

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

Doktori tézisek

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. 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.

Tudjuk, hogy a sejtkárosodások a sejt típusától, a sugárzási körülményektől és a sugárzás nagyságától függően, különböző mértékűek és jelentőségűek lehetnek. A sugárzást követő különböző szöveti és a sugárterápia során fellépő egyéni reakciók, amik befolyásolhatják az alkalmazott kezelést is már régóta ismeretesek. Az olyan specifikus markerek keresése, amelyek előre jeleznék a kialakuló egyéni különbségeket és károsodásokat, mind a mai napig tart, hiszen a tényleges hatást egyelőre csak becsülni tudjuk a dózis és a sejtípus ismeretében, a sugárterápia során is alkalmazott modellekkel. Fontos azt is tudni, milyen hatása lehet akár a diagnosztikai vizsgálatok során elszenvedett alacsony, kis dózisu sugárkezelésnek, befolyásolja-e ezt a sejtek, szövetek sugárérzékenysége, mivel ebben az irodalomban nincs egyetértés. Ezeken a direkt hatásokon túl, mind kis, mind nagy dózisu expozíció esetén számolni kell a sugárzás úgynevezett nem célzott, káros hatásaival is, mint a bystander hatás, illetve a genomiális instabilitás.

Olyan biomarkerek és biológiai folyamatok megismerése, melyek ezekre az előre nem prediktálható folyamatokra irányulnak, segítik azok bekövetkezésének valószínűségét meghatározni. Mivel akár egy sejtben 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. A sugárválaszban és az egyéni sugárérzékenységekben szerepet játszó gének felderítése, illetve hatásának vizsgálata is közelebb vihet minket ezek pontos megismeréséhez. 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. Ezen elemek károsodása közvetlenül és rövid úton befolyásolja a sejt permeabilitását, a fehérjeszintézis dinamikáját, és végső soron kihat a sejt metabolizmusára, a sejtben belüli és sejt-sejt közötti kommunikációra. Ezért fontos a genomiális DNS sérülés mellett a sejtalkotók károsodásának vizsgálata is, melyekkel megállapítható a sejt állapota. A sejtalkotók közül a mitokondrium érzékeny a sugárzás következményeire, és fontos szerepet

játszik az oxidatív stresszre kialakuló válaszreakciókban. A sugárzás okozta nem célzott hatásainál a kialakuló genotoxikus hatásban és a genomiális instabilitásban is fontos szerepet tulajdonítanak ennek a sejtalkotónak, ezért megfelelő célpontja lehet ezeknek a vizsgálatoknak. **Kísérleteinkben a mitokondrium leggyakoribb mutációjának, mint új sugársérülési markernek a mennyiségi analizisével kvantifikáltuk a kis és nagy dózisu sugárkezelés direkt és nem célzott hatásait, különböző sugárérzékenységu normal fibroblaszt sejt kultúrákban.**

Az egyéni sugárérzékenységi reakciók vizsgálatánál másik modellrendszerünk egér emlőtumor sejt kultúra és annak genetikailag módosított változatai voltak. Ebben a rendszerben vizsgáltuk a Növekedési és differenciálódási gén 15 (Growth Differentiation Factor-15, GDF-15) expresszió szintjének hatásait, a módosítatlan, és a gént túl- illetve az alul expresszáló csendesített sejt vonalban. **Kutatásom során ennek a kiválasztott kandidáns génnek a hatásait tanulmányoztam, hogyan befolyásolja a sejt károsító folyamatokat és alakítja a sejtek sugárérzékenységi reakcióját.**

A GDF-15 normal szövetben is termelődő citokin, amely részt vesz DNS károsodás hatására kialakuló gyulladási és stressz válasz kialakulásában. Ezen kívül más célgénnel való transzaktivációban, szerepet játszik a sejt ciklus, a DNS hibajavítás és az apoptózis szabályozásában is. Az ionizáló sugárzás hatására indukálódik és p53 fehérje célgénjeként azonosították. Magas szintje sugárrezisztenciát okozott emlőtumor és orr-garat eredetű tumoros sejt vonalakban. Nincs ismert saját receptora, a TGF- β fehérjékhez hasonlóan a TGF- β receptorokon keresztül fejt ki aktivitását.

A gént korábban kutató csoportunk is azonosította, mint sugár válasz gént, ismert, hogy az expozíciót követően indukálódik, azonban a sugár válaszban betöltött funkciója még nem tisztázott. Munkacsoportunk egy korábbi vizsgálatban megállapította, hogy a gén expresszió szintje befolyásolja a sejtek sugárérzékenységét, a magas GDF-15 szint rezisztensebbé, míg a génextpresszió lecsendesítése érzékenyebbé tette a sejteket a sugárkezelésre.

A túltermelő és csendesített sejt vonalakat a módosítatlan sejt vonalhoz hasonlítva, megfigyelhettük, hogyan hat a GDF-15 expresszió szint változása a sejtekre, és hogyan módosítja a sugár expozíciót követően a válaszreakciókat, a sejtek túlélését, reaktív oxigén gyök kibocsátását, a sugárzásra érzékeny mitokondriális DNS mutációk felhalmozódását, és más, a sugárérzékenységben szerepet játszó sugár válasz gének, mint a TGF- β 1 és 2 expresszióját.

2. Célkitűzés

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

2.1. A kis és moderált dózisu sugárzás hatásainak leírása normál sejtben létrejövő mitokondriális DNS károsodáson keresztül.

2.1.1. A CD akkumuláció dózisfüggésének összehasonlítása sugárérzékeny és rezisztens humán fibroblaszt sejtvonalakban

2.1.2. CD akkumuláció kimutatása szomszédos sejtekben.

2.1.2.1. A különböző szomszédosági hatást közvetítő módszerek összehasonlítása.

2.1.2.2. A szomszédosági hatás kiváltásában a donor és akceptor sejt szerepének bemutatása.

2.1.2.3. A szerotonin szerepének vizsgálata a szomszédosági hatásban.

2.1.3. Utódsejtekben megjelenő, genomiális instabilitás összehasonlítása sugárérzékeny és rezisztens fibroblasztokban

2.2. Tumor sejtvonalakban a GDF-15 szerepének vizsgálata a sugárválaszban

2.2.1. A sugárzás indukálta GDF-15 expresszió kimutatása.

2.2.2. 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:

2.2.2.1. a sejtek növekedésére,

2.2.2.2. a sugárérzékenységekben szerepet játszó TGF- β 1 és 2 génexpresszió változásaira

2.2.2.3. a mitokondriális „Common” deléció kialakulására

2.2.3. A GDF-15 szint befolyásának vizsgálata a sugárkezelés következményeire

2.2.3.1. A GDF-15 expresszió szint hatásának vizsgálata a sugárzás indukálta túlélésre

2.2.3.2. A GDF-15 befolyásának vizsgálata a sugárzás-indukált TGF- β 1 és 2 expresszióra

2.2.3.3. A sugárexpozíciót követő reaktív oxigén gyök mennyiségének és az irányított sejthalállal elpusztuló sejtek mennyiségi összehasonlítása a különböző GDF-15 expresszió szintű sejtvonalakban sugárzás hatására

2.2.3.4. A GDF-15 szint által alakított oxidatív stresszre érzékeny „Common” mitokondriális deléción vizsgálata sugárzás hatására

3. Módszerek

3.1. Sejtvonalak

3.1.1. Humán fibroblaszt sejtvonalak

Emlőrákos, sugárkezelt páciensek bőr-biopsziából kitenyésztett primer (BS2, CR2), illetve a primer tenyészetből h-TERT génnel immortalizált S1-hTERT fibroblaszt kultúra. A negyedik, fiatal, nem daganatos beteg bőrbopsziájából hTERT génnel immortalizált F11-hTERT sejttenyészet. A sejteket 10 % szérumot (Fetal Bovine Serum, Sigma-Aldrich) és 1% Fungimycint és Streptomycint (Gibco, Grand Island, NY, USA) tartalmazó Dulbecco' Modified Eagle Médiumon (DMEM) (Sigma-Aldrich) tartottuk.

3.1.2. Tumorsejtvonalak

LM2 egér emlő tumor sejtvonala és génmódosított sejtvonala. A két LM2 módosított sejtvonala a GDF-15 gént túltermelő (LM2-GDF15) és a géncsendesítéssel létrehozott (LM2-shGF15) változata. A sejteket 10 % szérumot (Sigma-Aldrich) és 1% Fungimycint és Streptomycint tartalmazó (Gibco) DMEM-en (Sigma-Aldrich) tartottuk, a génmódosított sejtvonalakhoz a megfelelő szelektív antibiotikumot adtuk.

3.2. Sugárkezelés

A direkt sugárkezelés a fibroblaszt sejttenyészet esetében egyszeri ^{60}Co - γ sugárzással történt (Gammatron-3 készülék, Siemens Erlangen, Németország), kis dózis (100 mGy) és közepes (2 Gy) dózis alkalmazásával. A dózisteljesítmény 2 Gy esetében 0,059 Gy/perc, 100 mGy esetében 0,0244 Gy/perc volt.

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

3.3. Kolónia assay

A sugárzás következtében fellépő sejtpusztulás mérésére kolónia assayt alkalmaztunk, mely során az egyszeri sugárkezelést követően a sejtek növekedésének megfelelő inkubációs idő elteltével a sejteket metanollal fixáltuk, és Commassie Blue BR-250 festékkel megfestettük a kialakult kolóniákat. A kolóniaszámlálás fénymikroszkóp alatt történt. Kolóniáknak azt a sejtcsoportot tekintettük, amelyet minimum 50 sejt alkotott. A kolónia-képzés (plating

efficacy, PE) és a túlélés (surviving fraction, SF) számolása Munshi és munkatársai által leírt módon történt (Munshi 2005).

3.4. Szemi-kvantitatív polimeráz láncreakció

A „common” mitokondriális deléció vizsgálatára polimeráz láncreakciót (PCR) alkalmaztunk. A mintákat szemi-kvantitatív PCR-rel amplifikáltuk először. Teljes izolált DNS-ből (MasterPure™ DNS izoláló kit, Epicentre Technologies Ltd, Madison, WI, USA) szaporítottuk fel a kívánt szekvenciát, a mintánk tartalmazta a nukleáris és a mitokondriális DNS-t is. A reakció során használt primerek (IDT Technologies, Neymark NY, USA) közül a „Common” deléciós mutáns meghatározására a primerek a deléción kívül helyezkedtek el, irodalmi adatok alapján validált primereket használtunk (Rogounovitch 2006). A vad típus meghatározására a primereket a deléción belülre terveztük, használtunk továbbá primereket a teljes mtDNS mennyiség meghatározására. Minden 50µl PCR reakcióelegyünk tartalmazott 1 µg DNS-t, 10x reakció puffert (1, 5mM), dNTP-t (0, 3mM), primer-t (0, 375 pM), és a DNS polimeráz enzimet (0,06 U/µl, Finnzymes Oy, Finland). A gyors, ciklikus hőmérséklet-váltásokhoz Bio-Rad PCR készüléket használtunk (Bio-Rad Laboratories, CA, USA).

3.5. Kvantitatív valós idejű PCR reakció

Kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakciót (qPCR) használtunk az egyszeri sugárkezelést követően fellépő mitokondriális „Common” deléciók felhalmozódásának kvantitatív mérésére, valamint a tumorsejtekben a kandidáns gének RNS expressziójának mérésére.

3.5.1. Mitokondriális deléció mérése

3.5.1.1. Humán fibroblasztokon

A humán fibroblasztokon a különböző genetikai háttérű és sugárérzékenységgű 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) qPCR reagenssel. A konfluens tenyészetből sejtszámolás után dózisonként 500.000 sejtet 25 cm² –es tenyésztőedényben inkubáltuk a kezelés előtt 24h-n keresztül. A sugárkezelést követően 37 °C-on inkubáltuk a sejteket. A DNS izolálást a sejtekből Epicentre MasterPure™ kittel végeztük.

A qPCR 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 Mixet. A detektálás és az analízis $\Delta\Delta CT$ módszerrel Corbett Rotor-gene Real-time PCR gépen (Qiagen, Hilden, Németország) történt, a CD mutánsok mennyiségi meghatározása, a vizsgált

termékmennyiség a nukleáris és mitokondriális DNS mennyiségét leíró termékekhez normalizált átlaga (ΔCT), a kezelt sejtekben a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva ($\Delta\Delta\text{CT}$).

3.5.1.2. Egér emlőtumor sejteken

Alkalmazhattuk a CD kimutatási módszert tumor sejtvonalakon is. A mitokondriális CD mennyiségi analízise a humán fibroblasztok méréséhez hasonlóan zajlott, a primerek a humán mintához hasonlóan helyezkedtek el, saját tervezésű és irodalomból átvett primereket használtunk (Zhang 2012). A teljes mitokondrium mennyiséget jellemző primerpár a mtDNS 12SrRNS-t kódoló szakaszán helyezkedett el, a nukleáris DNS jellemzésére a terméket a Cyclofillin C1 génre tervezett primerpár segítségével amplifikáltuk. A detektálás és az analízis $\Delta\Delta\text{CT}$ módszerrel Corbett Rotor-gene Real-time PCR gépen (Qiagen) történt.

3.5.1.3. 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 sejteket egyszeri gamma sugárkezeléssel (0 Gy, 0,1 és 2 Gy) kezeltük. A kiosztott sejtekből hetente sejtszámolás után továbboltottunk 300 ezer sejtet, a fennmaradó mennyiséget eltettük DNS izolálásra CD vizsgálathoz.

3.5.1.4. Szomszédsági vizsgálat

A szomszédsági kísérleteket primer és immortalizált sejtvonalon végeztünk, kétféle módszerrel. Mindkét módszernél azonos sejtszámot vizsgáltunk. 500 ezer sejtet oltottunk ki 25 ml-es tenyésztőedényekbe a sugárkezelés előtt 24 órával. Médiumcserés módszernél a donor sejteket besugaraztuk, majd a sugárkezelés után 1 órával a médiumot áthelyeztük a recipiens szomszédsági sejtekre. A szomszédsági sejtek a kezelt médiumban nőttek 72 órán keresztül. A „co-culture” módszernél a direkt sugárkezelt sejteket egy inzerter a besugarazatlan sejtekre helyeztük, a kezeletlen sejtek 72 órán keresztül együtt nőttek a sugárkezelt sejtekkel. A 72 óra után a sejtekből DNS-t izoláltunk, és valós idejű PCR-rel megállapítottuk a deléciós mitokondriumok arányát a fibroblaszt tenyészetekben.

Teszteltem a szerotonin szintjének befolyását a sugárzás okozta szomszédsági hatásra. F11-hTERT sejteken médiumcserés technikával mértem a különböző szerotonin tartalmú kondicionált médiumok (alacsony, magas, valamint egy nem meghatározott szerotonin tartalmú kondicionált médium) hatását a mutáns mitokondriumok mennyiségére.

3.5.2 Célgének expressziójának meghatározása Real-time PCR-rel

LM2 és módosított sejtvonalait használtuk. kezeletlen és sugárkezelt (2 Gy) sejtekből RNS-t izoláltunk RNeasy Mini kit (Qiagen) segítségével, 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 protokollja alapján készítettük.

A kandidáns gének a GDF-15 gén, a TGF-β1 és a TGF-β2, valamint az analízis során használt háztartási gének voltak. Felszaporításuk a rájuk tervezett primerpárok segítségével történt. A vizsgált gének relatív expressziójának kvantifikálása ΔΔCt analízissel történt.

3.6 WST assay

WST-1 assayt (Roche Life Sciences, Penzberg, Germany) alkalmaztunk az LM2 és genetikailag módosított tumorsejtvonalainak életképességének a vizsgálatára.

3.7 Apoptózis mérés

A programozott sejthalál mérésére a különböző sejtvonalakban NucView™ 488 MitoView™ 633 (Biotium Inc, Hayward, CA, USA) apoptózis kit-tet használtunk.

3.8 ROS mérés

A reaktív oxigén gyökök mérésére CellROX® Oxidative Stress Reagenst (Life Technologies, Grand Island, NY, USA) használtunk.

3.9 ELISA assay

A TGF-β1 ELISA mérés az LM2 és módosított sejtvonalainak felülúszójából mérve R & D TGF-β1 Mouse ELISA kittel (R&D Systems, Abingdon, UK), a gyártó protokollja alapján történt.

4. Eredmények

4.1. Humán fibroblasztokon végzett vizsgálatok

4.1.1. *In vitro* sugárérzékenységi vizsgálatok

A sugárérzékenység megállapítására a primer sejtvonalakban és az immortalizált sejtvonalakban kolónia assayt használtunk. Az vizsgálat során a 2 Gy sugárkezelés hatására túlélő frakció (SF2) értéke adta meg a sejtvonalak *in vitro* sugárérzékenységét, a 0,3 feletti értéket vettük normál/rezisztens a 0,2 alatti értéket sugárérzékeny sejtvonalknak.

4.1.2. Mitokondriális „Common” deléció (CD) kimutatásának optimalizálása

Szemi-kvantitatív PCR reakció során optimalizáltuk a CD kimutatási módszert, a PCR termékek hosszát 1%-os agaróz gélen ellenőriztük. A megfelelő primereket és kondíciókat kiválasztottuk kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakcióhoz.

4.1.3. Mitokondriális „Common” deléció mennyiségi analízise

A kvantitatív valós idejű PCR vizsgálatoknál (qPCR) a cél a CD mutánsok követése volt időben, összehasonlítva a sugárérzékeny (CS2, S1-hTERT) és normál, vagy sugárrezisztens (BR2, F11-hTERT) sejtvonalakokat. A hosszú idejű követés a kis és moderált dózisok késői hatását volt hivatott modellezni, a deléciós mutánsok felhalmozódásának mérésével, figyelembe véve a sejtek sugárérzékenységét is.

4.1.3.1. A „common deléció” felhalmozódása a sugárérzékenység függvényében

Összehasonlítottuk mind a négy humán fibroblaszt sejtvonalba a deléciós mutánsok mennyiségét sugárkezelés hatására. Hét nappal az egyszeri 2 Gy sugárkezelést követően a sugárérzékeny sejtvonalknál szignifikánsan magas volt. Vizsgáltuk a sugárérzékenység és a dózis szerepét a „common deléciós” mutánsok keletkezésében az immortalizált sugárérzékeny S1-hTERT és rezisztens F11-hTERT sejtvonalba. CD deléciós mutánsok akkumulációja dózisfüggő volt, mely a sugárérzékeny sejtvonalba ($P < 0,001$) magasabb mértékűnek bizonyult, már alacsony dózisonál is.

4.1.3.2. Szomszédsági vizsgálat

4.1.3.2.1. A különböző szomszédsági hatást közvetítő módszerek összehasonlítása

A bystander technikákat összehasonlítva a nem találtunk szignifikáns eltérést a deléciós mutánsok felhalmozódásában az inzerten direkt sejtek mellett „co-culture” tartott (ByIns) és a donorsejtekről származó kondicionált médium (ByMcs) hatásában ($P > 0,05$).

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

A primer és az immortalizált sejtkultúrákat is vizsgálva alátámasztottuk a korábbi feltevést, hogy a donor sejt sugárérzékenységtől nem függ a szomszédsági hatás, a sejtek egyéni választ adtak. Nem volt összefüggés a szomszédsági hatás és a dózis között sem.

4.1.3.2.3. A direkt sugárkezelt donor szerepének vizsgálata a szomszédsági hatásban

A donor és akceptor sejteket vizsgálva megfigyelhető volt, hogy a szomszédsági hatás csak a donor sejt egyéni választól függött. A korábban szomszédsági hatást nem mutató S1-hTERT ($1,14 \pm 0,23$) sejtvonalon is tudunk az F11-hTERT sejtvonaltól származó médiummal szignifikáns ($P=0,0069$) szomszédsági hatást kiváltani. Fordított esetben az S1-hTERT sejtekről származó médiumot az F11-hTERT sejtekre helyezve, a korábban kimutatott szignifikáns szomszédsági hatás nem volt megfigyelhető ($P=0,8826$), szinte teljesen lecsökkent a károsodott mitokondriumok mértéke a normál szintre, vagyis a szomszédsági hatás a direkt sugárkezelt sejtek bystander szignál átadó képességétől függött.

4.1.3.2.4. A szerotonin szérumszint hatásának vizsgálata a szomszédsági sejtekben

A szerotonin tartalom befolyását a szomszédsági hatásra vizsgáló kísérletekben, nem figyeltünk meg szignifikáns változást. A szomszédsági hatásban nem mutattak eltérést az alacsony és magas szerotonin tartalmú médiumokon nőtt sejtek, a szérumszerotonin szint nem befolyásolta a sejtek szignálátadó képességét.

4.1.3.3. Sugárzás indukálta genomiális instabilitás követése

A hosszú idejű követés során összehasonlítottuk a sugárérzékeny és sugárrezisztens immortalizált sejtvonalban a sugárzás hatására felhalmozódó deléciós mutánsok mennyiségét. A rezisztens sejtvonalban a hosszú idejű követés statisztikai analízise után megállapítható volt, hogy a kezeletlen kontrollhoz viszonyított általános CD akkumulációt nézve kis dózissra

nem tapasztaltunk ($P=0,6$), míg moderált 2 Gy dózisú egyszeri besugárzás hatására mérhető volt egy szignifikáns eltérés ($P=0,0285$). A sugárkezelés utáni napokat egyenként vizsgálva a korai időpontokban találtunk eltérést, ami visszatért a normál szintre.

A sugárérzékeny S1-hTERT sejtvonaltalban szignifikáns eltérést tapasztaltunk a kezeletlen kontrollhoz viszonyított általános CD akkumulációt nézve kis ($P=0,0345$) és moderált dózis ($P < 0,001$) hatására is, és a hetedik hét után egy ismételt emelkedést lehetett tapasztalni a deléciós mitokondriumok mennyiségében. Az utódsejtekben a CD mutációk felszaporodása, ami a genetikai instabilitás egyik jellemzője, tehát csak az érzékeny sejtvonaltalban volt kimutatható.

4.2. Vizsgálatok tumorsejt vonalakon

4.2.1. Az LM2 modell

A módosítatlan LM2 sejtvonaltalban kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakcióval (qPCR) vizsgáltuk a GDF-15 gén sugárkezelésre adott RNS expresszió változását. Eredményeink alapján a GDF-15 expresszió szintje dóziszfüggően ($P<0,001$) nőtt a kezeletlen kontrollhoz (0 Gy) képest. Kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakcióval (qPCR) vizsgáltuk a módosítatlan LM2 sejtvonaltalhoz képest a módosított sejtvonaltalok GDF-15 génexpresszióját. Génmódosítás hatására a GDF-15 gént konstitutívan túltermelő LM2-GDF15 sejtvonaltalban több mint 10-szeres GDF-15 génexpresszió volt mérhető az LM2 módosítatlan sejtvonaltalhoz képest ($P<0,01$). A géncsendesített sejtvonaltalban a GDF-15 expressziót közel 80 %-ban gátoltuk ($P<0,05$).

4.3. Sugárválaszt befolyásoló molekuláris hatások vizsgálata emlő tumor modellben

4.3.1. GDF-15 hatása a sugárérzékenységre

A GDF-15 hatását a sugárérzékenységre kolónia assay-el vizsgáltuk. A sugárzás hatására dóziszfüggően csökkent a túlélés, de a hatásban eltérést mutatták a sejtvonaltalok, a GDF-15 szint eltérően befolyásolta a sugárkezelésre adott választ. Az eredmények alapján megállapítottuk, hogy GDF-15 túltermelő sejtvonaltalban magasabb volt a túlélés, míg az LM2-shGDF15 csendesített sejtvonaltal túlélését tekintve már 2 Gy hatására is szignifikánsan több sejt pusztult el ($P=0,004$) a normál sejtvonaltalhoz képest.

4.3.2. GDF-15 hatása a proliferációra

A WST assay során a sejtvonaltalok életképességét vizsgáltuk 5 napon keresztül követve a kultúrákat. Megállapítottuk, hogy a GDF-15 gén bevitele megnövelte a sejtek osztódó

képességét ($P < 0,01$), míg a géncsendesítés csökkentette ($P = 0,02$) növekedési hajlandóságukat az eredeti sejtvonalhoz képest.

4.3.3. TGF- β 1 gén expresszió változása sugárkezelés hatására

A módosíthatlan LM2 sejtvonalban kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakcióval (qPCR) vizsgáltuk a TGF- β 1 gén sugárkezelésre adott RNS expresszió változását a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva. Az LM2 tumorsejtvonalban sugárkezelés hatására, emelkedő dózisu röntgenbesugárzást alkalmazva 24 óra elteltével a TGF- β 1 relatív expressziója a kezeletlen kontrollhoz képest dóziszfüggő ($P < 0,01$) emelkedést mutatott. A dózisokat egyenként vizsgálva szignifikánsan emelkedett relatív expresszió mértéke a kezeletlen kontrollhoz képest nagy dózisu egyszeri sugárkezelés hatására.

4.3.4. A GDF-15 hatása a TGF- β 1 szintre

A GDF-15 termeléstől függő TGF- β 1 expressziót hasonlítottuk össze az LM2 sejtvonalhoz képest kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakcióval (qPCR). A GDF-15-öt túltermelő LM2-GDF15 sejt kultúrában csökkent a TGF- β 1 expressziója. A géncsendesítésre enyhe, de nem szignifikáns emelkedés volt tapasztalható.

Az ELISA kísérlet során szignifikáns ($P = 0,0136$) csökkenést mértünk a GDF-15 gént konstitutívan túltermelő LM2-GDF-15 sejtvonal felülszójában. A csendesített LM2-shGDF15 sejtvonalban nem találtunk változást a TGF- β 1 termelésben a normál sejtvonalhoz képest.

4.3.5. A GDF-15 hatása a sugárzás indukálta TGF- β 1 expresszióra

Moderált 2 Gy sugárkezelés hatását vizsgáltuk az egyes sejtvonalokban qPCR-rel. A gént különböző módon expresszáló sejtvonalakat saját kezeletlen kontrolljukhoz képest nézve hasonló volt a relatív expresszió. Megfigyeltünk egy korai és enyhe génextpressziós emelkedést, de a változások nem bizonyultak szignifikáns különbségnek.

4.3.6. A sugárkezelés hatása a TGF- β 2 génextpresszióra

Kutatásunk során megvizsgáltuk a család másik sugárválaszgénjének, a TGF- β 2 expressziós változásait is qPCR-rel. Akut sugárválaszt 24 óra elteltével ennek a génnek az expressziója esetében nem tudtunk megállapítani LM2 sejtvonalban.

4.3.7. A GDF-15 hatása a TGF- β 2 génexpresszióra

A qPCR-rel vizsgált relatív RNS expresszió mértéke szignifikánsan változott, a GDF-15 expresszió függvényében. A GDF-15-öt túltermelő LM2-GDF15 sejtvonalban az expresszió lecsökkent az módosítatlan sejtvonalhoz képest ($P=0,017$).

4.3.8. A GDF-15 hatása a sugárzás indukálta TGF- β 2 génexpresszióra

A sugárkezelésre adott válaszon is módosított a GDF-15 génexpresszió változása. A túltermelő LM2-GDF15 sejtvonalban csökkent ($P=0,0202$) a TGF- β 2 expresszió saját kezeletlen kontrolljához képest, míg a csendesített sejtvonalban egy tendenciózus ($P=0,08$) emelkedést tapasztaltunk.

4.3.9. A sugárkezelés hatása a mitokondriális „common” deléció felhalmozódására

A korábban 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, ezért kísérleteinket optimalizáltuk egér tumor sejtekre. Szignifikáns dóziszfüggő növekedést ($P<0,001$) tapasztaltunk a deléciós mutánsok előfordulásában LM2 sejtvonalban.

4.3.9.1. A GDF-15 hatása a mitokondriális deléció felhalmozódására

A GDF-15 gén szerepének vizsgálatokor valós idejű polimeráz láncreakcióval (qPCR) megvizsgáltuk, hogyan befolyásolta a GDF-15 szint és a sugárzás a deléció előfordulási gyakoriságát. A GDF-15 túltermelő sejtvonalban nagymértékben lecsökkent ($P=0,03$) a sejtekben károsodás ($0,346\pm 0,0088$). Ezzel szemben a csendesített sejtvonalban szignifikánsan nőtt a mutáció előfordulása az eredeti LM2 sejtvonalhoz képest ($P=0,01$).

4.3.9.2. GDF-15 szint befolyása a sugárkezelés hatására indukálódó mitokondriális deléció felhalmozódásra

Az egyes sejtvonalakat vizsgálva megállapítottuk, hogy a GDF-15 gént túltermelő sejtvonalban a nagy dózisú (6 Gy) sugárzás nem okozott szignifikánsan mérhető mitokondriális DNS károsodást, ezzel szemben normál GDF-15 génexpressziójú LM2 ($P=0,008$) vonalban és az shRNS-sel ($P=0,0089$) csendesített sejt kultúrában is szignifikáns mitokondriális DNS károsító hatása volt a sugárkezelésnek a kezeletlen kontrollhoz képest. Ez a hatás a géncsökkentett sejtvonalban 72 óra után is megmaradt ($P=0,041$).

4.3.10. *GDF-15 hatása a sugárzás indukált apoptózisra*

Megállapítottuk, hogy emelkedő dózis hatására a normál LM2 sejtekben a dózistól függően nőtt az apoptotikus sejtek aránya. Az akkumuláció tendenciózus összefüggést mutat a dózissal ($P=0,06$). Az LM2 emlő tumor sejtvonalonban 6 Gy dózisu sugárkezelés szignifikáns ($P=0,025$) eltérést mutatott.

A különböző GDF-15 termelésű módosított sejtvonalakban a túltermelő LM2-GDF15 sejtvonala a módosítatlan LM2 tumor vonalnál rezisztensebbnek bizonyult ($P>0,05$) 6 Gy dózisu kezelés sem okozott szignifikánsan mérhető apoptózist. Ezzel ellentétben a gén csendesítése érzékenyebbé tette a sugárzásra, a LM2-shGDF15 kezeletlen kontroll sejtvonalonban található előfordulási arányhoz képest a 6 Gy-es dózis szignifikánsan majdnem háromszorosára emelte az apoptotikus sejtek arányát a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva ($P<0,001$).

4.3.11. *GDF-15 hatása az ionizáló sugárzás következtében felszabaduló ROS mennyiségére*

A reaktív oxigén gyökök mérése során összehasonlítottuk a 6 Gy röntgensugárzás hatására felszabaduló ROS mennyiségét az LM2 tumorsejtvonalonban és módosított változataiban. A korai időpontban mindhárom sejtvonalonban kimutatható akut reaktív oxigéntermelés, de csak a csendesített sejtvonalonban bizonyult szignifikánsnak ($P=0,0074$).

24 h elteltével ebben a sejtvonalonban még mindig tendenciózus ($P=0,0582$) emelkedés volt tapasztalható a kontrollhoz képest.

5. 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.

5.1. 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.

5.1.1. Alkalmazható volt a módszer a szomszédos hatás kimutatására, amely során megállapíthattuk, hogy

5.1.1.1. nem találtunk különbséget a kondicionált médium és az együttényésztés között a szomszédos hatás kiváltásánál,

5.1.1.2. a szomszédos sejtekben a CD akkumuláció mértéke a direkt besugárzott sejt bystander szignál átadó képességétől függ, nem pedig a sugárérzékenységtől

5.1.1.3. A bystander szignál átadó képessége nem függött a szérum szerotonin szintjétől

5.1.2. A sugárérzékeny és rezisztens humán fibroblaszt sejtvonalak hosszú idejű követésénél a sugárérzékeny sejtvonalba már kis dózis hatására is szignifikáns CD deléciós mutáns mennyiséget mérhettünk. 2 Gy besugárzás hatására mind a rezisztens, mind a szenzitív sejtvonalba mérhető volt a CD akkumuláció, de csak az érzékeny sejtvonalba alakult ki a hetedik hét után a genetikai instabilitás következtében ismételt emelkedés.

5.2. Vizsgáltam a GDF-15 citokin szerepét emlőtumor sejtvonalakban valamint hogy a GDF-1 szint hogyan módosítja a sugárválaszt.

5.2.1. Megállapítottuk, hogy a GDF-15 expresszió dóziszfüggően nő ionizáló sugárzás hatására

5.2.2. Megállapítottuk, hogy a GDF-15 gén szintje kihat:

5.2.2.1. a növekedésre, a sejtek a magas GDF-15 szint mellett jobban növekedtek,

5.2.2.2. a TGF- β 1 és TGF- β 2 expresszióra, magas GDF-15 szint gátolta ezek expresszióját, alacsony expressziója enyhén emelte

- 5.2.2.3. a „Common” deléciós mutánsok felszaporodására, a magas GDF-15 szint gátolta a mutánsok kialakulását, az alacsony expresszió növelte
- 5.2.3. A GDF-15 expresszió befolyásolta a sugárzás károsító hatását a sejtekre.
- 5.2.3.1. A sejtek túlélése a GDF-15 szint függvényében változott, a magas expresszió rezisztenciát, míg a géncsendesítés sugárérzékenységet okozott.
- 5.2.3.2. A GDF-15 expresszió szintje kihatott a sugárexpozíció következtében indukálódó TGF- β 2 termelődésre, magas szintje gátolta, alacsony szintje növelte az expressziót
- 5.2.3.3. 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
- 5.2.3.4. A GDF-15 befolyásolta a perzisztensen fennálló oxidatív stressz által okozott mitokondriális CD mutánsok felszaporodást, a túltermelő sejtekben nem okozott változást, az alacsony szintű sejt kultúrában magas volt a mutánsok előfordulási aránya a sugárkezelés után.

6. Saját publikációk jegyzéke

6.1. Folyóirat cikkek

Schilling-Tóth B, 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 , Schilling-Tóth B , 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

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.* 716:(1-2) 33-39. IF: 3.035

6.2. Könyvrészletek

Hegyesi H, Lambert JR, Sándor N, Schilling-Tóth B, 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.

6.3. Konferencia absztraktok

Schilling-Tóth B, Sándor N, Sáfrány G, Hegyesi H (2009) A γ -sugárzás okozta genetikai instabilitás vizsgálata in vitro sejt kultúrában. *Magyar Biofizikai Társaság XXIII. Kongresszusa* 2009. augusztus 23-26. Pécs

Schilling-Tóth B, Sándor N, Hegyesi N, Sáfrány G (2010) Effect of γ -irradiation in human cell mitochondrial DNA, 38. *European Radiation Research Society - General Assembly*. 2010. Szeptember 5-9. Stockholm, Svédország

Schilling-Tóth B, Sándor N, Kis E, Sáfrány G, Hegyesi H (2013) Ionizing Radiation induced effect of GDF-15 and TGFB1 in mammary carcinoma cells. *PhD Tudományos Napok* 2012. április 12-13, Budapest

Schilling-Tóth B, Sándor N, Varga Z, Kahán Zs, Sáfrány G, Hegyesi H (2013) A GDF-15 és a TGFB1 szerepe a sugárválaszban emlő tumor sejtekben. *Magyar Epidemiológiai Társaság és a Közép-európai Kemoprevenációs Társaság Kongresszusa*, 2013. április 5-6, Pécs

Schilling-Tóth B, Sándor N, Sáfrány G, Hegyesi H (2013) A GDF-15 gén szerepének vizsgálata a sugárzás indukált mitokondriális károsodásra, *Magyar Biofizikai Társaság XXIV. Kongresszusa* 2013. augusztus 27-30. Veszprém

Schilling-Tóth B, Sándor N, Varga Z, Kahán Zs, Sáfrány G, Hegyesi H (2013) Changes in the plasma levels of transforming growth factor beta-2 (TGFb2) and growth differentiation factor-15 (GDF15) in response to radiotherapy in breast cancer patients. *23th Annual Congress of the Romanian Society for Radiotherapy and Medical Oncology*. 2013. október 17-19. Kolozsvár, Románia

Schilling-Tóth B, Sándor N, Sáfrány G, Hegyesi H (2014) GDF-15 overexpression increase radiosensitivity of breast cancer cells, *Second International Conference on Radiation and Dosimetry in Various Fields of Research*, 2014. május 27-30. Niš, Szerbia

