akkumuláció dózisfüggésének összehasonlítása sugárérzékeny és rezisztens humán fibroblaszt sejtvonalakban
  - 4.1.2. CD akkumuláció kimutatása szomszédos sejtekben.
    - 4.1.2.1. A különböző szomszédsági hatást közvetítő módszerek összehasonlítása.
    - 4.1.2.2. A szomszédsági hatás kiváltásában a donor és akceptor sejt szerepének bemutatása.
    - 4.1.2.3. A szerotonin szerepének vizsgálata a szomszédsági hatásban.
  - 4.1.3. Utódsejtekben megjelenő, genomiális instabilitás összehasonlítása sugárérzékeny és rezisztens fibroblasztokban
- 4.2. Tumor sejtvonalakban a GDF-15 szerepének vizsgálata a sugárválaszban
  - 4.2.1. A sugárzás indukálta GDF-15 expresszió kimutatása.
  - 4.2.2. A GDF-15 molekuláris hatásainak vizsgálata a sejtek direkt sugárkezelésre adott válaszában, genetikai módosítással létrehozott, a GDF-15 gént specifikusan túltermelő, illetve lecsendesített sejtvonalakban.
    . A GDF-15 szint hatásának vizsgálata:
    - 4.2.2.1. a sejtek növekedésére,
    - 4.2.2.2. a sugárérzékenységben szerepet játszó TGF-β1-2 génexpresszió változásaira
    - 4.2.2.3. a mitokondriális "Common" deléció kialakulására
  - 4.2.3. A GDF-15 szint befolyása a sugárkezelés következményeire
    - 4.2.3.1. A GDF-15 szint hatásának vizsgálata a sugárzás indukálta túlélésre

- 4.2.3.2. A GDF-15 befolyásának vizsgálata a sugárválaszban és sugárérzékenységben szerepet játszó TGF-β1 és 2 expresszióra
- 4.2.3.3. A sugárexpozíciót követő reaktív oxigén gyök mennyiségének és az irányított sejthalállal elpusztuló sejtek mennyiségi összehasonlítása a különböző GDF-15 expresszió szintű sejtvonalakban
- 4.2.3.4. A GDF-15 szint által alakított oxidatív stresszre érzékeny "Common" mitokondriális deléció vizsgálata

# 5. Módszerek

## 5.1. Sejtvonalak

## 5.1.1. Humán fibroblaszt sejtvonalak

A négy különböző genetikai háttérrel rendelkező felhasznált sejtvonalból három: emlőrákos, sugárkezelt páciensek bőr-biopsziából kitenyésztett primer (BS2, CR2), illetve a primer tenyészetből S1 h-TERT génnel immortalizált fibroblaszt kultúra. A negyedik, fiatal, nem daganatos beteg bőrbiopsziájából hTERT génnel immortalizált (F11-hTERT) sejttenyészet.

A sejtvonalakról SF2 kolónia assay-el megállapítottuk *in vitro* sugárérzékenységüket, és ez alapján vontuk be őket a sugárérzékenység és mitokondriális DNS deléció kapcsolatát vizsgáló kísérletekbe. Ez a teszt a sejtek túlélését méri 2 Gy sugárzás hatására.

A sejtkultúrákat 20 % borjúszérumot (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) tartalmazó Dulbecco's modified Eagle's médiumban (Sigma-Aldrich) tenyésztettük 1% penicillin (100 U/ml) és streptomycin (100 µg/ml) (Gibco, Grand Island, NY, USA) hozzáadásával 37<sup>0</sup>C-on 5 %-os CO<sub>2</sub> koncentráció mellett sejttenyésztő inkubátorban. Az immortalizált sejtvonalakat egy korábbi vizsgálat során a laboratóriumunkban állították elő (Kis és mtsai 2005), a retrovirális konstrukciót Dr. Lansdorp (Terry Fox Laboratory Vancouver, Kanada) szolgáltatta. A konstrukció egy pMIG vektorban tartalmazta a humán Telomeráz Reverz Transzkriptázt, és a hozzá kötött GFP (Green Fluorescence Protein) marker gént. A plazmid konstrukciót FlyA13 retrovírus csomagoló sejtvonal (ECACC, Salisbury, UK) segítségével juttatták a primer fibroblaszt sejtvonalakba. A transzdukció után a GFP pozitív sejtek áramlási citométer segítségével lette kiválogatva, és a hTERT gén relatív expressziója valós idejű PCR segítségével lett ellenőrizve.

## 5.1.2. Egér emlő tumor-sejtvonalak

LM2 egér emlő tumor sejtvonal és génmódosított sejtvonalai. A két LM2 módosított sejtvonal a GDF-15 gént túltermelő (LM2-GDF15) és a géncsendesítéssel létrehozott (LM2-shGF15) változata. A sejteket 10 % szérumot (Fetal Bovine Serum, Sigma-Aldrich) és 1% Fungimycint és Streptomycint tartalmazó Dulbecco' Modified Eagle

Médiumon (DMeM-Sigma-Aldrich) tartottuk, a génmódosított sejtvonalakhoz a megfelelő szelektív antibiotikumot adtunk. Az LM2 módosítása egy korábbi vizsgálat során történt a laboratóriumunkban (Hegyesi és mtsai 2011), mely során az LM2-GDF15 túltermelő sejtvonal előállítása True ORFGDF15-GFP jelölt/pCMV6 plazmiddal (OriGene, Rockville, MD, USA) illetve kontrollnak használt üres vektorral való transzfektálással történt, a gyártó előírása szerint, Turbofect (Fermentas, Amherst, USA) felhasználásával. Mikor a sejtek elérték az 50-60%-os konfluencia állapotát, 5 µg plasmid hozzáadásával egy éjszakán keresztül inkubálódtak. Ezután a sejteket G418 (0,5 mg/ml) tartalmú médiumon tenyésztettük. A G418 rezisztens klónok három hét tenyésztés után lettek kiválogatva. A klónok GDF-15 mRNS expresszióját kvantitatív RT-PCR felhasználásával validáltuk, illetve áramlási citométeren (FACS Calibur Becton-Dickinson, San Jose, CA, USA) ellenőriztük a GFP pozitív sejtek arányát. A további in vitro kísérletekhez a sejtek tenyésztése megfelelő G-418 antibiotikum tartalmú médiumon történt.

A csendesített sejtvonal előállítása Dr. Lambert (Anschutz Medical Campus, Aurora, CO, USA) segítségével történt, aki a plazmid vektor konstrukciót szolgáltatta nekünk. Az LM2 sejteket a gyártó protokollját követve szubkonfluens állapot előtt transzfektáltuk többféle génspecifikus OriGene shRNS (OriGene) pRS vektorral (egér GDF-15 shRNS). A puromycin rezisztens klónok 15 µg/ml antibiotikum tartalmú tápoldaton lettek növesztve két héten keresztül. A klónok GDF15 mRNS génexpressziója real-time PCR-rel lett ellenőrizve, és a legmagasabb csendesítést elért klón lett kiválasztva a géncsendesített vizsgálatokhoz ennek a klónnak 10%-ra csökkent a GDF15 mRNS génexpressziója. A későbbi vizsgálatok előtt a sejtvonalak a kísérlet megkezdéséig 15 µg/ml puromycin tartalmú tápoldaton növekedtek, így elérhető volt egy stabil csendesített sejtvonal fenntartása.

## 5.2. Sugárkezelés

A direkt sugárkezelés a fibroblaszt sejttenyészet esetében egyszeri <sup>60</sup>Co-γ sugárzással történt (Gammatron-3 készülék, Siemens Erlangen, Németország), kis dózis (100 mGy) és közepes 2 Gy-es dózis alkalmazásával.

A dózisfüggés vizsgálatnál alkalmaztunk ettől eltérő sugárkezelést, 0,01-10 Gy dózisig. A kis dózisok esetében a légdózis-teljesítmény 0,0244 Gy/perc, a nagy dózisoknál 0,059 Gy/perc volt.

A tumor sejteket röntgensugárzással kezeltük, THX-250 (Siemens Erlangen, Németország) röntgenkészülékkel. Az alkalmazott dózisok az expresszió vizsgálatoknál a standard sugárkezelés 2 Gy-es dózisa és emelkedő dózisok (0-2-4-6) a többi vizsgálathoz. A légdózis-teljesítmény 1,46 Gy/perc volt.

#### 5.3. Kolónia assay

Humán fibroblaszt sejtvonalon a kolónia assay-hez a sugárérzékeny (S1-hTERT), és a normál (F11-hTERT) immortalizált kultúrákat használtuk. A sejteket normál körülmények közt tenyésztettük 20 %-os borjúsavót tartalmazó DMeM médiummal, a konfluens tenyészet eléréséig. Ekkor a fibroblasztokat az általánosan használt procedúrát követve 4 %-os Tripszin-EDTA oldat felhasználásával leválasztottuk a sejttenyésztő edény felületéről. A sejteket Tripán kék festék hozzáadása mellett Bürkerkamrában megszámoltuk, maid kioltottuk őket 100 mm<sup>2</sup> –es tenvésztőedénvre. A sejtszám 500 illetve 1000 sejt/Petri csésze volt. A szétosztás hibáit kiküszöbölendő, a sejtvonalakból minden alkalommal dózisonként minimum két párhuzamost oltottunk, és a kísérleteket legalább háromszor megismételtük. A sejtek szétosztása után 24 órával történt meg a sugárkezelés 0,1 és 2 Gy dózissal. A besugárzás után 14 napig inkubáltuk a sejteket, 3-4 naponta friss médiumot cserélve rajtuk. A két hét inkubációs idő elteltével a sejteket metanollal fixáltuk, és Commassie Blue BR-250 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) festékkel megfestettük az élő sejteket. A kolóniaszámlálás fénymikroszkóp alatt történt. Kolóniáknak azt a sejtcsoportot tekintettük, amelyet minimum 50 fibroblaszt sejt alkotott. A kolónia-képzés (plating efficacy, PE) és a túlélés (surviving fraction, SF) számolása Munshi és társai által leírt módon történt (Munshi és mtsai 2005).

Tumorsejtekben a kolónia assay-hez LM2, LM2-GDF15 overexpresszáló és LM2shGDF15 shRNS-sel gátolt egér emlő tumor kultúrákat használtuk. A sejtek szétosztása után 6 órával történt meg a sugárkezelés 2 és 4 Gy dózissal. 7-9 nap inkubációs idő elteltével a sejteket metanollal fixáltuk, és 1%-os Metilén-kékkel megfestettük. A kolóniaszámlálás fénymikroszkóp alatt történt. Kolóniáknak azt a sejtcsoportot tekintettük, amelyet minimum 50 tumor sejt alkotott. A kolónia-képzés (plating efficacy, PE) és a túlélés (surviving fraction, SF) számolása a már korábban leírt módon (Munshi és mtsai 2005) történt. A kolóniák száma a párhuzamosok átlagának számításával történik. A plating efficiencia a következő egyenletből számolható:

$$PE = \frac{Kolóniák száma}{Kiosztott sejtek száma}*100$$

A kolóniaképzés meghatározása után számítható ki a túlélés (SF), ami megadja a kezelésre adott választ. A túlélés meghatározható a következő egyenletből: a kezelt

minta PE-ja a kontroll minta PE-jához képest százalékosan

$$SF = \frac{Kezelt minta PE}{Kontroll minta PE} *100$$

A túlélést szemi-logaritmikus függvényen ábrázoljuk, ahol az x tengely a kezelést, esetünkben a besugárzás dózisát jelöli, az y pedig a túlélést logaritmikusan ábrázolva.

## 5.4. Szemi-kvantitatív polimeráz láncreakció

A "common" mitokondriális deléció vizsgálatára polimeráz láncreakciót alkalmaztunk. A mintákat szemi-kvantitatív PCR-rel amplifikáltuk először. A reakció termék mérete jellemzően a 100-400 bp között volt (2. táblázat) Az ajánlott termékhossz maximum 1000 bp, az ennél nagyobb termékek amplifikálásához már speciális PCR körülményeket, ún. long-term PCR technikát használnak. Az általunk vizsgált szakasz egy közel 5000 bázispár nagyságú részt érint a mitokondriális DNS. A mi rendszerünkben totál/teljes DNS-ből szaporítjuk fel a kívánt szekvenciát, vagyis a mintánk tartalmazza a nukleáris és a mitokondriális DNS-eket is.

A templátul szolgáló DNS-t a kezelést követő inkubációs idő után, 4%-os Tripszin-EDTA oldattal a tenyésztő-edényről leválasztott sejtekből izoláltuk MasterPure<sup>TM</sup> DNS izoláló kittel (Epicentre Technologies Ltd, Madison, WI, USA). A reakció során használt primereket (IDT Technologies, Neymark NY, USA) a második táblázat foglalja össze. A "common" deléció 4977 bp-os nagyságú, így a deléciós mutáns meghatározására a primereket a deléción kívülre, a kieső rész két végére terveztük. A rövid elongációs idő, 30 másodperces szintézis nem elég a teljes több mint 5000 bp nagyságú szakasz felszaporítására, így a deléciós primerek használata során vad típusú termék nem keletkezett. Két primerpárt is használtunk a deléciós mitokondriumok arányának megállapítására, az egyik egy 262 bp-os ( $\Delta$ 4977 mtDNS F1+R1) irodalmi adatokban validált primerpár (Rogounovitch és mtsai, 2002), a másik egy saját tervezésű, 373 bp ( $\Delta$ 4977 mtDNS F2+R2) nagyságú terméket eredményezett. A vad

#### DOI:10.14753/SE.2016.1871

típus meghatározására a primereket (WT mtDNS F+R) a deléción belülre terveztük, így amennyiben a deléció megtörténik, vad típusú termék nem keletkezik. Használtunk továbbá primereket a teljes mtDNS (Tmt mtDNS F+R) mennyiség meghatározására, ezeket a D-kanyart kódoló külső régió környékére terveztük. A primerek elhelyezkedését a mitokondriális DNS-en az 4. ábra szemlélteti.



4. ábra A kvantitatív polimeráz láncreakcióban a mitokondriális "common" deléciós mitokondriumok meghatározására használt primerek elhelyezkedése a mitokondriális DNS-en . A deléciós mitokondriumok jellemzésére a primereket a deléció külső oldalán helyezkedik el(Δ4977 mtDNS F+R), a vad típus felszaporítására a deléción belülre (WT mtDNS F+R), a teljes mitokondrium mennyiségét jellemző primerpárt pedig a mitokondriális DNS D-loop-jához (Tmt mtDNS F+R)

Minden 50µl PCR reakcióelegyünk tartalmazott 1 µg DNS-t, 10 x reakció puffert (1, 5mM), dNTP-t (0, 3mM), primer-t (0, 375 pM), és a DNS polimeráz enzimet (0,06  $U/\mu$ l, Finnzymes Oy, Finland).

A gyors, ciklikus hőmérséklet-váltásokhoz Bio-Rad PCR készüléket használtunk (Bio-Rad Laboratories, CA, USA).

A PCR-reakció programozott hőprofilját a 2. táblázat tartalmazza a humán fibroblaszt sejten végzett mitokondriális DNS deléció vizsgálat esetében (**2. Táblázat**).

Felfűtés és Denaturáció	15 perc	95°C
40x Denaturáció Annelálás DNS szintézis	30 mp	95°C
	30 mp	59°C
	30 mp	72°C
Végső extenzió	5 perc	72°C
	$\infty$	4°C

2. táblázat A humán fibroblasztokban előforduló mitokondriális CD detektálására használt PCR reakcióban alkalmazott hőmérsékleti ciklusok

A CD deléciós mutánsok vizsgálatára alkalmazott qPCR reakció során alkalmazott primereket a 3. táblázat tartalmazza.

Primer neve	Primer szekvencia	DNS régió	Termék (bp)	
Tmt mtDNS F	5'-GATTTGGGTACCACCCAAGTATTG-3'	mtDNS 16042-16066	83	
Tmt mtDNS R	5'-AATATTCATGGTGGCTGGCAGTA-3'	mtDNS 16102-16125		
WT mtDNS F	5'-CGACCACTTTGTCAAGCTCA-3'	mtDNS 9500- 9520	141	
WT mtDNS R	5'-GGTGATTGATACTCCTGATGCG-3'	mtDNS 9620- 9642		
ΔmtDNA <sup>4977</sup> F1 (Rogounovitch és mtsai 2002)	5'-CCCACTGTAAAGCTAACTTAGCATTAACC-3'	mtDNS 8293- 8322	262	
ΔmtDNA <sup>4977</sup> R1 Rogounovitch és mtsai 2002)	5'- GGTTTCGATGATGAGGTCTTTG-3'	mtDNS 13509-13531		
ΔmtDNA <sup>4977</sup> F 2	5'-CCCACTGTAAAGCTAACTTAGCATTAACC-3'	mtDNS 8293- 8322	373	
ΔmtDNA <sup>4977</sup> R2	5'-AGGTTGACCTGTTAGGGTGAGA-3'	mtDNS 1362- 13644		

## 3. táblázat A mitokondriális "common" deléció vizsgálatánál használt primerek jellemzői

## 5.5. Kvantitatív valós idejű PCR

Valós idejű polimeráz láncreakció segítségével állapítottuk meg a fibroblaszt kultúrákban mitokondriális "common" deléció pontos mennyiségét. Az általunk alkalmazott Maxima SybrGreen Master Mix 2x (Thermo Scientific Ltd, Loughborough,

UK) tartalmazta a reakció puffert, a beépítendő nukleotidokat, a Taq polimerázt és a kontamináció ellenőrzésére uracil DNA glikozilázt (UDG), csak a reakciónak megfelelő primereket és a DNS templátot kellett hozzáadni. Az analízis  $\Delta\Delta$ CT metódussal készült. Az alkalmazott módszer leírására a következő egyenletek szolgálnak:

 $\begin{array}{l} Ct \;_{vizsgált\;gén/génszakasz} \text{-} Ct \;_{a\;gén/génszakasz,\;amire\;normalizálunk} = \Delta Ct \\ \Delta Ct \;_{kezelt\;minta} \text{-} \Delta Ct \;_{Kontroll} = \Delta \Delta Ct \\ Relatív\;mennyiség = 2 \;^{-\Delta \Delta Ct} \end{array}$ 

Ezeket alkalmazva a "common" deléciós mutánsok leírására szolgáló ( $\Delta$ mtDNA<sup>4977</sup> F +R) primerek által felszaporított termékek mennyiségét, mint a vizsgált génszakaszokat normalizáltuk, a teljes mitokondriális DNS mennyisége leíró Tmt mtDNS primerekkel felszaporított, és a nukleáris DNS jellemzésére alkalmazott, normálisan állandó mennyiségben jelen levő úgynevezett "háztartási" GAPDH génre tervezett Gapdh F (5'-CGACCACTTTGTCAAGCTCA-3') és R (5'-AGGGGTCTACATGGCAACTG-3') primerek segítségével felszaporított termékre ( $\Delta$ Ct). Valamint összehasonlítottuk a kezelt mintákban a kezeletlen kontrollhoz képest ( $\Delta\Delta$ Ct), így tudtuk megállapítani a CD mutáns mitokondriumok relatív valószínűségét. Majd a két háztartási génre normalizált  $\Delta\Delta$ Ct értéket átlagoltuk. Így megkaptuk azt az eredményt, ahol a kontroll mintánkban a relatív mennyiség értéke mindig 1, és a kezelt mintákban ehhez képest alakul az arány.

## 5.5.1. Mitokondriális deléció mérése

## 5.5.1.1. Humán fibroblasztokon

A humán fibroblasztokon a különböző genetikai hátterű és sugárérzékenységű fibroblasztok (CR2, BS2, S1-hTERT, F11-hTERT) felhasználásával a mitokondriális "Common" deléció mérése a szemi-kvantitatív PCR technika során alkalmazott körülmények között zajlott, Maxima SybrGreen Master Mix 2x (Thermo Scientific Ltd) reagenssel.

A sejteket 10 % szérumot (Fetal Bovine Serum, Sigma-Aldrich) és 1% Fungimycint és Streptomycint tartalmazó Dulbecco' Modified Eagle Médiumon (DMeM) (Sigma-Aldrich) tartottuk. A konfluens tenyészetből sejtszámolás után dózisonként 500.000 sejtet 25 cm<sup>2</sup> –es tenyésztőedényben inkubáltuk a kezelés előtt 24h-n keresztül.

A sugárkezelést követően 37 <sup>0</sup>C-on inkubáltuk a sejteket, majd az inkubációs idő leteltével a sejteket a tenyészedényből összegyűjtöttük DNS izoláláshoz. A DNS

izolálást a sejtekből Epicentre MasterPure <sup>TM</sup> kittel végeztük, a gyártó protokollja szerint. A valós-idejű polimeráz láncreakció előtt a DNS-ek mennyiségét lemértük nanodrop segítségével (BioTEK Synergy HT).

Ezeknek a kondíciói a következők voltak: 20 µl végtérfogatú PCR Mix tartalmazott 1 µg teljes DNS-t, 1,875 pM primert, 10 µl Thermo Scientific Maxima SybrGreen qPCR Master Mix, vagy Luminaris Color HiGreen qPCR Master Mixet, ami tartalmazta a Hot Start Taq polimerázt, a dUTP-t, az Uracil-DNS Glikozilázt, a qPCR puffert, és a SybrGreen festéket. A detektálás 494 és 521 nm-en történt Corbett Rotor-gene Realtime PCR gépen (Qiagen, Hilden, Németország). A Luminaris Mix tartalmaz még egy kék festéket 615 nm-es abszorpcióval és igényel még 0,5 µl Yellow Sample puffert, ami 413 nm abszorbeál). Két kitre azért volt szükség, mert a Maxima SybrGreen qPCR kit magyarországi forgalmazása időközben megszűnt, így ugyanannak a gyártónak egy továbbfejlesztett termékét voltunk kénytelenek használni, aminek a kondíciói jelentős mértékben hasonlítottak az előzőhöz. A PCR reakció első denaturációs lépése Maxima SybrGreen qPCR Mix és a Luminaris Color HiGreen qPCR kit tartalmazott még egy első ciklust a felfűtés előtt 50 <sup>0</sup>C-on 60 másodpercig, a továbbiakban követte az előző beállításokat.

Az analízis  $\Delta\Delta$ CT módszerrel történt, a CD mutánsok mennyiségi meghatározása a vizsgált termékmennyiség a nukleáris és mitokondriális DNS mennyiségét leíró termékekhez normalizált átlaga a kezelt sejtekben a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva.

## 5.5.1.2. Egér emlőtumor sejteken

A "Common" deléció megtalálható az egér mitokondriális DNS-en is (Zhang és mtsai 2013a), ezért munkánk során alkalmazhattuk a CD kimutatási módszert egér tumor sejtvonalakon a sugárérzékenységben szerepet játszó GDF-15 gén vizsgálatánál. A felhasznált sejtvonalak LM2 egér emlő tumor sejtvonal és génmódosított sejtvonalai voltak, a GDF15 gént túltermelő (LM2-GDF15) és géncsendesítéssel létrehozott (LM2-shGF15) változata.

A mitokondriális CD mennyiségi analízise a humán fibroblasztok méréséhez hasonlóan zajlott, a hőprofilt a 4. táblázat tartalmazza.

Felfűtés és Denaturáció	15 perc	95°C
40x Denaturáció	30 mp	95°C
Annelálás DNS szintézis	30 mp	60°C
	30 mp	72°C
Végső extenzió	5 perc	72°C
	œ	4°C

4. táblázat A kvantitatív polimeráz láncreakció hőprofilja egér mitokondriális CD kimutatására

Az alkalmazott primerek listáját az 5. táblázat tartalmazza.

5. táblázat A kvantitatív polimeráz láncreakció során az egér modellben felhasznált primerek az egér mitokondriális CD mérésére

Név	Szekvencia	Helye a mitokondriális DNS-en	PCR termék
tmt pr F	5'-ATCGTACCGCGGTGGCT-3'	mtDNS 67-88	
tmt pr R	5'-CACAAAGGTTTGGTCCTGGCCT- 3'	mtDNS 311- 331	264 bp
del pr F (Zhang	5'-TCATTCTAGCCTCGTACCAACA-	mtDNS 8912-	
és mtsai 2013a)	3'	8933	304 hn
del pr R (Zhang	5'-GAGGTCTGGGTCATTTTCGTTA-	mtDNS 13070-	Jorop
és mtsai 2013a)	3'	13091	

A teljes mitokondrium mennyiséget jellemző primerpárt (tmt pr F+R) a mtDNS 12SrRNS-t kódoló szakaszára terveztük. Az analízisnél, a nukleáris DNS jellemzésére, normálisan állandó mennyiségben jelen levő Cyclofillin C1 génre tervezett, Cyc1 F 5'-CCAGGTATACAAGCAGGTGTGCTC-3' és Cyc1 R 5'-CATCATTAGGGCCATCCTGGAC-3' szekvenciájú primerpár segítségével felamplifikált terméket is használtunk a normalizáláshoz. A  $\Delta\Delta$ CT analízis során a common deléciós mitokondriumok mennyiségét a mitokondriális és nukleáris DNS mennyiségének leírására szolgáló génekre tervezett primerek által felszaporított termékekre normalizáltunk, ezeket viszonyítottuk össze a kezelt és kezeletlen mintákban, ahogy ezt már korábban leírtam a humán fibroblaszt vizsgálatok során

#### DOI:10.14753/SE.2016.1871

alkalmazott módszereknél. A primereket a humán mintához hasonlóan helyezkedtek el, a deléciós primerek irodalmi adatok alapján validált primerek voltak (Zhang és mtsai 2013a) az egér mitokondriális DNS szakaszaira, ezeknek az elhelyezkedését az 5 ábrán mutatom be.



5. ábra Az egér CD kimutatására használt primerek elhelyezkedése a mtDNS-en. A deléciós mitokondriumok jellemzésére a primereket a deléció külső oldalán helyezkedik el (del pr F+R), a teljes mitokondrium mennyiségét jellemző primerpárt pedig a mitokondriális DNS 12SrRNS szakaszára (tmt pr F+R).

## 5.5.2. A mitokondriális "Common deléció" hosszú idejű követése

A hosszú idejű követést hetven napon keresztül végeztük immortalizált humán fibroblaszt sejtvonalakon. A sugárérzékeny (S1-hTERT) és sugárrezisztens (F11-hTERT) sejtvonalunkban hasonlítottuk össze a deléciós mitokondriumok mennyiségének alakulását az időben. A korábban alkalmazott metodikát követve a sejteket kiosztottuk konfluens osztódó tenyészetből az egyszeri sugárkezelés előtti napon, 300.000 sejtet dózisonként. A következő napon gamma-sugárzással kezeltük a sejteket, 0 Gy-el, kis dózissal 100 mGy-el és 2 Gy-el. Ezután egy hetet inkubáltuk őket. Egy hét elteltével a kiosztott sejtekből sejtszámolás után továbboltottunk 300 ezer sejt, a

fennmaradó mennyiséget eltettük DNS izolálásra CD vizsgálathoz. A hosszú idejű követést 10 héten keresztül végeztük, hetente mérve a sugárzás okozta mitokondriális károsodás mértékét, és összehasonlítva az érzékeny és rezisztens sejtvonal reakcióit.

### 5.5.3. Szomszédsági vizsgálat

A szomszédsági kísérleteket primer és immortalizált sejtvonalon is végeztünk, kétféle módszerrel. Mindkét módszernél azonos sejtszámot vizsgáltunk. 500 ezer sejtet oltottunk ki 25 ml-es tenyésztőedényekbe a besugárzás előtt 24 órával. Az első módszer az úgynevezett médiumcserés módszer. Ennél a módszernél a donor sejteket besugaraztuk, majd a sugárkezelés után 1 órával a médiumot, benne az esetlegesen termelődött anyagokkal áthelyeztük a recipiens szomszédsági sejtekre. A szomszédsági sejtek, melyeket valódi besugárzás nem ért, ebben a kezelt médiumban nőttek 72 órán keresztül. Az inkubációs idő letelte után a sejtekből DNS-t izoláltunk és kvantitatív real-time PCR módszerrel meghatároztuk a "common" deléció mennyiségét.

A másik kísérlet az ún. "ko-kultúra" módszeren alapult, a direkt sugárkezelt sejteket egy inzerten a besugarazatlan sejtekre helyeztük, így a kezeletlen sejtek 72 órán keresztül együtt nőttek a sugárkezelt sejtekkel. A 72 órás hatóidő után a sejtekből DNS-t izoláltunk, és valós idejű PCR-rel megállapítottuk a CD deléciós mitokondriumok arányát a fibroblaszt tenyészetekben. Összehasonlítottuk a primer és immortalizált sejtkultúrák szomszédsági reakcióit a sugárérzékenység és a dózis függvényében.

Nemzetközi kooperációban, más laborokkal együtt teszteltem a szerotonin transzmitter szintjének hatását a szomszédsági sejteken. A szomszédsági hatást korábban szomszédsági szignált kiváltó F11-hTERT sejteken médiumcserés technikával mértem a különböző mértékű szerotonin tartalmú borjúsavó szérumot tartalmazó médiumokat alkalmazva. A különböző szerotonin tartalmú szérumok a Szerotonin- jelű alacsony, a Szerotonin+ jelű magas, valamint egy nem meghatározott szerotonin tartalmú kondicionált médiumot használtam. 2 Gy sugárkezelést követő 72 óra inkubációs idő letelte után DNS-t izoláltunk, és valós idejű polimeráz láncreakció segítségével mértük a CD mutáns mitokondriumok mennyiségét.

#### 5.5.4. Célgének expressziójának meghatározása Real-time PCR-rel

A vizsgálatban szereplő sejtkultúrák az LM2 egér emlő tumor sejtvonal és génmódosított sejtvonalai, a GDF-15 gént túltermelő (LM2-GDF15) és

géncsendesítéssel létrehozott (LM2-shGF15) változatai voltak. A sejteket a már leírt módon tenyésztettük és röntgenbesugárzással kezeltük, majd 24 óra inkubációs idő után kerültek összegyűjtésre a vizsgálathoz.

A sejtekből RNS-t izoláltunk RNeasy Mini kit (Qiagen) segítségével, a gyártó protokollja szerint. Az RNS tisztítása tisztító oszlopon zajlott, a sejtek lizálása, a proteinek leoldása és a DNS DNáz enzimmel való elemésztése után, a végső eluálás nukleáz-mentes vízben történ. Az RNS mennyiséget spektrofotométerrel mértük meg, majd 1µg-nyi mennyiséget cDNS-sé alakítottunk át a valós idejű polimeráz láncreakcióhoz. A cDNS-t, High Quality cDNS kittel (Applied Biosystem Ltd, Thermo Fisher Scientific Group, Loughborough, UK), a gyártó protokolljának megfelelően készítettük.

A PCR reakció hőprofilja a 6. táblázatban található.

	-	
Felfűtés és Denaturáció	15 perc	95°C
40x Denaturáció	30 mp	95°C
Annelálás DNS szintézis	30 mp	60°C
	30 mp	72°C
Végső extenzió	5 perc	72°C
	x	4°C

6. Táblázat A q PCR reakció hőprofilja a TGF-β család RNS expresszió mérésére

A kandidáns génjeink vizsgálatához tervezett primereket a 7. táblázat tartalmazza. A kandidáns gének a GDF-15 gén, a TGF- $\beta$ 1 és a TGF- $\beta$ 2 mellett feltüntettem az alkalmazott "háztartási" géneket, melyekre a  $\Delta\Delta$ CT analízis során normalizáltuk az expresszió mértékét. A vizsgált gének leírására szolgáló (Egér GDF-15 F+R, Egér TGF- $\beta$ 1 F+R, Egér TGF- $\beta$ 2 F+R) primerek által felszaporított termékek mennyiségét normalizáltuk a nukleáris DNS jellemzésére alkalmazott, állandó mennyiségben jelen levő pol2g génre tervezett (Egér pol2g F+R) és a HGPRT génre tervezett (Egér HGPRT F+R) primerek segítségével felszaporított termékre ( $\Delta$ Ct). Valamint összehasonlítottuk a kezelt mintákban a kezeletlen kontrollhoz képest ( $\Delta\Delta$ Ct), így tudtuk megállapítani a vizsgált gének relatív expresszióját. Majd a két háztartási génre normalizált  $\Delta\Delta$ Ct értéket átlagoltuk. Így megkaptuk azt az eredményt, ahol a kontroll mintánkban a relatív mennyiség értéke mindig 1, és a kezelt mintákban ehhez képest alakul az arány.

Primer neve	Primer szekvencia	Helye a cDNS-en	PCR termék hossza
Egér pol2g F	5'-TGTGGTCACTCAGGTCAACAAGGT- 3'	348-371	100 hn
Egér pol2g R	5'-TGTCTACACGCGTGCCTACAATCT- 3'	524-547	199 bp
Egér HGPRT F	5'- CCTGCTGGATTACATTAAAGCACTG-3'	377-401	251 hn
Egér HGPRT R	5'-GTCAAGGGCATATCCAACAACAAA -3'	705-728	331 bp
Egér GDF-15 F	5'-AACACGCATGCGCAGATCAAAGC- 3'	762-784	125 hr
Egér GDF-15 R	5'-AAGTCTGCAGTGACACACCACTGT- 3'	874-897	135 bp
Egér TGF-β1 F	5'-CCCTATATTTGGAGCCTGGA-3'	1846-1865	57 hn
Egér TGF-β1 R	5'-GTTGGTTGTAGAGGGCAAGG-3'	1884-1903	<i>51</i> Up
Egér TGF-β2 F	5'- AATGTGCAGGATAATTGCTGC -3'	2152-2172	130 hn
Egér TGF-β2 R	5'- CTCCATAGATATGGGCATGC -3'	2263-2282	130 op

## 7. Táblázat A qPCR reakció felhasznált primerek a TGF-β család RNS expresszió mérésére

## 5.6. WST assay

A sejtek növekedésének túlélésének a detektálására használva a módszert, az LM2 tumor sejtvonalat, és annak GDF-15 génmódosított változatait, az LM2-GDF15 túltermelő és LM-shGDF15 csendesített sejtvonalakat használtuk. A WST assay a WST-1 (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene bisulfonate) reagens színreakcióján alapszik.

A sejteket 96 lyukú plate-re osztottuk szét, 1000 sejtet lyukanként, kísérletenként 8 technikai párhuzamost alkalmazva egy sejttípusból. A kísérletet három biológiai párhuzamossal ismételtük meg és értékeltük. A sejtek 100  $\mu$ l 10 %-os borjúsavót tartalmazó DMeM oldatban növekedtek, a mérés kezdetéig, amit különböző időpontokban mértünk. Az inkubációs idő 0, 24, 48, 72, 96 és 120 óra volt. Ezután 10  $\mu$ l WST oldatot adtunk a sejtekhez és 1 óra elteltével lemértük a színváltozás alapján a

mitokondriális dehidrogenázok aktivitását. Az abszorbancia mikroplate-leolvasó segítségével (Biotek, Synergy HT Winooski, VT, USA) lett mérve 450/630 nanométeren.

#### 5.7. Apoptózis mérés

A programozott sejthalál mérésére a különböző sejtvonalakban NucView<sup>TM</sup> 488 MitoView<sup>TM</sup> 633 (Biotium Inc, Hayward, CA, USA) apoptózis kit-et használtunk. A besugárzást az apoptotikus sejtek beazonosításában a kit működése a kaszpáz 3/7 enzim aktivitásán és mitokondriális membránpotenciál változáson alapszik.

A MitoView<sup>TM</sup> 633 egy távoli vörös mitokondriális festék, képes a sejtmembránon átdiffundálni, és a sejtben a mitokondriumban halmozódik fel. A festés mértéke függ a membránpotenciáltól, ezért az apoptotikus sejtek jóval kisebb festődést mutatnak, mint az egészséges sejtek.

A sugárkezelést követően a sejteket 24 órán keresztül inkubáltuk 37 <sup>0</sup>C-on, majd az inkubációs idő leteltével a sejteket a tenyészedényből összegyűjtöttük apoptózis vizsgálathoz, amit a gyártó protokolljának megfelelően végeztünk el. A sejteket centrifugálással kiülepítettük, a felülúszót leöntöttük. 200 μL előmelegített 37 <sup>0</sup>C-os 10 %-os szérumot tartalmazó Dulbecco's Modified Eagle Médiumban újra felkevertük a sejteket. A sejtszuszpenzióhoz 1 μL NucViewTM 488 és 1 μL MitoView<sup>TM</sup> 633 fluoreszcens festéket adtunk. 1 órán keresztül sötétben, szobahőmérsékleten inkubáltuk a sejteket. Ezután ismét lecentrifugáltuk t és 500 μl PBS puffer hozzáadásával lemértük áramlási citométeren. A NucView<sup>TM</sup> festék 488nm-en, a MitoViewTM festék 633 nm-en detektálható.

Az analízis CellQuest Pro<sup>TM</sup> (Becton-Dickinson, Oxford, UK) 3.1 szoftver programmal történt.

#### 5.8. ROS mennyiség mérése

A kísérlet során a felhasznált sejtek az LM2 egér tumor, és laborunkban előállított GDF-15 génmódosított sejtvonalai voltak, a túltermelő LM2-GDF15 és a csendesített LM2-shGDF15 sejtvonal volt. A reaktív oxigén gyökök mérésére CellROX® Oxidative Stress Reagenst (Life Technologies, Grand Island, NY, USA) használtunk. Ez a fluoreszcens próba az élő sejtekben található ROS mérésére alkalmas, fluoriméterrel,

vagy áramlási citométerrel. A CellROX Oxidative Stress kit mérés egy színreakción alapszik, mely során a sejtekben képződő reaktív oxigén gyökök mennyisége mérhető.

A sejteket konfluens tenyészet eléréséig megfelelő antibiotikumot tartalmazó médiumon növesztettük, majd 96 lyukú sejttenyésztő edényre osztottuk őket. Hagyományos tripszin-EDTA kezeléssel leválasztottuk őket a tenyésztőedényről, az élő sejteket fénymikroszkóp alatt Bürker-kamrában megszámoltuk, és 3000 sejtet 100 µl 10%-os borjúsavót tartalmazó DMeM médiumban kiosztottunk.

A sejteket sugárkezeltük, 0 és 6 Gy-el, majd inkubáltuk 37 °C-on. A sejtekhez hozzáadtuk az 5 μM mennyiségű CellROX® Deep Red Reagenst. A sejteket 30 percig 37 fokon inkubáltuk, PBS pufferrel megmostuk, majd fluoriméteren, plate-readerrel (Biotek, Synergy HT Winooski, CA, USA) detektáltuk a termelődő ROS mennyiségét 30 perccel és 24 órával kezelés után.

### 5.9. TGF- $\beta$ 1 ELISA assay

A TGF-β1 ELISA mérés az LM2 és módosított sejtvonalainak felülúszójából mérve TGF-β1 Mouse ELISA kittel (R&D Systems, Abingdon, UK), a gyártó protokollja alapján történt. A sejteket a kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció vizsgálathoz használtuk, róluk a kezelt médiumot 24-48-72 órával sugárkezelés után gyűjtöttük. A sejtek kezelését a real-time PCR mérés leírásánál részleteztem.

## 5.10. Eredmények kiértékelése, statisztikai analízis

A kísérletek során kapott eredmények minimum három mérés átlagát és az átlaghoz számított standard hibát (SEM) jelölik. Az eredményeket egy-utas ANOVA varianciaanalízissel értékeltük, a többszörös összehasonlítás Bonferroni, illetve Dunett korrekcióval történt Graphpad Prism 5.0. (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) software-rel történt. A dózisfüggés vizsgálatokra két-utas ANOVA variancia-analízist alkalmaztunk. Szignifikáns eltérésnek a P <0,05 értékeket fogadtuk el.

# 6. Eredmények

## 6.1. Humán fibroblasztokon végzett vizsgálatok

## 6.1.1. In vitro sugárérzékenységi vizsgálatok

A sugárérzékenység megállapítására a primer sejtvonalakban és az immortalizált sejtvonalakban a 2 Gy sugárkezelés hatására túlélő frakció (SF2) assay szolgált, amely a kontroll és kezelt sejtek kolónia assay-el való vizsgálatából adódott. Az eredményeket, mely alapján a primer és immortalizált sejteket kiválasztottuk a további vizsgálatokhoz, a 8. táblázat tartalmazza. Normál illetve rezisztens sugárérzékenységű sejtvonalnak fogadtuk el ar egyszeri 2 Gy sugárkezelés után 0,3 feletti SF2 értékkel rendelkező sejtvonalakat. Sugárérzékenynek tekintettük a nemzetközi standardok alapján a 0,2 alatti SF2 értékkel rendelkező sejtvonalakat. Az eredmények alapján normál, vagy rezisztens sejtvonalnak a primer CR2 és F11-hTERT sejtvonal bizonyult, míg szenzitívnek a primer BS2 és az immortalizált S1-hTERT. A további kísérletekhez ezek a sejtvonalak lettek kiválasztva.

Sejtvonal neve	SF2	Sugárérzékenység
CR2 primer	0,32±0,049	normál/rezisztens
BS2 primer	0,11±0,01	érzékeny
F11-hTERT immortalizált	0,391±0,042	normál/rezisztens
S1-hTERT immortalizált	0,179±0,037	érzékeny

8. Táblázat A kiválasztott fibroblaszt sejtvonalak sugárérzékenysége

## 6.1.2. Mitokondriális "Common" deléció (CD) kimutatásának optimalizálása

Vizsgálataink tárgya két sugárérzékeny (BS2, S1-hTERT) és két normál érzékenységű (CR2, F11-hTERT) sejtvonal volt. A direkt és szomszédsági hatás-vizsgálatokhoz primer és immortalizált sejtkultúrát egyaránt használtunk, kizárva annak a lehetőségét, hogy a génmódosítás befolyásolja a sejtek esetleges túlélését, illetve a mitokondriális DNS károsodásának mértékét.

#### DOI:10.14753/SE.2016.1871

A szemi-kvantitatív PCR reakció során kimutattuk, hogy a deléciós mutáns előfordult a kontroll besugarazatlan csoportban is, ez azonban megfelel az irodalmi adatoknak, mert a deléció maga spontán is bekövetkezhet, illetve nő az előfordulási gyakorisága a korral. Bár az amplifikációjának mértéke alacsonyabb volt a kontrollban, mint a sugárkezelt csoportban, nem találtunk olyan sejtvonalat, amiben hiányzott volna. Az ábrán láthatóak a PCR reakciók termékei, a különböző primerekkel, és a nekik megfelelő nagyságú termékekkel (**6. ábra**).



**6. ábra A humán mitokondriális "common deléció" kimutatásához használt primerek termékei agaróz gélen 100bp-os DNS létra mellett.** A baloldalon látható a CD mutánsok mennyiségének jellemzésére a deléció két oldalára tervezett primerpárokkal amplifikált 262 és 373 bázispár nagyságú termék (Δ mtDNS). Jobb oldalon a vad típus (WT mtDNS) primerpár 141, a teljes mitokondriális DNS mennyiségének jellemzésére tervezett (totál mtDNS) primerpár 83 bázispár nagyságrendű termékei látható.

#### 6.1.3. Mitokondriális "Common" deléció mennyiségi analízise

A valós idejű PCR vizsgálatoknál a cél a CD mutánsok követése volt időben, összehasonlítva a sugárérzékeny és normál, vagy sugárrezisztens sejtvonalakat. A hossszú idejű követés a kis és moderált dózisok késői hatását volt hivatott modellezni, a deléciós mutánsok felhalmozódásának mérésével. Megfigyelhető különbségeket kerestünk kis és moderált dózisnál a fibroblaszt sejtvonalakban. Figyelembe vettük a sejtek sugárérzékenységét is.

Ahogy azt már a módszerek leírásánál említettem, a  $\Delta\Delta$ CT analízis során a "common" deléciós mutánsok leírására szolgáló primerek által felszaporított termékek mennyiségét, mint a vizsgált génszakaszokat normalizáltuk, a teljes mitokondriális DNS mennyisége leíró Tmt mtDNS primerekkel felszaporított, és a nukleáris DNS jellemzésére alkalmazott GAPDH génre (részletesen lásd Módszerek fejezet).

## 6.1.4. A "common deléció" felhalmozódása a sugárérzékenység függvényében

Összehasonlítottuk mind a négy humán fibroblaszt sejtvonalban a deléciós mutánsok mennyiségét sugárkezelés hatására (**7. ábra**).



7. ábra A kvantitatív polimeráz láncreakció során a megállapított deléciós mitokondriumok mennyisége a különböző sugárérzékenységű primer és immortalizált fibroblaszt sejtvonalakban a 2 Gy sugárkezelést követő 7. napon a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva. Az eredmények minimum 3 mérés átlagát, és a standard hibát (SEM) ábrázolják.
\*= P <0,05</p>

#### DOI:10.14753/SE.2016.1871

Hét nappal az egyszeri 2 Gy sugárkezelést követően a sugárérzékeny sejtvonalaknál mind a primer BS2 (2,5±0,24; P=0,014), mind az immortalizált S1-hTERT sejtvonalban (2,03±0,4; P=0,045) magasabbnak bizonyult, mint a rezisztens CR1 (1,51±0,41; P=0,5866) és F11-hTERT (1,71±0,07; P=0,209) sejtvonalban.

Vizsgáltuk a sugárérzékenység szerepét a "common deléciós" mutánsok keletkezésében az immortalizált sugárérzékeny S1-hTERT és rezisztens F11-hTERT sejtvonalban. Összehasonlítottuk a CD deléciós mutánsok akkumulációjának dózisfüggését (**8. ábra**).



8. ábra A sugárérzékeny S1-hTERT és rezisztens F11-hTERT sejtvonalban dózisfüggő "common" deléciós mutáns mitokondriumok előfordulási gyakorisága qPCR-rel mérve a sugárkezelést követő 7. napon a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva. Az ábrán a besugarazatlan kontrollhoz viszonyított relatív CD mennyiség látható emelkedő dózis hatására. Az eredmények minimum három mérés átlagát és a standard hibát (SEM) ábrázolják. (\*=P <0,05; \*\*=P <0,01; \*\*\*=P <0,001).

Az akkumuláció dózisfüggő a sugárérzékeny sejtvonalban (P <0,001). A különböző dózisok hatását összehasonlítva a két sejtvonalban, az érzékeny sejtvonalban nagyobb deléciós mitokondrium akkumuláció volt megfigyelhető mind kis (10 mGy-nél 1,54±0,16 és 50 mGy-nél 1,93±0,32), mind nagy dózisnál (2 Gy-nél 1,62±0,24 és 10 Gy-nél 2,4±0,4). Ez az eltérés kis dózisnál (*P*=0,0037), és moderált dózisnál is szignifikánsnak mutatkozott (2 Gy-nél *P*=0,0069). A rezisztens sejtvonalnál

szignifikáns CD akkumuláció (P=0,0296) csak a legnagyobb 10 Gy (1,63±0,3) dózis alkalmazása esetén volt mérhető.

## 6.1.5. Szomszédsági vizsgálat

A szomszédsági kísérleteknél a CD mennyiségi analízisével Megvizsgáltuk a szomszédsági hatás kapcsolatát a sugárérzékenységgel és a sugárzás dózisával. Összehasonlítottuk a különböző szomszédsági hatás kiváltására alkalmas technikákat. Megfigyeltük a szerotonin szint jelentőségét mutáns mitokondriumok felhalmozódásában, aminek szomszédsági hatásban fontos szerepet tulajdonítanak

# 6.1.5.1. A különböző szomszédsági hatást közvetítő módszerek technikák összehasonlítása

A Bystander technikákat összehasonlítva a nem találtunk szignifikáns eltérést a deléciós mutánsok felhalmozódásában az inzerten direkt besugarazott sejtek mellett "coculture"-ben tartott szomszédjaikban (ByIns) valamint a sugárkezelt donorsejtekről származó kondicionált médium (ByMcs) által kiváltott hatásban (P > 0,05) (**9. ábra**).



**9. ábra CD deléciós mitokondriumok felhalmozódása a szomszédos sejtekben 72 órával a kezelés után qPCR reakcióval mérve.** A szomszédos sejtek sugárkezelést kapott donorsejtek mellett (ByIns), vagy azoktól származó kondicionált médiumon (ByMcs) nőttek. Az eredmények a "common deléciós" mutáns mitokondriumok mennyiségét ábrázolják a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva, minimum három mérés átlagát és a standard hibát (SEM).

# 6.1.5.2. A sejtvonalak sugárérzékenységének és a donorsejt expozíciójának dózis- hatása a szomszédos sejtekben

A szomszédsági kísérleteknél a különböző sugárérzékenységű sejtvonalakat összehasonlítva megállapítható volt, hogy a CD akkumulációban érvényesülő szomszéd hatás nem minden sejtben jelent meg (**10. ábra**). Szignifikáns eltérés a primer CR1 sejtvonalban kis (P=0,0477), az immortalizált F11-hTERT sejtvonalban 2 Gy hatására (P=0,0019) volt mérhető.



10. ábra Szomszédsági hatás összehasonlítása az egyes sejtvonalakban qPCR reakcióval mérve. A sejteket 0,1 és 2 Gy dózisú sugárexpozíciót elszenvedett donorsejtek médiumával kezeltük. Az ábrán szomszédsági sejtekben mért kezeletlen kontrollhoz viszonyított relatív CD mennyiség látható a primer CR2 sugárrezisztens, a BS2 radioszenzitív, és immortalizált S1-hTERT szenzitív és F11-hTERT rezisztens sejtvonalon. Az eredmények minimum három mérés átlagát és a standard hibát (SEM) ábrázolják. (\*=P < 0,05; \*\*=P < 0,01)

A primer és az immortalizált sejtkultúrákat is vizsgálva alátámasztottuk a korábbi feltevést, hogy a donor sejt sugárérzékenységtől nem függ a szomszédsági hatás

(Morgan 2003), a sejtek egyéni választ adtak. Nem volt szoros összefüggés a szomszédsági hatás és a dózis között sem (**10. ábra**), szignifikáns eltérés a primer sejtvonalban kis (1,863±0,234) (P=0,0477), az immortalizált F11-hTERT sejtvonalban 2 Gy hatására (2,04±0,35) (P=0,0014). A szenzitív sejtvonalban a direkt hatáshoz hasonló, de nem teljesen azonos mértékű a változás, de szignifikáns eltérés nem mutatkozott.

# 6.1.5.3. A direkt sugárkezelt donor szerepének vizsgálata a szomszédsági hatásban

A donor és akceptor sejteket vizsgálva, 2 Gy sugárexpozíció után szomszédsági hatást mutató F11-hTERT (P=0,0014) és korábban szomszédsági hatást nem mutató S1-hTERT (immortalizált sejtvonalakban követtük a "common" deléciós mutánsok előfordulását. Az akceptor sejteket saját, illetve a másik sejtvonalnak a direkt sugárkezelt donorsejtekről származó kondicionált médiumával kezeltük (**11. ábra**).



**11. ábra CD akkumuláció a különböző sugárkezelt donorsejtekről származó kondicionált médiummal kezelt szomszédos sejtekben qPCR reakcióval mérve**. Az eredmények a "common deléciós" mutáns mitokondriumok mennyiségét ábrázolják a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva, minimum három mérés átlagát és a standard hibát (SEM). (\*\*=P <0,01)

Megfigyelhető volt, hogy a szomszédsági hatás csak a donor sejttől függött. A korábban szomszédsági hatást nem mutató S1-hTERT (1,14±0,23) sejtvonalon is tudtunk az F11-hTERT sejtvonaltól származó médiummal szignifikáns (P=0,0069) szomszédsági hatást kiváltani (1,6±0,08). Fordított esetben az S1-hTERT sejtekről származó médiumot az F11-hTERT sejtekre helyezve, a korábban kimutatott szignifikáns szomszédsági hatás (2,04±0,35) nem volt megfigyelhető (P=0,8826), szinte teljesen lecsökkent a károsodott mitokondriumok mértéke (1,16±0,11) a normál szintre.

## 6.1.5.4. A szerotonin hatásának vizsgálata a szomszédos sejtekben

A szerotonin hatásának vizsgálatához az F11-hTERT sejtvonalat használtuk, az átviteli technikák közül a médiumcserés módszert alkalmaztuk. A donor sejteket 2 Gy-el kezeltük, a sejtek különböző szerotonin tartalmú médiumban nőttek. A sejtekre vagy a magas szerotonin szintű (Szerotonin+), vagy az alacsony szerotonin szintű (Szerotonin-) kondicionált médiumát helyeztük át a sugárkezelt sejtekről (**12. ábra**).



12. ábra Szerotonin szint befolyása a szomszédsági hatásra qPCR reakcióval mérve. A sejteket magas (Szerotonin+) és alacsony (Szerotonin-) tartalmazó médiumon tenyésztettük, majd kezeltük a szomszédos sejteket (ByMcs) direkt 2 Gy sugárkezelt sejtekről származó kondicionált médiummal. Az eredmények három mérés átlagát mutatják, a CD mutáns mitokondriumok relatív mennyiségét a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva, és a SEM-t.

A szerotonin tartalom befolyását a szomszédsági hatásra nem figyeltünk meg. A különböző szerotonin tartalmú médiumokon tartott sejtek a szomszédsági hatásban nem mutattak eltérést.

## 6.1.6. Sugárzás indukálta genomiális instabilitás követése

A genomiális instabilitás hosszabb idővel a sugárkezelés után fordul elő a sejtekben, és jellemző rá a mutációk felszaporodása. Ezért a CD mutáció mennyiségi követésével modelleztük a szervezetben előforduló esetleges genomiális instabilitást. A primer sejtkultúrák limitált passzázs-száma miatt a hosszú követéses kísérleteknél az immortalizált sejtekkel dolgoztunk. (S1-hTERT és F11-hTERT).

A hosszú idejű követés során összehasonlítottuk a sugárérzékeny és sugárrezisztens immortalizált sejtvonalban a sugárzás hatására felhalmozódó deléciós mutánsok mennyiségét. Mindkét sejtvonalban detektáltunk a sugárzás hatására "common" deléciós mitokondrium akkumulációt a sugárkezelést követően. Kinetikáját tekintve a károsodás közvetlenül a sugárkezelést követően volt a legmagasabb, kis dózis hatására a rezisztens sejtvonalban a maximális  $1,75\pm0,04$ -szoros, a szenzitív sejtvonalban  $1,87\pm0,5$  akkumuláció volt mérhető (13 és 14. ábra), melyek azonban a rezisztens sejtvonalban a hetedik héten már kiszelektálódtak. Az ábrákon a CD deléciós mutánsok relatív mennyisége látható a teljes mitokondriális és nukleáris DNS mennyiségre normalizálva ( $\Delta$ CT) és a kezelt mintát a kezeletlenhez viszonyítva ( $\Delta$ \DeltaCT) (részletesebben lásd Módszerek fejezet.

A rezisztens sejtvonalban (13. ábra) a hosszú idejű követés statisztikai analízise után megállapítható volt, hogy a kezeletlen kontrollhoz viszonyított az egész időszakra vonatkozó CD akkumulációt nézve kis dózisra nem tapasztaltunk (P=0,6) eltérést, míg moderált 2 Gy dózisú egyszeri besugárzás hatására mérhető volt szignifikáns emelkedés (P=0,0285). A sugárkezelés utáni napokat egyenként vizsgálva a korai időpontokban találtunk eltérést, ami visszatért a normál szintre. Egyszeri 2 Gy dózisú gammasugárzás hatására az F11-hTERT sejtvonalban korai időpontban a legnagyobb felhalmozódás 1,88±0,09.



**13. ábra CD deléciós mitokondriumok hosszú idejű követése a sugárrezisztens F11hTERT sejtvonalban qPCR reakcióval mérve**. Az ábra CD deléciós mutánsok relatív mennyiségét mutatja a kezelt mintát a kezeletlenhez viszonyítva. Az eredmények minimum három mérés átlagát és a standard hibát (SEM) ábrázolják. (\*=p<0,05, \*\*=p<0,01)

Az érzékeny S1-hTERT sejtvonalban, ahol a korai emelkedés a 14. napon érte el 2 Gy hatására a maximális mennyiséget, a CD deléciós mitokondriumok aránya 2,4±0,3 volt. A felhalmozódás dózisfüggőnek mutatkozott, a 2 Gy károsító hatása több deléciós mitokondriumot eredményezett, de mindkét sejtvonalban volt emelkedés a kis dózis hatására is (14. ábra). Szignifikáns eltérést tapasztaltunk a kezeletlen kontrollhoz viszonyított általános CD akkumulációt nézve kis (P=0,0345) és moderált dózis (P < 0,001) hatására a sugárérzékeny S1-hTERT sejtvonalban. A hetedik hét után egy ismételt emelkedést lehetett tapasztalni a deléciós mitokondriumok mennyiségében (1,8±0,33), ami a 70. nap eltelte után sem tért vissza a kontroll szintjére, még mindig, 24%-os emelkedés volt tapasztalható (1,24±0,1).



14. ábra Hosszú idejű követés a sugárérzékeny S1-hTERT sejtvonalban qPCR reakcióval mérve. Az eredmények a CD deléciós mutánsok relatív mennyiségét mutatják a teljes mitokondrium mennyiségre normalizálva ( $\Delta$ CT) és a kezelt mintát a kezeletlenhez viszonyítva ( $\Delta$ \DeltaCT). Az eredmények minimum három mérés átlagát és a standard hibát (SEM) ábrázolják. (\*=p <0,05;\*\*=p <0,01)
### 6.2. Vizsgálatok tumorsejt vonalakon

### 6.2.1. Az LM2 modell

A módosítatlan LM2 sejtvonalban kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakcióval (qPCR) vizsgáltuk a GDF-15 gén sugárkezelésre adott RNS expresszió változását. Eredményeink alapján megállapítottuk, hogy kezelés után 24 órával a GDF-15 expresszió dózisfüggően (P < 0,001) nőtt (**15. ábra**) a kezeletlen kontrollhoz (0 Gy) képest. A dózisok hatását egyenként elemezve megállapítható, hogy 2 Gy sugárkezelés hatására 1,72±0,23, 4 Gy hatására 2,14±0,29 és 6 Gy hatására 3,64±0,38-szor, szignifikánsan (P < 0,01) magasabb relatív GDF-15 expresszió volt mérhető az LM2 sejtvonalban a sugárkezelést nem kapott mintákhoz képest. Az eredmények a GDF-15 relatív expresszióját mutatják pol2 és HGPRT sugárkezelésre normális körülmények között nem változó "háztartási" génekre normalizálva ( $\Delta$ CT) és a kezelt mintát a kezeletlenhez (LM2 0Gy) viszonyítva ( $\Delta$ \DeltaCT).



15. ábra GDF-15 expresszió LM2 tumor sejtvonalban a kezeletlen kontrollhoz (0 Gy) viszonyítva, 24 órával besugárzás után qPCR reakcióval mérve. Az eredmények a GDF-15 relatív expresszióját mutatják. Az eredmények minimum három mérés átlagát és a standard hibát (SEM) ábrázolják. (\*\*=p <0,01)

Kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakcióval (qPCR) vizsgáltuk a módosítatlan LM2 sejtvonalhoz képest a módosított sejtvonalak GDF-15 génexpresszióját. Génmódosítás hatására a GDF-15 gént konstitutívan túltermelő LM2-GDF15 sejtvonalban több mint 10-szeres GDF-15 génexpresszió volt mérhető az LM2 eredeti sejtvonalhoz képest (11,51±1,45) (P < 0,01). A géncsendesített sejtvonalban a GDF-15 expressziót közel 80 %-ban (0,26±0,06) gátoltuk (P < 0,05). (16. ábra).



16. ábra GDF-15 relatív expresszió a túltermelő (LM2-GDF15) és csendesített (LM2shGDF15) sejtvonalban az LM2 sejtvonalhoz viszonyítva qPCR reakcióval mérve. Az eredmények a GDF-15 relatív expresszióját mutatják Az eredmények minimum három mérés átlagát és a standard hibát (SEM) ábrázolják. (\*=P <0,05; \*\*=P <0,01)

## 6.2.2. Sugárválaszt befolyásoló molekuláris hatások vizsgálata emlő tumor modellben

### 6.2.2.1. GDF-15 hatása a sugárérzékenységre

A GDF-15 hatását a sugárérzékenységre kolónia teszttel vizsgáltuk (**17. ábra**). A sugárzás hatására dózisfüggően csökkent a túlélés, de a hatásban eltérést mutatták a sejtvonalak, a GDF-15 szint eltérően befolyásolta a sugárkezelésre adott választ.



**17. ábra Kolónia assay az LM2 módosított sejtvonalaiban a sugárzást követő 7. napon.** A számított túlélés kezeletlen kontrollhoz képest, szemi-logaritmikus skálán ábrázolva. Az eredmények minimum három mérés átlagát és a standard hibát (SEM) ábrázolják. (\*\*=P <0,01)

Az eredmények alapján megállapítottuk, hogy GDF-15 túltermelő sejtvonalban magasabb volt a túlélés mind a moderált 2 Gy (0,63±0,04), mind a nagy 4 Gy (0,21±0,05) dózisú sugárexpozíció hatására normál LM2 sejtvonalhoz képest (0,49±0,026 2 Gy-nél és 0,13±0,3 4 Gy-nél). Az LM2-shGDF15 csendesített sejtvonalban csökkent a túlélés (2 Gy-nél 0,3±0,046 és 4 Gy-nél 0,03±0,008). A csendesített sejtvonal túlélését tekintve már 2 Gy hatására is szignifikánsan több sejt pusztult el (P=0,004).

### 6.2.2.2. GDF-15 hatása a proliferációra

A WST assay során a mitokondriális enzimaktivitás mérésével a sejtvonalak életképességét vizsgáltuk 5 napon keresztül követve a kultúrákat. Megállapítottuk, hogy a GDF-15 gén bevitele megnövelte a sejtek osztódó képességét, míg a géncsendesítés csökkentette életképességüket és növekedési hajlandóságukat az eredeti sejtvonalhoz képest. Szignifikáns eltérés mutatkozott a kiindulási sejtvonalhoz képest mind a csendesített LM2-shGDF15 (P=0,02), mind a túltermelő LM2-GDF15 sejtvonalban (P < 0,001). A **18. ábrán** látható, hogy az idő elteltével, hogyan válik el a sejtvonalak osztódó képessége, és hogyan nő meredeken a gént túltermelő LM2-GDF15 sejtvonalban (a 0. napon 0,1±0,008 és a 6. napon 2,4±0,41). A csendesített LM2-shGDF15 sejtvonalban az osztódó képesség az idő elteltével kis mértékben változik, majd az idő előre haladtával lecsökken (a 0. napon 0,08±0,013 és a 6. napon 0,19±0,023) az eredeti sejtvonalhoz képest (a 0.napon 0,04±0,005 és a 6. napon 0,9±0,059).



18. ábra Sejtszám változás a különböző sejtvonalakban WST assay-el mérve a módosítatlan LM2, a csendesített LM2-shGDF15 és a túltermelő LM2-GDF15 sejtvonalban. Az eredmények minimum három mérés átlagát és a standard hibát (SEM) ábrázolják. (\*=P < 0.05;\*\*\*=P < 0.001)

### 6.2.2.3. TGF-β1 gén expresszió változása sugárkezelés hatására

A módosítatlan LM2 sejtvonalban kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakcióval (qPCR) vizsgáltuk a TGF- $\beta$ 1 gén sugárkezelésre adott RNS expresszió változását a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva. Vizsgálataink során arra voltunk kíváncsiak, hogy milyen hatással van a sugárkezelés, illetve a GDF-15 géntermelés változása a családba tartozó más citokinek expressziójára, illetve hogy a GDF-15 szint változása hogyan befolyásolja a sugárzás-indukált TGF- $\beta$ 1 expressziót. Az LM2 tumorsejtvonalban sugárkezelés hatására, 24 óra elteltével a TGF- $\beta$ 1 relatív expressziója a kezeletlen kontrollhoz képest dózisfüggő (P < 0,01) emelkedést mutatott. A dózisokat egyenként vizsgálva szignifikánsan változott a TGF- $\beta$ 1 expresszió mértéke a 4 Gy (P=0,0026) hatására. A relatív expresszió mértéke a kezeletlen kontrollhoz képest, amely mindig 1,59±0,122 nagy dózisú 4 Gy és 1,61±0,065 6 Gy egyszeri sugárkezelés hatására. (19. ábra)



19. ábra A TGF- $\beta$ 1 génexpresszió szint változása emelkedő dózisú sugárkezelés hatására qPCR reakcióval mérve. A méréseket 24h-val besugárzás után végeztük, LM2 emlő tumor sejtvonalon. Az eredmények a TGF- $\beta$ 1 relatív expresszióját mutatják kezeletlen kontrollhoz viszonyítva. Az eredmények minimum három mérés átlagát és a standard hibát (SEM) ábrázolják. (\*=P <0.05;\*\*=P <0.01)

### 6.2.2.4. A GDF-15 hatása a TGF-β1 szintre

A GDF-15 termeléstől függő TGF- $\beta$ 1 expressziót hasonlítottuk össze az LM2 sejtvonalhoz képest kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakcióval (qPCR). A GDF-15-öt túltermelő LM2-GDF15 sejtkultúrában csökkent a TGF- $\beta$ 1 expressziója (0,699±0,09). A géncsendesítésre enyhe emelkedés volt tapasztalható (1,251±0,1) (**20. ábra A).** 

Az ELISA kísérlet során szignifikáns (P=0,0136) csökkenést mértünk a GDF-15 gént konstitutívan túltermelő LM2 GDF-15 sejtvonal felülúszójában. A csendesített LM2-shGDF15 sejtvonalban nem találtunk változást a TGF- $\beta$ 1 termelésben a csendesítés hatására (**20. ábra B**).



20. ábra LM2 kezeletlen kontrollhoz viszonyított TGF- $\beta$ 1 relatív expresszió és citokin szint a GDF-15-öt különböző mértékben expresszáló sejtvonalakban. A. A qPCR reakcióval mért relatív RNS expresszió látható LM2 kezeletlen kontrollhoz (0 Gy) viszonyítva, a túltermelő LM2- GDF15 és csendesített LM2-shGDF sejtvonalban. Az eredmények minimum három mérés átlagát és a standard hibát (SEM) ábrázolják. (\*=p<0,05). B. ELISA assay-el mért TGF- $\beta$ 1 citokin szint az LM2, a túltermelő LM2-GDF15 és a csendesített LM2-shGDF15 és a csendesített LM2-sh

### 6.2.2.5. A GDF-15 hatása a sugárzás indukálta TGF-β1 expresszióra

Moderált 2 Gy sugárkezelés hatását vizsgáltuk az egyes sejtvonalakban kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakcióval (qPCR). A gént különböző módon expresszáló sejtvonalakat saját kezeletlen kontrolljukhoz képest nézve hasonló volt a relatív expresszió. A gént különböző módon expresszáló sejtvonalakat saját kezeletlen kontrolljukhoz képest nézve hasonló volt a relatív expresszió. Megfigyeltünk egy korai



és enyhe génexpressziós emelkedést, de a változások nem bizonyultak szignifikáns különbségnek. (21. ábra).

21. ábra GDF-15 hatása a sugárzás indukálta TGF-β1 expresszióra saját kezeletlen kontrollhoz viszonyítva 2 Gy sugárkezelés után LM2, túltermelő LM2-GDF15 és csendesített LM2-shGDF15 sejtekben mérve qPCR-rel. Az eredmények minimum három mérés átlagát és a standard hibát (SEM) ábrázolják.

### 6.2.2.6. A sugárkezelés hatása a TGF-β2 génexpresszióra

Kutatásunk során megvizsgáltuk a család másik tagjának, a TGF-β2-nek az expressziós változásait is kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakcióval (qPCR). A változások követése kiterjedt az ionizáló sugárzás indukálta TGF-β2 génexpresszióra, illetve a GDF-15 szintfüggő expresszióra. Az expressziós változások követésével a módosított sejtvonalakban megfigyelhettük, milyen hatással van GDF-15 szint a sugárzás-indukált TGFb2 kifejeződésre. A kezelést követő 24 óra múlva ennek a génnek az expressziója esetében nem tudtunk indukciót megállapítani. (**22. ábra**).



**22.** ábra TGF-β2 relatív expresszió kezeletlen kontrollhoz (0 Gy) képest LM2 egér tumor sejtvonalban a sugárkezelés után 24 órával qPCR reakcióval mérve. Az eredmények minimum három mérés átlagát és a sztenderd hibát (SEM) ábrázolják.

### 6.2.2.7. A GDF-15 hatása a TGF-β2 génexpresszióra

Az qPCR-rel vizsgált relatív RNS expresszió mértéke szignifikánsan változott, mikor a sejtvonalunkat módosítottuk. A GDF-15 túltermelő LM2-GDF15 sejtvonalban egy

jelentős TGF $\beta$ 2 expresszió gátlást értünk el azáltal, hogy a GDF-15 termelését több mint 10-szeresére növeltük (0,24±0,049). A GDF15- túltermelő LM2-GDF15 sejtvonalban az expresszió lecsökkent az módosítatlan sejtvonalhoz képest (*P*=0,017). Az inkubációs idő hosszabbítása nem változtatott ezen, 48 óránál a túltermelő sejtben csökkenés, míg a csendesített sejtvonalban enyhe mértékű növekedést tapasztaltunk, de ez nem bizonyult szignifikánsnak. (**23. ábra**).



23. ábra TGF- $\beta$  relatív expresszió génmódosítás hatására LM2 kezeletlen mintához viszonyítva, qPCR reakcióval mérve. Az ábrán a módosítatlan LM2-höz viszonyított relatív expresszió látható a GDF15- túltermelő LM2-GDF15 sejtvonalban és a csendesített sejtvonalban (LM2-shGDF) 24-48-72 órával kiosztást követően. Az eredmények minimum három mérés átlagát és a standard hibát (SEM) ábrázolják. (\*=P <0,05; \*\*=P <0,01)

### 6.2.2.8. A GDF-15 hatása a sugárzás indukálta TGF-β2 génexpresszióra

A sugárkezelésre adott válaszon is módosított, a GDF-15 génexpresszió változása. A besugárzást követő 24 óra múlva az LM2-GDF15-ben saját kezeletlen kontrolljához képest csökkent (P=0,0202) a TGF- $\beta$ 2 termelődés ( $0,49\pm0,072$ ), míg a csendesített sejtvonalban egy tendenciózus (P=0,08) emelkedést tapasztaltunk ( $1,45\pm0,18$ ) (**24. ábra**).

Az inkubációs idő hosszabbítása nem változtatott a sugárválaszon, a 0 Gy - es besugarazatlan kontrollhoz képest a túltermelő sejtben egy enyhe csökkenés, míg a csendesített sejtvonalban hasonló mértékű növekedést tapasztaltunk, de ez nem bizonyult szignifikánsnak (24. ábra).





# 6.2.2.9. A sugárkezelés hatása a mitokondriális "common" deléció felhalmozódására

A korábban a fibroblaszt tenyészeteken végzett vizsgálatok során megállapítottuk, hogy a mitokondriális "common" deléció mérése elég érzékeny, és ezért alkalmas a sugárzás következtében fellépő oxidatív stressz reakciók által kiváltott DNS károsodások mérésére. Korábbi irodalmi adatok alapján ismert (Zhang és mtsai 2013a), hogy az egér mitokondriális DNS-én ugyanúgy előfordul a humánhoz hasonló "common" deléciós mutáció, így a korábbi humán sejteken végzett kísérleteinket optimalizáltuk egér tumor sejtekre. Az ábrák a CD deléciós mutánsok relatív mennyiségét mutatják a teljes mitokondrium mennyiségre normalizálva ( $\Delta$ CT) és a kezelt mintát a kezeletlenhez viszonyítva ( $\Delta$ \DeltaCT).

Az emelkedő dózis hatására kialakuló mutációk vizsgálatát LM2 sejtvonalon végeztük valós idejű polimeráz láncreakcióval (**25. ábra**). Szignifikáns dózisfüggő növekedést (P < 0,001) tapasztaltunk a deléciós mutánsok előfordulásában, ahogy a sugárzás dózisa emelkedett. A dózisokat egyenként vizsgálva, szignifikáns eltérést (P=0,008) 6 Gy esetében mértünk (5,641±1,406), ekkor a CD mutáns mitokondriumok mennyisége több mint ötször nagyobb volt, mint a nem sugárkezelt kontrollban.



**25. ábra Deléciós mitokondriumok aránya LM2 módosítatlan egér emlő tumor sejtvonalban a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva, qPCR reakcióval mérve.** Az eredmények minimum három mérés átlagát és a standard hibát (SEM) ábrázolják. (\*\*=P <0,01)

### 6.2.2.10. GDF-15 hatása a mitokondriális deléció felhalmozódására

Megvizsgáltuk, hogyan befolyásolta a GDF-15 szint és a sugárzás a deléció előfordulási gyakoriságát (**26. ábra**). A GDF-15 túltermelő sejtvonalban nagymértékben lecsökkent (P=0,03) a károsodás (0,346±0,0088). Ezzel szemben a csendesített sejtvonalban szignifikánsan nőtt a mutáció előfordulása az eredeti LM2 sejtvonalhoz képest (P=0,01).



26. ábra a deléciós mitokondriumok arányának változása a GDF-15 génmódosítás hatására LM2-GDF15 túltermelő és LM2-shGDF15 csendesített sejtvonalban LM2 kontrollhoz képest qPCR reakcióval mérve. A relatív CD felhalmozódása látható LM2 kontrollhoz viszonyítva, a túltermelő és csendesített sejtvonalban. Az eredmények minimum három mérés átlagát és a standard hibát (SEM) ábrázolják. (\*=P <0,05)

## 6.2.2.11. GDF-15 befolyása a sugárkezelés hatására indukálódó mitokondriális deléció felhalmozódásra

A sugárkezelés károsító hatását qPCR-rel vizsgálva az egyes sejtvonalakban (**27. ábra**) megállapítottuk, hogy a GDF-15 gént túltermelő sejtvonalban a nagy dózisú (6 Gy) besugárzás nem okozott szignifikánsan mérhető mitokondriális DNS károsodást (24 óra után 1,01±0,24). Ezzel szemben normál GDF-15 génexpressziójú LM2 vonalban és az shRNS-sel (P=0,0089) csendesített sejtkultúrában is szignifikáns mitokondriális DNS károsító hatása volt a sugárkezelésnek a kezeletlen kontrollhoz képest. Mindkét sejtvonalban korai időpontban hasonlóan változott a deléció előfordulási aránya, az LM2 sejtvonalban 5,641±1,24, a csendesített LM2-shGDF15 sejtvonalban 8,314±2,21. Azonban 72 órával besugárzás után a géncsendesített, ezáltal szenzitívebbé tett sejtvonalban még mindig magas (7,375±1,01) a "common" deléciós mutánsok



mennyisége (P=0,041), mikor az eredeti sejtvonalból már elkezdtek kiszelektálódni a mutáns mitokondriumok (2,77±0,54).

27. ábra A 2 Gy sugárzás mitokondriális DNS károsító hatásának vizsgálata 0 Gy kezeletlen kontrollhoz viszonyítva, qPCR reakcióval mérve módosítatlan LM2, túltermelő LM2-GDF15 és csendesített LM2-shGDF15 sejtekben. Az eredmények minimum három mérés átlagát és a standard hibát (SEM) ábrázolják. (\*=P <0,05,\*\*=P <0,01)

### 6.2.2.12. GDF-15 hatása a sugárzás indukált apoptózisra

NucView<sup>TM</sup> 488 MitoView<sup>TM</sup> 633 apoptózis kittel megállapítottuk, hogy a normál LM2 sejtekben a dózistól függően nő az apoptotikus sejtek aránya. Az apoptózis tendenciózus összefüggést mutat a dózissal (P=0,06). Az LM2 emlő tumor sejtvonal igen rezisztensnek bizonyult, a maximális dózisként alkalmazott 6 Gy besugárzás a kontrollhoz viszonyítva 5,822±0,85%-ról 9,163±0,858 %-ra emelte az apoptotikus sejtek arányát, ami 1,8-szoros növekedést jelent, szignifikáns (P=0,025) eltérést mutat (**28. ábra A**). A különböző GDF-15 termelésű módosított sejtvonalakban (**28. ábra B**) a túltermelő LM2-GDF15 sejtvonal a kiindulási LM2 tumor vonalnál is rezisztensebbnek bizonyult (P>0,05), 6 Gy 1,3 szorosára emelte az apoptotikus sejtek arányát, 4,98±0,7%-ról 6,65±0,89 százalékra. Ezzel ellentétben a gén lecsendesítése érzékenyebbé tette őket a sugárzásra, a LM2-shGDF15 kezeletlen kontroll sejtvonalban található előfordulási arányhoz képest (3,39±0,38) a 6 Gy-es dózis szignifikánsan majdnem háromszorosára (9,7±1,17) emelte az apoptotikus sejtek arányát a kezeletlen kontrollhoz képest (P < 0,001).



**28.** ábra NucView<sup>TM</sup> **488** MitoView<sup>TM</sup> **633** apoptózis kittel mért apoptotikus sejtek százaléka A. Az apoptotikus sejtek százaléka LM2 módosítatlan sejtvonalban emelkedő dózis hatására. B. Az apoptotikus sejtek aránya 6 Gy sugárkezelés hatására a különböző GDF-15 termelésű LM2, a túltermelő LM2-GDF15, a csendesített, LM2-shGDF15 sejtvonalban. Az eredmények minimum három mérés átlagát és a standard hibát (SEM) ábrázolják. (\*=P <0,05; \*\*=P <0,01;\*\*\*=P <0,001)

## 6.2.2.13. GDF-15 hatása az ionizáló sugárzás következtében felszabaduló ROS mennyiségére

CellROX kittel, a reaktív oxigén gyökök mérése során összehasonlítottuk a 6 Gy röntgensugárzás hatására felszabaduló ROS mennyiségét az LM2 tumorsejtvonalban és módosított változataiban. A sejtek alap ROS termelése hasonló mértékű volt. A korai időpontban mindhárom sejtvonalban látható akut reaktív oxigéngyök termelés emelkedés besugárzás hatására. A sugárkezelésre adott korai reakciókat mérve 30 percnél, az oxidatív stresszre adott válasz mindhárom sejtvonalban hasonló mértékű ROS felszabadulást eredményezett, de csak a csendesített sejtvonalban bizonyult szignifikánsnak (P=0,0074) a kezeletlen kontrollhoz hasonlított emelkedés. Az LM2 sejtvonalban a kontrollhoz képest 47,11±11%, a túltermelő LM2-GDF15 sejtvonalban 31,6±5,79, a csendesített sejtvonalban 41,13±3,53%-os emelkedést tapasztaltunk a ROS termelésben a kezeletlen kontrollhoz képest (**29. ábra**).



29. ábra CellROX kittel mért ROS termelődés LM2, módosított LM2-GDF15 túltermelő és LM2-shGDF15 csendesített sejtvonalban 30 perccel 6 Gy sugárkezelés után. Az eredmények minimum három mérés átlagát és a standard hibát (SEM) ábrázolják. (\*\*=P <0,01)

A kezelés után 24 óra elteltével a sejtkultúrákban már eltérő mennyiségű ROS volt mérhető. A GDF-15 hiánya az LM2-shGDF15 sejtvonalban azt eredményezte, hogy 24 h elteltével csak ebben a sejtvonalban még mindig tendenciózus (P=0,0582) ROS emelkedés volt tapasztalható a kontrollhoz képest (31,12±1,13%), míg a túltermelő LM2-GDF15 és a normál LM2 sejtvonalban visszatért a ROS szint az eredeti állapotra. (**30. ábra**)



**30. ábra CellROX kittel mért ROS termelődés LM2, módosított LM2-GDF15 túltermelő és LM2-shGDF15 csendesített sejtvonalban 24 órával sugárkezelés után.** Az eredmények minimum három mérés átlagát és a standard hibát (SEM) ábrázolják.

## 7. Megbeszélés

Munkám során két modellrendszerben, normál fibroblaszt és emlőtumor sejtvonalban kutattam a sugárzás okozta molekuláris változásokat.

A humán fibroblaszt vizsgálatok a sugárzás direkt és nem-célzott hatásainak tanulmányozására irányultak, melyet egy új vizsgálati módszerrel, a mitokondriális "Common" deléció (CD) mennyiségi analízisével vizsgáltam.

A CD, mint új sugársérülési biomarker alkalmazása során régóta ismert irodalmi adatokra is támaszkodhattunk. Köztudott, hogy a sugárzás sejtkárosító hatásában nem csak a legfőbb célpont, a nukleáris DNS molekula, hanem egyéb sejtalkotók is érintettek lehetnek, ilyen például a mitokondrium, a citoszkeletális rendszer, vagy az endoplazmatikus retikulum (Somosy, 2000). Ezek közül pont a mitokondriumok olyan dinamikusan változó intracelluláris organellumok, amelyeknek központi szerepük van a sejt oxidatív metabolizmusában és az apoptózisban, ezért nagy jelentőségük van a sugárexpozíciót követő sérüléseiknek (Modica-Napolitano és Singh 2002). A sugárkezelés oxidatív stressz körülményeket hoz létre a sejtben, aminek következtében károsodások jelennek meg a mitokondriális DNS-en (Vanassi és mtsai 1999) és mutációk keletkeznek (Schapira és Cooper, 1992). A mitokondriális DNS sérülések az oxidatív foszforilációban résztvevő enzimek aktivitásának csökkenéséhez vezethetnek, ami reaktív oxigéngyökök felszabadulását eredményezi (Yakes és van Houten, 1997). A károsodott mitokondriumok eltávolításának hiányában a sérült mitokondriumok jelentős mennyiségű szabadgyököt termelnek és önfenntartó oxidatív stressz állapotot hozhatnak létre a sejtben (Chen és mtsai 2007). A reaktív oxigéngyök felszabadulás következtében pedig leállhat a sejt növekedése, szeneszcens állapotba kerülhet (Chen és Ames, 1994), vagy az apoptotikus útvonalak elindítását eredményezi (Russo és mtsai 2005). Ezeknek az adatoknak a fényében az általunk vizsgált mitokondriális "Common" deléció vizsgálatával már korai időpontban is felismerhetjük a sugárkezelés károsító hatásának következményeit, a sejten belüli stressz reakciók beindulását, ami a sejt pusztulásához is vezethet, és azonosíthatjuk vele a sugárkárosodást elszenvedett sejteket.

Vizsgálatainkat normál szöveti fibroblaszt sejtvonalakon végeztük, mivel a normál szöveteket ért kis és közepes dózisok hatása fontos kérdés volt a kutatásunk során,

hiszen mind a sugárterápia során, mind az orvos-diagnosztikai eljárások során éri expozíció a normál nem-tumoros szöveteket is.

A kis dózisok alkalmazásának direkt következményeinek kimutatása mellett a kísérleti célok közé tartozott a normál szövetekben okozott úgynevezett nem-célzott (NTE) hatások kimutatására alkalmas biomarker keresése is. Ezek az előre nem prediktálható hatások, mint a genomiális instabilitás, a szomszédsági és az abszkopális hatás (Iyishima és mtsai; Jella és mtsai 2012) az utóbbi években a sugárbiológiai kutatások fókuszában állnak (Morgan és Sowa, 2015). A kialakuló változások az expozíció helyétől térben és időben is elválasztódnak (Morgan 2003). Az egyes sejtek, szövetek egyéni válaszreakciókat adnak (Kadhim és mtsai 2003), megnehezítve a károsodás azonosítását. Nem követik a lineáris küszöb nélküli dózis modellt, sőt, jelentőségüket alacsony dózisú sugárexpozícióknál tartják fontosnak (Kadhim és mtsai 2013), ezért humán sejtkultúrákon végzett vizsgálatainkban a kis és közepes dózisok nem célzott hatásainak vizsgálatára helyeztük a hangsúlyt. Figyelembe vettük, hogy az egyes sejtvonalak sugárérzékenysége mennyiben befolyásolja a sugárzás indukálta deléciós Közvetlenül sugárkezelést követően, mutánsok előfordulását. az érzékeny sejtvonalakban szignifikáns emelkedést tapasztaltunk, alacsony dózisok alkalmazása mellett is. A "Common" deléciós mutánsok számának emelkedése és a sugárérzékenység összefüggött egymással, ami megfelelt a korábbi irodalmi adatoknak (Kubota és mtsai 1997), és kísérleteinkben nem csak nagy dózisok, hanem alacsony dózisú γ-sugárexpozíció hatására is megnyilvánult.

A mitokondriális "common" deléció mérésénél megállapítottuk, hogy alkalmas a sugárzás nem célzott és direkt károsító hatásának kimutatására is. Direkt sugárkezelt fibroblasztokban korábban már mértek ionizáló (Prithivirajsingh és mtsai 2004) és ultraibolya sugárzás hatására is (Kaneko és mtsai 2012) bekövetkező "Common" deléciós mitokondrium-szám emelkedést, de csak nagy dózisok alkalmazása mellett. A mi rendszerünkben alacsony (0,1 Gy) és moderált (2 Gy) gamma-sugárzás hatására is detektáltuk a deléciós mutációk számának emelkedését és normál szöveti környezetben detektáltuk vele a kis dózisú gamma sugárzás károsító hatását.

A sugárkezelés direkt következményei mellett a nem-célzott hatásokat is ki tudtunk mutatni ezzel a módszerrel. A vizsgálatunk során négy különböző genetikai hátterű

fibroblaszt sejtkultúrában mértük a feltételezett egyéni különbségeket (Kadhim és mtsai 1998) a sugárzás indukálta deléciós mutáns mitokondriumok előfordulásában.

A nem célzott hatások közül az utódgenerációkban felhalmozódó mutációk előfordulását immortalizált sejtvonalakon néztük. Követtük a sejtvonalakban a sugárzás következtében felhalmozódó CD mutánsok mennyiségét, és hosszú idővel a sugárkezelést követően sikerült egy második felszaporodást kimutatni. Ennek az emelkedésnek az oka lehet a genomiális instabilitás, vagyis az, hogy az utódokban akkumulálódnak a mutációk és további mutációkat gerjesztenek, ami végül a sejt halálához vezethet (Little és mtsai 1997). A mi vizsgálataink során ezt a késői genomiális instabilitást csak a sugárérzékeny sejtvonalban tudtuk megfigyelni. Ez a különbség a sejtek sugárérzékenységéből adódhat. Zhang és munkatársai egy tanulmányukban a sugárkezelésre különböző módon reagáló érzékeny és rezisztens egértörzseket megfigyelve azt találták, hogy a szenzitív törzs érzékenyebben reagált a sugárzás következtében fellépő mitokondriális változásokra. Ezek jellemzően patogén és apoptotikus folyamatokra utaló jelek voltak, mint a kálcium beáramlás után nehezen helyreálló normális működés a mitokondriumban, és a mitokondriális permeabilitási tranzíciós pórusok nagyobb mértékű nyitódása (Zhang és mtsai 2013b). Ezek a megfigyelések is alátámasztják, hogy a mitokondriális változások követése elég szenzitív módszer lehet a sugárkezelés hatásainak vizsgálatára.

Nem vizsgáltuk a genomiális instabilitás kialakulásának okát, de arról több elmélet is létezik, melyek illenek a megfigyeléseinkhez. Azzam és munkatársai szerint a károsodást kiváltó szignál a tenyészetben tartott fibroblasztok érintkezésénél, a sejt-sejt kapcsolat létrejöttével átadódhat (Azzam és mtsai 2002). Barcellos-Hoff és munkatársai szerint a sugárzás, mint egy nem specifikus stressz faktor olyan citokineket szabadít fel, mint a sejtciklusban, sejthalálban szerepet játszó TGF-β1, ezáltal megváltoztatja, és az utódokban is kialakítja a károsodást (Barceloss-Hoff és mtsai 2001). Raynaud és munkatársai szerint a károsító folyamat epigenetikusan is kódolt és átadódhat az utódgenerációkra (Raynaud és mtsai 2000). Yakes és van Houten tanulmányukban leírják, hogy a károsodást kiválthatják reaktív oxigén gyökök (ROS), és a sugárzás következtében sérült mitokondriumok alakulnak ki, melyek fennmaradhatnak és felszaporodhatnak a sejtekben, tovább csökkentve annak túlélési valószínűségét (Yakes és van Houten, 1997). A mi rendszerünkben a fibroblasztjainkat hTERT génnel

immortalizáltuk, ezért a telomerek rövidülése nem okozhatta a késői genomiális instabilitást, a többi kiváltó ok azonban nem zárható ki. Tumor sejteken végzett kísérleteink is azt mutatják, hogy a sugárérzékenységgel összefügg a mitokondriális deléciós mutánsok számának emelkedése, a ROS molekulák és különböző a sugárválaszban szerepet játszó citokinek termelődése, ami alátámasztja Barcellos-Hoff, és Yakes eredményeit is. Ezek azonban nem zárják ki azt, hogy a genomiális instabilitás kialakulásáért felelős, irodalmi adatokkal alátámasztott mechanizmusok bármelyike végbemehet a sejtben és okozhatja a sejtekben a genomiális instabilitást.

A normál sejtvonalakban létrejövő nem-célzott hatások másik kísérleti célpontja a direkt sugárkezelést nem kapott, de azokkal közvetett kapcsolatban álló sejtekben létrejövő károsodás, úgynevezett szomszédsági hatás volt. Belyakov és munkatársai fibroblasztokon végzett megfigyelései alapján ismert, hogy a szomszédsági hatás nem dózisfüggő (Belyakov és mtsai 2001). Howe és munkatársai sugárkezelt betegek vérének vizsgálatával bizonyították, hogy a szomszédsági hatás nem függött a páciens sugárérzékenységétől (Howe és mtsai 2009). Ismert az is, hogy erre a nem célzott hatásra is az egyéni válasz a jellemző (Kadhim és mtsai 2013). Ezeket az irodalmi adatokat alátámasztják a mi kísérleteink is, amelyekben a mitokondriális CD mennyiségének növekedését, mint új sugársérülési markert mutattuk ki a bystander sejtekben. A szomszédsági vizsgálatunk során alkalmaztunk sugárérzékeny és rezisztens fibroblasztokról származó kondicionált médiumokat és megvizsgáltuk, hogyan befolyásolja a károsodás mértékét a dózis, valamint az, hogy milyen kezelt donorsejtről származik az kezeletlen akceptorokra ható médium. Alátámasztottuk a korábban magas dózisú sugárzás hatására mért adatokat (Prithivirajsingh és mtsai 2004), hogy a szomszédsági hatás fibroblaszt sejteken is detektálható a CD mutáns mitokondriumok mennyiségének kimutatásával. A szomszédsági hatást eredményező különböző technikák között nem mértünk szignifikáns különbséget, a sejtek tehát a sugárkezelés után nagyon rövid időn belül a környezetükbe leadják a szignált, bár Mothersill és Seymour még 96 órával a kezelést követően is mért szomszédsági hatást (Mothersill és Seymour 1997).

Amikor a szomszédsági hatást mutató sugárkezelt sejtekről áthelyeztük a szomszédsági hatást nem mutató sejtekre a kezelt médiumot, az eddig nem reaktív sejteknél is mérhető volt CD akkumuláció. Ez az eredmény alátámasztja azt a feltevést, hogy a sugárzás

hatása mindig az adott sejt, illetve közeg állapotára jellemző (Barcellos-Hoff és mtsai 2005).

Eredményeink alapján a sejtek szomszédsági válasza a különböző genetikai háttérrel rendelkező fibroblasztokban individuális eltéréseket mutatott, külső behatás csak akkor változtatta ezt meg, ha a kezelés egy olyan sejt médiuma volt, ami mutatott szomszédsági hatást, de nem befolyásolta azt sem a szerotonin szint, sem a magasabb dózisú sugárkezelés, vagy a sejt sugárérzékenysége.

A szomszédsági hatásmechanizmus hasonlóan összetett, mint az egyéb nem célzott hatások. Kísérleteinkben a médiumcserés technika kizárta, hogy a szomszédsági hatást kiváltó jel a gap junctionokon keresztül adódjon át, mint ahogy azt Azzam és munkatársai 2001-es munkájuk során fibroblaszt sejteken megfigyelték. Azonban ismert, hogy a mitokondriális "common" deléciós mutánsok felszaporodása emelkedett reaktív oxigéngyökök jelenlétére utal, amit szintén a szomszédsági hatás egyik kiváltó okának tartanak, és mint az apoptotikus folyamatok beindulásáért felelős molekulákat írták le bystander fibroblasztokban (Mothersill és Seymour 1997). Irodalmi adatok utalnak rá azonban, hogy a ROS molekulák egyedül nem okozhatják a nem-célzott hatásokat (Morgan 2003), ezért nem zárhatjuk ki annak lehetőségét, hogy ezen a jelen kívül, párhuzamosan, egyéb jelátviteli folyamatok is hatnak a sejtekre, és károsítják azokat.

A tumorsejteken ilyen további molekuláris útvonalak megismerésére is irányultak a kísérleteink. Az emlőtumor sejtvonalakon kutatásunk középpontjában a sugárzás és a mitokondriális deléció kapcsolatának tanulmányozása mellett ugyanis a GDF-15 fehérje és a sugárérzékenység kapcsolata állt.

A fehérjék vizsgálata különösen fontos a sugárbiológiában, hiszen tudjuk, hogy a DNS károsodás mellett a fehérjékben bekövetkező változások több szempontból is meghatározóak a sugárexpozíció válaszreakcióiban. Elsősorban a DNS-t ért károsodás hatására aktiválódó és a jelátvitelben szerepet játszó fehérjék, amik a sejt további sorsáért felelnek az olyan multifunkcionális fehérjék, mint a p53, melynek a GDF-15 az egyik célmolekulája, vagy az általunk is vizsgált TGF-β (Canman és mtsai 1998; Mitsutake és mtsai 2001; Hagan és mtsai 2000; Mi és mtsai 2009). A fehérjék által közvetített jelátviteli utak mellett Shuryak és Brenner 2012-ben írt tanulmányából ismerjük, hogy a sugárkezelés hatására bekövetkező sejthalál lehet a fehérjéket

közvetlenül ért károsodás következménye is, és az így megváltozott szerkezetű, karbonilált fehérjék csökkentik a DNS hibajavítási mechanizmust, és a sejt túlélési valószínűségét (Shuryak és Brenner, 2012).

Kísérleteimben a GDF-15 sugárválasz gén hatásait figyeltem meg. Munkacsoportunk korábbi mikro-array kísérlet során azonosított kandidáns géneket, melyeknek ionizáló sugárzás hatására megváltozik az expressziója (Kis és mtsai 2006). Ezek közül a GDF-15 mind alacsony, mind magas dózisnál indukálódott, ezért választottuk ki kandidáns molekulának, feltételezve, hogy szerepet játszik a sejtek sugárzásra adott válaszában. Korábbi kísérleteink alapján (Hegyesi és mtsai 2011) ismertük, hogy a GDF-15 kiütése sugárérzékenyebbé teszi az egér emlőtumor sejteket. A sugárterápia hatékonyságának növelése szempontjából is fontos kutatási terület a sugárválaszban és főleg a tumorsejtek sugárérzékenyítő mechanizmusaiban szerepet játszó molekulák megismerése.

A GDF-15 sugárérzékenységben betöltött szerepét kutatva, egér emlő tumor sejtvonallal végeztem kísérleteket. Létrehoztunk két olyan sejtvonalat, amelyek közül az egyik a GDF-15-öt konstitutívan túltermeli (LM2-GDF15), és egy másikat, amelyik RNS interferenciával gátolt, a GDF-15-öt alig termelő LM2-shGDF15 sejtvonalat. A GDF-15 szinttől függő hatásokat vizsgáltam a túlélésére, életképességére, és az irányított sejthalálra, az apoptózisra. A sugárzás utáni oxidatív stressz válaszban a felszabaduló reaktív oxigén gyökök és az arra érzékeny mitokondriális deléciók keletkezésének követésével vizsgáltam, hogy a GDF-15 szint változtatásával növelhető, vagy kivédhető a stressz reakciók beindulása.

Eredményeink alapján arra következtethetünk, hogy a GDF-15 egy korai sugárválasz gén, aminek a sugárzás hatására dózisfüggően nő az expressziója. Ez megfelel a korábban fibroblasztokon végzett mikro-array kísérleti adatoknak (Kis és mtsai 2006).

A citokin molekula túltermelése szignifikánsan megnövelte sugárkezelés után a sejtek túlélését, csökkentette a sugárérzékenységet, ezzel ellentétben a csendesített sejtvonalban szignifikánsan magasabb sejtpusztulást tudtunk elérni. Li és munkatársai 2013-as munkájukban endothél sejteken végzett kísérleteik során a GDF-15 indukció hatására emelkedett reaktív oxigén gyök képződést mértek (Li és mtsai 2013). Amikor mi a sugárzás következtében termelődő reaktív oxigén molekulák termelését vizsgáltuk, a csendesített sejtvonalban még 24 óra elteltével is mérhető volt a megemelkedett ROS

mennyisége. Ezzel összefüggésben megvizsgáltuk a sejthalál típusok közül az irányított sejthalált, hiszen az apoptózisról köztudott, hogy megnövekedett mennyiségű reaktív oxigéngyökök is iniciálhatják (Dohare és mtsai 2008). A vizsgálatok során szignifikáns összefüggés találtunk a GDF-15 expresszió szintje és az apoptózis között. Az alacsony expressziós szintű sejtvonalban az apoptotikus sejtek aránya szignifikánsan magasabb volt, a sejtpusztulás háromszor olyan hatékony volt, mint a kiindulási sejtvonalban, míg a GDF-15-öt magasan expresszáló sejtvonalban a besugárzásnak még emelkedő dózis hatására sem volt szignifikáns sejthalált előidéző hatása. Graichen és munkatársai hasonló eredményre jutottak, mikor a GDF-15-öt gátlás alól felszabadítva humán emlőkarcinóma sejteken csökkent apoptózist mértek (Graichen és mtsai 2010).

A reaktív oxigén gyök felszabadulás következtében fellépő oxidatív stressz állapot létrejötte kihat a sejt egyéb partikulumaira is, például a mitokondriális DNS-re. Vizsgálataink során igazoltuk, hogy a korábban humán fibroblaszt sejtvonalakon mért, a sugárzás hatására kialakuló mitokondriális DNS károsodást kimutató módszerünk (Schilling-Tóth és mtsai 2011) alkalmazható egér sejtvonalakon is. 6 Gy hatására szignifikáns eltérést mutattunk ki egér tumor sejtvonalban in vitro körülmények között, amit más irodalmi adatok is alátámasztanak. Zhang és munkatársai különböző normál egér szövetekben mértek CD akkumulációt ionizáló sugárzás hatására és megállapították, hogy a hatás szövetspecifikusan, de megnyilvánul, a CD akkumuláció ionizáló sugárzás hatására egerekben is mérhető (Zhang és mtsai 2013a). Ismert, hogy a mitokondrium szerkezetében és funkciójában bekövetkező változások akár a tumoros elfajulások korai jelei is lehetnek, ezért fontos a tanulmányozásuk és akár új, szelektív kemoterápiás szerek molekuláris célpontjaivá válhatnak (Modica-Napolitano és Singh 2002). Dani és munkatársai egy 2004-es tanulmányukban megállapították, hogy a tumoros sejtekben a CD akkumuláció nagyságrendekkel kisebb, mint normál szövetekben, de a jelentőségét nem értékelik kevesebbre. Ezt azzal magyarázták, hogy a tumoros szövetben előforduló CD deléció kisebb százalékban is elérheti azt a maximális mennyiséget, amit ez a gyorsan osztódó, nagy mennyiségű energiát felhasználó tumor szövet még tolerálni tud, és gyorsan el is pusztul. Ezzel szemben a lassú, vagy csekély osztódó képességű normál szövetekben a heteroplazmiás mitokondriumokat nemcsak tolerálják, de valószínűleg kompenzálják is, hiszen perzisztensen fennmaradhatnak (Dani és mtsai 2004).

A GDF-15 egyéb molekulákkal való kölcsönhatását vizsgáltuk. A TGF-B1 és 2 és a növekedési és differenciálódási faktor között több okból is feltételezhető volt a kapcsolat. Egyrészt mindkét molekula sugárválasz gén (Epperly és mtsai 1999, Rodemann és Bamberg 1995), ráadásul szerepet játszik a sugárérzékenységben (Irons és mtsai 2012, Quarmby és mtsai 2003). A feltételezésünket erősítette továbbá, hogy a családban jellemző, hogy a felszabaduló citokin család egy másik tagja negatív regulátorként gátolja. Ezt figyelhetjük meg a TGF-B2 esetében, a molekula gátolhatja a TGF-B1 expresszióját (Stroschein és mtsai 1999). A család két másik tagját vizsgálva megállapítottuk, hogy a magas GDF-15 koncentráció gátolta a TGF-B1 expressziót. A 2 Gy egyszeri sugárkezelés hatására indukálódó GDF-15 emelkedés nem akkora mértékű, hogy gátlást okozhatna, de ha a génmódosítással tízszeresére növeltük a GDF-15 expressziót, ez a gátlás már meg tudott nyilvánulni, ezért feltételezhető, hogy a két gén között egy koncentráció-függő gátló hatás van. A sugárérzékenységgel kapcsolatban megfigyeléseink hasonlóak ahhoz, amit Irons és munkatársai sugárérzékeny és rezisztens egerek csontvelői sejtjeiben mértek, magas TGF-B1 szint mellett nagyobb a sejtpusztulás, sugárérzékenyebbek a sejtek (Irons és mtsai 2012).

A mi eredményeink azt mutatják, hogy in vitro egér emlő tumor modellben a TGF- $\beta$ 2 gén expressziója egyszeri röntgen besugárzás hatására korai időpontban nem változik, nem korai sugárválasz gén, aktivációja valószínűleg később következik be, vagy nagyobb dózis hatására. Ezt korábbi irodalmi adatok is alátámasztják, Epperly és munkatársai nem találtak változást 24 órával a besugárzás után, ellenben 120 nap után nagy dózist (20 Gy) alkalmazva jelentős változást észleltek az expresszióban in vivo besugárzott egerekben (Epperly és mtsai 1999). A molekulák közötti kapcsolatot vizsgálva a GDF-15-öt különböző módon expresszáló sejtvonalakban megállapítottuk, hogy a gén túltermelése szignifikánsan gátolta a TGF- $\beta$ 2 expressziót, ahogy a TGF- $\beta$ 2 is gátolhatja a TGF- $\beta$ 1-et (Stroschein és mtsai 1999). Ennek magyarázata lehet, hogy gátló molekuláinak aktiválódását serkenti, vagy a p53 transzkripciós faktoron keresztül szabályozza az expresszióját.

Ezen kívül a magas GDF-15 citokin vizsgálatainkban gátolta az apoptózis beindulását, növelte a sejtek túlélését. Az apoptózis mitokondriális útvonalának a fő irányító fehérjéje a p53 protein, ami szerepet játszik a sejtciklus és a sejthalál irányításában (Osada és mtsai 2007), ennek célgénje a GDF-15, ami ezáltal összefüggésbe hozható a

sejtek sugárérzékenységével. Az apoptotikus belső úton indukálódó folyamatokra jellemző a mitokondrium részvétele (Mancini és Moretti 2009) és a reaktív oxigén gyök felszabadulás (Simon és mtsai 2000). A GDF-15 ezen útvonalon kifejtett hatását kísérleteink csendesítésének mutatja, hogy során а gén következtében meghosszabbodott az időszak, amikor a sugárzás következtében nagy mennyiségű reaktív oxigéngyököt termeltek a sejtek. Az magas ROS koncentráció növelte az erre érzékeny mitokondriális "common" deléciós mutánsok kialakulását, aminek emelkedett mennyisége kiválthat további ROS felszabadulást (Majora és mtsai 2009), és ez a sejt öregedéséhez (Eshaghian és mtsai 2006), illetve halálához vezethet (31. ábra).



**31. ábra A GDF-15 molekula hatása a sejtben.** Sugárkezelés hatására olyan molekuláris folyamatok indulnak be, melyek a GDF-15 termelődéséért felelnek. A mitokondriumban a sugárexpozíció az oxidatív foszforiláció enzimkomplexeket, és a mitokondriális DNS károsítva reaktív oxigéngyökök kialakulásához és a sejt irányított sejthalálához vezethet. Ezt gátolja a GDF-15 molekula. A DNS károsodás észlelése után a sejt olyan jelátviteli útvonalakat aktivál, melyek, mint a p53 molekula a sejt további sorsáért felelnek. A p53 molekula célgénjeként a GDF-15 termelés növeli a sejtek túlélését, csökkenti a sejtek sugárérzékenységét és egyéb sugárérzékenységért felelős citokinek, mint a TGF- $\beta$ 2 termelődését.

Ezeket az eredményeket összevetve megállapíthatjuk, hogy a magas GDF-15 szint serkenti a sejtek túlélését a sugárexpozíció után, ezáltal csökkentve a sugárérzékenységet, gátolva a ROS felszabadulást, ami megakadályozza a sejtek irányított sejthalál következtében való elpusztulását, és csökkenti a perzisztensen fennálló oxidatív stressz válasz következtében kialakuló mutációk mennyiségét a mitokondriális genomban, tehát mind a tumorsejtek sugárérzékenyítése, mind a normál szövetek védelmére irányuló kísérletek alanya lehet. Ismert ezen kívül, hogy a TGF-ß aktiválódás oxidatív stressz hatására a Smad4 útvonalon szeneszcenciát vált ki a sejtekben (Kretova és mtsai 2014), és a GDF-15 a p53 útvonalon kívül a Smad4 útvonalon keresztül is aktiválódhat. Ezért még további kutatások tárgya lehet, hogy a GDF-15 saját családján belül gátolja a TGF-β1 –et és a TGF-β2-őt, amik összefüggésbe hozhatók a szeneszcenciával és a késői mellékhatással is, és ez valószínűvé teszi, hogy ezekre a mechanizmusokra is hatással van.

### 8. Következtetések

A mitokondriális "Common" deléció szenzitív markernek bizonyult a kis és közepes dózisú ionizáló sugárzás direkt és nem célzott hatásainak tanulmányozására. A vizsgálataink során kandidáns molekulánk, a GDF-15 sugárérzékenységi markernek bizonyult, expresszió szintje befolyásolta a sejtek válaszreakcióit az ionizáló sugárzásra.

- 8.1. A CD mennyiségi felhalmozódása a direkt sugárkezelés hatására mérhető volt, de a mennyisége a sugárérzékenységtől függött. A szenzitív sejtvonalakban korai időpontban magasabbnak bizonyult, mint a rezisztens sejtekben.
- 8.2. Alkalmazható volt a CD analízis a szomszédos hatás kimutatására, amely során megállapíthattuk, hogy
  - 8.2.1. nem találtunk különbséget a kondicionált médium használata és az együtt-tenyésztés között a szomszédsági hatás kiváltásánál,
  - 8.2.2. a szomszédos sejtekben a CD akkumuláció mértéke a direkt besugárzott sejt bystander szignál átadó képességétől függ, nem pedig a sugárérzékenységtől
  - 8.2.3. A bystander szignál átadó képessége nem függött a szérum szerotonin szintjétől
- 8.3. A sugárérzékeny és rezisztens humán fibroblaszt sejtvonalak hosszú idejű követésénél a sugárérzékeny sejtvonalban már kis dózis hatására is szignifikáns CD deléciós mutáns mennyiséget mérhettünk. 2 Gy besugárzás hatására mind a rezisztens, mind a szenzitív sejtvonalban mérhető volt a CD akkumuláció, de csak az érzékeny sejtvonalban alakult ki a hetedik hét után a genetikai instabilitás következtében ismételt emelkedés.
- 8.4. Vizsgáltam a GDF-15 citokin szerepét emlőtumor sejtvonalakban valamint hogy a GDF-1 szint hogyan módosítja a sugárválaszt.
  - 8.4.1. Megállapítottuk, hogy a GDF-15 expresszió dózisfüggően nő ionizáló sugárzás hatására
  - 8.4.2. Megállapítottuk, hogy a GDF-15 gén szintje kihat:

- 8.4.2.1. a növekedésre, a sejtek a magas GDF-15 szint mellett jobban növekedtek,
- 8.4.2.2. a TGF-β1 és TGF-β2 expresszióra, magas GDF-15 szint gátolta ezek expresszióját, alacsony expressziója enyhén emelte
- 8.4.2.3. a "Common" deléciós mutánsok felszaporodására, a magas GDF15 szint gátolta a mutánsok kialakulását, az alacsony expresszió növelte
- 8.4.3. A GDF-15 expresszió befolyásolta a sugárzás károsító hatását a sejtekre.
  - 8.4.3.1. A sejtek túlélése a GDF-15 szint függvényében változott, a magas expresszió rezisztenciát, míg a géncsendesítés sugárérzékenységet okozott.
  - 8.4.3.2. A GDF-15 expresszió szintje kihatott a sugárexpozíció következtében indukálódó TGF-β2 termelődésre, magas szintje gátolta, alacsony szintje növelte az expressziót
  - 8.4.3.3. A GDF-15 szint függvényében változott a sugárexpozíció hatására kialakuló reaktív oxigén gyök-termelődés, az apoptózissal bekövetkező sejthalál, magas szintje gátolta a ROS termelődést és az apoptózist, alacsony szintje emelte ezek hatását
  - 8.4.3.4. A GDF-15 befolyásolta a perzisztensen fennálló oxidatív stressz által okozott mitokondriális CD mutánsok felszaporodást, a túltermelő sejtekben nem okozott változást, az alacsony szintű sejtkultúrában magas volt a mutánsok előfordulási aránya a sugárkezelés után.

## 9. Összefoglalás

Az ionizáló sugárzás direkt sejtkárosító hatása, melynek fő célpontja az örökítő anyag, már régóta ismert. Az úgynevezett nem célzott hatások tekintetében az irodalom azonban már korántsem ilyen egységes. Kísérleteink során a sugárzás okozta direkt károsodások mellett ezeket az úgynevezett nem-célzott hatásokat is vizsgáltuk kis és nagy dózisú egyszeri sugárkezelés után.

Egyre több irodalmi adat támasztja alá azt a feltevést, miszerint a DNS-en kívül más sejtalkotók, mint például a mitokondriumok sérülése is fontos szerepet játszik a sejt későbbi mutációinak felhalmozódásában, így a mitokondriális változások vizsgálata megfelelő módszer lehet a sejtben bekövetkező kis hatások detektálásában. Munkánk során a mitokondriális DNS molekula "Common" deléciójának (CD) akkumulációját mértük normál humán fibroblaszt sejtekben, mint egy lehetséges új sugársérülési biomarkert. A deléciós vizsgálatok során direkt sugárkezelésnél a korai időpontban deléciós mutánsok felszaporodását mértünk. Mindegyik sejtvonalban detektálható volt a károsodás, de érzékeny sejtekben már kis dózis is szignifikáns emelkedést okozott. Hosszú idejű követésnél a szenzitív sejtvonalban mérhető volt egy második, feltételezhetően a genomiális instabilitás által okozott felszaporodás. A szomszédsági hatást is detektálni tudtuk, ami nem függött a dózistól, vagy a sugárérzékenységtől, a sejtek egyéni reakciókat mutattak.

A sugárzás egy szintén előre nem prediktálható hatását, az egyéni sugárérzékenységet emlőkarcinóma modellen vizsgáltuk. A tumorsejteken végzett kísérletek során a GDF-15, mint egy lehetséges sugárérzékenységi biomarker szerepét próbáltuk tisztázni a sugárválaszban. A GDF-15 citokin molekuláris hatásainak vizsgálatához genetikai módosítással létrehozott alacsony, normál és magas GDF-15 expresszió szintű egér emlőtumor kultúrákon vizsgáltuk.

Eredményeink alapján a GDF-15 a sugárérzékenységet befolyásoló, korai sugárválasz molekula. Expressziós szintjének emelkedése növelte a sejtek túlélését, csökkentette az apoptotikus sejtek előfordulását, a ROS mennyiséget, és a mitokondriális DNS mutációk keletkezését. Csendesítése ezzel szemben érzékennyé tette a tumorsejteket a sugárzásra, ezért további vizsgálata fontos információkkal szolgálhat a tumorok sugárérzékenyítő kezelése tekintetében.

### **Summary**

The biological consequences of high radiation doses are well established, however results of low-dose and non-targeted effects (NTE) are controversial. Aim of this study was to investigate the direct and non-targeted effects of ionizing radiation.

Recently more study confirm, that beside the nuclear DNA, other organelles, such the mitochondrion injury could play a central role in radiation injury, which suggest the analysis of mtDNA alterations are suitable to study low frequency changes in irradiated cells. In the first part of the study quantitative real-time PCR analysis of the mitochondrial Common deletion (CD) accumulation was performed in normal fibroblast cell lines and investigated as a new biomarker for NTE. Low and moderate doses of gamma radiation was used for modelling normal tissue reaction after radiation.

After direct radiation the increase in CD amount could be noticed in every cell line, beside that a radiosensitivity-dependent difference could be detected within the cell lines. A higher relative amount of common deletion could be observed in radiosensitive cell lines even after low doses. In the long time scale study a significant second CD increase was found in the sensitive fibroblasts, which could be caused by genomic instability. In point of bystander effect no association could be measured to radiosensitivity or dose, the cell lines showed individual bystander responses.

In the second part of our study GDF-15 gene was investigated as a novel biomarker for individual radiosensitivity. Its functional analysis was performed on breast cancer cell lines. The molecular effect of the gene was examined in a normal GDF-15 expressing, a GDF-15 overexpressing and a GDF-15 gene-silenced cell line.

Our results show that the GDF-15 is an early radio response gene, playing role in radiosensitibility. Changing the expression level had a significant effect on the cells. Overexpression of the gene caused radioresistance, repressed apoptosis, ROS release, and CD mutation accumulation of the cells. Whereby gene-silencing induced significant radiosensitibility, increased the effect of ionizing radiation. These results arguing for a further investigation of GDF-15 in treatment of cancer.

## 10. Irodalomjegyzék

- Akagi Y, Ito K, Sawada S. (1993). Radiation-induced apoptosis and necrosis in Molt-4 cells: a study of dose-effect relationships and their modification. *Int J Radiat Biol*, 64(1):47-56.
- Albertoni M, Shaw P, Nozaki M, Godard S, Tenan M, Hamou M, Fairlie D, Breit S, Paralkar V, de Tribolet N, van Meir EG, Hegi M. (2002, június 20). Anoxia induces macrophage inhibitory cytokine-1 (MIC-1) in glioblastoma cells independently of p53 and HIF-1. *Oncogene*, old.: 21: 4212–4219.
- Alsner J, Rødningen OK, Overgaard J. (2007). Differential gene expression before and after ionizing radiation of subcutaneous fibroblasts identifies breast cancer patients resistant to radiation-induced fibrosis. *Radiother Oncol.*, 83(3):261-6.
- Andreassen CN, Alsner J. (2009). Genetic variants and normal tissue toxicity after radiotherapy: A systematic review.*Radiother Oncol* 92: 299–309.
- Andreassen CN, Alsner J, Overgaard M, Sørensen FB, Overgaard J. (2006). Risk of radiation-induced subcutaneous fibrosis in relation to single nucleotide polymorphisms in TGFB1, SOD2, XRCC1, XRCC3, APEX and ATM--a study based on DNA from formalin fixed paraffin embedded tissue samples. *Int J Radiat Biol*, 82(8):577-86.
- Antoccia A, Sgura A, Berardinelli F, Cavinato M, Cherubini R, Gerardi S, Tanzarella C. (2009). Cell cycle perturbations and genotoxic effects in human primary fibroblasts induced by low-energy protons and X/gamma-rays. J Radiat Res., 50(5):457-68.
- Assefa Z, Van Laethem A, Garmyn M, Agostinis P. (2005). Ultraviolet radiationinduced apoptosis in keratinocytes: on the role of cytosolic factors. *Biochim Biophys Acta.*, 1755(2):90-106.
- Asur RS, Thomas RA, Tucker JD. (2009). Chemical induction of the bystander effect in normal human lymphoblastoid cells. *Mutat Res*, 676: 11-19.
- Autsavapromporn N, de Toledo SM, Little JB, Jay-Gerin JP, Harris AL, Azzam EI. (2011). The role of junction communication and oxidative stress in the propagation of toxic effects among high-dose α-particle-irradiated human cells. *Radiat Res.*, 175:347–357.

- Azzam EI, de Toledo SM, Gooding T, Little JB. (1998). Intercellular communication is involved in the bystander regulation of gene expression in human cells exposed to very low fluences of alpha particles. *Radiat Res*, 150(5):497-504.
- Azzam EI, De Toledo SM, Spitz DR, Little JB. (2002). Oxidative metabolism modulates signal transduction and micronucleus formation in bystander cells from alpha-particle-irradiated normal human fibroblast cultures. *Cancer Res*, 62(19):5436-42.
- Azzam EI, Jay-Gerin JP, Pain D. (2012). Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury. *Cancer Lett*, 327(1-2):48-60.
- Barcellos-Hoff MH, Brooks AL. (2001). Extracellular signaling through the microenvironment: a hypothesis relating carcinogenesis, bystander effects, and genomic instability. *Radiat Res*, (156) 618–627.
- Barcellos-Hoff MH, Park C, Wright EG. (2005). Radiation and the microenvironment tumorigenesis and therapy. *Nat Rev Cancer*, 5: 867-875.
- Barjaktarovic Z, Schmaltz D, Shyla A, Azimzadeh O, Schulz S, Haagen J, Dörr W, Sarioglu H, Schäfer A, Atkinson MJ, Zischka H, Tapio S. (2011). Radiationinduced signaling results in mitochondrial impairment in mouse heart at 4 weeks after exposure to X-rays. *Plos One*, 6(12):e27811.
- Bauskin AR, Brown DA, Junankar, Rasiah KK, Eggleton S, Hunter M, Liu T, Smith D, Kuffner T, Pankhurst G J, Johnen H, Russell PJ, Stricker PD, Grygiel JJ, Kench JG, Henshall SM, Sutherland RL, Breit SN. (2005). The propeptide mediates formation of stromal stores of proMIC-1: Role in determining prostate cancer outcome. *Cancer Res*, old.: 65:2330-6.
- Bauskin AR, Jiang L, Luo XW, Wu L, Brown DA, Breit SN. (2010). The TGF-beta superfamily cytokine MIC-1/GDF15: secretory mechanisms facilitate creation of latent stromal stores. *J Interferon Cytokine Res*, old.: 30(6):389-9.
- Bauskin AR, Zhang HP, Fairlie WD, He XY, Russell PK, Moore AG, Brown DA, Stanley KK, Breit SN. (2000). The propeptide of macrophage inhibitory cytokine (MIC-1), a TGF-beta superfamily member, acts as a quality control determinant for correctly folded MIC-1. *EMBO J*, 19:2212–2220.

- Belyakov OV, Malcolmson AM, Folkard M, Prise KM, Michael BD. (2001). Direct evidence for a bystander effect of ionizing radiation in primary human fibroblasts. *Br J Cancer*, 84(5), 674–679.
- Bentzen SM, Overgaard J. (1994). Patient-to-patient variability in the expression of radiation-induced normal tissue injury. *Semin Radiat Oncol*, 4 (2):66-80.
- Bernasconi P, Torchiana E, Confalonieri P, Brugnoni R, Barresi R, Mora M, Cornelio F, Morandi L, Mantegazza R. (1995). Expression of transforming growth factorbeta 1 in dystrophic patient muscles correlates with fibrosis. Pathogenetic role of a fibrogenic cytokine. *J Clin Invest.*, 96(2):1137-1144.
- Berneburg M, Plettenberg H, Medve-König K, Pfahlberg A, Gers-Barlag H, Gefeller O, Krutmann J. (2004). Induction of the photoaging-associated mitochondrial common deletion in vivo in normal human skin. J Invest Dermatol, 122(5):1277-1283.
- Bianchi MS, Bianchi NO, Bailliet G. (1995). Mitochondrial DNA mutations in normal and tumor tissues from breast cancer patients. *Cytogenet Cell Genet*, 71(1):99-103.
- Blanchette F, Day R, Dong W, Laprise MH, Dubois CM. (1997). TGFbeta1 regulates gene expression of its own converting enzyme furin. J Clin Invest., 99(8):1974-1983.
- Blank KR, Rudoltz MS, Kao GD, Muschel RJ, McKenna WG. (1997). The molecular regulation of apoptosis and implications for radiation oncology. *Int J Radiat Biol*, 71(5):455-466.
- Bogenhagen D, Clayton DA. (1977). Mouse L cell mitochondrial DNA molecules are selected randomly. *Cell*, 11:719–727.
- Bootcov MR, Bauskin AR, Valenzuela SM, Moore AG, Bansal M, He XY,Zhang HP, Donnellan M, Mahler S, Pryor K, Walsh BJ, Nicholson RC, Fairlie WD, Por SB, Robbins JM, Breit SN. (1997). MIC-1, a novel macrophage inhibitory cytokine, is a divergent member of the TGF-β superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A*, old.: 94(21): 11514–11519.
- Border WA, Noble NA. (1994). Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. *N Engl J Med.*, 331(19):1286-1292.

- Böttner M, Martin Laa M, Schechingerb B, Rappold G, Klaus Unsickera K, Suter-Crazzolara C. (1999) Characterization of the rat, mouse, and human genes of growth/differentiation factor-15/macrophage inhibiting cytokine-1 (GDF-15/MIC-1). *Gene*, old.: Volume 237, Issue 1, Pages 105–111.
- Bouquet F, Pal A, Pilones KA, Demaria S, Hann B, Akhurst RJ, Babb JS, Lonning SM, DeWyngaert JK, Formenti SC, Barcellos-Hoff MH. (2011). TGFβ1 inhibition increases the radiosensitivity of breast cancer cells in vitro and promotes tumor control by radiation in vivo. *Clin Cancer Res*, 17(21):6754-65.
- Bower JE, Ganz PA, Tao ML, Hu W, Belin TR, Sepah S, Cole S, Aziz N. (2009). Inflammatory biomarkers and fatigue during radiation therapy for breast and prostate cancer. *Clin Cancer Res*, 15: 5534–5540.
- Brown DA, Breit SN, Buring J, Fairlie WD, Bauskin AR, Liu T, Ridker PM. (2002). Concentration in plasma of macrophage inhibitory cytokine-1 and risk of cardiovascular events in women: a nested case-control study. *Lancet*, 359(9324):2159-2563.
- Bua E, Johnson J, Herbst A, Delong B, McKenzie D, Salamat S, Aiken JM. (2006).
  Mitochondrial DNA-deletion mutations accumulate intracellularly to detrimental levels in aged human skeletal muscle fibers. *Am J Hum Genet.*, 79(3):469-480.
- Buonanno M, De Toledo SM, Pain D, Azzam EI. (2011a). Long-term consequences of radiation-induced bystander effects depend on radiation quality and dose and correlatewith oxidative stress. *Radiat Res*, 175:405–415.
- Buonanno M, de Toledo SM, Azzam EI. (2011b). Increased frequency of spontaneous neoplastic transformation in progeny of bystander cells from cultures exposed to densely-ionizing radiation. *Plos One*, 6 art. no. e21540.
- Campa A, Balduzzi M, Dini V, Esposito G, Tabocchini MA. (2015). The complex interactions between radiation induced non-targeted effects and cancer. *Cancer Lett*, 356(1):126-136.
- Campisi J. (2005). Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: Good citizens, bad neighbors. *Cell*, 120: 513–522.
- Campisi J, d'Adda di Fagagna F. (2007). Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8(9):729-740.

- Canman CE, Lim DS, Cimprich KA, Taya Y, Tamai K, Sakaguchi K, Appella E, Kastan MB, Siliciano JD. (1998). Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. *Science*, 281(5383):1677-1679.
- Chang JT, Chan SH, Lin CY, Lin TY, Wang HM, Liao CT, Wang TH, Lee LY, Cheng AJ. (2007). Differentially expressed genes in radioresistant nasopharyngeal cancer cells: gp96 and GDF15. *Mol Cancer Ther.*, 6(8):2271-2279.
- Chang WP, Little JB. (1992). Persistently elevated frequency of spontaneous mutations in progeny of CHO clones surviving X-irradiation: association with delayed reproductive death phenotype. *Mutat Res*, 270:191–199.
- Chen B, Zhong Y, Peng W, Sun Y, Hu YJ, Yang Y, Kong WJ. (2011). Increased mitochondrial DNA damage and decreased base excision repair in the auditory cortex of D-galactose-induced aging rats. *Mol Biol Rep.*, 38(6):3635-3642.
- Chen JH, Halesy CN , Ozanne SE. (2007). DNA damage, cellular senescence and organismal ageing: causal or correlative? *Nucleic Acids Res*, 35 (22): 7417– 7428.
- Chen Q, Ames BN. (1994). Senescence-like growth arrest induced by hydrogen peroxide in human diploid fibroblast F65 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 91(10):4130-4134.
- Chen YZ, Liu D, Zhao Yx, Wang HT, Ya G, Ying C. (2014). Diagnostic Performance of Serum Macrophage Inhibitory Cytokine-1 in Pancreatic Cancer: A Meta-Analysis and Meta-Regression Analysis. DNA Cell Biol., 33(6): 370-377.
- Cheng X, Ivessa AS. (2010). The migration of mitochondrial DNA fragments to the nucleus affects the chronological aging process of Saccharomyces cerevisiae. *Aging Cell.*, 9:919–923.
- Chiu HW, Fang WH, Chen YL, Wu MD, Yuan GF, Ho SY, Wang YJ. (2012). Monascuspiloin enhances the radiation sensitivity of human prostate cancer cells by stimulating endoplasmic reticulum stress and inducing autophagy. *Plos One*, 7(7):e40462.
- Chofor N, Harder N, Willborn KC, Poppe B. (2012). Internal scatter, the unavoidable major component of the peripheral dose in photon-beam radiotherapy. *Phys Med Biol*, ;57(6):1733-1743.

- Chow J, Tron VA. (2005). Molecular aspects of ultraviolet radiation-induced apoptosis in the skin. *J Cutan Med Surg*, 9(6):289-295.
- Ciftci R, Tas F, Yasasever CT, Aksit E, Karabulut S, Sen F, Keskin S, Kilic L, Yildiz I, Bozbey HU, Duranyildiz D, Vatansever S. (2014). High serum transforming growth factor beta 1 (TGFB1) level predicts better survival in breast cancer. *Tumour Biol.*, 35(7):6941-6948.
- Corral-Debrinski M, Horton T, Lott MT, Shoffner JM, McKee AC, Beal MF, Graham BH, Wallace DC. (2002). Marked Changes in Mitochondrial DNA Deletion Levels in Alzheimer Brains. *Genomics*, 23 (2): 471–476.
- Corral-Debrinski M, Shoffner JM, Lott MT, Wallace DC. (1992). Association of mitochondrial DNA damage with aging and coronary atherosclerotic heart disease. *Mutat Res*, 275 (3-6): 169–180.
- Cronin TD, Brauer RO. (1949). Radiodermatitis and necrosis. Surgery, 26(4):665-672.
- Cuevas-Ramos G, Petit CR, Marcq I, Boury M, Oswald E,Nougayrede JP. (2010). Escherichia coli induces DNA damage in vivo and triggers genomic instability in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(25):11537-11542.
- Dani SU, Dani MA, Simpson AJ (2005). The common mitochondrial DNA deletion deltamtDNA(4977): shedding new light to the concept of a tumor suppressor mutation. *Med Hypotheses*. 61(1):60-3
- Day TK, Hooker AM, Zeng G, Sykes PJ. (2007). Low dose X-radiation adaptive response in spleen and prostate of Atm knockout heterozygous mice. Int J Radiat Biol, 83(8):523-34.
- Dayal D, Martin SM, Owens KM, Aykin-Burns N, Zhu Y, Boominathan A, Pain D, Limoli CL,Goswami PC, Domann FE, Spitz DR. (2009). Mitochondrial complex II dysfunction can contribute significantly to genomic instability after exposure to ionizing radiation. *Radiat Res*, 172:737–745.
- Denton D, Nicolson S, Kumar S. (2012). Cell death by autophagy: facts and apparent artefacts. *Cell Death Differ.*, 19(1):87-95.
- Derynck R, Akhurst RJ, Balmain A. (2001). TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nat Genet.*, 29(2):117-29.
- Derynck R, Goeddel DV, Ullrich A, Gutterman JU, Williams RD, Bringman TS, Berger WH. (1987). Synthesis of messenger RNAs for transforming growth factors
alpha and beta and the epidermal growth factor receptor by human tumors. *Cancer Res*, 47(3):707-712.

- Detmer K, Steele TA, Shoop MA, Dannawi H. (1999). Lineage-restricted expression of bone morphogenetic protein genes in human hematopoietic cell lines. *Blood Cells Mol Dis*, 25(5-6):310-23.
- Dickinson ME, Kobrin MS, Silan CM, Kingsley DM, Justice MJ, Miller DA, Ceci JD, Lock LF, Lee A, Buchberg AM, et al. (1990) Chromosomal localization of seven members of the murine TGF-beta superfamily suggests close linkage to several morphogenetic mutant loci. *Genomics*, 6(3):505-20.
- Ding LH, Shingyoji M, Chen F, Chatterjee A, Kasai KE, Chen DJ. (2005) Gene expression changes in normal human skin fibroblasts induced by HZE-particle radiation. *Radiat Res.*, 164(4 Pt 2):523-6.
- Dodson M, Darley-Usmar V, Zhang J. (2013). Cellular metabolic and autophagic pathways: traffic control by redox signaling. *Free Radic Biol Med*, 63:207-221.
- Dohare P, Garg P, Sharma U, Jagannathan NR, Ray M. (2008). Neuroprotective efficacy and therapeutic window of curcuma oil: in rat embolic stroke model. BMC Complement Altern Med, 8:55.
- Doherty AT. (2012). The in vitro micronucleus assay. Methods Mol Biol, 817:121-41.
- Dong C, Zhu S, Wang T, Yoon W, Li Z, Alvarez RJ, ten Dijke P, White B, Wigley FM, Goldschmidt-Clermont PJ. (2002). Deficient Smad7 expression: a putative molecular defect in scleroderma. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 99(6):3908-3913.
- Epperly M.W., Travis E.L., Sikora Ch., Greenberger J.S. (1999 Vol 5, Iss 4, August). Magnesium superoxide dismutase (MnSOD) plasmid/liposome pulmonary radioprotective gene therapy: modulation of irradiation-induced mRNA for IL-1, TNF-a, and TGF-b correlates with delay of organizing alveolitis/fibrosis. *Biol Blood Marrow Transplant*, pp. 204-214.
- Escribano-Díaz C, Orthwein A, Fradet-Turcotte A, Xing M, Young JT, Tkáč J, Cook MA, Rosebrock AP, Munro M, Canny MD, Xu D, Durocher D. (2013). A cell cycle-dependent regulatory circuit composed of 53BP1-RIF1 and BRCA1-CtIP controls DNA repair pathway choice. *Mol Cell.*, 49(5):872-83.
- Eshaghian A, Vleugels RA, Canter JA, McDonald MA, Stasko T, Sligh JE. (2006). Mitochondrial DNA deletions serve as biomarkers of aging in the skin, but are

typically absent in nonmelanoma skin cancers. *The J Invest Dermatol*, 126(2):336-344.

- Fairlie WD, Russell PK, Wu WM, Moore AG, Zhang H-P, Brown PK, Bauskin AR, Breit SN (2001) Epitope mapping of the transforming growth factor-beta superfamily protein, macrophage inhibitory cytokine-1 (MIC-1): identification of at least five epitope specificities. *Biochemistry*, old.: 40:65-73.
- Fang J, Holmgren A (2006). Inhibition of thioredoxin and thioredoxin reductase by 4hydroxy-2-nonenal in vitro and in vivo. *J Am Chem Soc.*, 128:1879–1885.
- Ferriere F, Khan NA, Meyniel JP, Deschaux P. (1997). 5-Hydroxytryptamine-induced calcium-channel gating in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) peripheral blood lymphocytes. *Biochem J.*, 323 (Pt 1):251-258.
- Forrester HB, Vidair CA, Albright N, Ling CC, Dewey WC. (1999). Using Computerized Video Time Lapse for Quantifying Cell Death of X-irradiated Rat Embryo Cells Transfected with c-myc or c-Ha-ras. *Cancer Res* (59) 931–939.
- Fujii D, Brissenden JE, Derynck R, Francke U. (1986). Transforming growth factor beta gene maps to human chromosome 19 long arm and to mouse chromosome 7. *Somat Cell Mol Genet.*, 12(3):281-8.
- Garcia-Barros M, Paris F, Cordon-Cardo C. (2003). Tumor response to radiotherapy regulated by endothelial cell apoptosis. *Science*, (300) 1155-9.
- Ghandhi SA, Ming L, Ivanov VN, Hei TK, Amundson SA. (2010). Regulation of early signaling and gene expression in the alpha-particle and bystander response of IMR-90 human fibroblasts. *BMC Med Genomics*., 3:31.
- Glaviano A, Nayak V, Cabuy E, Baird DM, Yin Z, Newson R, Ladon D, Rubio MA, Slijepcevic P, Lyng F, Mothersill C, Case CP. (2006). Effects of hTERT on metal ion-induced genomic instability. *Oncogene*, 25(24):3424-35.
- Gobbel GT, Chan PH. (2001). Neuronal death is an active, caspase-dependent process after moderate but not severe DNA damage. *J Neurochem*, 76(2):520-531.
- Göttlich B, Reichenberger S, Feldmann E, Pfeiffer P. (1998). Rejoining of DNA double-strand breaks in vitro by single-strand annealing. *Eur J Biochem*, 258(2):387-95.
- Gaziev AI, Shaikhaev GO. (2007). Ionizing radiation can activate the insertion of mitochondrial DNA. *Radiats Biol Radioecol*, 47:673–683.

- Graichen R., Liu DX., Sun Y., Lee K-O. Lobie P.E. (2002). Autocrine Human Growth Hormone Inhibits Placental Transforming Growth Factor-b Gene Transcription to Prevent Apoptosis and Allow Cell Cycle Progression of Human Mammary Carcinoma Cells. J Biol Chem, 277 (29):26662–26672.
- Grasso C, Fabre MS, Collis SV, Castro ML, Field CS, Schleich N, McConnell MJ, Herst PM. (2014). Pharmacological doses of daily ascorbate protect tumors from radiation damage after a single dose of radiation in an intracranial mouse glioma model. *Front Oncol*, 15 (4):356.
- Graziewicz MA, Day BJ, Copeland WC. (2002). The mitochondrial DNA polymerase as a target of oxidative damage. *Nucleic Acids Res*, 30:2817–2824.
- Grosovsky AJ, Parks KK, Giver CR, Nelson SL. (1996). Clonal analysis of delayed karyotypic abnormalities and gene mutations in radiation-induced genetic instability. *Mol Cell Biol*, 16:6252–6262.
- Habashi JP, Judge DP, Holm TM, Cohn RD, Loeys BL, Cooper TK, Myers L, Klein EC, Liu G, Calvi C, Podowski M, Neptune ER, Halushka MK, Bedja D, Gabrielson K, Rifkin DB, Carta L, Ramirez F, Huso DL, Dietz HC. (2006).
  Losartan, an AT1 antagonist, prevents aortic aneurysm in a mouse model of Marfan syndrome. *Science*, 312(5770):117-121.
- Hagan M, Wang L, Hanley JR, Park JS, Dent P. (2000). Ionizing radiation-induced mitogen-activated protein (MAP) kinase activation in DU145 prostate carcinoma cells: MAP kinase inhibition enhances radiation-induced cell killing and G2/M-phase arrest. *Radiat Research*, 153(4):371-383.
- Hall EJ. (2006). Intensity-modulated radiation therapy, protons, and the risk of second cancers. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 65(1):1-7.
- Han Y, Wang Y, Xu HT, Yang LH, Wei Q, Liu Y, Zhang Y, Zhao Y, Dai SD, Miao Y, Yu JH, Zhang JY, Li G, Yuan XM, Wang EH. (2009). X-radiation induces nonsmall-cell lung cancer apoptosis by upregulation of Axin expression. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 75(2):518-526.
- Harms-Ringdahl M, Nicotera P, Radford IR. (1996). Radiation induced apoptosis. *Mutat Res*, 366(2):171-9.
- Hayflick L. (1962). The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res*, 37: 614–636.

- Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P. (1997). TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature*, 390(6659):465-471.
- Helland A, Johnsen H, Frøyland C, Landmark HB, Saetersdal AB, Holmen MM,
  Gjertsen T, Nesland JM, Ottestad W, Jeffrey SS, Ottestad LO, Rodningen OK,
  Sherlock G, Børresen-Dale AL. (2006). Radiation-induced effects on gene expression: an in vivo study on breast cancer.*Radiother Oncol* 80(2):230-5.
- Hendry JH, West CM. (1997). Apoptosis and mitotic cell death: their relative contributions to normal-tissue and tumour radiation response. *Int J Radiat Biol.*, 71(6):709-719.
- Holt IJ, Harding AE, Morgan-Hughes JA. (1988). Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature*, 331:717–719.
- Hou J, Wang F, Kong P, Yu PK, Wang H, Han W. (2015). Gene Profiling Characteristics of Radioadaptive Response in AG01522 Normal Human Fibroblasts. *PLoS One.*, 10(4):e0123316.
- Howe O, O'Sullivan J, Nolan B, Vaughan J, Gorman S, Clarke C, McClean B, Lyng FM. (2009). Do radiation-induced bystander effects correlate to the intrinsic radiosensitivity of individuals and have clinical significance? *Radiat Res*, 171(5):521-529.
- Hromas R, Hufford M, Sutton J, Xu D, Li Y, Lu L. (1997). PLAB, a novel placental bone morphogenetic protein. *Biochim Biophys Acta*, old.: 1354(1):40-4.
- Inoue H és Tani K. (2014). Multimodal immunogenic cancer cell death as a consequence of anticancer cytotoxic treatments. *Cell Death Differ*, 21(1):39-49.
- Irons SL, Serra V, Bowler D, Chapman K, Militi S, Lyng F, Kadhim M. (2012). The effect of genetic background and dose on non-targeted effects of radiation. *Int J Radiat Biol.*, 88(10):735-742.
- Ishiyama H, Teh BS, Ren H, Chiang S, Tann A, Blanco AI, Paulino AC, Amato R. (2012). Spontaneous regression of thoracic metastases while progression of brain metastases after stereotactic radiosurgery and stereotactic body radiotherapy for metastatic renal cell carcinoma: abscopal effect prevented by the blood-brain barrier? *Clinl Genitourin Cancer*, 10(3):196-198.
- Ito N, Kawata S, Tamura S, Takaishi K, Shirai Y, Kiso S, Yabuuchi I, Matsuda Y, Nishioka M, Tarui S. (1991). Elevated levels of transforming growth factor beta

messenger RNA and its polypeptide in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*, 51(15):4080-4083.

- Jang CW, Chen CH, Chen CC, Chen JY, Su YH, Chen RH. (2002). TGF-beta induces apoptosis through Smad-mediated expression of DAP-kinase. *Nat Cell Biol*, 4(1):51-58.
- Jella KK, Garcia A, McClean B, Byrne HJ, Lyng FM. (2012). Cell death pathways in directly irradiated cells and cells exposed to medium from irradiated cells. *Int J Radiat Biol*, 89(3):182-190.
- Jobling AI, Nguyen M, Gentle A, McBrien NA. (2004) Isoform-specific changes in scleral transforming growth factor-beta expression and the regulation of collagen synthesis during myopia progression. *J Biol Chem.*, 279(18):18121-18126.
- Johnen H, Lin S, Kuffner T, Brown DA, Tsai VW, Bauskin AR, Wu L, Pankhurst G, Jiang L, Junankar S, Hunter M, Fairlie WD, Lee NJ, Enriquez RF, Baldock PA, Corey E, Apple FS, Murakami MM, Lin EJ, Wang C, During MJ, Sainsbury A, Herzog H, Breit SN. (2007). Tumor-induced anorexia and weight loss are mediated by the TGF-β superfamily cytokine MIC-1. *Nat Med*, (11):1333-40.
- Joiner M, van der Kogel A. (2009) *Basic Clinical Radiation Biology (Fourth Edition)*. London UK: Hodder Education. *Old*: 12, 33, 34, 39, 116
- Joiner MC, Marples B, Lambin P, Short SC, Turesson I. (2001). Low-dose hypersensitivity: current status and possible mechanisms. *I Int J Radiat Biol*, 49(2):379-389.
- Kadhim M, Salomaa S, Wright E, Hildebrandt G, Belyakov OV, Prise KM, Little MP. (2013). Non-targeted effects of ionising radiation-Implications for low dose risk. *Mutat Res*, 752(2):84-98.
- Kadhim MA. (2003). Role of genetic background in induced instability. *Oncogene*, 22, 6994–6999.
- Kadhim MA, Macdonald DA, Goodhead DT, Lorimore SA, Marsden SJ, Wright EG. (1992). Transmission of chromosomal instability after plutonium alpha-particle irradiation. *Nature*, 355(6362):738-40.
- Kaneko N, Vierkoetter A, Kraemer U, Sugiri D, Matsui M, Yamamoto A, Krutmann J, Morita A. (2012). Mitochondrial common deletion mutation and extrinsic skin ageing in German and Japanese women. *Experimental Dermatology*, 1:26-30.

- Karotki AV, Baverstock M. (2012). What mechanisms/processes underlie radiationinduced genomic instability. , 69:3351–3360.
- Kiefer J. (1971). Target theory and survival curves. J Theor Biol, 30(2):307-317.
- Kim GJ, Fiskum GM, Morgan WF. (2006). A role for mitochondrial dysfunction in perpetuating. *Cancer Res*, 66:10377–10383.
- Kim KW, Speirs CK, Jung DK, Lu B. (2011). The zinc ionophore PCI-5002 radiosensitizes non-small cell lung cancer cells by enhancing autophagic cell death. *J Thorac Oncol*, 6(9):1542-1552.
- Kim SZ, Kim DY, Yoo H, Yang HS, Shin SH, Hong EK, Cho HK, Lee SH. (2007). Radiation-induced Necrosis Deteriorating Neurological Symptoms and Mimicking Progression of Brain Metastasis after Stereotactic-guided Radiotherapy. *Cancer Res Treat*, 39(1): 16–21.
- Kingsley DM. (1994). The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes Dev*, 8:133-146.
- Kirkinezos IG, Moraes CT. (2001). Reactive oxygen species and mitochondrial diseases. *Cell & Developmental Biology*, 12:. 449–457.
- Kis E, Szatmári T, Keszei M, Farkas R, Ésik O, Lumniczky K, Falus A, Sáfrány G. (2006). Microarray analysis of radiation response genes in primary human fibroblasts. *Int J Radiat Biol*, 66 (5): 1506–1514.
- Korkalainen M., Huumonen K, Naarala J, Viluksela M., Juutilainen J. (2012). Dioxine induces genomic instability in mouse embryonic fibroblasts. *PLoS One*, 7: e37895.
- Kote-Jarai Z, Williams RD, Cattini N, Copeland M, Giddings I, Wooster R, tePoele RH, Workman P, Gusterson B, Peacock J, Gui G, Campbell C, Eeles R. (2004). Gene expression profiling after radiation-induced DNA damage is strongly predictive of BRCA1 mutation carrier status. *Clin Cancer Res.*, 10(3):958-63.
- Kretova M, Sabova L, Hodny Z, Bartek J, Kollarovic G, Nelson BD, Hubackova S, Luciakova K. (2014). TGF-β/NF1/Smad4-mediated suppression of ANT2 contributes to oxidative stress in cellular senescence. *Cell Signal*, 26(12):2903-2911.
- Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P,Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, El-Deiry WS, Golstein P, Green DR, Hengartner M, Knight

RA, Kumar S, Lipton SA, Malorni W, Nuñez G, Peter ME, Tschopp J, Yuan J, Piacentini M, Zhivoto B, Melino G. (2009). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ*, old.: 3–11.

- Kubota N, Hayashi J, Inada T, Iwamura Y. (1997). Induction of a particular deletion in mitochondrial DNA by X rays depends on the inherent radiosensitivity of the cells. *Radiat Res.*, 148(4):395-398.
- Kwak MK, Itoh K, Yamamoto M, Kensler TW. (2002). Enhanced expression of the transcription factor Nrf2 by cancer chemopreventive agents: role of antioxidant response element-like sequences in the nrf2 promoter. *Mol Cell Biol*, 22:2883– 2892.
- Kwak MK, Wakabayashi N, Itoh K, Motohashi H, Yamamoto M, Kensler TW. (2003). Modulation of gene expression by cancer chemopreventive dithiolethiones through the Keap1-Nrf2 pathway Identification of novel gene clusters for cell survival. J Biol Chem, 278:8135–8145.
- Kwon YW, Ueda S, Ueno M, Yodoi J, Masutani H. (2002). Mechanism of p53dependent apoptosis induced by 3-methylcholanthrene: involvement of p53 phosphorylation and p38 MAPK. *J Biol Chem.*, 277(3):1837-1844.
- Kyprianou N, Rock S. (1998). Radiation-induced apoptosis of human prostate cancer cells is independent of mutant p53 overexpression. *Anticancer Res*, 8(2A):897-905.
- Lambin P, Marples B, Fertil B, Malaise EP, Joiner MC. (1993). Hypersensitivity of a human tumour cell line to very low radiation doses. *Int J Radiat Biol*, 63(5):639-650.
- Leach JK, Van Tuyle G, Lin PS, Schmidt-Ullrich R, Mikkelsen RB. (2001). Ionizing Radiation-induced, Mitochondria-dependent Generation of Reactive Oxygen/Nitrogen. *Cancer Res*, 61: 3894–3901.
- Lee DH, Yang Y, Lee SJ, Kim KY, Koo TH, Shin SM, Song KS, Lee YH, Kim YJ, Lee JJ, Choi I, Lee JH. (2003). Macrophage Inhibitory Cytokine-1 Induces the Invasiveness of Gastric Cancer Cells by Up-Regulating the Urokinase-type Plasminogen Activator System. *Cancer Res*, old.: 63(15):4648-55.

- Levine AJ. (1997). p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*, 88(3):323-31.
- Li J, Yang L, Qin W, Zhang G, Yuan J, Wang F (2013) Adaptive induction of growth differentiation factor 15 attenuates endothelial cell apoptosis in response to high glucose stimulus *PloS One* 8(6):e65549
- Lin HK, Bergmann S, Pandolfi PP. (2004). Cytoplasmic PML function in TGF-beta signalling. *Nature*. , 431(7005):205-211.
- Lin PH, Lee SH, Su CP, Wei YH. (2003). Oxidative damage to mitochondrial DNA in atrial muscle of patients with atrial fibrillation. *Free Radic Biol Med*, 35 (10): 1310–1318.
- Lippens S, Hoste E, Vandenabeele P, Agostinis P, Declercq W. (2009). Cell death in the skin. *Apoptosis*, 14(4):549-69.
- Little JB, Nagasawa H, Pfenning T, Vetrovs H. (1997). Radiation-induced genomic instability: delayed mutagenic and cytogenetic effects of X rays and alpha particles. *Radiat Res*, 148:299–307.
- Little MP, Tawn EJ, Tzoulak Ii, Wakeford R, Hildebrandt G, Paris F, Tapio S, Elliotta P. (2008). A Systematic Review of Epidemiological Associations between Low and Moderate Doses of Ionizing Radiation and Late Cardiovascular Effects and Their Possible Mechanisms. *Radiat Res*, (169) 99–109.
- Liu Y, Teige I, Birnir B, Issazadeh-Navikas S. (2006). Neuron-mediated generation of regulatory T cells from encephalitogenic T cells suppresses EAE. *Nat Med*, 12(5):518-525.
- Liu ZY, Zhang GL, Wang MM, Xiong YN, Cui HQ. (2011). MicroRNA-663 targets TGFB1 and regulates lung cancer proliferation. *Asian Pac J Cancer Prev*, 12(11):2819-2823.
- Long JR, Liu PY, Liu YJ, Lu Y, Xiong DH, Elze L, Recker RR, Deng HW. (2003). APOE and TGF-beta1 genes are associated with obesity phenotypes. *J Med Genet.*, 40(12):918-24.
- Luo S, Kleemann GA, Ashraf JM, Shaw WM, Murphy CT. (2010). TGF-β and insulin signaling regulate reproductive aging via oocyte and germline quality maintenance. *Cell.*, 143(2):299-312.

- Lyng FM, Seymour CB, Mothersill C. (2002). Early events in the apoptotic cascade initiated in cells treated with medium from the progeny of irradiated cells. *Radiat Prot Dosimetry*, 99(1-4):169-72.
- Mac Manus MP, Hicks RJ, Matthews JP, Wirth A, Rischin D, Ball DL. (2005). Metabolic (FDG-PET) response after radical radiotherapy/chemoradiotherapy for non-small cell lung cancer correlates with patterns of failure. *Lung Cancer*, 49(1):95-108.
- Majora M, Wittkampf T, Schuermann B, Schneider M, Franke S, Grether-Beck S, Wilichowski E, Bernerd F, Schroeder P, Krutmann J. (2009). Functional Consequences of Mitochondrial DNA Deletions in Human Skin Fibroblasts. Am J Pathol, 175(3): 1019–1029.
- Mancini F, Moretti F. (2009). Mitochondrial MDM4 (MDMX): an unpredicted role in the p53-mediated intrinsic apoptotic pathway. *Cell Cycle.*, 8(23):3854-3859.
- Marples B, Joiner MC. (2000). Modification of survival by DNA repair modifiers: a probable explanation for the phenomenon of increased radioresistance. *Int J Radiat Biol*, 76(3):305-312.
- Marples B, Lambin P,Skov KA,Joiner MC. (1997). Low dose hyper-radiosensitivity and increased radioresistance in mammalian cells. *Int J Radiat Biol*, 71 (6): 721-735.
- McCord JM. (2008). Superoxide dismutase, lipid peroxidation, and bell-shaped dose response curves. *Dose Response*, 6:223–238.
- Meng H, Terado T, Kimura H. (1998). Apoptosis induced by X-rays and chemical agents in murine fibroblastic cell lines with a defect in repair of DNA double-strand breaks. *Int J Radiat Biol*, 73(5):503-510.
- Mezentsev A, Amundson SA. (2011). Global gene expression responses to low- or high-dose radiation in a human three-dimensional tissue model. *Radiation Res.*, 175(6):677-88.
- Mi J, Dziegielewski J, Bolesta E, Brautigan DL, Larner JM. (2009). Activation of DNA-PK by Ionizing Radiation Is Mediated by Protein Phosphatase 6. *PLoS* One., 4(2):e4395.
- Minafra L, Bravata V. (2014). Cell and molecular response to IORT treatment. *Translational Cancer Res*, 3(1):32-47.

- Mitsutake N, Namba H, Shklyaev SS, Tsukazaki T, Ohtsuru A, Ohba M, Kuroki T, Ayabe H, Yamashita S. (2001). PKC delta mediates ionizing radiation-induced activation of c-Jun NH(2)-terminal kinase through MKK7 in human thyroid cells. *Oncogene*, 20(8):989-996.
- Modica-Napolitano JS, Singh KK. (2002). Mitochondria as targets for detection and treatment of cancer. *Expert Rev Mol Med.*, 4(9):1-19.
- Morgan WF. (2003). Non-targeted and delayed effects of exposure to ionizing radiation I-II. *Radiation Res*, 159:567-596.
- Morgan WF, Sowa MB. (2015). Non-targeted effects induced by ionizing radiation: mechanisms and potential impact on radiation induced health effects. *Cancer Lett*, 356(1):17-21.
- Moses HL, Serra R. (1996). Regulation of differentiation by TGF-β. *Curr Opin Genet Dev*, 6 (5): 581–586.
- Mothersill C, Bucking C, Smith RW, Agnihotri N,O'Neill A ,Kilemade M, Seymour CB. (2006). Communication of Radiation-Induced Stress or Bystander Signals between Fish in Vivo. *Environmental Technological Science Letters*, old.: 40 (21), pp 6859–6864.
- Mothersill C, Saroya R, Smith RW, Singh H, Seymour CB. (2010). Serum serotonin levels determine the magnitude and type of bystander effects in medium transfer experiments. *Radiat Res.*, 174(1):119-23.
- Mothersill C, Seymour C (1997). Medium from irradiated human epithelial cells but not human fibroblasts reduces the clonogenic survival of unirradiated cells. *Int J Radiat Biol*. 71(4):421-7
- Müller K, Meineke V. (2007). Radiation-induced alterations in cytokine production by skin cells. *Exp Hematol.*, 35(4 Suppl 1):96-104.
- Munshi A., Hobbs M., Meyn R.E. (2005). Clonogenic Cell Survival Assay. In *Methods Mol Med* (110:21-8). New Yersey: Humana Press.
- Murphy JEJ, Nugent S, Seymour C, Mothersill C. (2005). Mitochondrial DNA point mutations and a novel deletion induced by direct low-LET radiation and by medium from irradiated cells. *Mutat Res*, 585: 127-136.

- Naka K, Hoshii T, Muraguchi T, Tadokoro Y, Ooshio T, Kondo Y, Nakao S, Motoyama N, Hirao A. (2010). TGF-beta-FOXO signalling maintains leukaemia-initiating cells in chronic myeloid leukaemia. *Nature*, 463(7281):676-680.
- Nicklas JA,Brooks EM, Hunter TC, Single R, Branda RF. (2004). Development of a Quantitative PCR (TaqMan) Assay for Relative Mitochondrial DNA Copy Number and the Common Mitochondrial DNA Deletion in the Rat. *Environ Mol Mutagen*, 44:313–320.
- Nugent SM, Mothersill CE, Seymour C, McClean B, Lyng FM, Murphy JE. (2007). Increased mitochondrial mass in cells with functionally compromised mitochondria after exposure to both direct gamma radiation and bystander factors. *Radiat Res*, 168: 134–142.
- Nystrom T. (2005). Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. *Embo J*, 24:1311–1317.
- Okada H és Mak TW. (2004). Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. *Nat Rev Cancer*, (4) 592-603.
- Olive PL, Durand RE. (1997). Apoptosis: an indicator of radiosensitivity in vitro? *Int J Radiat Biol*, 71(6):695-707.
- Osada H, Yoshitake Y, Ikeda T, Ishigaki Y, Takata T, Tomosugi N, Sasaki H, Yonekura H. (2011) Ultraviolet B-induced expression of amphiregulin and growth differentiation factor 15 in human lens epithelial cells. *Mol Vis*, 17:159-169.
- Osada M, Park HL, Park MJ, Liu JW, Wu G, Trink B, Sidransky D. (2007). A p53-type response element in the GDF15 promoter confers high specificity for p53 activation. *Biochem Biophys Res Commun*, 354 (4): 913–918.
- Pandey BN, Gordon DA, Pain D, Azzam EI. (2006). Normal human fibroblasts exposed to high or low dose ionizing radiation: differential effects on mitochondrial protein import and membrane potential. *Antioxid Redox Signal.*, 8:1253–1261.
- Panganiban RA, Mungunsukh O, Day RM. (2012). X-irradiation induces ER stress, apoptosis, and senescence in pulmonary artery endothelial cells. *Int J Radiat Biol*, 89(8):656-667.
- Panganiban RAM, Andrew L. Snow AL, Day RM. (2013). Mechanisms of Radiation Toxicity in Transformed and non.transformed cells. *Int J Mol Sci*, 14, 15931-15958.

- Paralkar WM, Vail AL, Grasser WA, Brown TA, Xu H, Vukicevic S, Ke HZ, Qi H, Owen TA, Thompson DD. (1998). Cloning and Characterization of a Novel Member of the Transforming Growth Factor-β/Bone Morphogenetic Protein Family. *J Biol Chem*, 273: 13760-13767.
- Parvez K, Parvez A, Zadeh G. (2014). The diagnosis and treatment of pseudoprogression, radiation necrosis and brain tumor recurrence. *Int J Mol Sci*, 15(7):11832-11846.
- Patrushev M, Kasymov V, Patrusheva V, Ushakova T, Gogvadze V, Gaziev AI. (2006). Release of mitochondrial DNA fragments from brain mitochondria of irradiated mice. *Mitochondrion*, 6:43–47.
- Peng TI, Yu PR, Chen JY, Wang HL, Wub HY, Weic YH, Jou MJ. (2005). Visualizing common deletion of mitochondrial DNA-augmented mitochondrial reactive oxygen species generation and apoptosis upon oxidative stress. *Biochim Biophys Acta*, 1762 (2): 241–255.
- Pesznyák Cs, Sáfrány G. (2013). *Sugárbiológia*. BME elekktronikus tankönyv.old:63, 66, 67
- Poon RC, Agnihotri N, Seymour C, Mothersill C. (2007). Bystander effects of ionizing radiation can be modulated by signaling amines. *Environ Res.*, 105(2):200-211.
- Prise KM, O'Sullivan JM. (2009). Radiation-induced bystander signalling in cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, (9) 351-360.
- Prithivirajsingh S, Story MD, Bergh SA, Geara FB, Ang KK, Ismail SM, Stevens CW, Buchholz TA, Brock WA. (2004). Accumulation of the common mitochondrial DNA deletion induced by ionizing radiation. *FEBS Letters*, 271: 227–232.
- Quarmby S, Fakhoury H, Levine E, Barber J, Wylie J, Hajeer AH, West C, Stewart A, Magee B, Kumar S. (2003). Association of transforming growth factor beta-1 single nucleotide polymorphisms with radiation-induced damage to normal tissues in breast cancer patients. *Int J Radiat Biol*, 79(2):137-143.
- Quarmby S, West C, Magee B, Stewart A, Hunter R, Kumar S. (2002). Differential expression of cytokine genes in fibroblasts derived from skin biopsies of patients who developed minimal or severe normal tissue damage after radiotherapy. *Radiat Res.*, 157(3):243-8.

- Ramírez-Miranda A, Navas-Pérez A, Gurria-Quintana L, Vargas-Ortega J, Murillo-Correa C, Zenteno JC. (2008). PCR-based detection of heteroplasmic deleted mitochondrial DNA in Kearns-Sayre syndrome. Archivos de la Sociedad Espanola de Oftalmogia, 83: 155-160.
- Rashi-Elkeles S, Warnatz HJ, Elkon R, Kupershtein A, Chobod Y, Paz A, Amstislavskiy V, Sultan M, Safer H, Nietfeld W, Lehrach H, Shamir R, Yaspo ML, Shiloh Y. (2014). Parallel profiling of the transcriptome, cistrome, and epigenome in the cellular response to ionizing radiation . *Sci Signal.*, 7(325):rs3.
- Raynaud CM, Sabatier L, Philipot O, Olaussen KA, Soria JC. (2006). Telomere length, telomeric proteins and genomic instainstability during the multistep carcinogenic process. *Crit Rev Oncol Hematol*, 66:99–117.
- Ricchetti M, Fairhead C, Dujon B. (1999). Mitochondrial DNA repairs double-strand breaks in yeast. *Nature*, 402:96–100.
- Robbins ME, Zhao W. (2004). Chronic oxidative stress and radiation-induced late normal tissue injury: a review. *Int J Radiat Biol.*, 80:251–259.
- Roberts AB, Sporn MB. (1993). Physiological Actions and Clinical Applications of Transforming Growth Factor-β (TGF-β). *Informa Healthcare*, old.: Volume 8, 1:1-9.
- Rödel C, Haas J, Groth A, Grabenbauer GG, Sauer R, Rödel F. (2001). Spontaneous and radiation-induced apoptosis in colorectal carcinoma cells with different intrinsic radiosensitivities: survivin as a radioresistance factor. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 55(5):1341-1347.
- Rogounovitch TI, Saenko VA, Shimizu-Yoshida Y, Abrosimov AY, Lushnikov EF, Roumiantsev PO, Ohtsuru A, Namba H, Tsyb AF, Yamashita S. (2002). Large deletions in mitochondrial DNA in radiation-associated human thyroid tumors. *Cancer Res*, 62(23):7031-7041.
- Rötig A, Cormier V, Blanche S, Bonnefont JP, Ledeist F, Romero N, Schmitz J, Rustin P, Fischer A, Saudubray JM. (1990). Pearson's marrow-pancreas syndrome: a multisystem mitochondrial disorder in infancy. *J Clin Invest*, 86:1601-1608.
- Russo T, Zambrano N, Esposito F, Ammendola R, Cimino F, Fiscella M, Jackman J, O'Connor PM, Anderson CW, Appella E. (1995). A p53-independent pathway

for activation of WAF1/CIP1 expression following oxidative stress. *J Biol Chem.*, 270(49):29386-29391.

- Samuels DC, Schon EA, Chinnery PF. (2004). Two direct repeats cause most human mtDNA deletions. *Trends in Genetic*, 20(9):393-8.
- Scandura JM, Boccuni P, Massagué J, Nimer SD. (2004). Transforming growth factor beta-induced cell cycle arrest of human hematopoietic cells requires p57KIP2 up-regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(42):15231-15236.
- Schapira AH, Cooper JM. (1992). Mitochondrial function in neurodegeneration and ageing. *Mutat Res.*, 275(3-6):133-143.
- Schilling-Tóth B, Sándor N, Kis E, Kadhim M, Sáfrány G, Hegyesi H. (2011). Analysis of the common deletions in the mitochondrial DNA is a sensitive biomarker detecting direct and non-targeted cellular effects of low dose ionizing radiation. *Mutat Res*, 33-39.
- Schon EA, Rizzuto R, Moraes CT, Nakase H, Zeviani M, DiMauro S. (1989). A direct repeat is a hotspot for large-scale deletion of human mitochondrial DNA. *Science*, 244 (4902): 346-349.
- Schubert C, Hong S, Natarajan L, Mills PJ, Dimsdale JE. (2007). The association between fatigue and inflammatory marker levels in cancer patients: a quantitative review. *Brain Behav Immun*, 21: 413-427.
- Sciacco M, Bonilla E, Schon EA, DiMauro S, Moraes CT. (1994). Distribution of wildtype and common deletion forms of mtDNA in normal and respiration-deficient muscle fibers from patients with mitochondrial myopathy. *Human Molecular Genetics*, 3(1):13-19.
- Scott I, Joule RJ. (2010). Mitochondrial fission and fusion. *Essays in Biochemistry*, 47: 85–98.
- Selzer E, Hebar A. (2011). Basic principles of molecular effects of irradiation. Wiener Medizinischer Wochenschrift, old.: (162/3–4) 47–54.
- Shariat SF, Lotan Y, Saboorian H, Khoddami SM, Roehrborn CG, Slawin KM, Ashfaq R. (2004). Survivin expression is associated with features of biologically aggressive prostate carcinoma. *Cancer*, 100(4):751-757.
- Shay JW, Werbin H. (1992). New evidence for the insertion of mitochondrial DNA into the human genome: significance for cancer and aging. *Mutat Res*, 275:227–235.

- Shinohara A, Ogawa T. (1995). Homologous recombination and the roles of doublestrand breaks. *Trends Biochem Sci*, 20(10):387-391.
- Shuryak I, Brenner DJ. (2012). Mechanistic analysis of the contributions of DNA and protein damage to radiation-induced cell death. *Radiat Res*, 178(1):17-24.
- Simon HU, Haj-Yehia A, Levi-Schaffer F. (2000). Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis*, 5 (5): 415-418.
- Siva S, MacManus MP, Martin RF, Martin OA. (2015). Abscopal effects of radiation therapy: A clinical review for the radiobiologist. *Cancer Lett*, 356(1):82-90.
- Sokolov M, Panyutin IG, Neumann R. (2006). Genome-wide gene expression changes in normal human fibroblasts in response to low-LET gamma-radiation and high-LET-like 125IUdR exposures. *Radiat Prot Dosimetry*, 122(1-4):195-201.
- Sokolov MV, Smirnova NA, Camerini-Otero RD, Neumann RD, Panyutin IG. (2006). Microarray analysis of differentially expressed genes after exposure of normal human fibroblasts to ionizing radiation from an external source and from DNAincorporated iodine-125 radionuclide. *Gene*, 382:47-56.
- Solinas G, Marchesi F, Garlanda C, Mantovani A, Allavena P. (2010). Inflammationmediated promotion of invasion and metastasis. *Cancer Metastasis Rev*, 29(2):243-248.
- Somosy Z. (2000). Radiation response of cell organelles. *Micron*, 31(2):165-81.
- Sosna J, Voigt S, Mathieu S, Lange A, Thon L, Davarnia P, Herdegen T, Linkermann A, Rittger A, Chan FK, Kabelitz D, Schütze S, Adam D. (2014). TNF-induced necroptosis and PARP-1-mediated necrosis represent distinct routes to programmed necrotic cell death. *Cell Mol Life Sci*, 71(2):331-348.
- Spitz DR, Azzam EI, Li JJ, Gius D. (2004). Metabolic oxidation/reduction reactions and cellular responses to ionizing radiation: a unifying concept in stress response biology. *Cancer Metastasis Rev*, 23(3-4):311-322.
- Srinivasula SM, Ahmad M, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES. (1998). Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization. *Mol Cell.*, 1(7):949-57.
- Strelau J, Sullivan A, Böttner M, Lingor P, Falkenstein E, Suter-Crazzolara C, Galter D, Jaszai J, Krieglstein K, Unsicker K. (2000). Growth/differentiation factor-15/macrophage inhibitory cytokine-1 is a novel trophic factor for midbrain dopaminergic neurons in vivo. *J Neurosci*, 20(23):8597-603.

- Stroschein SL, Wang W, Zhou S, Zhou Q, Luo K. (1999). Negative feedback regulation of TGF-beta signaling by the SnoN oncoprotein. *Science*, 286(5440):771-774.
- Suciu D. (1983). Cellular death by apoptosis in some radiosensitive and radioresistant mammalian tissues. *J Theor Biol*, 105(3):391-401.
- Sugihara T, Magae J, Wadhwa R, Kaul SC, Kawakami Y, Matsumoto T, Tanaka K. (2004). Dose and dose-rate effects of low-dose ionizing radiation on activation of Trp53 in immortalized murine cells. *Radiat Res.*, 162(3):296-307.
- Surova O, Zhivotovsky B. (2013). Various modes of cell death induced by DNA damage. *Oncogene*, 32, 3789–3797.
- Tan M, Wang Y, Guan K, Sun Y. (2000). PTGF-beta, a type beta transforming growth factor (TGF-beta) superfamily member, is a p53 target gene that inhibits tumor cell growth via TGF-beta signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97 (1): 109–114.
- te Poele RH, Okorokov AL, Jardine L, Cummings J, Joel SP. (2002). DNA damage is able to induce senescence in tumor cells in vitro and in vivo. *Cancer Res*, 62(6):1876-1883.
- Trovik J, Salvesen HB, Cuppens T, Amant F, Staff AC. (2014). Growth differentiation factor-15 as biomarker in uterine sarcomas. *Int J Gynecol Cancer*, old.: 24(2):252-9.
- Tsai KK, Stuart J, Chuang YY, Little JB, Yuan ZM. (2009). Low-dose radiationinduced senescent stromal fibroblasts render nearby breast cancer cells radioresistant. *Radiat Res*, 172(3):306-13.
- UNSCEAR. (1993). Sources and effects of ionizing radiation, UNSCEAR 1993 report to the General Assembly, with scientific annexes. *United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation*, (old.: 1-922). New York.
- Valderrama-Carvajal, H., Cocolakis, E., Lacerte, A., Lee, E.-H., Krystal, G., Ali, S., Lebrun, J.-J. (2002). Activin/TGF-beta induce apoptosis through Smaddependent expression of the lipid phosphatase SHIP. *Cell Biol*, 4: 963-969.
- Vaseva AV, Moll UM. (2009). The mitochondrial p53 pathway. *Biochim Biophys Acta*, 1787(5):414-420.
- Verheij M, Bartelink H. (2000). Radiation-induced apoptosis. *Cell Tissue Res*, 301(1):133-142.

- Vilarino-Guell C, Smith AG, Dubrova YE. (2003). Germline mutation induction at mouse repeat DNA loci by chemical mutagens. *Mutat Res*, 526:63–73.
- Vujaskovic Z, Groen HJM. (2000). TGF-beta, radiation-induced pulmonary injury and lung cancer. *Int J Radiat Biol*, 76 (4): 511-516.
- Wall NA, Hogan BLM. (1994). TGF-β related genes in development. *Curr Opin Genet Dev*, 4 (4): 517–522.
- Wallace DC. (1999). Mitochondrial Diseases in Man and Mouse. *Mitochondria*, 283:1482-1488.
- Wallace DC. (2010). Mitochondrial DNA mutations in disease and aging. *Environ Mol Mutagen*, 51(5):440-450.
- Wang J, Zheng H, Sung CC, Richter KK, Hauer-Jensen M. (1998). Cellular sources of transforming growth factor-beta isoforms in early and chronic radiation enteropathy. *Am J Pathol.*, 153(5):1531-1540.
- Wang W, Esbensen Y, Kunke D, Suganthan R, Rachek L, Bjoras M, Eide L. (2011). Mitochondrial DNA damage level determines neural stem cell differentiation fate. *J Neurosci*, 31:9746–9751.
- Wang XB, Jiang XR, Yu XY, Wang L, He S, Feng FY, Guo LP, Jiang W, Lu SH. (2014). Macrophage inhibitory factor 1 acts as a potential biomarker in patients with esophageal squamous cell carcinoma and is a target for antibody-based therapy. *Cancer Science*, old.: 105(2):176-85.
- Warters RL, Hofer KG. (1977). Radionuclide toxicity in cultured mammalian cells. Elucidation of the primary site for radiation-induced division delay. *Radiat Res.* , 69(2):348-358.
- Warters RL, Packard AT, Kramer GF, Gaffney DK, Moos PJ. (2009). Differential gene expression in primary human skin keratinocytes and fibroblasts in response to ionizing radiation. *Radiat Res.*, 172(1):82-95.
- Waters KM, Stenoien DL, Sowa MB, von Neubeck C, Chrisler WB, Tan R, Sontag RL, Weber TJ. (2013). Annexin A2 modulates radiation-sensitive transcriptional programming and cell fate. *Radiat Res*, 179(1):53-61.
- Wersäll PJ, Blomgren H, Pisa P, Lax I, Kälkner KM, Svedman C. (2006). Regression of non-irradiated metastases after extracranial stereotactic radiotherapy in metastatic renal cell carcinoma. *Acta Oncol*, 45(4):493-7.

- Wolff S. (1992). Is radiation all bad? The search for adaptation. *Radiat Res*, 131(2):117-123.
- Wouters BG, Skarsgard LD. (1997). Low-dose radiation sensitivity and induced radioresistance to cell killing in HT-29 cells is distinct from the "adaptive response" and cannot be explained by a subpopulation of sensitive cells. *Radiat Res*, 148(5):435-42.
- Xiao M, Whitnall MH. (2009). Pharmacological countermeasures for the acute radiation syndrome. *Curr Mol Pharmacol*, 2(1):122-33.
- Xu J, Kimball TR, Lorenz JN, Brown DA, Bauskin AR, Klevitsky R, Hewett TE, Breit SN, Molkentin JD. (2006). GDF15/MIC-1 functions as a protective and antihypertrophic factor released from the myocardium in association with SMAD protein activation. *Circ Res.*, 98(3):342-350.
- Yang H, Asaad H, Held KD. (2005). Medium-mediated intercellular communication is involved in bystander responses of X-ray-irradiated normal human fibroblasts. *Oncogene*, 24, 2096–2103.
- Yang H, Filipovic Z, Brown D, Breit SN, Vassilev LT. (2003). Macrophage inhibitory cytokine-1: a novel biomarker for p53 pathway activation. *Mol Cancer Ther*, 2(10):1023-1029.
- Yokoyama Kobayashi M, Saeki M, Sekine S, Kato S. (1997). Human cDNA encoding a novel TGF-beta superfamily protein highly expressed in placenta. J Biochem, 122 (3): 622-626.
- Yoshida K, Kubo Y, Kusunoki Y, Morishita Y, Nagamura H, Hayashi I, Kyoizumi S. (2009). Caspase-independent cell death without generation of reactive oxygen species in irradiated MOLT-4 human leukemia cells. *Cell Immun*, 255 (1–2): 61–68.
- Yu L, Tumati V, Tseng SF, Hsu FM, Kim DN, Hong D, Hsieh JT, Jacobs C, Kapur P, Saha D. (2012). DAB2IP regulates autophagy in prostate cancer in response to combined treatment of radiation and a DNA-PKcs inhibitor. *Neoplasia*, 14(12):1203-1212.
- Zeviani M, Moraes CT, DiMauro S, Nakase H, Bonilla E, Schon EA, Rowland LP. (1988). Deletions of mitochondrial DNA in Kearns-Sayre syndrome. *Neurology*, 38(9):1339-46.

- Zhang B, Davidson MM, Hei TK. (2014). Mitochondria regulate DNA damage and genomic instability induced by high LET radiation. *Life Sci Space Res (Amst)*, 1:80-88.
- Zhang SB, Maguire D, Zhang M., Zhang Zh., Zhang A., Yin L., Zhang L., Huang L., Vidyasagar S., Swarts S., Okunieff P. (2013 a). The Murine Common Deletion: Mitochondrial DNA 3860-bp Deletion after Irradiation. *Radiat Res*, pp. 407-413.
- Zhang SB, Maguire D, Zhang M, Tian Y, Yang S, Zhang A, Casey-Sawicki K, Han D, Ma J, Yin L, Guo Y, Wang X, Chen C, Litvinchuk A, Zhang Z, Swarts S, Vidyasagar S, Zhang L, Okunieff P (2013 b) Mitochondrial DNA and functional investigations into the radiosensitivity of four mouse strains *Int J Cell Biol*; 2014:850460
- Zhang YE, Clement JQ, Gridley DS, Rodhe LH, Honglu WU. (2009). Protein expression profile changes in human fibroblasts induced by low dose energetic protons. Advances in Space Research , 44 (12): 1450-1456.
- Zhao W, Robbins ME. (2009). Inflammation and chronic oxidative stress in radiationinduced late normal tissue injury: therapeutic implications. *Curr Med Chem*, 16:130–143.
- Zhao Y, Zhong R, Sun L, Jia J, Ma S, Liu X. (2015). Ionizing Radiation-Induced Adaptive Response in Fibroblasts under Both Monolayer and 3-Dimensional Conditions. *Plos One*, 10(3):e0121289.
- Zhou T, Chou JW, Simpson DA, Zhou Y, Mullen TE, Medeiros M, Bushel PR, Paules RS, Yang X, Hurban P, Lobenhofer EK, Kaufmann WK. (2006). Profiles of global gene expression in ionizing-radiation-damaged human diploid fibroblasts reveal synchronization behind the G1 checkpoint in a G0-like state of quiescence. *Environ Health Perspect.*, 114(4):553-9.
- Ziegler C, Wessels JM. (1998). Investigation of lipid peroxidation in liposomes induced by heavy ion irradiation. *Radiat Environ Biophys*, 37:95–100.

## 11. Saját publikációk jegyzéke

### Az értekezés témájában megjelent közlemények

#### 11.1. Folyóirat cikkek

- <u>Schilling-Tóth B</u>, Sándor N, Walter FR, Bocsik A, Sáfrány G, Hegyesi H (2014) Role of GDF15 in radiosensitivity of breast cancer cells *Cent Eur J Biol* 9:(10) 982-992. IF: 0.633\*
- Mothersill C, Antonelli F, Dahle J, Dini V, Hegyesi H, Iliakis G, Kämäräinen K, Launonen V, Lumniczky K, Lyng F, Safrany G, Salomaa S, <u>Schilling-Tóth B</u>, Tabocchini A, Kadhim MA (2012) A laboratory inter-comparison of the importance of serum serotonin levels in the measurement of a range of radiation-induced bystander effects: Overview of study and results presentation. *Int J Radiat Biol* 88: 763-769. IF: 1.895
- <u>Schilling-Tóth B</u>, Sándor N, Kis E, Kadhim M, Sáfrány G, Hegyesi H (2011) Analysis of the common deletions in the mitochondrial DNA is a sensitive biomarker detecting direct and non-targeted cellular effects of low dose ionizing radiation *Mutat. Res.* 716:(1-2) 33-39. IF: 3.035

### 11.2. Könyvrészletek

Hegyesi H, Lambert JR, Sándor N, <u>Schilling-Tóth B</u>, Sáfrány G (2011) Validation of Growth Differentiation Factor (GDF-15) as a Radiation Response Gene and Radiosensitizing Target in Mammary Adenocarcinoma Model. *Breast Cancer: Recent advances in biology, imaging and therapeutics* 381-396.

### Független közlemények

Hejjas K, Szekely A, Domotor E, Halmai Z, Balogh G, <u>Schilling B</u>, Sarosi A, Faludi G, Sasvari-Szekely M, Nemoda Z (2009) Association between depression and the Gln460Arg polymorphism of P2RX7 gene: A dimensional approach *Am J Med Genet B* 150:(2) 295-299. Sándor N, Walter FR, Bocsik A, <u>Schilling-Tóth B</u>, Léner V, Varga Z, Kahán Zs, Deli MA, Sáfrány G, Hegyesi H (2014) Low dose cranial irradiation-induced cerebrovascular damage is reversible in mice. *Plos One* 9:(11):e112397

# 12. Köszönetnyilvánítás

Témavezetőimnek dr. Hegyesi Hargitának és dr. Sáfrány Gézának a szakmai segítségért és tanácsokért.

Kollegáimnak: Sándor Nikolettnek, Kis Enikőnek, aszisztenseinknek: Fodor Bettynek, Lökős Ritának, Firgyesi Máriának és a többi kollegának a munkám és a disszertáció írása során nyújtott segítségért.

A SE Patológiai Doktori Iskolának a lehetőségért, hogy a disszertációmat elkészíthettem, külön köszönet Dr. Kovalszky Ilona professzor asszonynak a bátorításért.

A családomnak sok-sok szeretettel.

A munkámat az European Union NOTE projekt (FP6-036465/2006), az OTKA K77766 és az ETT 827-1/2009 pályázat keretében végezhettem.

\*