

Sugárérzékenységért felelős gének azonosítása, hatásmechanizmusuk vizsgálata

Doktori értekezés

Sándor Nikolett

Semmelweis Egyetem
Patológiai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Hegyesi Hargita Ph.D, egyetemi docens
Dr. Sáfrány Géza D.Sc, főosztályvezető főorvos

Hivatalos bírálók: Dr. Voszka István Ph.D, egyetemi docens
Dr. Jurányi Zsolt Ph.D, osztályvezető főorvos

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Bérczy Viktor D.Sc, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Hideghéty Katalin Ph.D, egyetemi docens
Dr. Wikonkál Norbert D.Sc, egyetemi tanár

Budapest
2018

Tartalom

Rövidítések jegyzéke	5
1. Bevezetés	11
1.1. Az elektromágneses sugárzás biológiai hatásai.....	11
1.2. Besugárzás alkalmazása és következményei, egyéni sugárérzékenység.....	13
1.3. Sejtműködés és zavarai.....	14
1.3.1. Sejtciklus.....	14
1.4. Sugárzás indukálta mediátorok szerepe a sugárválaszban.....	18
1.5. Az általunk vizsgált sugárválasz gének tulajdonságai, kapcsolata a sejt túlélésével.....	20
1.5.1. GDF-15 (Growth Differentiation Factor-15).....	20
1.5.1.1. Sugárzás és GDF-15.....	22
1.5.2. TP53INP1 (Tumor Protein P53 Inducible Nuclear Protein 1).....	23
1.6. Kísérleti rendszerünk.....	24
2. Célkitűzések	25
3. Módszerek	26
3.1. F11 primer humán fibroblaszt sejtvonal és sejtenyésztés.....	26
3.1.1. Stabil GDF-15 géncsendesített sejtvonalak létrehozása.....	26
3.1.2. TP53INP1 géncsendesítés.....	27
3.2. Szomszédsági (ún. bystander) vizsgálatok.....	28
3.3. Valós idejű kvantitatív polimeráz láncreakcióval (qPCR) történő mérések..	28
3.3.1. Génexpressziós vizsgálatok mérése a genomiális DNS-ről átíródó mRNS- ekkel (RNS izolálás, cDNS átírás, valós idejű kvantitatív PCR).....	28
3.3.1.1. Génexpresszió változás direkt besugarazott és bystander fibroblasztokon.....	31
3.3.1.2. Géncsendesítés hatékonyságának ellenőrzése, illetve sugárzás indukálta génexpressziós változások normál és géncsendesített fibroblasztokban...32	
3.3.1.3. GDF-15 illetve TP35INP1 gén gátlásának következménye egyéb sugárválasz gének kifejeződésére.....	33

3.3.2. Mitokondriális DNS károsodás vizsgálat.....	33
3.4. Géncsendesítés hatékonyságának fehérje alapú ellenőrzése, a sugárzás indukálta GDF-15 fehérje termelés időbeni változásának megfigyelése ELISA-val.....	35
3.5. Sugárérzékenység vizsgálat.....	36
3.6. Sejtosztódás, sejtciklus analízis.....	36
3.7. Autofágia vizsgálatok.....	37
3.7.1. Acridine Orange festéssel.....	37
3.7.2. Áramlási citométerrel (FACS).....	38
3.8. Szenescencia mérések.....	38
3.9. Kettős láncú DNS törések mérése γ -H2AX festéssel.....	39
3.10. Statisztikai analízis.....	40
4. Eredmények.....	41
4.1. A GDF-15 gén sugárválaszban betöltött szerepének vizsgálat.....	41
4.1.1. GDF-15 gén működésének változása közvetlenül besugárzott fibroblaszt sejtekben, illetve közvetlenül sugártalálattól el nem szenvedett bystander (szomszédsági) sejtekben	41
4.1.2. GDF-15 gátlás lentivírus vektor közvetített shRNS-ekkel.....	42
4.1.3. <i>GDF-15</i> fehérje mennyiségi változása az idő függvényében a különböző géncsendesített sejtekben.....	44
4.1.4. Sugárzás indukált GDF-15 génkifejeződés időfüggése.....	45
4.1.5. GDF-15 gén változtatásának hatása a besugárzás által indukált egyéb génekre.....	46
4.1.6. GDF-15 csendesítés hatása a sejtek sugárérzékenységére.....	48
4.1.7. Bystander hatás mérése a GDF-15 géncsendesített és normál sejtek mitokondriális DNS delécióinak előfordulásában.....	49
4.1.8. GDF-15 gén csendesítésének hatása a sejtciklusra 2 Gy-el történő besugárzás esetében.....	51
4.2. A TP53INP1 gén vizsgálata a sugárválaszban.....	53

4.2.1.	A TP53INP1 gén kifejeződésének változása közvetlenül besugározott és közvetlen sugárhatást el nem szenvedett humán fibroblaszt sejtekben..	53
4.2.2.	TP53INP1 génkifejeződés időfüggő változása 2 Gy besugárzásra.....	54
4.2.3.	A TP53INP1 gén csendesítése short hearpin RNS-t kódoló lentivírussal, s az így létrejött sejt vonal sugárválaszában bekövetkező változások.....	55
4.2.4.	Túlélés vizsgálata kolónia-képző kísérlettel a TP53INP1 kifejeződés függvényében.....	56
4.2.5.	Ionizáló sugárzás okozta autofágia kialakulása eltérő mennyiségű <i>TP53INP1</i> -et kifejező fibroblasztokban.....	57
4.2.6.	Szenescencia módosulása 6 Gy besugárzás után TP53INP1 géncsendesített sejtekben.....	59
4.2.7.	Besugárzás hatás a mitokondriális DNS deléciók felhalmozódására TP53INP1 géncsendesített sejtekben.....	60
4.2.8.	<i>TP53INP1</i> fehérje mennyiségének befolyása a GDF-15, CDKN1A és GADD45A gének sugárzás általi megváltozására.....	61
4.2.9.	Az ionizáló sugárzás hatására létrejött DNS kettős lánc törések javításának időkinetikája.....	64
5.	Megbeszélés.....	66
5.1.	Sugárzás indukálta molekuláris változások.....	66
5.2.	A GDF-15 tumorbiológiai hatásai, válasza az ionizáló sugárzásra.....	67
5.3.	Génexpressziós gátlás short hearpin RNS-el, s ennek sugárérzékenységre gyakorolt hatása.....	69
5.4.	GDF-15 hatása a bystander hatásra.....	70
5.5.	A GDF-15 fehérje hatása a mitokondriális DNS sérülésekre.....	71
5.6.	Sejtciklus időtartamának változása és annak változása GDF-15 gén hiányában.....	72
5.7.	A TP53INP1 fehérjének sugárhatást befolyásoló hatásai.....	73
5.8.	TP53INP1 gén hatása a sugárzás indukálta sejthalálra.....	75

5.9. TP53INP1 és az oxidatív egyensúly.....	76
5.10. TP53INP1 fehérje mennyiségének összefüggés más szabályozó fehérjék termelődésével.....	77
6. Következtetések.....	80
7. Összefoglalás.....	82
8. Summary.....	83
9. Irodalomjegyzék.....	84
10. Saját közlemények jegyzéke.....	101
11. Köszönetnyilvánítás.....	103

Rövidítések jegyzéke

- AKT1: RAC-alfa szerin/treonin-protein kináz
- ALDH4: aldehyd- dehidrogenáz
- Atg1: autofágiához köthető protein 1 homológ
- ATM: Ataxia Telangiectáziában Mutáns fehérje
- ATR: Ataxia Telangiectáziában és Rad3-hoz köthető gén
- BAD: Bcl2-Asszociált Sejthalál Agonista fehérje
- Bax: BCL2 Asszociált X gén
- BCL2L1: BTG2 fehérjét kódoló gén
- BNIP3: 3. BCL2 Interakciós Protein gén
- BRCA1: 1. Breast Cancer (emlőrák) gén
- BTG2*: 2. BTG Antiproliferációs faktor fehérje
- BTG2: BTG2 fehérje
- CCNE1: Ciklin E1 gén
- CDC2: CDK1 alternatív elnevezése
- CDC6: 6. Sejt osztódás ciklus gén
- CDKN1: ciklin-dependens kináz gátló 1A (= p21) gén
- cDNS: komplement (mRNS-ről átírt) DNS
- Ct: ciklusküszöb
- $\Delta\Delta$ Ct: delta-delta ciklusküszöb
- CXC-10: CXC-kemokin-ligandum-10
- CXCL-12: 12.C-X-C motif kemokinligandum gén
- CXCL-2: 2. C-X-C motif kemokinligandum gén
- CXCR4: 4. C-X-C motif kemokinreceptor
- DDB2: 2. DNA károsodáshoz kötő fehérje

DLGAP4: 4. DLG -asszociált fehérje

DMeM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*; fibroblasztokhoz használt alap tápoldat

DNA-PK: DNA-függő protein kináz

dNTP: dezoxiribózt tartalmazó nukleozid-trifoszfát (DNS alkotó)

E2F: transzkripció faktor

EDTA: etilén-diamin-tetraecetsav

EGF: epidermális növekedési faktor

EGFR: epidermális növekedési faktorreceptor

EGR1: 1. korai növekedési válasz gén

ELISA: enzim-kapcsolt immunoszorbens kísérlet

ERBB1: epidermális növekedési faktorreceptor másik neve

ERK: extracellulárisjel-szabályozott protein kináz

F: forward primer (előre haladó oligonukleotid szakasz)

F11-hTERT: immortalizált humán fibroblaszt sejtvonal

FACS: *fluorescence activated cell sorting*; áramlási citométer

FBS: *Fetal Bovine Serum*; magzati szarvasmarha szérum

FDXR: ferredoxin reduktáz

FITC: fluoreszcein-izotiocianát

FOS: Fos Proto-Onkogén

GADD45A: növekedés gátló és DNSsérülés gén

GAPDH: gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz gén

GDF-15: növekedési és differenciálódás faktor-15 gén

GFP: zöld fluoreszcens protein;

GFRAL: GDNF család receptor α -szerű receptor

GPX1: 1. glutation-peroxidáz

H2AX: H2A hiszton Családtag X gén

HCT116: humán vastagbél rák sejtvonala

Hela: humán méhnyakrák sejtvonala

Hela S3: módosított Hela sejtvonala

HER2: 2. humán epidermálisnövekedési faktor receptor

HSP90: hő sokk fehérje 90

hTERT: humán telomeráz reverz transzkriptáz (*hTERT*)

IFN- γ : interferon-gamma gén

IGFR1: 1. inzulin szerű növekedési faktor

IL-6: interleukin-6

INK4: ciklin-dependens kináz gátló család

IP-10: interferon-gamma-indukált protein 10 (a CXCL10 citokin másik neve)

KIP: ciklin-dependens kináz gátló egyik családja

KITLG: KIT ligandum fehérje

LC3: mikrotubulushoz köthető protein 1 könnyű lánc 3 alfa gén

LPS: lipopoliszaharid

MAP: mikrotubulushoz köthető protein

MAPK: mitogén-aktivált protein kináz

MCM2: 2. mini kromoszóma fenntartó komplex komponens gén

MCP-1: monocita kemoattraktáns protein-1

MCP-3: monocita kemoattraktáns protein-3

MDM2: 2. egér dupla perc fehérje

MEF: egér embrionális fibroblaszt sejtvonala

MIP-1a: makrofág gyulladáscsökkentő proteinek, más néven (emberben) CCL3

Mn-SOD: Mn-szuperoxid-dizmutáz

mRNS: messenger v. hírvivő RNS

mtDel: deléciók mitokondriális DNS kimutatására szolgáló primerpár

mTOR: mechanisztikus Rapamicin- Kináz célzó fehérje

MTP1/4: GDF-15 géncsendesített humán fibroblaszt sejtvonal

MTP2/3: GDF-15 gént túlexpresszázó humán fibroblaszt sejtvonal

MYC: protoonkogének transzkripció faktor

NF- κ B: sejtmagi faktor kappa B

NINJ1: ideg sérülés által indukált protein-1 fehérje

p16: ciklin-dependens kinázgátló-2A fehérje

P53: tumor protein p53 gén

p73: tumor protein P73 gén

PAPPA: várandósság-asszociált plazma protein-A gén

PBS: foszfát-puffer, izotóniás sóoldat

PC3: humán prosztataraák sejtvonal

PCNA: proliferáló sejtmagi antigén

PCR: Polimerase Chain Reaction (polimeráz lánreakció)

> qPCR: kvantitatív PCR reakció

PDGF: vérlemezke-eredetű növekedési faktor

PDGFB: vérlemezke-eredetű növekedési faktoralegység B

PE: plating efficiency („megtelepedési” ráta)

PFA: paraformaldehid

PI3K: foszfatidil-inozitol-4,5-bis-foszfát 3-kináz

PLK3: Polo szerű kináz

PTEN: foszfatáz és tenzin homológ fehérje

R: reverz primer (visszafelé haladó oligonukleotid szakasz)

RAD54L: DNS javítás és rekombinációs protein RAD54-szerű fehérje

RAS: RAS géncsalád

Rb: retinoblasztóma

RB1: retinoblasztomát kódoló gén

ROS: reaktív oxigén gyök

SA-B –Gal: szeneszencia-asszociált - β -galaktozidáz

SDF-1: sztrómális sejt eredetű faktor 1 (CXCL-12 másik elnevezése)

SESN1: SESN1 gén

Sesn2: sesn2 gén

SF: surviving fraction (túlélő frakció)

SF2 %: 2 Gy dózist kapott sejtek túlélési hányadosa %-ban kifejezve

shRNS: short-hairpin RNS (rövid hajtú RNS-ek)

shTP53INP1: TP53INP1 géncsendesített humán fibroblaszt sejtvonal

SKOV3: humán petefészek rák sejtvonal

SMA-560: spontán rágsáló asztrocitóma sejtvonal

SMAD: SMAD fehérje

Sp1, 3: transzkripció faktor

TBR1: receptor protein szerin/ treonin kinázt kódoló gén

TGF- β 1: átalakító növekedési faktor - béta1 fehérje

THP-1: humán monocita sejtvonal

TIMP-1: 1. TIMP metallopeptidáz gátló

TNF- α : tumor nekrozis faktor

TP53INP1: Tumor Protein P53 által indukálható magi fehérje 1 gén

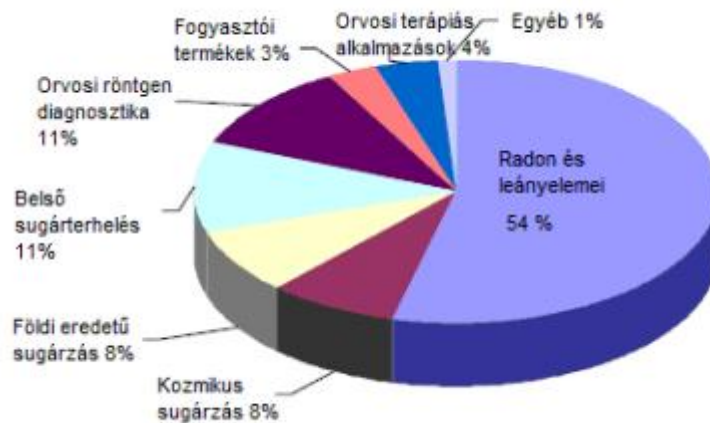
VEGF: ér-endotél növekedési faktor

X –Gal: 5-bromo-4-kloro-3-indolil β -D-galakto-piranozid

γ H2AX: foszforilált H2AX fehérje

1. Bevezetés

A jelen kor embereit érő sugárzások a természetes környezetből eredő sugárzásokon kívül (mely végig kísérte az élővilág kialakulása óta) mesterséges emberi tevékenységekből adódó többletsugárzás is éri. A sugárforrások arányait az alábbi (1.) ábra mutatja:



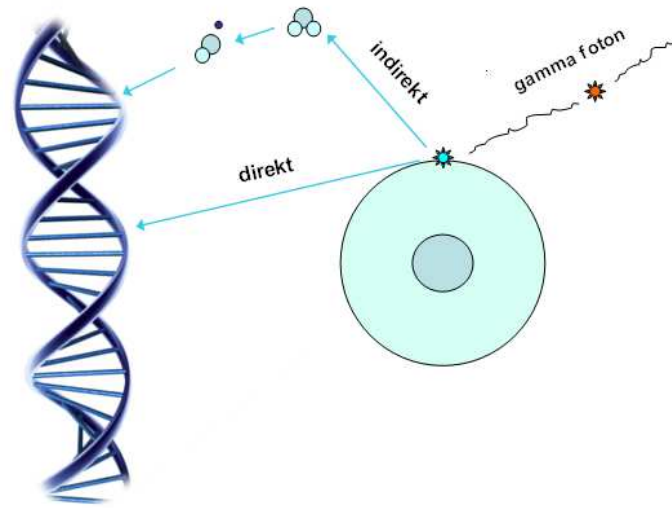
1. ábra: a Föld lakosságát érő, különféle eredetű sugárzások eloszlása (1)

A természetes háttérsugárzás földrajzi helyenként változik, függ az alapkőzet összetételétől, ill. a tengerszint feletti magasságtól. Ez átlagosan 2,4 mSv/ év. Ehhez hozzájárul a mesterséges forrásokból származó háttérsugárzás, ami kb. még 0,6 mSv-et tesz ki. (2) Hazánkban az átlagos természetes háttérsugárzás 3-4 mSv/ év a föld magasabb radon tartalmától. (3)

1.1. Az elektromágneses sugárzás biológiai hatásai

Dolgozatom a diagnosztikában és gyógyászatban legtöbbször használt gamma- és röntgen-sugárzás hatásaira fókuszál. Mindkettő az ionizáló sugárzások közé tartozik, vagyis az útjába eső közeg atomjait képes ionizálni. A gamma- és röntgen-sugárzások közvetlenül ritkán képesek ionizálni a biológiailag fontos molekulákat (DNS, fehérjék, lipidek), hanem előbb a közeg atomjait (leginkább víz molekulákat) ionizálják, szabad

gyökök képződését generálva, amik később indirekt módon roncsolják tovább a szerves makromolekulákat (2. ábra).



2. ábra: a sejt örökítő anyagát károsító közvetlen és közvetett hatás (3.)

Ezen fizikai és kémiai folyamatok 0,1 ns-től 1 s-ig terjedő idő alatt le is zajlanak. Ezek biológiai hatása később, órákkal vagy akár napokkal, évekkel később manifesztálódik (4). E biológiai hatás függ egyfelől attól, hogy milyen sejtalkotók károsodtak, másfelől a sugárhatástól érintett sejtek minőségétől és állapotától is (gyorsan osztódó sejtről vagy nyugalmi állapotú sejtről van-e szó, működnek-e benne a hibajavításhoz szükséges gének, tumor szupresszor gének, stb., illetve tartalmaz-e a környezete elegendő mennyiségű gyökfogókat). Legsúlyosabb eset, ha a genetikai állományt kódoló molekula, a (genomiális vagy mitokondriális) DNS sérül. Ez lehet egy láncú, kétláncú törés, vagy csak a bázisok károsodása. A sejt (és adott esetben a szövet) további túlélése attól függ, hogy hogyan képes kijavítani a keletkező károkat.

Nyugalmi állapotban lévő sejtben a DNS törés kevésbé nagy jelentőségű, mivel ott az érintett szakasz kis valószínűséggel pótolható. Osztódó sejteknél egy ki nem javított kettős lánc-törés létfontosságú gének elvesztésével járhat, végzetes lehet. Ez áll a gyorsan osztódó sejtek (pl. csontvelő, őssejtek) sugárérzékenysége, s a kevésbé vagy egyáltalán nem osztódó sejtek (pl. idegsejt, izom) sugárrezisztenciája mögött. A determinisztikus sugárhatás mechanizmusa éppen a fent leírt DNS-károsodások

következtében kialakuló sejtpusztulás, mely, ha bizonyos mennyiségű sejtet érint, akkor az adott szerv vagy szervrendszer károsodásához vezet (ld. később). Ha a sejt nem is hal meg, de kialakulhatnak mutációk, melyek száma idővel felhalmozódhat a generációk alatt, megnövelve ezzel a daganat kialakulásának kockázatát. Ez okozhatja a késői sugárválaszként megjelenő sztochasztikus hatást. Ezért fontos, hogy ha DNS károsodás történik, a sejtciklus ideiglenes leállítása, hogy a sejtnek a töréseket legyen ideje kijavítani. A DNS károsodások mértéke csak az őt ért sugárzás fajtájától és dózistól függ, nem függ a sejt tulajdonságaitól, a későbbi hibajavítás sikere viszont erősen befolyásolja a sejt, illetve az egyén további sorsát (3). A sugárkárosodást, s így az egyéni sugárérzékenységet módosító tényezők közé leginkább azok a szabályzó molekulák tartoznak tehát, melyek a DNS hiba felismerésében, javításában vagy a sejtciklus szabályozásában működnek közre.

Determinisztikus hatás: egy bizonyos dózis (küszöb dózis) felett biztosan bekövetkező esemény. Súlyossága függ az elnyelt dózistól illetve az érintett szerv sugárérzékenységétől (3). Ezek a hatások leginkább akut sugársérülések, de az időben jobban elhúzódó, bőrben kialakuló elváltozások (bőrpír, égési sérülés, teleangiectázia) is ide sorolhatók. Embernél a félhalálos dózis (LD_{50}): 4 Gy (egész testet érintő) (5).

Egy gyakori késői mellékhatás pl. a fibrózis, mely sok szövetet érinthet (bőr, izom, gasztrointesztinális traktus), évekkal a sugárterápia után is megjelenhet. A sugárzás indukálta fibrózis összefügg egyes gyulladáscsökkentő citokinek (pl. TGF- β , TNF- α) aberráns működésével. (6, 7)

Sztochasztikus hatás esetén a betegség kialakulása nem elkerülhetetlen, csak a kialakulásának valószínűsége növekszik a dózissal. Ennek nincs küszöbdózisa, ezért a legkisebb dózis is kockázati tényezőt jelent.

1.2. Besugárzás alkalmazása és következményei, egyéni sugárérzékenység

Orvosi alkalmazása az ionizáló sugárzásoknak alapvetően két területen történik: a diagnosztikában (röntgen-felvétel, CT, stb.) és a terápiában (^{60}Co -sugárforrás, lineáris gyorsítók). Daganatos betegek sugárterápiája során a cél a daganatsejtek elpusztítása (vagy legalábbis további osztódásuk gátlása) a normál sejtek lehető legkisebb

károsodása mellett. A sugárterápián átesett betegek 5-10 %-ában alakul ki a sugárzás következtében fellépő súlyos korai vagy késői mellékhatás (8).

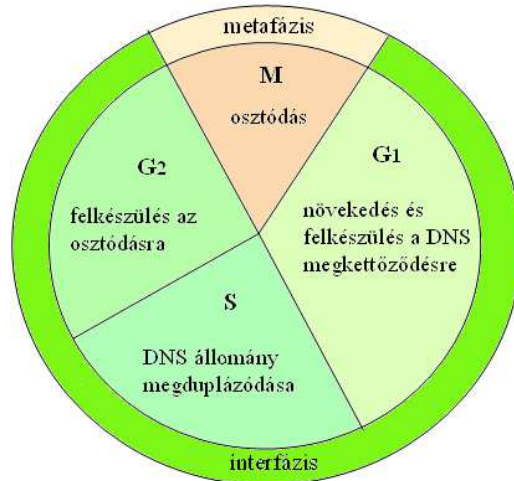
Egyéni sugárérzékenységtől függ, hogy a standardizált sugárterápia után kialakul-e a páciensben súlyos mellékhatás. Ennek csökkentésére fontos lenne egyrészt a besugarazandó terület lehető legpontosabban kialakítása (erre egyre jobb technikák és berendezések állnak rendelkezésre, pl. mélylélegzéssel sugárterápia, ahol a sugárzás leadásánál figyelembe veszik a beteg lélegzési ütemét (9), másrészt sugárérzékenyítő szerek kifejlesztése, illetve a sugárérzékenységért felelős gének illetve jelátviteli útvonalak mind alaposabb feltérképezése, melynek segítségével egyénre szabott terápiát lehetne kivitelezni. Néhány lehetséges módja lehet ennek pl. DNS hibajavításban szereplő gének gátlása, vagy a sejthalált indukáló útvonalak beindítása, vagy épp a sejt túléléshez vezető mediátorok gátlószereinek, illetve p53 reaktivátorok alkalmazása (10). Ehhez adna fontos támpontot, hogy tisztában lássuk a sejtszintű folyamatokat. A következő fejezetben olyan sugárválaszban szerepet játszó tényezőket mutatok be, melyek a munkám szempontjából fontosak.

1.3. Sejtműködés és zavarai

1.3.1. Sejtciklus

Az ember szervezete (ahogy a többi eukarióta többsejtű élőlény is) többféle sejtípusból épül fel, sajátos funkcióval, tulajdonságokkal, s mindegyik eltérő életidővel, proliferációs képességgel jellemezhető, melyeket a különböző életkori sajátságok is módosíthatnak.

Minden sejtünk sejtosztódással jött létre, s ebben a folyamatban a károsodott sejtek kijavítása vagy elpusztítása, így a genetikai állomány pontos továbbadása létfontosságú a szervezet túlélése szempontjából. Ennek zavara, illetve a sejtproliferációs kontroll alól való kiszabadulása viszont súlyos betegségekhez, daganatok kialakulásához, halálhoz vezethet.



3. ábra: a sejtciklus sematikus ábrája (11)

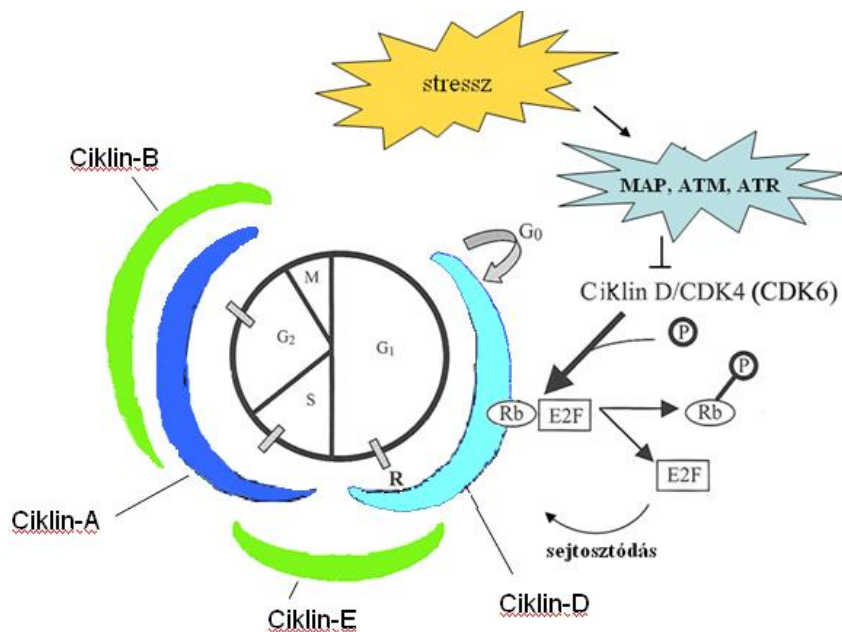
A sejtciklus, melynek során a sejt megkettőződik, 2 fő szakaszból áll: interfázisból és metafázisból (3. ábra).

Metafázisban történik maga a mitózis, az interfázisban pedig a sejt felkészül az osztódásra. Ez utóbbi is több szakaszra osztható: G_1 (a sejt felkészül a DNS másolásra, megalkotja a replikációhoz kellő molekulákat), S (génállomány lemásolódása), G_2 szakaszra (a megkettőződés után a sejt felkészül az osztódásra). Az osztódási ciklus ideje fajonként és sejtípustól függően erősen változhat, de egy tipikus gyorsan osztódó emberi sejténél a szakaszok időtartama a következő: G_1 : 11 h, S: 8 h, G_2 : 4 h, M pedig 1 óra (12). A sejtciklus szabályozásában különböző ciklinek és ciklin dependens kinázok (Cdk-k) vesznek részt, s ezek együttesen végzik a szabályzó fehérjék foszforilálását, ezáltal aktiválását. A sejtosztódás során hibák merülhetnek fel, s ezek kiküszöbölésére, illetve továbbadásának megakadályozására ellenőrző pontok alakultak ki, melyek csak akkor engedik továbbhaladni a sejtosztódást, ha minden rendben történt, így biztosítják, hogy a genetikai állomány sértetlenül adódjon tovább. Ilyen ellenőrző pontokat találunk a G_1/S fázis határán, az S fázisban és a G_2/M között (3).

Az ellenőrző pontban azt ellenőrzi a sejt, hogy génhiba nélkül haladhasson tovább. Ha a „beékelt” szünet alatt az észlelt hibát a rendszer nem tudja kijavítani, vagy az ellenőrző pont nem működik megfelelően akkor DNS szakaszok veszhetnek el, vagy mutációk alakulhatnak ki, ami később a sejt halálát okozhatja, vagy daganatképződéshez vezethet (8).

G_2 pontban a már megkettőződött DNS épségének, illetve osztódásra való felkészültségének ellenőrzése folyik, M ellenőrzési pontban pedig a nem jól szeparálódott kromoszómák utódsejtbe kerülésének megakadályozására törekszik a sejt.

A 4. ábra mutatja a különböző folyamatokat, és azok irányításában részt vevő ciklineket. G_1 fázisra a *ciklin-D* és a Cdk4 vagy Cdk6-kináz aktivitása jellemző. Ha a rendszer nem észlelt hibát, akkor ezek komplexe foszforilálja a retinoblastoma fehérjét (Rb), mely ezáltal elválik az eddig kötött E2F transzkripciós faktortól. Ez utóbbi fehérje aktivál olyan géneket, melyek az S fázishoz való átmenethez szükségesek. G_1 fázis végén megemelkedik a *ciklin-A*, s szintje megemelkedett marad még tovább is, mert szükséges mind a G_1/S átmenethez, az S fázis előrehaladtáig (Cdk2-vel), és majd a G_2/M átmenethez is. G_1/S átmenethez szükség van még a *ciklin-E*-Cdk2 komplexére is. S fázis végén megjelenik a *ciklin-B*, melynek Cdk2 kinázzal képzett komplexe ellenőrzi a mikrotubulusok elrendeződését, valamint a magi struktúrák átrendeződésében van szerepe. Maximumát a G_2/M átmenetkor éri el, majd anafázis alatt eltűnik. (Ha a ciklin-B termelődés vagy Cdk2 foszforiláció blokkolt, G_2 -nél megreked a ciklus.) (3)



4. ábra: a sejtciklus és az azt szabályzó ciklinek időbeli megjelenésének sematikus váza (Radiology Key nyomán (13).)

Oxidatív stressz hatására az E2F molekula felszabadulása gátolva marad, s így nem tudja a sejtciklus folytatásához szükséges géneket aktivizálni.

A ciklinek csak addig vannak jelen, míg szükség van rájuk, aztán ubiquitin-mediált úton gyorsan felemészthetők.

A finomabb szabályozhatóságot ciklindependens-kináz gátlók biztosítják, melyek közül a legtöbbet vizsgált a CDKN1A. A Cdk gátlókat két csoportra lehet osztani: a *kináz-inhibitor proteinek* (KIP) családjára és a *Cdk4-inhibitorok* (INK4) családjára. Mindkét család tagjai a G₁/S ellenőrzési ponton való átmenethez szükségesek (14).

Bármely szabályzó fehérje meghibásodik, az hibás sejtosztódást, daganatképződést, aberráns sejtműködést okozhat. A fontos szabályzó gének csoportjai a következők: (a.) protoonkogének, (b.) szupresszorgének, (c.) ciklinek és Cdk-k, ezek (d.) gátlók, illetve (e.) növekedési faktorok és citokinek. Továbbá a sejt túlélésében még jelentős szerephez jutnak a különféle DNS hibajavításhoz hozzájáruló gének is (15)

A protoonkogének: a normál sejtproliferációt serkentő géncsalád, melyek kiesnek a szabályzás alól, ezáltal túlműködésük lép fel, onkogénekké válnak. Ezek lehetnek pl. *növekedési faktorok* (PDGF, EGF, TGF- β), *növekedési faktor receptorok* (pl. ERBB1, 2, IGFR1 stb.), *jelátvivők* (pl. RAS), *transzkripció faktorok* (pl. NF- κ B, FOS)

A protoonkogének hibás működéséhez elég az egyik allélnak megváltozni.

A tumor szupresszorgének: a proliferáció gátlásában vesznek részt. Az onkogének mellett ezen csoport génjeinek funkcióvesztése növelheti a tumorok kialakulásának esélyeit. Náluk mindkét allélnak el kell veszíteni funkcióját ahhoz, hogy tumorhoz vezessen. Ide tartozik néhány *jelátviteli molekula* (pl. TGF-B2, SMAD, NF1, PTEN), *proliferációt szabályzó gén* (pl. p16, RB1, melynek működési zavara szintén az egyik leggyakoribb oka az emberi daganatok kialakulásának), *sejtciklus szabályzó ill. apoptózist befolyásoló gének* (pl. p53 – a daganatok ~ 50 %-ában jelentkeznek –, BRCA1, GADD45, BAD, Bax, stb..) (15)

Ezen felül még történhetnek olyan vírusfertőzések, melyek beleszólhatnak a normál sejtciklusba oly módon, hogy ösztönzik a számukra előnyös sejtosztódást, hogy beépülhessenek a gazdasejtbe, ill. átvezetik a sejtet az ellenőrzési pontokon, s így tumor

kialakulásához vezethetnek. Frekventált célpontok a P53, ill. a Rb fehérjék. (Ilyen pl. az SV40, és CJ vírusok) (16).

A **p53** fehérje az egyik legfontosabb – ha nem a legfontosabb – fehérje a sejt megfelelő működésének fenntartásában, illetve a fellépő hibák kezelésében. A genom megőrzéséért felelős gén, melynek szerepe van a sejtciklus szabályozásában, DNS hibajavítási folyamatok alakulásában, szükség esetén az apoptózis felé irányításban. (17) Normál esetben a p53 transzkripciós faktor szintje alacsony, rövid életű, gyorsan lebomlik. A sejtet érő stresszre (DNS-károsodás, alacsony oxigénszint, sugárhatás, a mitotikus orsó sérülése, onkogén aktiválódás) - különféle szignálmolekulákon keresztül (pl. DNA-PK, kazein-MAP, SAP, sugárkárosodásra legfőképp az ATM és ATR) foszforilálódik, megnő az életideje, s fokozódik a hatása. Ha a sejtet DNS sérülés éri, képes önmaga is felismerni a károsodás helyét, illetve más, hírvivők aktiválják további feladatokra. (15)

A sejtciklus és sejtműködés egy tipikus megzavarója az ionizáló sugárzás, mely sértheti a DNS-t, illetve kárt okozhat még fontos szabályzó fehérjékben is, mindezeknek súlyos következményei lehetnek (ahogy már korábban említettem: különböző tumorok, vagy sejtípustól függően eltérő típusú sejthalál: apoptózis, nekrozis, szeneszencia, mitotikus sejthalál kialakulása).

Az ionizáló sugárzás nem csak a genomiális, hanem a mitokondriális DNS-t is roncsolhatja. Ennek sérülései sem elhanyagolhatók, hiszen ismert a tény, hogy a mitokondriális sérüléseknek kihatása lehet a genomiális DNS épségére, s genetikai instabilitáshoz is vezethet. (18, 19) A mitokondriális DNS leggyakrabban előforduló sérülése egy 4977 bázispár hosszúságú szakaszának kitörése (deléciója) a DNS-ből (ún. Common deléció). (20) Ennek megtörténtének és mértékének detektálása szintén segíthet képet kapni a sejtek épségének és állapotának felméréséhez.

1.4. Sugárzás indukálta mediátorok szerepe a sugárválaszban

Sugárzás következtében kialakuló DNS törések által kiváltott sejtválaszért egy komplex jelátvivő rendszer (ún. „DNA damage response” (DDR)) aktiválódik (17, 21) felel. Ennek részeként a rendszer két fő elindító molekulája az „ataxia-telangiectasia

mutated kináz” (ATM), illetve az „ataxia telangiectasia and Rad3-related protein” (ATR) Ezek további szabályzó fehérjéket, transzkripció faktorokat foszforilálnak, s így kulcs irányítói a sugárzás után lezajló folyamatoknak. Az ATM aktiválhatja a Chk2-t, továbbá a p53-t (s ennek mediátorát, az MDM2-t), illetve DNS hibajavítás egyik lehetséges útvonalaként a BRCA1-et (22, 23). Hogy mekkora mértékű a DNS sérülése, illetve a p53 mely részén foszforilálódik, az fogja eldönteni a sejt további sorsát (10). Ser-15-nél foszforilálva a sejtciklus leállításáért felelős fehérjék (pl. a CDKN1A vagy a GADD45A-n keresztül) vagy a DNS hibajavításban szereplő fehérjék (DDB2, MSH2) átíródását indítja el; Ser-46-os helyen autofágia (BNIP3, SESN2), apoptózis (Bax, Puma, NOXA), szenescencia, vagy mitotikus katasztrófa irányába is terelheti a sejtet (10, 24).

Az autofágia szerepe a túlélésre kettős. Alapvető feladata a meghibásodott sejtalkotók megsemmisítése, felemésztése a sejtből. Ha a hibás organelumok mértéke nem haladja meg a kritikus mennyiséget, az a sejt túlélését eredményezi, ha viszont túl sok a hiba és nem képes kiküszöbölni azokat, az a sejt halálát eredményezi (25-27). Alapvetően az mTOR és az Atg1 kináz szabályozzák, hogy kialakuljon-e autofágia, de további kaszkádmolekulák is nélkülözhetetlenek a folyamatok beindításához (26). A sejt elpusztulása ellen hat az EGFR, mely beindítva a PI3K/AKT1 útvonalat, mely további anti-apoptotikus (BCL2L1, NF- κ B), vagy a DNS hibajavításban közrejátszó géneket aktivál (10). Autofágia kialakulásában közrejátszhat, továbbá sejtvédő tulajdonságai miatt az EGFR túltermelő tumorok elleni célzott terápia egyik fő célpontja, gátlásával a daganatok érzékenyíthetővé válnak sugárzásra (28).

Ishwarya Venkata Narayanan normál humán fibroblasztokban 2 Gy hatására 1, 2 és 4 órával a besugárzást követően számos gén működésének változását mutatja be egyik 2017-es cikkében. A már említetteken kívül többek között a BTG2, EGR1, SESN1, MYC, PAPA gének expressziója is megváltozott (ezek a sejtciklus szabályozásban, sejtproliferációban, gyulladásban, oxidatív stressz-válaszban vesznek részt) (29).

Ezen jelátviteli útvonalakhoz tartozó gének működésbeli eltérése mind hozzájárulhat az egyéni sugárérzékenység alakulásában.

1.5. Az általunk vizsgált sugárválasz gének tulajdonságai, kapcsolata a sejt túlélésével

Sugárválasz géneknek nevezzük azokat a géneket, melyeknek sugárzásra reagálnak, következtében megváltozik az expressziójuk.

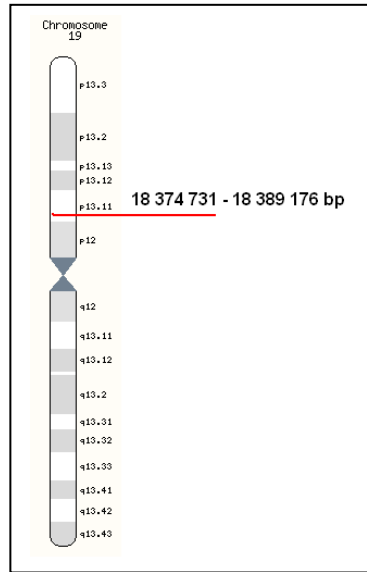
Korábbi fibroblaszt sejteken végzett in-vitro kísérleteinkkel beazonosítottunk néhány olyan sugárválasz gént, melyeknek kis és nagy dózisú besugárzásra is változott a működésük. Ezek közül kettőt választottunk ki további funkcionális vizsgálatokhoz.

1.5.1. GDF-15 (Growth Differentiation Factor-15)

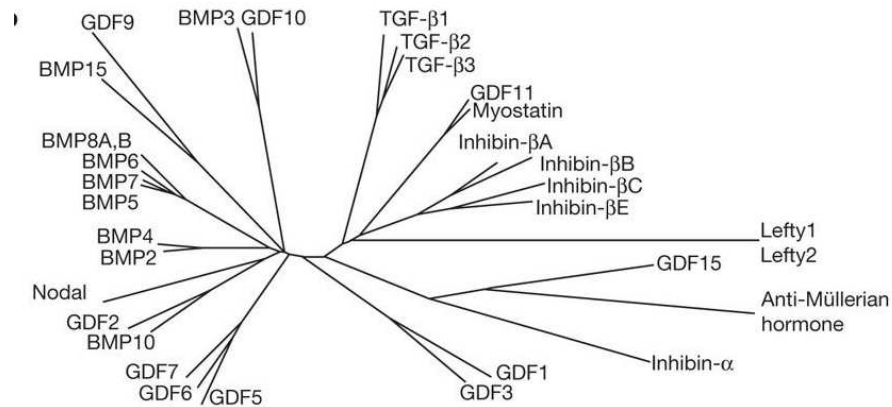
A GDF-15 gén (mely ismert még „non-steroidal anti-inflammatory drugs activated” gén (NAG-1), „prostate differentiation factor” (PDF), „placental bone morphogenetic protein” (PLAB) és „macrophage inhibitory cytokine” (MIC) néven is (30)) egy kb. 25 kDa-os, 446 bázispárból álló (szerkezetét ld. 5. ábra), 19-es kromoszómán elhelyezkedő gén által kódolt fehérje (6. ábra), mely a TGF- β szupercsalád tagja (ld. 7. ábra; benne is megtalálható a TGF- β -ra jellemző hét konzervált karboxi-terminális cisztein) (31). A család többi tagjával csak körülbelül 15–29 %-os szekvencia azonosságot mutat (32). Az 1990-es években fedezték fel placentából izolálva.



5. ábra: a GDF-15 fehérje szerkezete (33)



6. ábra: a GDF-15 gén 19-es kromoszómán belüli elhelyezkedése (34)



7. ábra: a TGF- β géncsalád filogenetikus fája (35)

Maga a gén 2 exonból és egy középük ékelődő intronból áll (31). Számos transzkripciósfaktor, köztük leginkább a p53, a Sp1 és Sp3 szabályozza expresszióját (36, 37).

Kis mennyiségben majdnem minden szervben termelődik, legnagyobb mennyiségben a placentában, prosztatában, májban, vesében és tüdőben fejeződik ki, de kis mennyiségben a vastagbélben, és az agyban is (35).

Hatása elég szerteágazó, részt vesz a sejt növekedésében és differenciálódásában (38), ismert kapcsolata a gyulladásos folyamatokkal, szöveti sérülések gyógyulásával (gyulladás-keltő molekulák hatására (pl. IL-1 β , IL-2, TNF- α , TGF- β) aktiválódnak a makrofágok, s ezzel egy időben elkezd termelődni a GDF-15 is, mely a gyulladás ellen hat autokrin módon, mintegy negatív visszacsatolásként szolgálva (32). Hatással van a szív- és érrendszeri betegségek, valamint tumorok kialakulására, illetve azok súlyosságára (39-45). Ez esetekben a vérben vagy adott szövetben megváltozó koncentrációja miatt biomarkerként is használják a diagnosztikában (10, 46, 47). Gyermekek váró anyák vérplazmájában is megemelkedik koncentrációja (48). Étvágycsökkentő, s ennek köszönhetően elhízás elleni hatását is felfedezték (49). Emelkedett GDF-15 szérumszintet mértek diabéteszes és az ennek következtében kialakuló krónikus veseelégtelenségben szenvedő betegek vérében (50).

Hatásmechanizmusa és receptora még nem teljesen feltérképezett, eddigi feltételezések szerint a TGF- β receptorain keresztül kapcsolódik (51), de a közelmúltban az agyi neuronoknál megtalálták receptorát (GFRAL) (41).

A GDF-15 molekula kedvező hatásairól többen is beszámoltak, pl. Kirti Kumar Tiwari, aki egy 2015-ös cikkében leírta, hogy humán tüdő endotél sejtekben fellépő hiperoxia esetén oxidatív stressz és DNS károsodás lépett fel, mely a GDF-15 gén kifejeződésének növekedését eredményezte, aminek túlélést segítő és antioxidáns hatása volt (37).

1.5.1.1. Sugárzás és GDF-15

A gén sugárzással való összefüggését még kevesen vizsgálták. Shuang Li és munkatársai dózisfüggő emelkedését mérték humán limfoid sejteken (1-10 Gy-ig) (52). Tüdő fibroblaszt sejteket alfa-részecskékkel sugározva is a gén megemelkedett expresszióját találták (53). Emlő tumoros biopsziákban is megnőtt a kifejeződése sugárterápia után a terápia előtti állapotához képest. (54)

Említésre méltó, hogy a GDF-15 aktivációját megfigyelték humán fibroblasztokban látható fény és közeli ultraviola sugárzás hatására is (55).

Humán dermális fibroblasztokban ennek a génnek sugárválaszát és abban kifejtett konkrét szerepét eddig csak a mi munkacsoportunk vizsgálta.

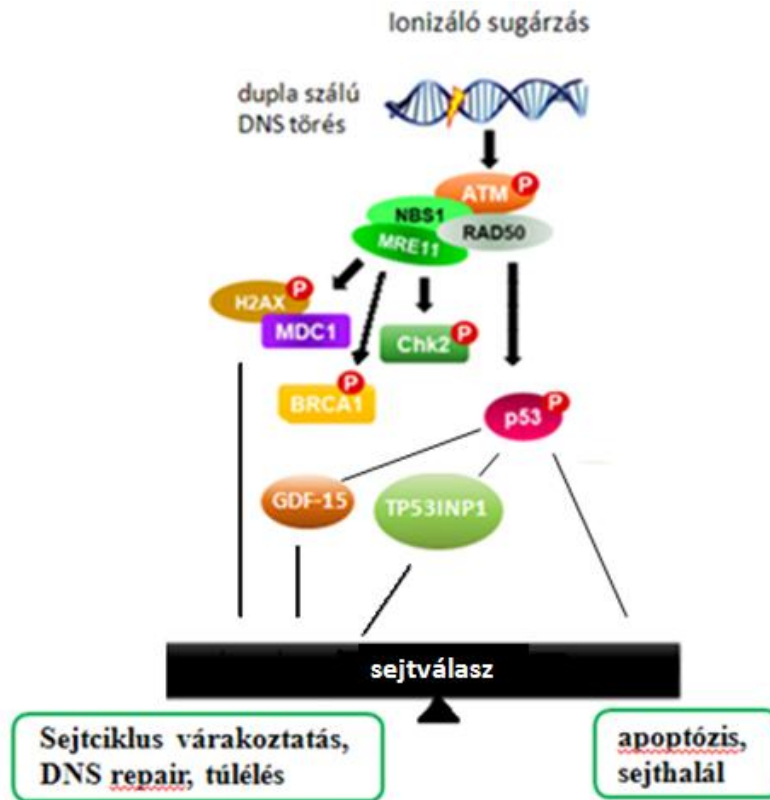
1.5.2. TP53INP1 (Tumor Protein P53 Inducible Nuclear Protein 1)

Egy másik sugárválasz gén, a TP53INP1, a 8-as kromoszómán található (8q22.1). Az irodalomban ismert még „stress-induced protein” (SIP), „p53-dependent damage-inducible nuclear protein 1” (p53DINP1) és „thymus-expressed acidic protein” (TEAP) néven is (56). E gén két izomorfája létezik: a TP53INP1 α és a TP53INP1 β . A mi méréseink az α izomorfa vonatkoznak.

A szóban forgó gén egy olyan stressz-válasz gén, mely különféle hatásokra (kemoterápiás szerekre, alkoholra, hősokk hatására, erős oxidáló szerekre vagy UV, látható vagy gamma-sugárzásra (57, 58) aktivitása megemelkedik. A p53, p73 vagy E2F1 molekulák aktiválhatják, ugyanakkor ő is képes a p53 gént szabályozni a Ser-46 foszforilálása által (56). Túlműködése sejtciklus gátláshoz és apoptózishoz vezethet emlő tumor és humán embrionális vese sejteknél (59). Gátlásával a DNS törés által indukálódott sejthalál és a sejtciklus gátlás kisebb mértékű volt (25). Oxidatív stressz enyhítő hatását többen is leírták (60, 61). Sejtípustól függően növeli vagy csökkenti a sejtproliferációt és sejt migrációt mir-125b microRNS-en keresztül (62). Tumoros elváltozások kialakulására is hatással van (60, 62-64).

Sugárhatásban betöltött szerepéről még nem sokan írtak; részt vesz a sugárzás indukálta autofágia kialakulásában LC3 molekulához kötve (60, 65).

A 8. ábra a GDF-15 és TP53INP1 közreműködését mutatja be a sugárválaszban:



8. ábra: a sejt DNS kettős törésre adott válasza. Az ATM által aktivált gének és jelátviteli utak szabják meg a sejt további sorsát. Ebben nagy szerepe van a p53 transzkripciós faktornak, a GDF-15 és a TP53INP1 fehérjéknek is (Wonhee Hur és Seung Kew Yoon nyomán (21)).

1.6. Kísérleti rendszerünk

Testünk egész felületét bőr borítja, melynek hám alatti részét a laza rostos kötőszövethez tartozó fibroblaszt sejtek alkotják. In-vitro sejttenyészetben modelleztük e sejtípus viselkedését sugárhatásra. Mivel a primer sejttenyészet élettideje rövid (kb. 50 passzálsig / generációig tart), a sejteket immortalizáltuk, s ezáltal könnyen kezelhető kísérleti rendszerhez jutottunk.

Mivel a diagnosztikus eljárások során kis dózisok érik az embert, a sugárterápia során pedig általánosan 2 Gy-es frakciókkal kezelik a beteget (66), ezért a kísérleteinkhez mi is (kis dózissnak számító) 0,1 Gy-t és 2 Gy-t alkalmaztunk.

2. Célkitűzések

Célunk olyan sugárválasz gének azonosítása volt, melyek hozzájárulnak a direkt sugárzást kapott, vagy a sugársérült sejt környezetében lévő sejtek túléléséhez, továbbá hatással vannak az egyéni sugárérzékenység mértékére.

Kérdéseink az alábbiak voltak:

1. Meghatározni a GDF-15 és a TP53INP1 gén ionizáló sugárzásra adott válaszát fibroblasztokban (dózis- és időfüggés mérése)
2. Hogyan befolyásolja a sejtek ionizáló sugárzásra adott válaszreakcióit a GDF-15 és TP53INP1 gének működésének gátlása?

3. Módszerek

3.1. F11 primer humán fibroblaszt sejtvonal és sejtenyésztés

Az in-vitro kísérletekhez felhasznált sejtvonalak alapját egy humán bőr biopsziából kitenyésztett (primer) fibroblaszt sejtkultúra (**F11**) képezte. E primer tenyészetből immortalizált sejtvonalat hoztunk létre (**F11-hTERT**) a humán telomeráz fehérje (hTERT) cDNS-nek stabil bevitelével. Ehhez egy olyan plazmidot használtunk, amelyet Dr. Lansdorp, Terry-Fox Laboratory, BC Cancer Research Centre, Vancouver, British Columbia, Canada V5Z 1L3 bocsátott rendelkezésünkre. A plazmid a hTERT cDNS mellett markerként a zöld fluoreszcensfehérjét (GFP) is kódolta és alkalmas volt arra, hogy retrovírus pakoló sejtekben róla a hTERT és GFP fehérjéket kódoló retrovírusok keletkezzenek. A transzdukció nem volt 100 %-os hatékonyságú, ezért (hogy a továbbiakban mégis elkerüljük a nem immortalizálódott sejtek használatát) a GFP termelés hatására zölden fluoreszkáló - és így hTERT génnel is rendelkező - sejteket áramlási citométerrel válogattuk ki.

Az így nyert sejtek és az összes továbbiakban említett sejt tenyésztése és fenntartása 10 %-os magzati borjú szérum (FBS), 1 %-os antibiotikum (Penicillin/Streptomycin) és antimikotikum (Amphotericin B) és 1000 mg/l glükóz tartalmú Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (SIGMA, St. Louis, MO, USA) alap médiumban történt, 36,7 °C-ot és 5 %-os CO₂-szintet biztosító termosztátban.

3.1.1 Stabil GDF-15 géncsökkentett sejtvonalak létrehozása

A már kialakított F11-hTERT sejteket olyan lentivírussal kezeltük, mely GDF-15 mRNS-re komplementer ún. shRNS (rövid hajtűszerű RNS) szakaszt is kódol. (MISSION Lentiviral Transduction System, SIGMA). A vektorba az shRNS szakasz mellett puromicin rezisztencia gén is be volt illesztve, így a GDF-15 gén expressziójában gátolt fibroblasztoknak (továbbiakban: MTP klónok) szelekciója lehetővé vált (két héten keresztül 1 µg/ml-es puromicin tartalmú tápoldatban növesztve). A „MISSION Lentiviral Transduction System” 5 különböző shRNS konstrukciót tartalmazott, ezekkel 5 különböző, elméletileg GDF-15 géncsökkentett fibroblaszt kultúrát tudtunk kialakítani (MTP1, MTP2, MTP3, MTP4, MTP5). Mivel ezek mindegyike heterogén sejthalmazból állt, így hogy egységes genetikájú

sejtvonalakat kapjunk, s hogy azok közül is hozzájussunk a leginkább géncsendesített sejttenyészethez egy sejtől kiinduló, egyedi klónokat növesztettünk. Ehhez egy 10 cm átmérőjű Petri csészére 1000 db sejtet oltottunk ki, majd a kinövő telepeket egyesével felvettük és szeparálva tovább növesztettük még mindig puomicin tartalmú szelekciós médiumban tartva őket. A géncsendesítés hatékonyságát az egyes sejtvonalakban az 1. táblázat mutatja be. Ez alapján a további munkánkhoz ki tudtuk választani a leginkább géncsendesített sejtvonalat, továbbiakban ezt a sejtvonalat MTP1/4 névvel jelzem. Meg kell említeni, hogy a tenyésztett klónok közt volt olyan is, mely GDF-15 mRNS kifejeződésében nem csökkent, hanem nőtt (ezeket MTP2/3 névvel láttuk el). Ezeket egyes mérésekben szintén felhasználtuk pozitív kontrollként.

Így a GDF-15 gén funkcionális vizsgálatát célzó kísérleteinkben a normál F11-hTERT sejtvonal mellett a fent említett MTP1/4 és MTP2/3 klónokkal dolgoztunk.

3.1.2. TP53INP1 géncsendesítés

Szintén a már említett F11-hTERT immortalizált humán fibroblaszt sejtvonalból történt, de ebben az esetben TP53INP1 gén által kódolt mRNS-ekre komplementer shRNS-eket (TP53INP1-shRNA) és puomicin-rezisztencia gént tartalmazó lentivírus vektorral (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) fertőztük a sejteket, hogy TP53INP1 géncsendesített fibroblasztokhoz jussunk. Több hétig puomicines szelekciós médiumban tartva a sejteket stabil TP53INP1 géncsendesített sejt kultúrát alakítottunk ki.

TP53INP1 csendesítése esetén is több, ez esetben 3 féle vektor állt rendelkezésünkre. Legjobb hatásfokkal a 2-es klónban sikerült a gén gátlása: ebben a kiindulási fibroblaszthoz képest közel harmad akkora TP53INP1 kifejeződést találtunk. Dolgozatom többi részéhez már ezekkel a klónokkal dolgoztam, melyek a továbbiakban shTP53INP1 néven fognak szerepelni.

3.2. Szomszédsági (ún. bystander) vizsgálatok

Ezen vizsgálatokkal arról akartunk információt kapni, hogy milyen változás történik akkor, ha a sejteket nem éri sugárzás, de kapcsolatba kerülnek olyan sejtekkel, melyeket viszont ért. Ilyen kísérleteket a normál fibroblasztok GDF-15 és TP53INP1 génkifejeződéses vizsgálatainál, illetve a mitokondriális DNS sérülések témakörében alkalmaztunk.

Ebben a modellben a besugározott sejtenyészet (donor) médiumát kapták meg a befogadó sejtek, s azzal inkubáltuk őket 2 órán át. További részleteket a megfelelő kísérlet leírásában közlök.

3.3. Valós idejű kvantitatív polimeráz láncreakcióval (qPCR) történő mérések

3.3.1. Génexpressziós vizsgálatok mérése a genomiális DNS-ről átíródó mRNS-ekkel (RNS izolálás, cDNS átírás, valós idejű kvantitatív PCR)

RNS izolálás

A lefagyasztott sejtekből előbb totál RNS-t izoláltunk (RNeasy Mini kit-tel, QIAGEN GmbH - Germany), spektrofotométerrel mértük az egyes minták RNS koncentrációját (260/280 nm-en), majd az összehasonlíthatóság kedvéért azonos mennyiségű (1-1 µg) RNS-ekből kiindulva cDNS-sé írtuk át azokat reverz transzkripció segítségével (High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, *Applied Biosystems*TM, USA).

cDNS átírás:

Minden egyes (RNS) mintához az alábbi reakcióelegyet kevertük össze külön csövekbe:

- 10 X RT Buffer	(2 µl)	} 10 µl
- 25 X dNTP Mix	(0,8 µl)	
- 10 X RT Random Primers	(2 µl)	
- Multi Scribe TM Reverse Transcriptase	(1 µl)	
- nukleáz mentes víz	(4,2 µl)	

- valamint a vizsgálati mintából származó RNS 1µg-jának megfelelő térfogat, } **10 µl**
és annyi nukleáz mentes víz, mely 10 µl-re kiegészíti.

Így a két 10 µl-es részlet összekeveréséből eredő **20 µl-es** össztérfogatú elegyeket *BioRadiCycler* típusú „fél-kvantitatív” PCR készülékbe helyeztük, és az alábbi beállítások mellett polimeráz láncreakcióba vittük:

1. lépés: 25 °C, 10 perc
2. lépés: 37 °C, 120 perc
3. lépés: 85 °C, 5 perc
4. lépés: 4 °C, ∞ perc

A kvantitatív PCR reakció paraméterei általánosan a következők voltak:

25 µl-es végtérfogatú reakcióelegyet használtunk, melynek komponensei egy mintára és egy génre nézve:

- 12,5 µl Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (Thermo Scientific Ltd.,

Loughborough, UK), mely tartalmazza:

- a kettős szálú DNS láncba beépülő fluoreszcens festéket (Maxima SYBR Green),
- apolimeráz enzimet (Maxima Hot Start Taq DNA polimeráz),
- a beépülő nukleotidokat (dNTP) és a sókat.

- 2 µl cDNS

- 1,3 µl primer pár (egy génhez tartozó *forvard* és *reverz* irányú oligonukleotid

elegye, 12,5 pM-os koncentrációjúra kihígítva; (Integrated DNA

Technologies, Inc.)

- 9,2 µl víz

A PCR reakciót Rotor-Gene, Corbett-3000 real-time PCR System System, (Invitrogene, Carlsbad, CA, USA) típusú készülékben végeztük az alábbi paraméterekkel:

1. Kezdő **denaturáló** szakasz (10 perc, 95 °C-on)
2. **Amplifikáció** 40 ciklussal;
minden ciklusban 3 szakasz épül egymásra:
 - a.) denaturáció: 95 °C, 30 s,
 - b.) primerek kapcsolódása: 59 °C, 30 s,
 - c.) meghosszabbítás: 72 °C, 30 s.
3. Végül egy folyamatos **melegítés** 72 °C-ról 95 °C-ig az „olvadáspont-görbe analízishez”.

Referencia (ún. housekeeping) génként a:

- **β -actin-t** (F: 5' - TTGCCGACAGGATGCAGAAGGA - 3',

R: 5' - AGGTGGACAGCGAGGCCAGGAT - 3'), és a

- **GAPDH-t** (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)

F: 5' - CGACCACTTTGTCAAGCTCA - 3',

R: 5' - AGGGGTCTACATGGCAACTG - 3')

választottuk.

A relatív génexpresszió változás kiszámításához a $\Delta\Delta Ct$ értékeket használtuk fel; a változás mértéke mindig egy kezeletlen, kontroll mintához lett viszonyítva. Ct érték (Threshold Cycle) alatt azt a ciklusszámot értjük, ahány szükséges volt egy bizonyos mennyiségű termék eléréséhez. A PCR reakció végére minden egyes mintában minden általunk vizsgált génhez hozzárendelhető egy Ct érték. Az egy adott mintához tartozó vizsgált gén Ct értéke és a referencia gén Ct értékének különbség a ΔCt . $\Delta\Delta Ct$ pedig a kezelt minta ΔCt értékének és a kontroll minta ΔCt értékeinek különbségéből adódik. Ebből számítható a két minta közt fennálló relatív mennyiségbeli különbség.

Minden eredmény két technikai párhuzamos, ill. több biológiai mérés átlagaiból adódik.

3.3.1.1. Génexpresszió változás közvetlenül besugározott és bystander fibroblasztokon

Ezen méréseknél a donor és befogadó sejteket is az F11-hTERT szolgáltatta. Közvetlen hatás méréséhez dózisonként 1-1 (25 cm² alapterületű) tenyésztő flaskába 500-500 ezer darab sejtet oltottunk ki. Besugárzásuk az ezt követő napon történt 0; 0,01; 0,04; 0,1; 0,5 és 2 Gy gamma-sugárzással (Co⁶⁰ sugárforrást alkalmazva, kis dózisonál 0,0244 Gy/perc, nagy dózisonál 0,37 Gy/perc dózisteljesítményt alkalmazva; Gammatron-3; Siemens, Erlangen, Germany). 2 h-val a besugárzást követően a sejteket begyűjtöttük, s további génexpressziós vizsgálatokig -70 °C-ra le lettek fagyasztva, felhasználásig ott tároltuk őket.

A szomszédsági hatás méréséhez két csoportra osztottuk a sejteket (szintén 500-500 ezer db sejt /flaska-val dolgozva) donor és befogadó „szerephez”. A donor csoport flaskáit a fent említett dózissal sugaraztuk be, 2h elteltével ezek ún. kondicionált médiumait áthelyeztük a kezeletlen, nem besugározott (befogadó) sejtekre. Genomiális DNS-en kódolt gének működésének vizsgálatánál ezt a kondicionált médiumot 2 h-n keresztül hagytuk rajta a befogadó sejteken, ezt követően (a direkt besugározott sejtekhez hasonlóan) ezeket is összegyűjtöttük, lefagyasztottuk, majd későbbi RNS izolálás után génexpressziót mértünk (9. ábra).

A GDF-15 gén relatív expresszió változásának méréséhez (a már említett, sugárzás következtében nem változó háztartási géneken kívül) a következő primer párt alkalmaztuk:

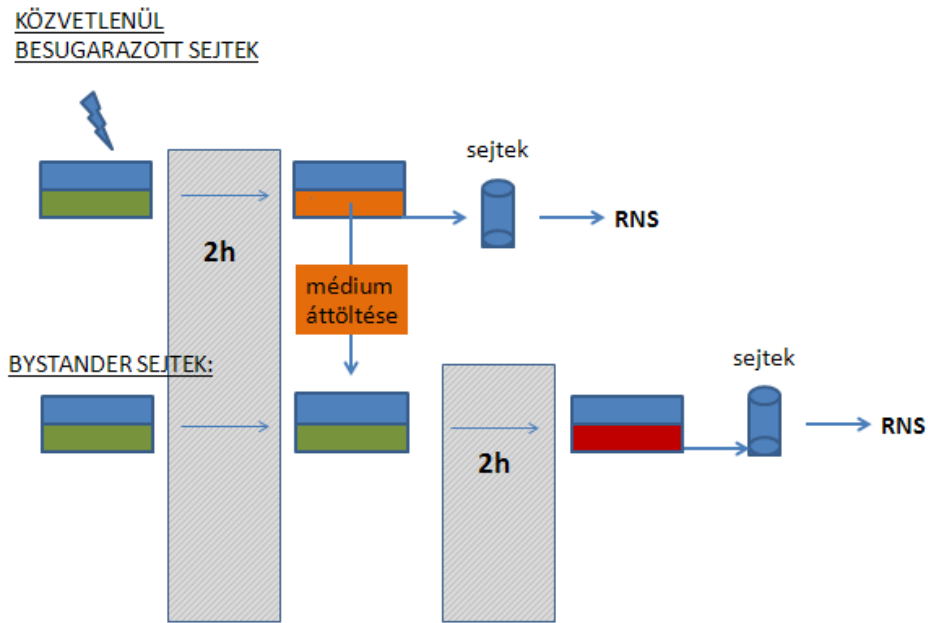
GDF-15: F: 5'– CCA AAG ACT GCC ACT GCA TA – 3'

R: 5'– CCA AGA AGG TCA CCC CAA TA– 3';

TP53INP1 gén változásának meghatározásához pedig:

F: 5'- TCA GCA GAA GAAGAAGAAGAA GAG - 3',

R: 5'- AGC AGG AAT CAC TTG TAT CAG C - 3'



9. ábra: a bystander kísérletek vázlatos folyamat ábrája

3.3.1.2. Géncsendesítés hatékonyságának ellenőrzése, illetve sugárzás indukálta génextpressziós változások normál és géncsendesített fibroblasztokban

A géncsendesítés megtörténtéről is valós idejű qPCR segítségével győződünk meg.

Az 3.1.2. fejezetben leírt módon kiszelektálódott MTP1/4 sejtvonalban vizsgáltuk a GDF-15 változását. 2 Gy besugárzás következményeinek időbeni változásához, illetve a kiütés meglétének igazolására F11-hTERT és MTP1/4 sejteket oltottunk ki, majd a következő napon besugaraztuk, majd 2, 4, 24, 48 órával később begyűjtöttük őket, s a bennük termelődő GDF-15 expresszióját valós idejű qPCR-el határoztuk meg az 4.2.1. pontban leírtak szerint. Ezt követte az, hogy ugyanezen sejtvonalakon a 2 h-s időpontnál más dózisok hatásait is megnézzük. Így a hasonlóképpen kioltott sejteket másnap nem csak 2 Gy-el, hanem 0,01; 0,04; 0,1; 0,5 Gy-el is besugaraztuk. Két órával a procedúra után a sejteket lefagyasztottuk, majd a szokásos RNS izolálás és cDNS gyártás után polimeráz láncreakciót (qPCR) végeztünk.

A TP53INP1 gátlásának igazolása következőképpen történt: F11-hTERT sejtekből és shTP53INP1 sejtekből is ugyanannyit oltottunk ki kontroll csoportba és besugaraztunk

csoportba. Utóbbiak 2 Gy-el lettek besugározva, majd 2 órával később belőlük is és a nem besugározott csoportból is RNS lett izolálva a későbbi kvantitatív PCR reakcióhoz.

A méréshez az előző fejezetekben leírt primereket használtuk.

3.3.1.3. GDF-15 illetve TP53INP1 gén gátlásának következménye egyéb sugárválasz gének kifejeződésére

A GDF-15 ill. TP53INP1 mellett más olyan gének működését is mértük ezen a módosított sejtvonalakon, melyek működése előzetes mérések alapján ionizáló sugárzás hatására szintén megváltozik, valamint összefüggésben állnak a sejtciklus szabályozással, hibajavítással, és egyéb stressz-válasz folyamatokkal.

Ezek pedig a:

- **TGF- β 1:** F: 5' – CCG CTT CAC CAG CTC CAT GT - 3',
R: 5' - TGC TAC CGC TGC TGT GGC TA - 3',
- **CDKN1A:** F: 5' - CCT CAT CCC GTG TTC TCC TTT - 3',
R: 5' - GTA CCA CCC AGC GGA CAA GT - 3',
- **GADD45A:** F: 5' - TCA GCG CAC GAT CAC TGT C - 3',
R: 5' -CCA GCA GGC ACA ACA CCA C - 3',

valamint a **GDF-15** és a **TP53INP1** gének voltak (e két utolsó gén primereinek szekvenciáját már ismertettem).

A tenyésztőedényben növekvő sejteket 2 Gy γ -sugárzásnak vetettük alá, majd 2 h inkubációs idő után a sejteket összegyűjtve RNS-t izoláltunk, majd PCR reakciót indítottunk.

3.3.2. Mitokondriális DNS károsodás vizsgálat

Ennél a kísérletnél a sejtekből teljes DNS-t izoláltunk. (Master Pure DNA Purification Kit; EPICENTRE Biotechnologies, Madison, Wisconsin) A mitokondriumokban a károsító hatások következtében (pl. ionizáló sugárzás, toxikus anyagok) leggyakrabban

megsérülő szakasza az ún. Common Deléció (CD) régió. A sejtet ért károsodás becsülhető ezen kiesett deléció szakaszok mennyiségének meghatározásával, melyet valós idejű qPCR technika segítségével kvantifikálni tudunk.

E vizsgálattal egy részről a **GDF-15** gén jelentőségét igyekeztünk feltérképezni direkt besugározott és bystander sejtekben. Ehhez F11-hTERT és MTP1/4 sejteket sugaraztunk be 2 Gy-el (25 cm²-es flaskákban; 500 000 db / flaska denzitással), majd ezt követően direkt hatás méréséhez a besugározott sejteket 72 h-val a kezelést követően begyűjtöttem, DNS izolálást követően 1 µg DNS mintában a mitokondriumukban felhalmozódó DNS deléciók arányát mértük qPCR-rel. A szomszédsági hatás méréséhez a besugárzás után 2 h-val a besugározott vagy kontroll sejtek médiumára cseréltük a nem kezelt, ugyan azon sejtípushoz tartozó sejt kultúrák médiumát. 72 h-val a médiumcserét követően a befogadó sejteket is leszedtük, majd ugyan úgy PCR reakcióval mértük a deléciók mennyiségét.

Másrészről a **TP53INP1** hiányos sejteknél direkt hatásban néztük a géncsendesítés eredményét. A sejteket itt 0; 0,1; 0,5 és 2 Gy-el sugaraztuk be, majd ezek is szintén 72 h-ig inkubálódtak a feldolgozás előtt.

A reakció paraméterei a már említettek szerint voltak beállítva; a reakció elegy összetételében annyi különbséggel, hogy 2 µl cDNS helyett 1 µg mennyiségnek megfelelő térfogatú teljes DNS-t használtunk fel. Vagyis:

- 12,5 µl Maxima SYBR Green qPCR Master Mix
- 2 µg DNS
- 1,3 µl primer pár (12,5 pM)
- annyi µl nukleáz mentes víz, hogy a végtérfogat 25 µl legyen.

Ezen kísérlethez használt primer szett:

1. **mtDel:** a deléció szakasz két végéről induló primerek, melyek csak akkor adnak terméket, ha a deléció szakasz kiesett, a deléció megtörtént

F: 5'- CCC ACT GTA AAG CTA ACT TAG CAT TAA CC -3';

R: 5'- GGT TTC GAT GAT GTG GTC TTT G -3'.

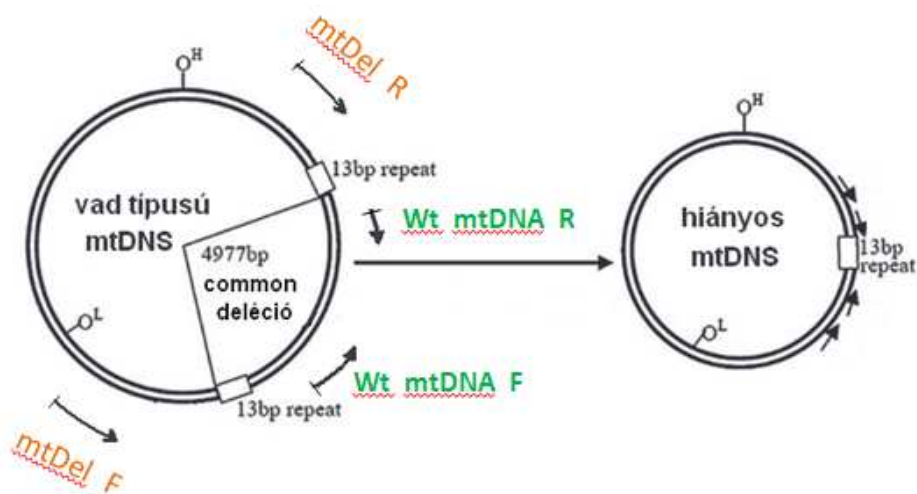
2. **WTmtDNA**: a deléciós szakaszban lévő régió, mely csak akkor hoz fel terméket, ha a DNS ép maradt

F: 5'- CTG AGC CTT TTA CCA CTC CAG -3',

R: 5'- GGT GAT TGA TAC TCC TGA TGC G -3').

3. referencia génnek ez utóbbi mellett a genomiális GAPDH-t használtuk.

A fenti primer szettek mitokondriális genomba való elhelyezkedését az alábbi (10.) ábra szemlélteti:



10. ábra: Humán mitokondriális DNS szerkezete a sugárzás hatására gyakran kitörő „Common Deléció” szakasszal. Baloldalon a még ép DNS, jobb oldalon a már kitört 4977 bázispár nélkül. Ez utóbbi csak akkor ad terméket PCR reakcióval, ha a neki megfelelő mtDel F+R primer párral dolgoztunk, a WtmtDNA primer párral nem.

3.4. Géncsendesítés hatékonyságának fehérje alapú ellenőrzése, a sugárzás indukálta GDF-15 fehérje termelés időbeni változásának megfigyelése ELISA-val

Mivel a GDF-15 egy szekretálódó citokin, a termelődő fehérje mennyiségét a sejtek felülszójából is meg lehet határozni. F11-hTERT sejteket, valamint ennek GDF-15-öt alul- és felülexpresszázó módosulatát vizsgáltuk. Tenyésztőedényenként (25 cm²) 1 millió sejt lett kioltva, majd egyes tenyészetekről leszedett médiumot kioltástól számított 24, 30, ill. 48 h-val később gyűjtöttük be. Ezeket bekonzentrálva használtuk a

méréshez: 15-15 ml leszívott tápoldatot filteres centrifuga csövekben 4000 g-vel centrifugáltuk 30 percig szobahőmérsékleten. (AmiconUltra-15 Centrifugal Filter Devices, Millipore). A produktumból 150-150 µl-t használtunk fel a *GDF-15* tartalom meghatározáshoz (Human GDF-15 Quantikine ELISA Kit). Az eredményeket egy ismert koncentrációjú standardsor mérése alapján számítottuk ki.

3.5. Sugárérzékenység vizsgálat

A sejtek sugárzás utáni túlélését kolónia-képző kísérlettel mértük. Mind az alap sejtvonalból, mind a kérdéses génre nézve (akár *GDF-15*, akár *TP53INP1*) túltermelő illetve alulexpresszázó változatból egy sejt szuszpenziót létrehozva azonos mennyiségű sejtet oltottunk ki (500-500 vagy 1500-1500 db / 10 cm átmérőjű Petri csésze), dózisonként 3 párhuzamossal. Kioltság utáni napon a Petri csészéket 0,2 vagy 4 Gy gamma-sugárzással kezeltük, majd termosztátban további 2 hétig tenyésztettük. A kifejlődött telepeket metanol / ecetsavas fixálás után 1 %-os Comassie brillant kék R-250 festékkel tettük láthatóvá. Életképes telepnek az 50 vagy a fölötti sejtszámot elérő sejtsoportosulást vettük. A sugárzásnak kitett sejtek kontrollhoz viszonyított PE (ld. később) eredményeiből származtathatók az adott dózishoz tartozó SF (túlélő frakció vagy Surviving fraction) értékek, melyek sorozatából összeállítható egy túlélési görbe.

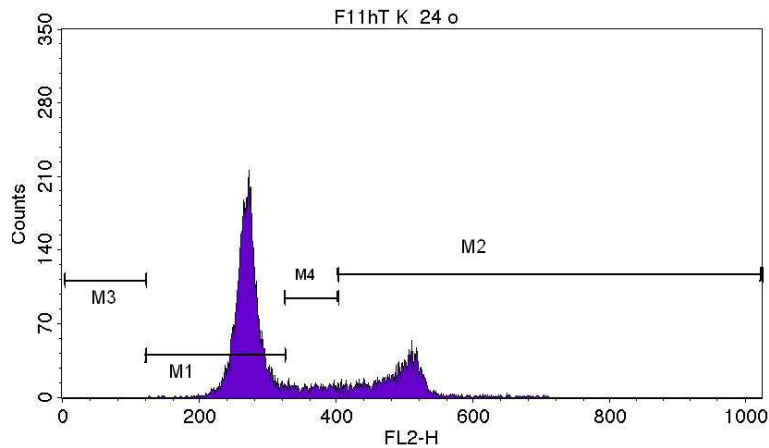
$$SF_x = PE(\text{kezelt}) / PE(K),$$

SF_x az X dózishoz tartozó túlélő frakció, $PE(\text{kezelt})$ az adott dózissal kezelt Petri csészén kinőtt telepszám / a kioltott sejtszám; a $PE(K)$ pedig a besugározatlan Petri csészén kinőtt telepek száma / a kioltott sejtszám.

3.6. Sejtosztódás, sejtciklus analízis

Tanulmányoztuk, hogy a géncsendesítés hogyan befolyásolja a sugárzás kiváltotta sejtciklus folyamatokat. 2 Gy gamma-sugárral való kezelés hatásának detektálásához propídium-jodidos festést használtunk, mely a DNS szálakba kötve élénk jelet ad fluocitométeres vizsgálat során. Sejtciklustól függően a sejtek aktuális DNS tartalma eltérő, amit a vele arányos (interkalálódott) festék mennyisége jelez. Ezt szemlélteti a 11. ábra.

Besugárzás után 6, 24, 48 és 72 órával a sejteket begyűjtöttük, 70 %-os etanolban fixáltuk $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on éjszakán át, majd festettük $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ tartalmú PI-ot és $100\text{ }\mu\text{g/ml}$ -es RN-ázt tartalmazó PBS oldatban ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on, 30 percig). Ezt követően FACS Calibur áramlási citométerrel mértük a minták DNS tartalmát.



11. ábra: egy tipikus áramlási citométerrel mért sejtciklus analízisképe. F11-hTERT sejtvonalon mért sejtciklus profil nem besugározott, normál sejteken 24 h-s tenyésztés után. Az M1-es tartományban a sejtek nyugvó fázisban, G1 szakaszban vannak. M4-es szakaszban a DNS elkezd megkettőződni, ez az S fázis a sejtosztódási ciklusban. M2 intervallum a már G₂/M fázisú sejtek mennyiségét jeleníti meg. (M3 szakasz az apoptotikus sejtek, törmelékek helye)

3.7. Autofágia vizsgálatok

3.7.1. Acridine Orange festéssel

6 lyukú tenyésztőedénybe helyezett, zsírtalanított, 24×24 mm-es üveg fedőlemezekre $50 - 50$ ezer shP53INP1, illetve F11-hTERT sejt lett kioltva, mind kontroll csoportnak, mind a kezelt csoportnak, mely utóbbi másnap 6 Gy -el lett besugározva. 48 h -val később $1\text{ }\mu\text{g/ml}$ -es koncentrációjú Acridine Orange-ot tartalmazó médiummal cseréltük le a tápjukat, és ebben inkubálódtak $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on, 15 percet. Háromszori PBS-es mosás után a fedőlemezeket a tárgylemezre borítottuk, s AxioImager A1 fluoreszcens mikroszkóppal számoltuk a narancsos pirosan fénylő autofág vakuólumok számát.

3.7.2. Áramlási citométerrel (FACS)

Szintén ugyanezen sejtvonalakon, ugyanolyan dózisokat használva az autofág vakuólák megfestése helyett itt az autofág vakuóla kialakulásában szerepet játszó LC3 molekula immunfluoreszcens festésével követtük nyomon a besugárzott és nem besugárzott sejtek közti különbséget. A humán LC3 molekulához specifikusan kötő antitest szolgáltatva az elsődleges antitestet, majd ennek detektálására zöld színű fluoreszcens festékhez kötődő másodlagos antitestet használtunk fel (ld. alább).

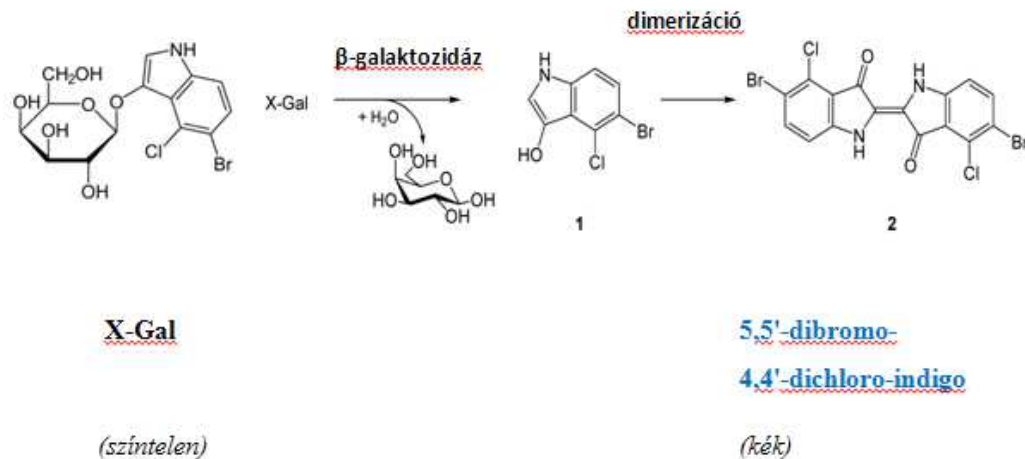
500-500 ezer db sejtet tenyésztő flaskába oltottunk ki mind a normál, mind a módosított sejtekből. Másnapi besugárzás után a sejtek még 48 h-ig tenyésztve voltak, majd tripszines leszedést követve a centrifuga csövekben lévő mintát PBS-el mostuk, 4 % PFA-val fixáltuk és 0,1 %-os Triton X-100 – PBS elegyében permeabilizáltuk (5 percig, szobahőn). Újabb mosás után 1 : 100 arányban elegyített elsődleges ellenanyag (humán anit-LC3, SIGMA, St. Louis, MO, USA)/ PBS oldatában inkubáltuk 1 órán át 4 °C-on. Mosás és centrifugálás után a kiülepedett anyagot szintén 1/100-nyi mennyiségben lévő másodlagos antitesttel (anti-Rabbit IgG DyLight 488 Biolegend, San Diego, USA) jelöltük meg (ezzel is 1 órán át állt 4 °C-on); majd egy végső mosást és fixálást követően áramlási citométerrel detektáltuk a sejtekhez antitestek közvetítésével kötődött fluoreszcencia jeleket. A pozitív és negatív populációk elkülönítésére izotípus kontrollokat (egy nem specifikusan kötő ellenanyagot) mértünk (Rabbit IgG Isotype Control, INVITROGEN unconjugated). A mérések FACS Calibur készüléken történtek, 100 000 - 100 000 esemény beméréséig tartottak. Az adatok értékelésére a CellQuest Pro programot használtuk.

3.8. Szenezscencia mérések

Ehhez a kísérlethez *in-situ* „szenezscencia-asszociált - β -galaktozidáz” (SA- β -gal) festést alkalmaztunk. Hasonlóan a 3.6.1 fejezethez 6 lyukú tenyésztőedényben, 24 x 24 mm-es üveglemezeken tenyésztettünk F11-hTERT és shTP53INP1 sejteket. 20 - 20 ezer db sejtet oltottunk és sugaraztunk az autofágia mérésnél leírtak szerint. 5 - 7 napos várakozás után a lemezeken lévő sejteket PBS oldattal mostuk, 2 % paraformaldehiddel fixáltuk, végül PBS-es mosás után frissen készített X-Gal oldatot (150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 5 mM K₃[Fe(CN)₆], 5 mM K₄[Fe(CN)₆], 30 mM citromsav, 30mM Na₂HPO₄, 1

mg/ml 5-bromo-4-kloro-3-indolil- β -D-galaktozid; pH = 6) adtunk a mintákhoz, és 12 – 24 h-ig inkubáltuk ebben a sejteket 37 °C-on, CO₂ nélküli termosztátban. Megfelelő idő után a sejteket mostuk, majd mielőtt tárgylemezre borítottuk volna, a számolás megkönnyítése érdekében sejtmaghoz kötődő DAPI festéssel is kezeltük a fedőlemezeket. Fénymikroszkóppal, 20 x-os nagyítás alatt számoltuk a kékre festődött sejtek arányát.

A szeszscens fibroblasztok által termelt β -galaktozidáz savas közegben (pH = 6) a galaktozidot galaktózzá alakítja, ezáltal az X-Gal-t is szétbontja: 5-bromo-4-kloro-3-hidroxiindol keletkezik, mely spontán dimerizációja révén kék színű 5,5'-dibromo-4,4'-dikloro-indigóvá alakul. (12. ábra.) Így ez az adott sejt citoplazmájának intenzív kék színt fog kölcsönözni, mely ezáltal könnyen detektálható lesz.



12. ábra: a szeszscencia-asszociált - β -galaktozidáz festés alapja

3.9. Kettős láncú DNS törések mérése γ -H2AX festéssel

A DNS kettős lánc-törések kimutatásának és mérésének egyik módszere a kettős törések helyéhez hozzákötő foszforilálódott hiszton fehérje, a γ -H2AX meghatározása a hozzá kötődő detektálható antitest mérésével. Ehhez FITC festéssel konjugált Anti-phospho-Histone H2A.X(Ser139) (Millipore) antitestet használtunk. Sejtvonalanként 6 db tenyésztő edényekbe oltottunk ki sejteket (1 millió db /flaska). Egy egyszeri 6 Gy-es besugárzás után vizsgáltuk a sugárzás indukálta DNS törések javításának időkinetikáját, így 6 különböző időpontban (besugárzást követően azonnal, 1, 2, 4, 6, 24 h-t követően)

gyűjtöttük be a kontroll és kezelt mintákat. A sejteket először PBS-el mostuk, majd tripszinnel oldottuk le az edényről. Újabb mosás után 90 %-os metanolban fixáltuk -20 °C-on, éjszakán át. Másnap 0,1 %-os Triton X-100 oldattal permeabilizáltuk, majd 3 % FBS/PBS oldatban blokkolódni hagytuk. Ezt követően jött az immunfestés a már említett ellenanyaggal (0,5 µl-t 100 µl sejthez, 30 percig jégben tartva inkubálódott). Mosás és fixálás (2 % PFA) után a fluoreszcens jeleket áramlási citométerrel detektáltuk, majd elemeztük a CellQest Pro program segítségével. A kiértékeléshez 3 - 5 biológiai párhuzamos eredményeinek átlagait számoltuk ki, minden egyes időpontnál t-teszttel határoztuk meg, van-e szignifikáns eltérést a két sejtvonal között.

3.10. Statisztikai analízis

Az eredményeket legalább három független kísérlet átlagaként és standard eltéréseként mutatom be. Szignifikancia számoláshoz párosítatlan t-tesztet használtam, több csoport összevetéséhez egy-utas ANOVA-t alkalmaztam. Statisztikailag szignifikáns adatoknak a $P < 0,05$ értékeket vettük. A számolásokat GraphPad nevű programmal végeztem (GraphPad Prism 5.0; Software, USA)

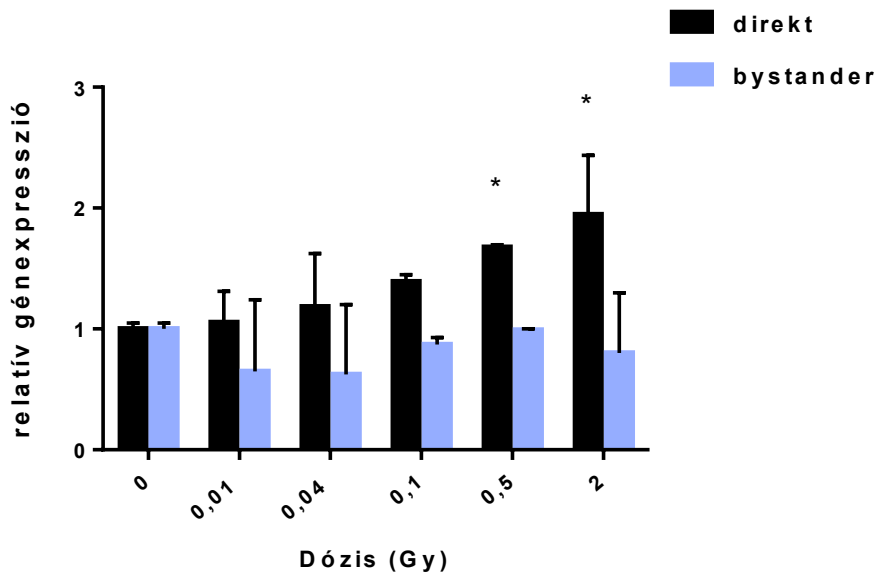
4. Eredmények

4.1. A GDF-15 gén sugárválaszban betöltött szerepének vizsgálata

4.1.1. GDF-15 gén működésének változása közvetlenül besugarazott fibroblaszt sejtekben, illetve közvetlen sugártalálót el nem szenvedett bystander (szomszédsági) sejtekben

Előzetes cDNS microarray kísérleteink alapján kiválasztottunk 2 olyan sugárválasz gént, melynek kifejeződése kis és nagy dózisokra is változott a humán fibroblaszt sejtekben.

Az egyik ilyen gén a GDF-15 volt. Ennek átíródásában bekövetkező változást néztük olyan sejtekben is, melyek direkt besugárzást nem kaptak, csak a besugárzott sejtek kondicionált médiumával lettek kezelve. A közvetlenül besugarazott csoport sejtjeit 2 órával a kezelést követően begyűjtöttük (és ebből RNS-t izoláltunk). A bystander sejtek pedig megkapták ezen begyűjtött sejtek kondicionált médiumát, melyekben 2 óráig inkubálódtak, végül ezekből is RNS-t izoláltunk. Azt kaptuk, hogy a közvetlenül besugarazott sejtek GDF-15 génkifejeződése a dózis emelésével nő, mely 0,5 és 2 Gy-nél szignifikánsan eltér a kontrollhoz viszonyítva (1,677 +/- 0,02 és 1,946 +/- 0,49). A nem besugarazott befogadó sejteknél nem találtunk eltérést a kontroll sejtekhez képest egyik dózisonál sem (13. ábra)



13. ábra: GDF-15 gén expressziós változása F11-hTERT sejtvonalban. Az ábrán közvetlenül (direkt) besugározott és szomszédsági (bystander) mintákban mért relatív gén-kifejeződés látható. A vizsgálatot a Módszerekben leírtaknak megfelelően végeztük. A diagramon 3-4 mérés átlagai vannak feltüntetve standard hibával. Szignifikancia szintet egy-utas ANOVA-val számoltunk. (*: $p < 0,05$).

4.1.2. GDF-15 fehérje termelés gátlása lentivírus vektor közvetített shRNS-ekkel

Mint a Módszerek c. fejezetben már tárgyaltam, 5 féle shRNS konstrukció felhasználása révén több, GDF-15-öt különböző mértékben gátolva termelő, géncsendesített fibroblasztokhoz jutottunk. A különféle eredményességgel gátolt klónok listáját és a hozzájuk tartozó GDF-15 kifejeződés mértékét, valamint sugárérzékenységi mutatókat az 1. számú táblázat foglalja össze. Kitűnik, hogy a normál F11-hTERT-hez képest az MTP1/4-es klón fejezi ki legkisebb mértékben GDF-15-öt (33 %), míg a normál kontrollhoz képest jóval magasabb expressziót mutat az MTP2/3 klón (292 %). Ezzel párhuzamosan megfigyelhető, hogy a GDF-15 kifejeződés mértékével fordítottan arányos a sejtek túlélése 2 Gy besugárzást követően. Vagyis a GDF-15 hiányos MTP1/4 sejtek jobban, az MTP2/3-as sejtek pedig kevésbé pusztulnak ionizáló sugárzás hatására, mint a módosítatlan F11-hTERT. Így elmondható, hogy a GDF-15 gén működési intenzitása hatással van a fibroblasztok sugárérzékenységére. (Az alábbi

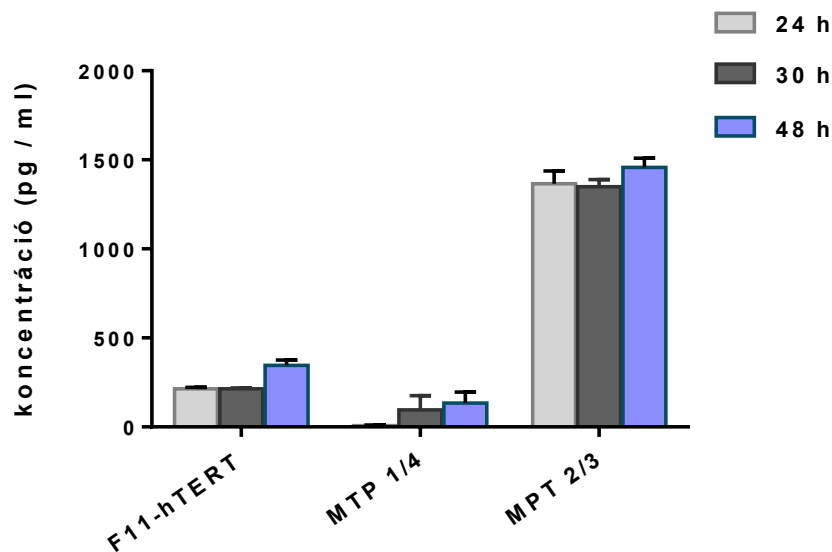
táblázaton kívül a 17. ábra is ezen módosult sejtvonalak túlélési tulajdonságait szemlélteti.)

1. táblázat: az F11-hTERT normál fibroblaszt és a GDF-15-shRNS-t kódoló lentivírus vektorokkal génmódosított sejtvonalak GDF-15 kifejeződése és sugárérzékenységi jellemzői. A feltüntetett klónok GDF-15 alap kifejeződését qPCR-el mértük, legalább 3 ismétléssel, az adatok az F11-hTERT megfelelő értékeire lettek normalizálva. A standard hibával ellátott átlag értékek láthatók a második oszlopban. A 3. oszlopban e klónok túlélő frakcióit láthatjuk 2 Gy γ -sugárzás után, mely telepkepző kísérlettel lett kimérve.

	GDF-15 relatív génkifejeződése	SF2 %
F11-hTERT	1	0,32
MTP_1	0,44 \pm 0,058	0,14
MTP_1/4	0,331 \pm 0,049	0,12
MTP_2	2,62 \pm 0,28	
MTP_2/3	2,92 \pm 0,75	0,34
MTP_3	0,59 \pm 0,16	0,24
MTP_4	1,09 \pm 0,27	0,28
MTP_5	0,73 \pm 0,02	

4.1.3. *GDF-15* fehérje mennyiségi változása az idő függvényében a különböző géncsendesített sejtekben

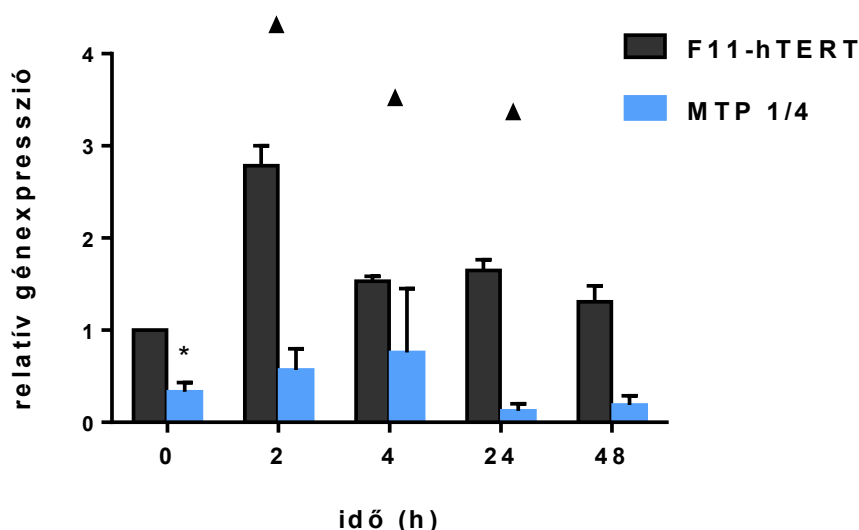
A *GDF-15* kifejeződést fehérje szinten is megmértük. A háromféle sejtípusból 10^6 - 10^6 db sejtet oltottunk ki tenyésztő edényekre, majd kioltást követően 24, 30, 48 h-val később begyűjtöttünk tenyésztő edényenként 5-5 ml médiumot, majd ezt betöményítve (Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Unit with Ultracel-30 membrane) vittük fel 96 lyukú ELISA lemezre. A mérés megmutatta, hogy a géncsendesített sejteknél jóval kevesebb *GDF-15* fehérje termelődik (8 ± 2 pg/ml), mint a normál sejtekben ($213,5 \pm 8,5$ pg/ml), míg a túltermelőknél több mint hatszoros fehérjetermelést látunk ($1366,47 \pm 70,53$). (14. ábra.) Az is megfigyelhető, hogy az idő múlásával is dúsul a sejtekben termelődő, s onnan a médiumba kibocsátódó citokin.



14. ábra: *GDF-15* fehérje termelődés a génmódosított sejtekben: normál, géncsendesített és *GDF-15*-öt túltermelő fibroblasztokról kioltás után különböző időpontokban leszedett és bekonzentrált felülúszókból ELISA módszerrel mért fehérje mennyiség. Az eredmények a nem koncentrált értékeket mutatják. Minimum 3 mérésből származott értékek átlagai lettek ábrázolva standard hibával. Egyik adatsor sem ért el szignifikáns változást ($p < 0,05$).

4.1.4. Sugárzás indukált GDF-15 génkifejeződés időfüggése

Méréseink része volt, hogy meghatározzuk a GDF-15 gén kifejeződésének kinetikáját a besugárzást követően. Eredményeinket a 15. ábra foglalja össze. Kitűnik, hogy a normál fibroblasztokban a besugárzás hatására erőteljesebb a GDF-15 gén működése, s ez 2 óra elteltével éri el maximumát (kontrollhoz viszonyított relatív expressziós értéke: $2,74 \pm 0,8$) és 48 óra múlva újra visszatér az eredeti szintre. Ebből is látszik, hogy a GDF-15 egy korai sugárválasz génnek minősül. Géncsendesített sejtvonal esetén a kontroll csoport alap GDF-15 kifejeződése jóval elmarad az normál sejtvonalhoz képest ($0,33 \pm 0,1$), így a hatékony géniütés stabilitása megerősítést nyert. Ugyanakkor ezen sejtek sugárzás indukálta GDF-15 expressziós emelkedése korántsem volt annyira jelentős, sőt, még maximális emelkedése sem éri el a genetikailag nem módosított fibroblasztok alapértékét ($0,76 \pm 0,69$).



15. ábra: GDF-15 gén kifejeződésének változása a besugárzástól eltelt idő függvényében normál és géncsendesített sejtekben. 2 Gy γ -besugárzással kezeltük mind a normál, mind a GDF-15-öt alultermelő sejtkultúrát. Ezt kövözően qPCR-rel meghatároztuk a GDF-15 gén kifejeződés időfüggését. Az oszlopok 3 mérés átlagát jelzik standard hibával. A 0 h-s időpontban a nem besugározott, kontroll sejtek kifejeződési értékei lettek összehasonlítva (*: $p < 0,05$), a továbbiakban ezen nem besugározott F11-hTERT sejtek értékeit vettük 1-nek, a többi időpontban - mindkét sejtvonal esetében - a besugározott sejtek értékei a megfelelő időponthoz tartozó, saját, nem besugározott kontrolljához lettek hasonlítva (▲: $p < 0,05$). Statisztika kiszámítása t-tesztel történt.

4.1.5. GDF-15 gén változtatásának hatása a besugárzás által indukált egyéb génekre

Ebben a kísérletben a GDF-15 hatását mértük négy másik, sugárzással összefüggésbe hozható gén alap- és sugárzás indukálta működésére.

Első körben azt vizsgáltuk, hogy a sugárzás megváltoztatja-e a vizsgált gének kifejeződését normál fibroblaszokban (F11-hTERT). Az 16. ábrán látszik, hogy a normál fibroblaszt sejtvonalban a TP53INP1 (2,56 +/- 0,21), CDKN1A (2,61 +/- 0,28) és GADD45A (1,433 +/- 0,14) gén kifejeződése jelentősen emelkedik 2 Gy gamma-sugárzás hatására, míg a TGF- β 1 (0,998 +/- 0,09) nem változik.

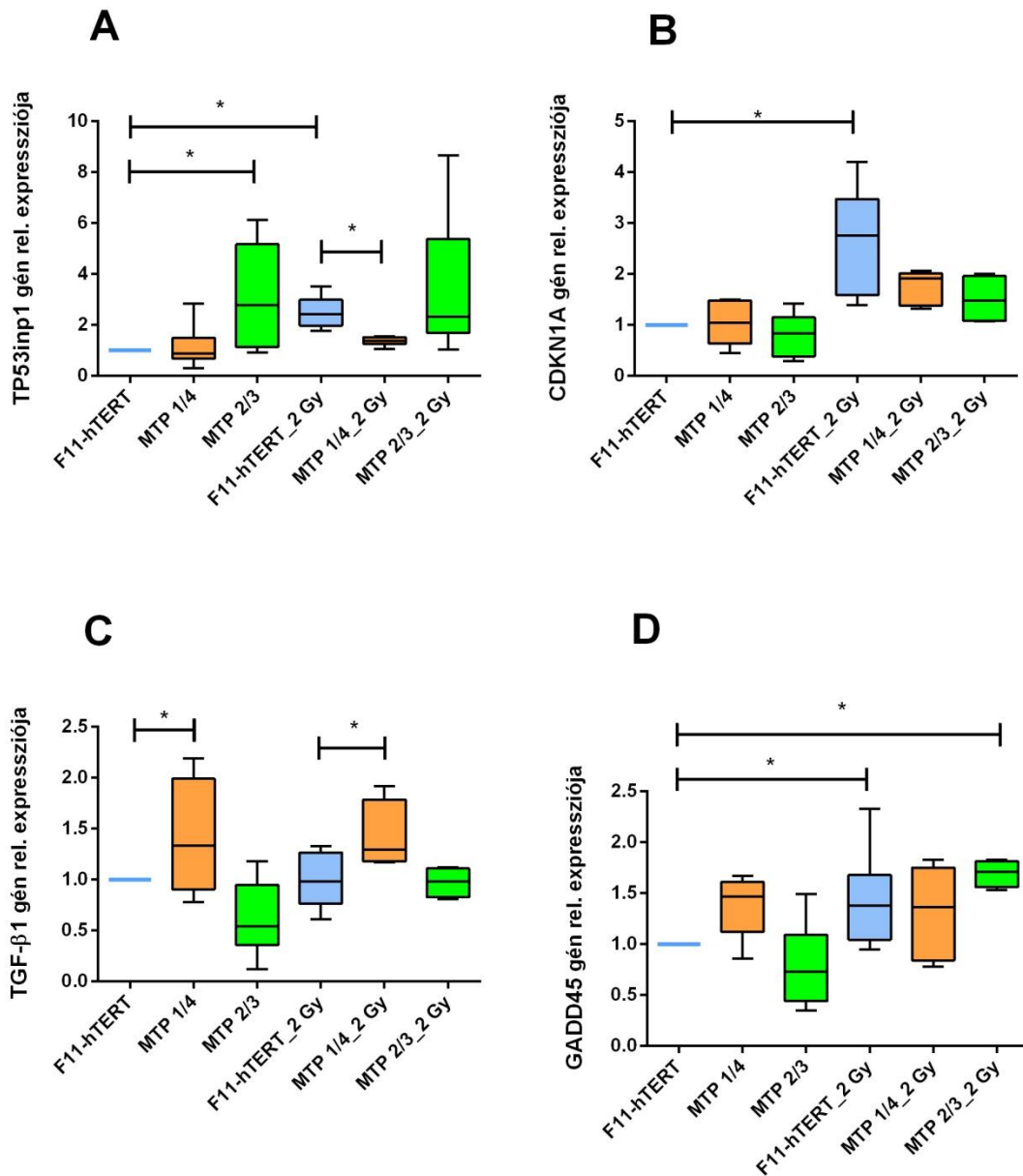
Másik kérdéskör volt, hogy az említett gének alap működését megváltoztatja-e a GDF-15 gén alul- vagy túlműködése ugyanezen sejtvonalban. Válaszként azt kaptuk, hogy ha a sejtekben gátlódott a GDF-15 gén kifejeződése, akkor a TGF- β 1 kifejeződés értéke megemelkedett (1,41 +/- 0,21 – 16/C.) míg a másik 3 géné nem változott jelentősen. (16/A, B, D.)

GDF-15 túlműködése (MTP2/3-as jelzésű hasábok) viszont nincs hatással se a TGF- β 1, se a CDKN1A, se a GADD45A génkifejeződésre, a TP53INP1 alap kifejeződését viszont megemeli (3,07 +/- 0,75) - ld. 16/A. diagram.

Megfigyeltük, hogy a GDF-15 működésének intenzitása ellentétesen befolyásolja a TGF- β 1 és TP53INP1 gének működését (16/A. és 16/C. ábrán)

Ha a sugárzás indukálta génkifejeződés változás GDF-15 függését vizsgáljuk, azt kapjuk, hogy GADD45A esetén a 2 Gy indukálta génkifejeződés emelkedést nem befolyásolta se a GDF-15 gén hiánya, se a túlműködése (16/D). Ellenben se a CDKN1A, se a TP53INP1 génkifejeződési értéke nem emelkedett meg annyira besugárzásra, ha a GDF-15 kisebb mennyiségben van jelen (1,36 +/- 0,17 és 1,74 +/- 0,33 a 2,47 +/- 0,57 helyett. 16/A. és 16/B. ábra). TGF- β 1 termelés szempontjából pedig a GDF-15 fehérje hiányának nagyobb hatása volt, mint a 2 Gy-es besugárzásnak, mivel ez utóbbi csak annyival változtatta meg a TGF- β 1 kifejeződést, amennyivel magának a GDF-15 gén kiütésének következménye is volt (1,42 +/- 0,11; 16/C ábra). A GDF-15 gén tehát a CDKN1A és TP53INP1 esetében volt hatással a sugárzás okozta

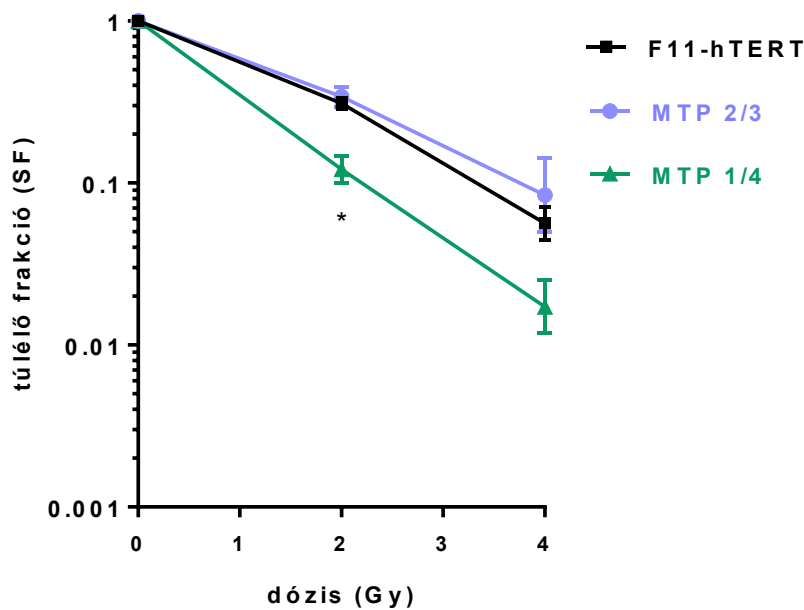
génkifejeződés változására. Vagyis GDF-15 hiánya gátolja a sugárzás TP53INP1, illetve CDKN1A kifejeződést serkentő hatását.



16. ábra: GDF-15 hiányának egyéb sugárválasz génekre gyakorolt hatása. 2 órával a besugárzás utáni génkifejeződést látunk kontroll és besugárzott mintákban. A.) esetben a TP53INP1, B.) esetben CDKN1A, C.) esetben TGF-β1, D.) esetben a GADD45A gének működése lett vizsgálva mind normál, mind a GDF-15 gént alul, ill. felülexpresszázó sejtekben qPCR segítségével. A dobozok 3 párhuzamos mérés $\Delta\Delta CT$ értékeiből adódó relatív génkifejeződési értékek középértékét (mediánját), valamint az alsó és felső kvartiliseit mutatják a minimum és maximum értékekkel feltüntetve. Statisztikai analízis 1 utas ANOVA-val történt (*: $p < 0,05$). 1-nek a nem besugarozott F11-hTERT értékeit vettük.

4.1.6. GDF-15 csendesítés hatása a sejtek sugárérzékenységére

A géncsendesített és GDF-15-öt nagy mennyiségben kifejező sejtek túlélését hasonlítottuk a normál fibroblasztokhoz képest. A vizsgált sejtek csak a GDF-15 termelésben különböztek, mindegyiket 2 és 4 Gy dózissal kezeltük. Besugárzás után mindhárom sejtípusnál csökkent az életben maradt sejtek száma, de található különbség, miszerint a GDF-15-öt túltermelő sejtek közül kevesebben pusztultak el a normál sejthez képest, míg a GDF-15 hiányos sejteknél többen (még ha nem is szignifikáns értékkel). 2 Gy esetén a normál F11-hTERT sejteknél 31 %-ra esett vissza a kinövő telepek száma, míg MTP1/4-nél ez 12 %-ra, MTP 2/3-nál 34,1 %-ra módosult. 4 Gy hatására 5,6 % helyett 1,7 %-os (MTP 1/4) és 8,4 %-os (MTP2/3) túlélést kaptunk (ld. 17. ábra).

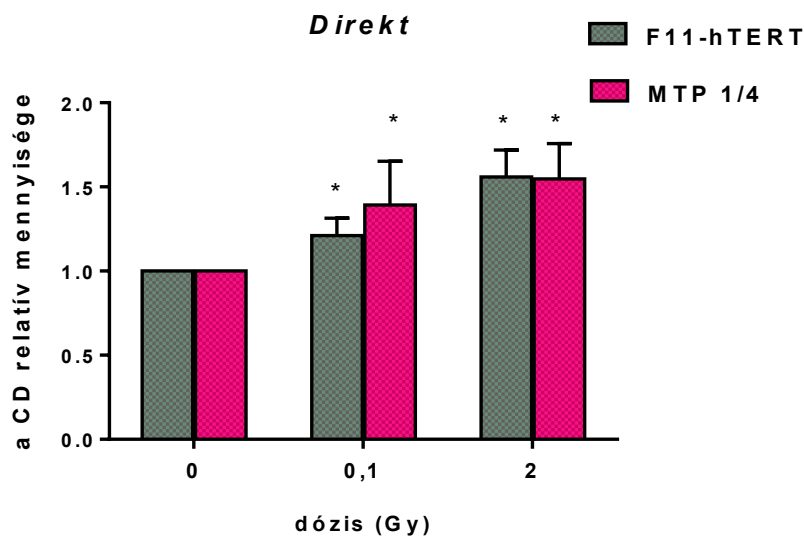


17. ábra: túlélési görbe. A 2 és 4 Gy dózisokban besugárzott sejtek túlélését mértük kolónia-képző kísérlet segítségével. Ugyanannyi sejt kioltása és kezelése után a pusztulás mértéke logaritmikus skálán ábrázolva látható. Több mint 3 különböző kísérlet átlagai és annak standard hibái lettek feltüntetve. A normál sejt vonal alakulásától való számottevő eltérés vizsgálatához Student' s t-tesztet használtunk. (*: $p < 0,05$)

4.1.7. Bystander hatás mérése a GDF-15 géncsendesített és normál sejtek mitokondriális DNS delécióinak előfordulásában

A 3.2.2. fejezetben leírtak szerint egyrészt a besugárzott fibroblasztokból mértük a mitokondriális DNS sérüléseket, másrészt a bystander hatás mérése esetében a nem besugárzott sejtek a besugárzott tenyészet 2 órás kondicionált tápoldatát kapták meg, majd ezután 72 h-s inkubációs idő után meghatároztuk a mitokondriális DNS-ükben felhalmozódó DNS deléciók, az ún. „Common Deléció”-k mennyiségét.

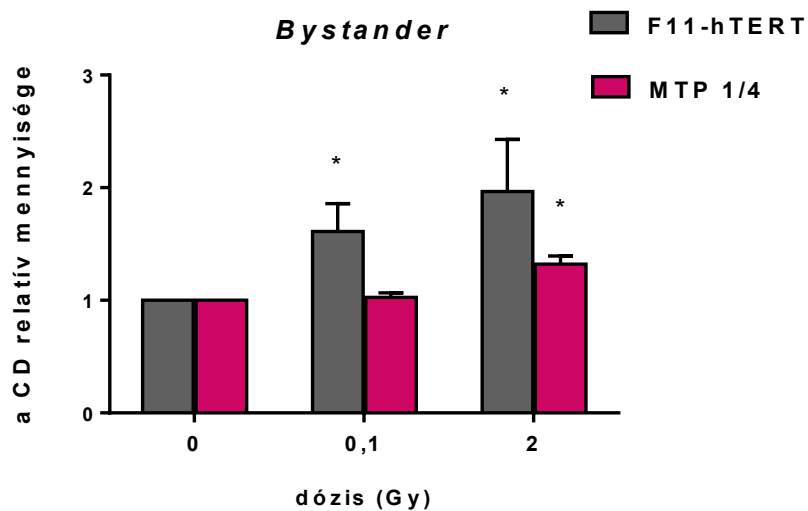
Ahogy a 18. ábra mutatja, a GDF-15 jelenléte vagy hiánya nem befolyásolja a mitokondriális DNS deléciójának mennyiségét a közvetlenül besugárzott fibroblaszt sejteken 3 nappal a besugárzás után (sem kis, sem nagy dózissal).



18. ábra: fibroblaszt sejtek mitokondriális DNS-károsodása besugárzás hatására GDF-15 csendesített sejtekben. A diagramon a kis és nagy dózissal kezelt sejtekben besugárzás után 72 h-val jelen lévő deléciók mennyiségét (CD) mutattuk ki valós idejű polimeráz láncreakcióval. A kísérletet legkevesebb 4-szer ismételtük, az oszlopdiagramon az átlagokat és a hozzájuk tartozó SE értékeket ábrázoltuk. (*: $p < 0,05$, mely minden esetben a kontrol 1 értékéhez képest értendő)

Amikor bystander sejtekben (mely esetben a sugárzás nem közvetlenül éri a sejteket) vizsgáltuk ugyan ezt a hatást (19. ábra), azt kaptuk, hogy a normál fibroblasztokban

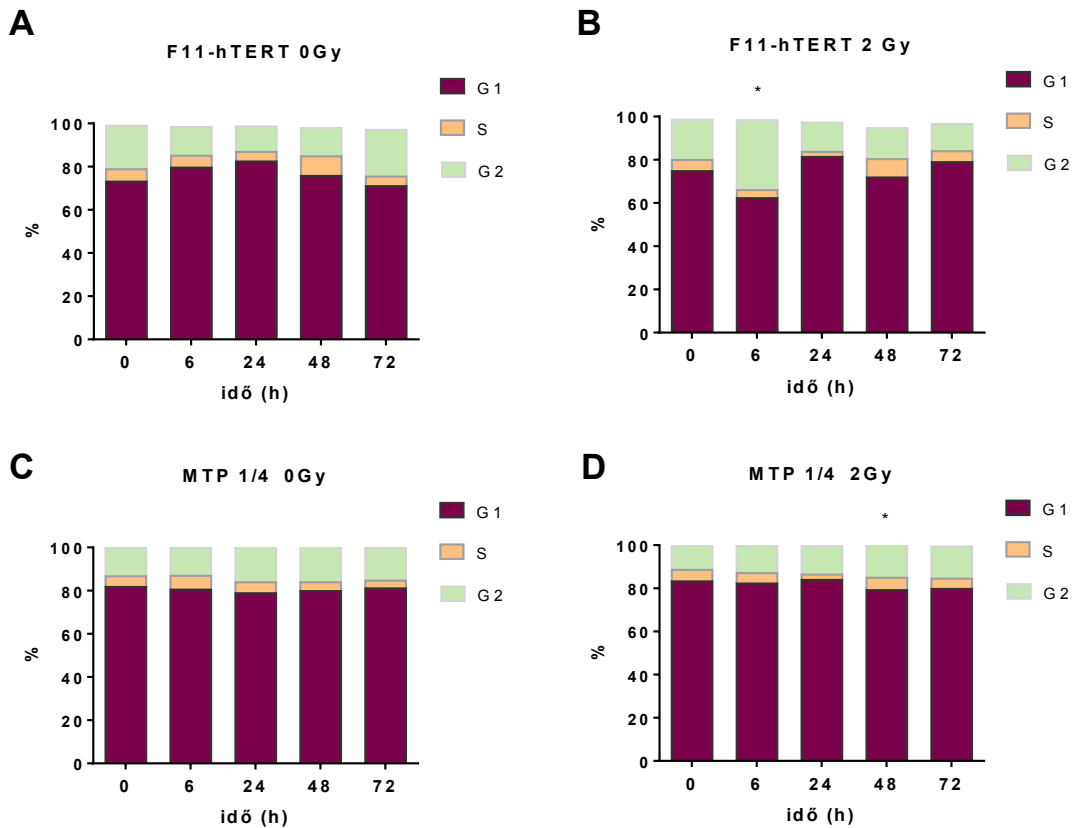
dózissal nő a deléciók száma, mely már kis dózisonál is számottevően több mint a kontroll sejtekben. A GDF-15 gén részleges működése esetén kis dózisonál a deléciók mennyisége a Common Deléciók régióban nem tér el a kontroll csoporthoz képest, 2 Gy esetén ellenben szignifikánsan megnő. Ez azt mutatja, hogy alacsony dózisonál a *GDF-15* hiánya csökkenti mitokondriális DNS deléciók felhalmozódását a szomszédos sejtekben.



19. ábra: a szomszédos sejtek mitokondriális DNS-károsodása besugárzás hatására GDF-15 csendesített sejtekben. A diagramon a kis és nagy dózissal kezelt sejtek kondicionált médiumát 2 óra inkubáció után az F11-hTERT és MTP 1/4 sejtekre tettük át, majd a kialakuló mitokondriális DNS deléciók mennyiségét mutattuk ki valós idejű polimeráz láncreakcióval. Az ún. „Common Deléciók” (CD) mennyisége mindkét sejt vonal esetén a saját kontrolljukhoz lett viszonyítva. A kísérletet legkevesebb 3-szor ismételtük, az átlagokat és a hozzájuk tartozó SE értékeket ábrázoltuk az oszlopdiagramon. Kiértékelésük egy-utas ANOVA-val történt.

4.1.8. GDF-15 gén csendesítésének hatása a sejtciklusra 2 Gy-el történő besugárzás esetében

Mint azt a bevezetőben tárgyaltam, a sugárzást ért sejtek épségének visszaállítása és túlélése szempontjából fontos az ellenőrző pontok jó működése és a megfelelő idő biztosítása a hibás DNS kijavítására. A sejtciklus szabályozásra gyakorolt hatását is vizsgáltuk a GDF-15 génnek. Normál esetben, ha a sejteket nem éri stressz, a sejtciklus fázisaiban kismértékű eltérés mutatkozik. Ennek időbeni változását a 20/A. ábra mutatja. Nem mérhető szignifikáns változás az eltérő fázisokban lévő sejtpopulációs ráta között az egyes időpontokban. Ezt az ionizáló sugárzással való kezelés befolyásolja, mely a 20/B. ábrán látható. Ez azt mutatja, hogy 6 órával a besugárzás után a sejtek jelentős része G_2 -ben megreked, nem tud tovább haladni, szünetelt a sejtosztódás. GDF-15 gén csökkent működése esetén ebben a G_2 fázisban történő leállás késleltetett, csak 48 h múlva jelentkezik és kisebb mértékben (20/D. ábra). Ez azt jelenti, hogy a *GDF-15* jelenléte fontos a sejt regenerációjához, mert hiánya csökkenti a javításhoz szükséges G_2 fázisban töltött idő mennyiségét.



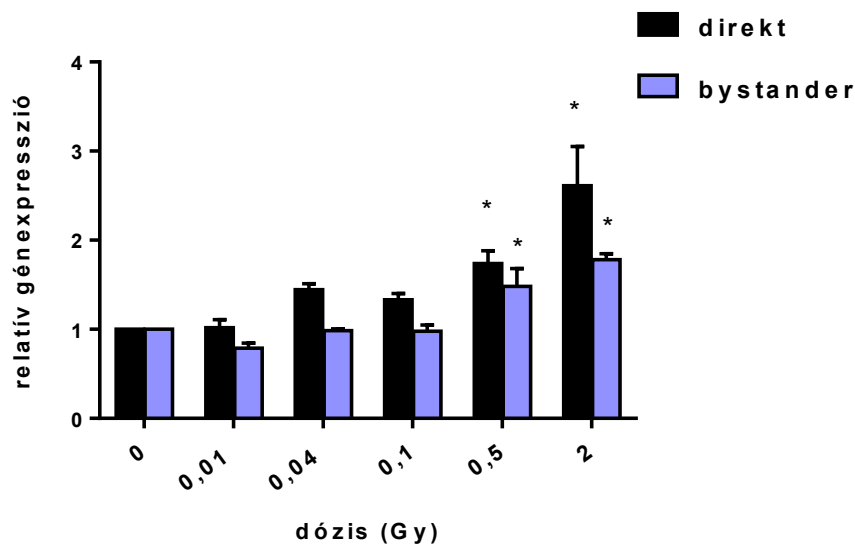
20. ábra: A GDF-15 gén csendesítésének a hatása a sugárzásra bekövetkező sejtciklus változásokra. 2 Gy γ -sugárzásnak kitett F11-hTERT (A., B.) és MTP $\frac{1}{4}$ (C., D.) sejtek sejtciklusban elfoglalt arányát vettük fel áramlási citométerrel mérve, propidium-jodidos festéssel; a besugárzás után 6, 24, 48 és 72 h-val. Az oszlopok az egyes fázisban lévő sejtek 3 független kísérletből adódó átlagát mutatják. Statisztikai értékeléséhez sejt típusonként és időpontoként külön-külön a kontroll és besugárzott mintákra illesztett t-tesztet használtuk.

4.2. A TP53INP1 gén vizsgálata a sugárválaszban

4.2.1. ATP53INP1 gén kifejeződésének változása közvetlenül besugárzott és közvetlen sugárhatást el nem szenvedett humán fibroblaszt sejtekben

Ha a TP53INP1 gén dózis-függő kifejeződését mértük a direkt besugárzott és bystander fibroblasztokban, azt találtuk, hogy a közvetlen sugárzást ért sejtekben (2 órával a kezelés után) statisztikailag valódi eltérés csak 0,5 Gy-től alakul ki (21. ábra), továbbá a nagy dózis esetén (2 Gy) ez a megemelkedett szint 48 óra múlva is fennáll. (22. ábra)

Hasonlóan a közvetlenül nem besugárzott sejteknél, amelyek csak a besugárzott sejtek médiumával érintkeztek, 0,5 Gy-től szintén kimutatható egy szignifikáns emelkedés. Vagyis a direkt sugárhatásnak kitett és a bystander sejtekben is a sugárzás (közvetve vagy közvetlenül) emelte a TP53INP1 gén kifejeződését.

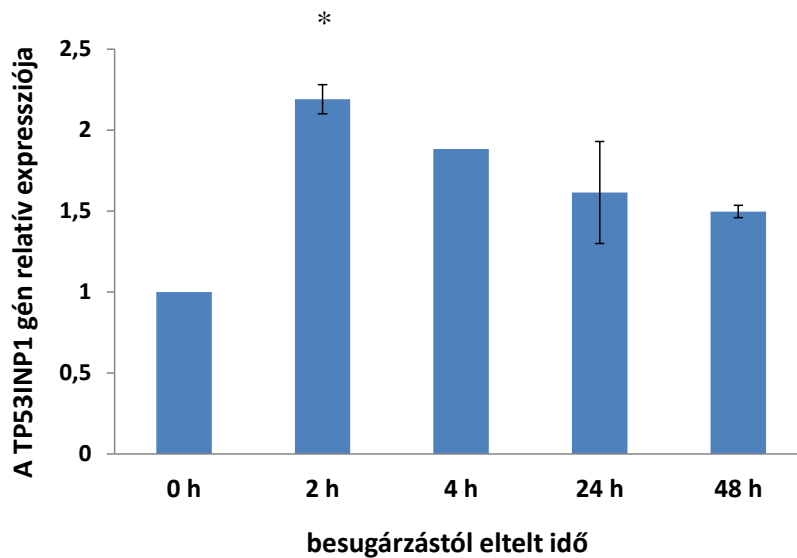


21. ábra: A TP53INP1 gén átíródásának dózisfüggő változása normál fibroblasztokban. A génkifejeződés mértékét 6 különböző dózisban vizsgáltuk - 2 órával a besugárzás után -. A változásokat qPCR-rel mértük, β -aktinra és GAPDH-ra normalizált értékekből kaptuk meg a kontrolhoz viszonyított relatív expressziós szinteket. Az oszlopok 3 mérés átlagát reprezentálják standard hibával. Statisztikája 1-utas ANOVA-val lett számolva. (*: $p < 0,05$)

4.2.2. TP53INP1 génkifejeződés időfüggő változása 2 Gy besugárzásra

Annak érdekében, hogy képet kapjunk a szóban forgó gén sugárzás indukálta működésének időbeli változásáról, több, 2 Gy-el besugárzott sejtenyészetet indítottunk el a kontroll csoport mellett. Ezeket különböző időpontokban begyűjtve belőlük RNS-t izoláltunk, s ezek relatív mennyiségét valós idejű polimeráz láncreakció mérésének segítségével hasonlítottuk össze.

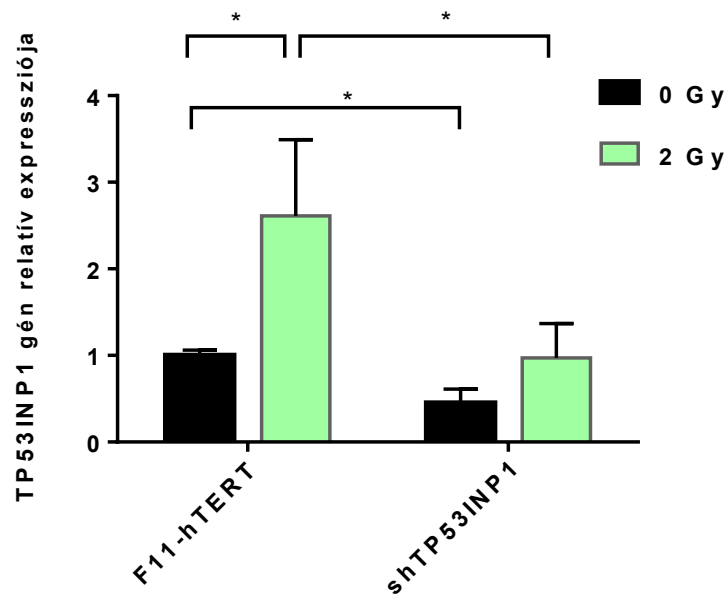
A 22. ábráról jól látszik, hogy a sugárzás hatására a TP53INP1 transzkripció 2 h-nál éri el a maximumát (több mint kétszeresére nő), majd ez a változás lassan csökkenni kezd, de 48 h múlva is még jelentős az eltérés a nem besugárzott sejtekhez képest.



22. ábrán a TP53INP1 gén sugárzás hatására megváltozott kifejeződésének időfüggése. Az oszlopok a 2 Gy gamma-sugárzással kezelt normál F11-hTERT fibroblaszt sejtek génkifejeződési értékeit jelzik. A 0 h-s adathoz a nem besugárzott sejtek alap kifejeződésének átlaga tartozik. A változásokat qPCR-rel mértük, β -aktinra és GAPDH-ra normalizálva. Statisztika 1-utas ANOVA-val lett kiszámolva. (*: $p < 0,05$)

4.2.3. A TP53INP1 gén csendesítése short hearpin RNS-t kódoló lentivírussal, s az így létrejött sejtvonal sugárválaszában bekövetkező változások

Ebben a kísérletben tanulmányoztuk, hogy a TP53INP1 géncsendesítés működik-e, illetve milyen változásokat hoz létre a sejtekben. A nem besugározott sejtekben kevesebb, mint felére csökken a TP53INP1 gén kifejeződése a módosított sejtekhez viszonyítva. Ugyanakkor sugárkezelés esetén jól látszik a sugárzás keltette TP53INP1 kifejeződés emelkedése mindkét sejtvonalon (2,61 +/- 0,44, ill. 0,97 +/- 0,18), bár az shTP53INP1 sejteknél még így is csak a normál sejtek alap működési értékét közelíti meg (23. ábra).

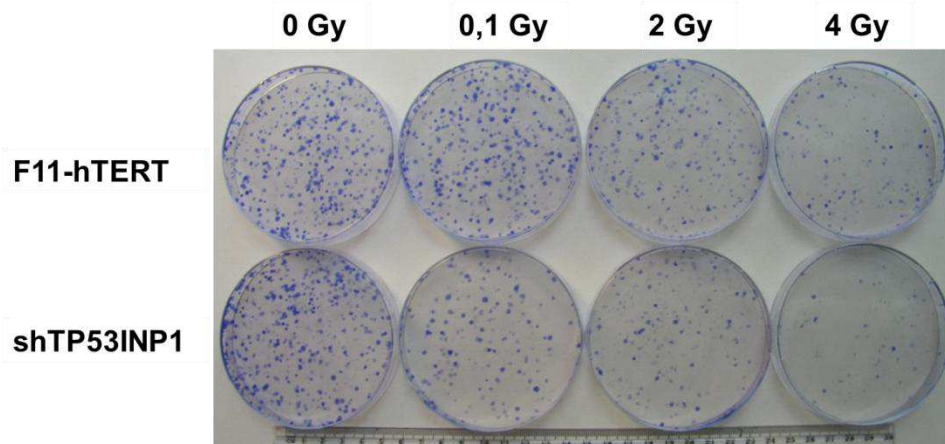


23. ábra: a TP53INP1 géncsendesítés hatékonyságának vizsgálata, sugárhatás módosulása. Kvantitatív PCR-rel mértük a normál és TP53INP1 géncsendesített sejtekben az alapszintű, valamint a 2 Gy besugárzás hatására változó TP53INP1 gén kifejeződését a Módszerek c. fejezetben leírtaknak megfelelően. 2 órával a besugárzás után a sejtekből kivont RNS-en elvégeztük először a reverz transzkripciót, majd az így kapott cDNS-eken a PCR reakciót. Az ábrán a háromszor ismételt, egy dózishoz tartozó relatív kifejeződés átlagai vannak feltüntetve + SE (*: $p < 0,05$). Statisztikai értékelése 1 utas ANOVA-val történt.

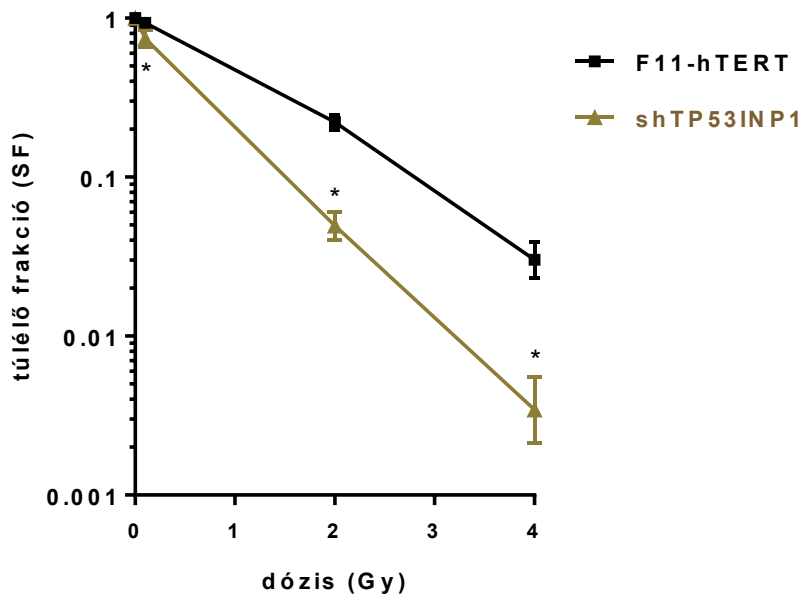
4.2.4. Sugárérzékenység vizsgálata kolónia-képző kísérlettel a TP53INP1 kifejeződés függvényében

Ebben a kísérletben F11-hTERT és shTP53INP1 sejteket sugárzás utáni túlélését hasonlítottunk össze. A 24. ábrán a túlélési görbe felvételéhez adatot szolgáltató kísérlet 0, 0,1, 2, és 4 Gy-el besugárzott Petri csészéi láthatók. A telepek kékre festődtek a Coomassie kék festéktől, jól látszik, hogy ahogy nő a kapott dózis, egyre kevesebb telep nő ki.

Miután az azonos számban kioltott sejtek megkapták a sugárzást, 2 hét tenyésztési idő alatt különböző számú kolónia képződött, melyből az SF értékeket kiszámolva túlélési görbét szerkesztettünk. (25. ábra) Ez pontosan rávilágít arra, hogy ha a fibroblasztokban a *TP53INP1* termelődés csökken, akkor a sejtek sugárérzékenyebbekké válnak. 2 Gy esetén 22 % helyett csak 4,9 %-uk éli túl a besugárzást, 4 Gy esetén 3 % helyett 0,3 %-uk.



24. ábra:a túlélési vizsgálathoz készített shTP53INP1 és F11-hTERT kolóniák képe fixálás és festés után. 10 cm-es Petri csészékre oltott 1500-1500 db sejtől kinövő,eltérő dózissal kezelt kolóniák képe látható.



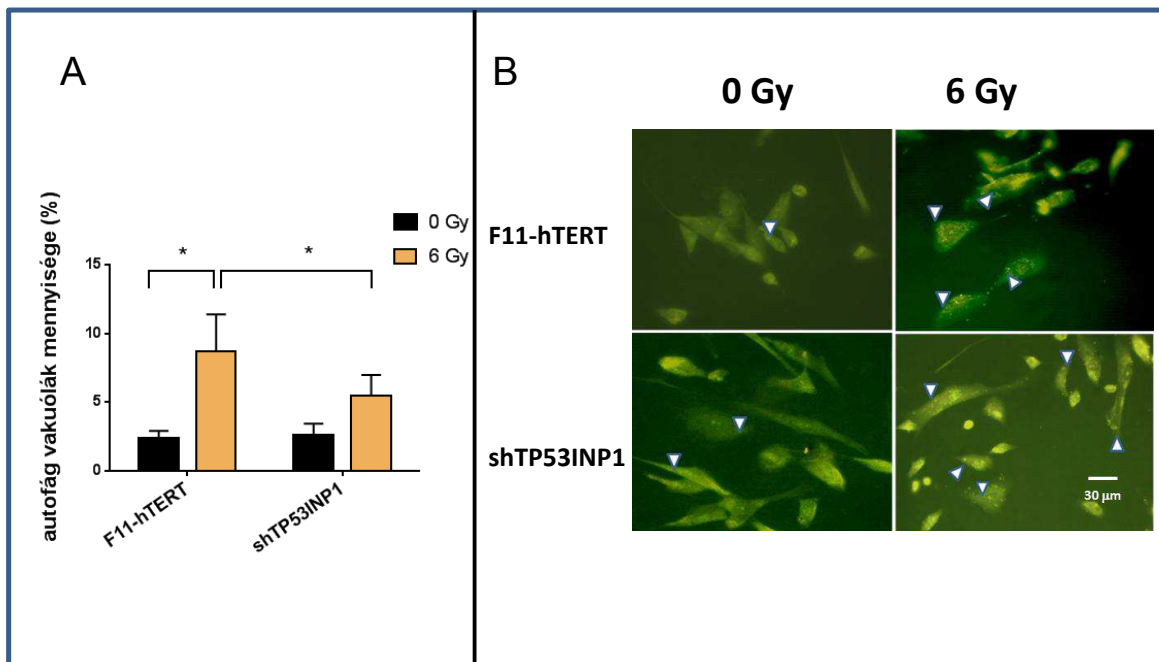
25. ábra: shTP53INP1 sejtek túlélésének dóziszfüggő változása ionizáló sugárzás hatására. A görbék az SF értékeket mutatják 0, 0,1, 2 és 4 Gy adása után, 6 párhuzamos mérést kiátlagolva, standard hibával. Statisztikai számolás t-tesztel készült. (*: $p < 0,05$)

4.2.5. Ionizáló sugárzás okozta autofágia kialakulása eltérő mennyiségű TP53INP1-et kifejező fibroblasztokban

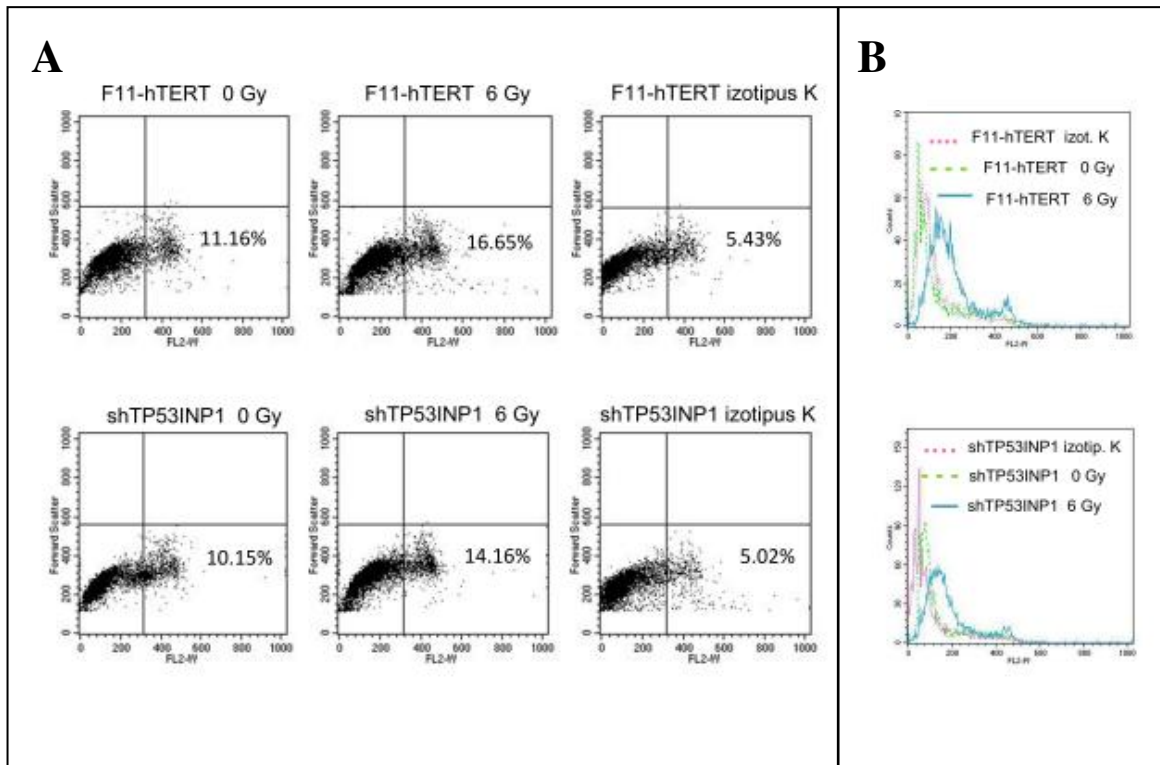
Hogy meghatározzuk, hogy van-e hatása a TP53INP1 fehérjének a sugárzás következtében károsodott sejtsejtszervecskék mennyiségére, összehasonlítottuk az F11-hTERT és shTP53INP1 sejtekben az autofág vakuólumok számát. Ha a sejtek nem kaptak besugárzást és TP53INP1 génjük is megfelelően működik, akkor az autofág vakuólák száma átlagosan $2,333 \pm 1,589 \%$, mely 6 Gy besugárzás hatására majdnem 4-szeresére növekszik ($8,718 \pm 2,66 \%$). Ha összevetjük ezzel a TP53INP1 géncsendesített sejteket, azt látjuk, hogy besugárzás hatására ezen sejtekben is emelkedett az autofág vakuólumok száma, de koránt sem akkora mértékben, mint az előző esetben ($2,608 \pm 0,842 \%$ -ról $5,501 \pm 1,47 \%$ -ra, vagyis csak 2,1-szeresére) (26/A. ábra).

Ha ugyanezen jelenségekört egy másik módszerrel, az autofág vakuólák kialakulásához szükséges LC3 molekula immunfluoreszcens festésével vizsgáltuk (27/A., B. ábra),

akkor azt kaptuk, hogy a bemért minták között 6 Gy következtében a festődött sejtek százalékos aránya F11-hTERT-nél 11,16 %-ról 16,65 %-ra ugyancsak emelkedett, míg az shTP53INP1 sejtek esetében ez az arány 10,5 %-ról 14,16 %-ra emelkedett, mely szintén kisebb mértékű, mint az eredeti sejtvonalban. A fluoreszcencia intenzitás alakulását ábrázolva is ugyanerre a következtetésre juthatunk (27/B. ábra). Mindkét kísérlet azt a következtetést támasztja alá, hogy a TP53INP1 gén hozzájárul a sugárzás indukálta autofágia kialakulásához.



26. ábra: autofágia mérése Acridine Orange festéssel TP53INP1-et különböző mértékben termelő sejtvonalakban 6 Gy besugárzást követően. Ez esetben az autofágia mérése Acridine Orange-os festéssel történt, a kiértékelése pedig fluoreszcens mikroszkóp alatt manuálisan. A.) A grafikonon a 0 és 6 Gy hatására keletkezett vakuólák számának átlagai és standard hibái vannak feltüntetve %-os értékben (*: $p < 0,05$) - lemezenként átlagosan 4-5 látótér, összesen kb. 100-150 sejt lett leszámolva. A B.) részen az Acridine Orange-al megfestett kísérleti lemezek mikroszkópos fényképei láthatók 20 x-os nagyítás alatt. A sejtekbe beépült GFP által okozott zöldes háttérszín mellett jól látszódnak a narancsosan világító autofág vakuólák, melyeket fehér nyilakkal jelöltünk.

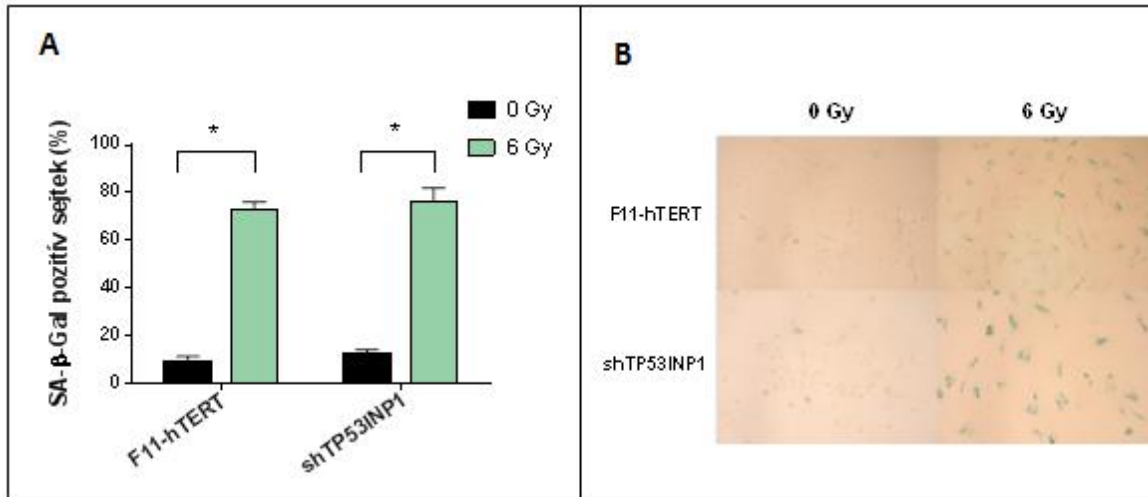


27. ábra: autofágia mérése az autofágia kialakulásához hozzájáruló LC3 molekula detektálása által. A.) LC3 fehérjéhez kötődő, zölden fluoreszkáló festékekkel kombinált antitest mérése áramlási citométerrel. 0 Gy-el és 6 Gy-el besugárzott shTP53INP1 és F11-hTERT minták, valamint izotípus kontrolljuk (nem specifikusan kötő ellenanyag) mérési eredményei lettek feltüntetve; ugyanezen mérések fluoreszcencia intenzitás értékei a hisztogramokon láthatók (B.)

4.2.6. Szenescencia módosulása 6 Gy besugárzás után TP53INP1 géncsendesített sejtekben

A sugárzás indukált szenescenciának vizsgálata során a szenescencia-asszociált béta-galaktozidáz (SA- β -Gal)- aktivitást mérve hasonlítottunk össze a normál és TP53INP1 géncsendesített sejt kultúrát a Módszerek c. fejezetben leírtaknak megfelelően. A 28/A. ábrán jól látszik, hogy 0 Gy esetén nincs különbség a géncsendesített és alap sejt vonal között, 6 Gy hatására pedig a szenescencia mértéke (közel azonos mértékben) megnő mind a TP53INP1 gént normálisan kifejező, mind az azt alul termelő fibroblasztokban (8,944 +/- 2,276 %-ról 72,972 +/- 3,182 %-ra, ill. 11,791 +/- 2,211 %-ról 76,468 +/- 5,425 %-ra). Az is látszik viszont, hogy nincs

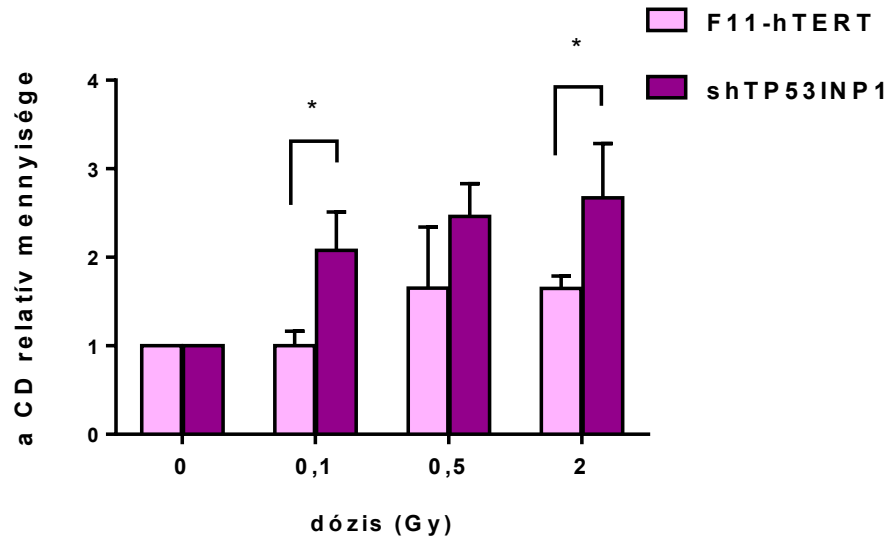
számmottevő eltérés a két sejtvonal között. Vagyis a TP53INP1 gén nem befolyásolja a sugárzás indukálta szenescencia kialakulását humán fibroblasztokban.



28. ábra: szenescenssé vált fibroblasztok mennyisége 6 Gy kezelés után. Az A.) panelen látható számszerűsítve a mikroszkóppal számolt kékre festődött szenescens sejtek száma a kioltott sejtszámhoz viszonyítva. Egy adatsor 3 külön kísérlet átlagából jön ki. Az oszlopok az egyes lemezeken 100 sejtől számolt szenescenssé vált sejtek %-ának átlagát látható standard hibákkal ellátva. Statisztikát t-tesztel számoltunk. (*: $p < 0,05$) A B.) panel ennek vizuális szemléltetése az eredményt szolgáltatató tárgylemezek fotóival. Kék sejtek, amelyekben a SA- β -galaktozidáz enzim működésbe lépett, a nem festődött sejtek a normál, ép sejteket jelentik.

4.2.7. Besugárzás hatása a mitokondriális DNS deléciók felhalmozódására TP53INP1 géncsendesített sejtekben

Emelkedő dózissal kezelve a sejteket nő a mitokondriális DNS törések száma, mely shTP53INP1-es sejtekben nagyobb mértékű, már 0,1 Gy dózisonál is szignifikáns eltérést eredményez (2,08 +/- 0,43 a kontrollhoz képest) 29. ábra. 2 Gy besugárzás esetén a TP53INP1 hiányos sejtekben szintén magasabb volt (1,647-szeres emelkedés helyett 2,67-szeresre nőtt) a sugárzás okozta hibás mitokondriális DNS-ek száma a nem besugározott sejtekhez képest. Ebből arra következtethetünk, hogy TP53INP1 gén hiányában több mitokondriális DNS sérülés alakul ki.



29. ábra: *TP53INP1*-hiányos fibroblasztokban sugárzás hatására bekövetkező mitokondriális DNS károsodás mértéke. Az ábrán a kvantitatív PCR-rel mért mitokondriális DNS deléciók (ún. Common Deléciók: CD) relatív értékeinek átlagai látszódnak 4 dózisonál, melyek mindkét sejtvonal esetén a saját kontroll csoportjukhoz lett viszonyítva. A mérések 3-szor lettek megismételve, átlaguk és szórásuk fel van tüntetve. t-teszttel állapítottuk meg a 95 %-os konfidencia intervallumú szignifikanciát (*: $p < 0,05$).

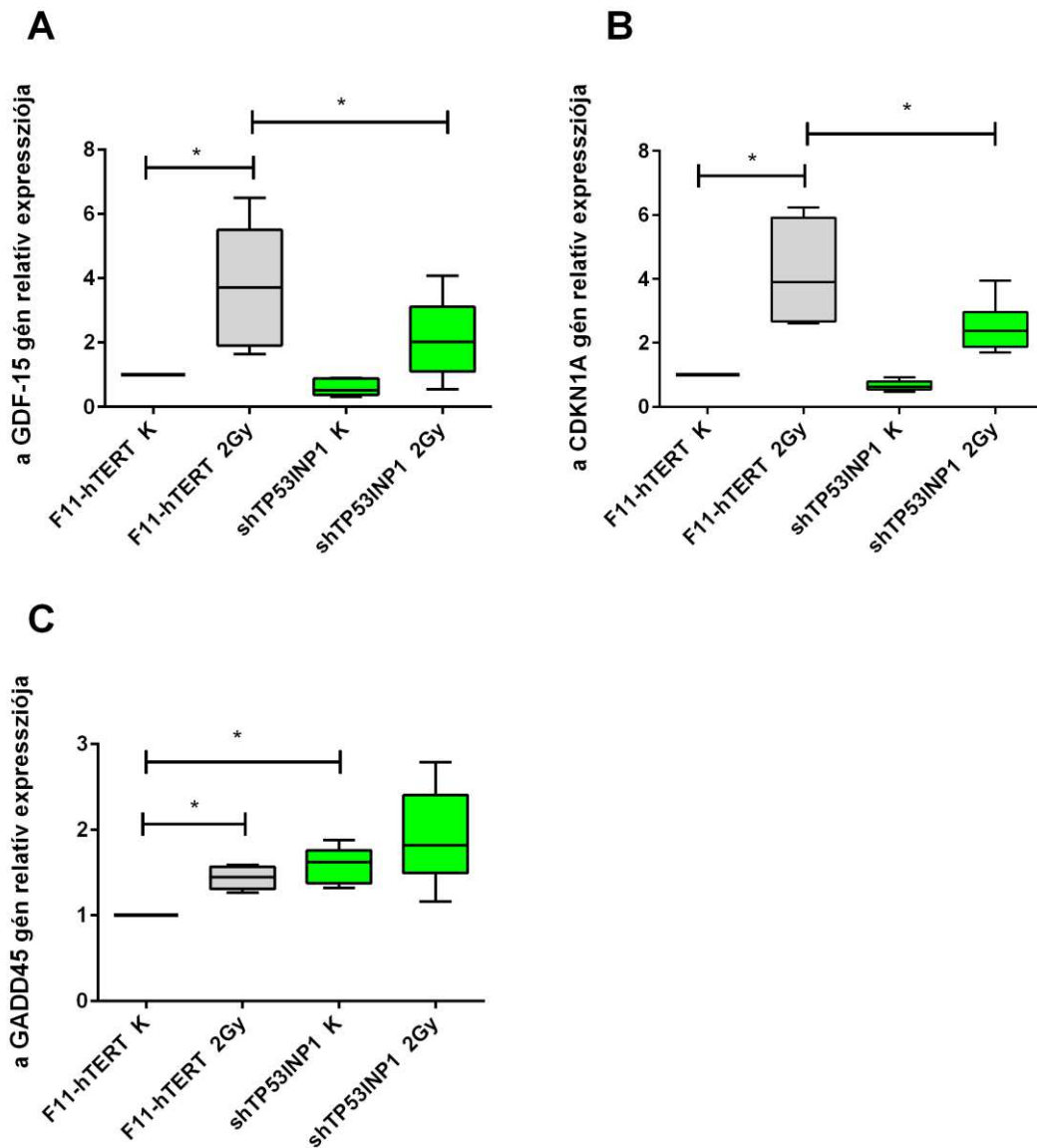
4.2.8. *TP53INP1* fehérje mennyiségének befolyása a GDF-15, CDKN1A és GADD45A gének sugárzás általi megváltozására

Korábban már említettem, hogy a címben szereplő gének transzkripciója ionizáló sugárzás hatására humán fibroblasztokban megváltozik. Most arra voltunk kíváncsiak, hogy van-e összefüggés e 3 gén kifejeződésének mértéke és a *TP53INP1* kifejeződése között, vagyis, módosul-e a sugárzás következtében megváltozott mRNS transzkripciójuk, ha a sejtben gátoltá válik a *TP53INP1* kifejeződése.

Elsőként megint azt vettük górcső alá, hogy hogyan változik a fent említett gének kifejeződése 2 Gy ionizáló sugárzás hatására az F11-hTERT sejtvonalban. Mindhárom gén kifejeződése megnőtt a besugárzás hatására (GDF-15: $3,788 \pm 0,758$; CDKN1A: $4,166 \pm 0,867$; GADD45A: $1,433 \pm 0,14$); 30. ábra.

Ha magának a génkiütésnek hatását nézzük besugárzás nélkül a sejtvonalakban, azt találjuk, hogy GDF-15 és CDKN1A génkifejeződésében nincs szignifikáns az eltérés a TP53INP1-normál és TP53INP1 géncsendesített sejtek alap értékei között, vagyis nincs hatása a géncsendesítésnek e két gén kifejeződésre. Ellentétben ezzel, a GADD45A működése megnövekedett a TP53INP1 kiütése esetén (1-ről 1,593 +/- 0,08-ra) (30/C. ábra)

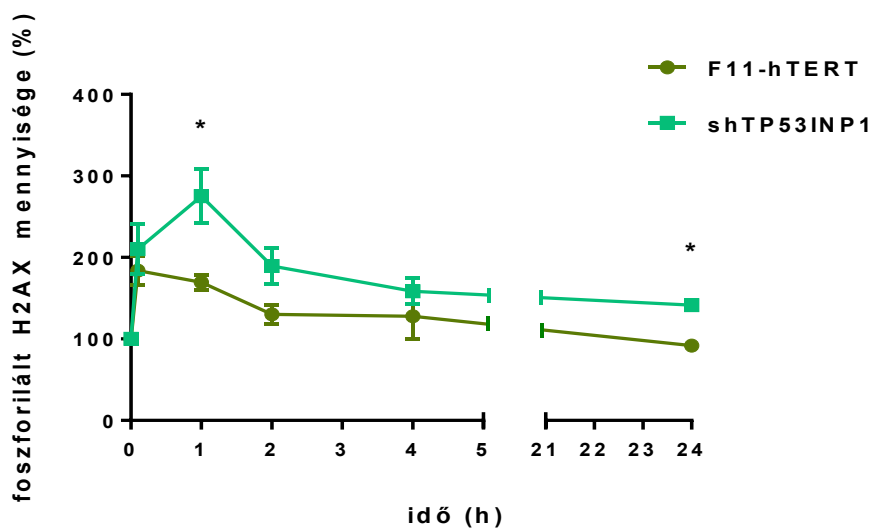
Ha viszont a sugárzás következtében fellépő expressziós változás eltéréseit nézzük, akkor a GADD45A működésére nem volt hatása a TP53INP1 hiányának, viszont mind a GDF-15, mind a CDKN1A kifejeződése nem tudott akkora mértékben emelkedni, mint TP53INP1 gén jelenlétében (3,788 +/- 0,758 helyett csak 2,084 +/- 0,332-ig, ill. 4,166 +/- 0,867 helyett csak 2,516 +/- 0,226-ig nőtt a relatív génkifejeződés) 30/A, B, C. ábrák.



30. ábra: TP53INP1 gén befolyása más sugárválasz génekre. Kvantitatív valós idejű PCR-rel mértük a GDF-15, CDKN1A és GADD45A gének relatív kifejeződését 2 h-val egy egyszeri, 2 Gy-es besugárzás után. A mérések GAPDH-ra és β -aktinra lettek normalizálva. Statisztikai elemzés 1 utas ANOVA-val lett elvégezve. (*: $p < 0,05$) A dobozok 3 párhuzamos mérés középértékét (mediánját), az alsó és felső kvartiliseit mutatják a minimum és maximum értékekkel együtt. 1-nek a nem besugarozott F11-hTERT értékeit vettük.

4.2.9. Az ionizáló sugárzás hatására létrejött DNS kettős lánctörések javításának időkinetikája

6 Gy-el kezelt F11-hTERT és shTP53INP1 sejtekben mértük a kettős töréseket jelző H2AX foszforiláció mértékét áramlási citométerrel, hogy megbecsüljük a TP53INP1 hatását a DNS hibajavítás lefolyására. Azt kaptuk, hogy a sugárzást 5 perccel követő időpontban a kettős törések felszaporodnak mindkét sejtvonalba, mely 1 óra elteltével még mindkét sejtvonalon jelen van, az F11-hTERT besugározott sejtjeiben azonban szignifikánsan kisebb mértékben, mint az shTP53INP1-nél. 2 óra múlva már csak a géncsendesített sejtvonalon van szignifikánsan több jel a saját kontrolljához képest, a normál F11-hTERT-ben már nem. 4 h után már mindkét sejtvonalnál kezdi megközelíteni a kontroll értéket, ám 24 h elteltével a TP53INP1-et alul termelő sejtekben még mindig nem maradéktalan a DNS-törések kijavítása, a kontroll sejtekhez képest szignifikánsan több kijavítatlan DNS van. Vagyis a *TP53INP1* hozzájárul a sejtekben lévő ép DNS állomány megőrzéséhez, a hibák mielőbbi kijavításához (31. ábra)



31. ábra: A kétlánú DNS törések kijavításának hatékonysága a TP53INP1 gén alulműködése esetén. Az ábrán a 0 és 6 Gy-es kezelés utáni, különböző időpontokból származó, foszforilált H2AX-re specifikus ellenanyaggal jelölt F11-hTERT és shTP53INP1 sejtek áramlási citometriai mérésének eredményei vannak összefoglalva. Az eredmények 3 különálló kísérlet átlagából származnak (standard

hibával feltüntetve). Szignifikancia értékelését t-tesztel végeztük, a kétféle sejtvonalaik értékeinek egy időponthoz tartozó páriainak összehasonlítására (*: $p < 0,05$)

5. Megbeszélés

5.1. Sugárzás indukálta molekuláris változások

Kutatásaink során az ionizációs sugárzásra bekövetkező génkifejeződés változások részletesebb leírását, s egyes megváltozott gének sugárválaszban betöltött szerepének feltérképezését tűztük ki célul emberi, normál kötőszöveti fibroblaszt sejtekben.

Sokan, sokféle megközelítéssel vizsgálták az ionizáló sugárzás egészséges szövetekre gyakorolt hatását, ezen belül is a génexpressziós vagy proteomikai változásokat. (67-73) A kis dózisú sugárzás által indukált génműködés változások azonban kevésbé vizsgált terület volt, s így kevésbé feltérképezett. Pedig a radiológiai gyakorlatban, diagnosztikus, vagy terápiás célú beavatkozások során nem elhanyagolható kis dózisú sugárterheléssel találkozhat az ember, aminek további, nem kívánt mellékhatásainak leküzdésében sokat segíthet, ha tudjuk, milyen gének, jelátviteli útvonalak aktiválódnak ilyenkor.

Korábbi kísérleteink alapján azt találtuk, hogy a fibroblasztokban a TP53INP1 és GDF-15 gén aktivitása megváltozik, ha ionizáló sugárzás éri azokat. Ezen gének kölcsönhatásban állnak más szabályozó génekkel, komplex jelátviteli útvonalaknak szereplői, melyek a túléléshez és sugárrezisztenciához is köthetők. Ezért is fontos tisztázni működésüket, valamint sugárérzékenyítő hatásukat alaposabban megvizsgálni (akár normál fibroblasztokban, akár tumoros sejtvonalakban), hogy egyre optimálisabb rák ellenes terápiákat lehessen tervezni.

Számos sejt, köztük az endotélek, fibroblasztok, immunsejtek, parenchimális sejtek különféle citokineket választanak ki sugárzás hatására. (74-76) Ezen citokinek mennyisége a sugárválaszok minőségét befolyásoló tényező, így a terápiára adott gyengébb válaszáért, ill. sugárbetegségek kialakulásáért is felelős lehet. (77-79) Pl. radio- és kemorezisztens tüdő adenokarcinóma sejtvonal ellenállása összefüggésbe hozható az AKT kináz jelátviteli úttal, illetve néhány más génnel (*IL-6*, *PDGFB*, *SDF-1*, *CXCR4 receptor*, *HSP90*) (80). Nem-kissejtes tüdő karcinómás betegek sugárkezelése után nem sokkal számos gyulladáscitokin koncentráció értéke változott a plazmában, köztük az *IL-33*, *MCP-3*, *MIP-1a*, *eotaxin*, *IP-10*, *MCP-1*, *IL-6*, *TIMP-1* és *VEGF*. Ezek közül az utolsó öttel magasabb toxicitási érték is együtt járt (81).

Humán fibroblasztban UVB sugárzásra megemelkedett a *TNF- α* és *IL-6* kifejeződése, állapította meg Ramasamy Karthikeyan munkacsoportja (82).

További kísérletek kemo- és radiorezisztens tumorsejteken tisztázhatnák, hogy e citokineket vagy receptoraikat támadva vajon el lehetne-e érni csökkent tumor életképességet, ill. lehetne-e a környező szöveteket védeni a sugárterápia miatt esetlegesen kialakuló mellékhatásoktól. Chung-Ying Huang például, aki magas kockázatú prosztatara kóros betegeket kezelt, kimutatta, hogy számos növekedési faktor és citokin (pl. *IL-1B*, *CXC-10*, *GDF-15*) túlműködik azon tumor biopsziából növesztett sejtvonalakban, melyek rosszul reagáltak a kemoterápiás szerekre (83). Továbbá *TNF- α* képes lassítani a rákos burjánzást szolid tumorokban, ennek hatása ezen felül még növelhető *NF- κ B*-val, mely növeli a tumor sejtek szenzitivitását *TNF- α* -ra (84). Yasuko kutatócsoportja arról számol be, hogy nehéz ion ($^{12}\text{C}^{5+}$)- sugárzásra (és még a bystander sejtekben is) dózis függően lecsökkent a *TNF- α* és *IL-6* citokinek mennyisége humán makrofág sejtekben (THP-1), mely jelenséget a sugárzás indukálta NO felszaporodásnak tulajdonítanak. Ebben a rendszerben e molekulát tartják felelősnek a bystander hatás közvetítéséért. *IFN- γ* -val, vagy LPS-el kezelve besugárzás előtt a sejteket a *TNF- α* szintje kevésbé csökkent le, illetve legátolva a NO termelődését, ugyanerre az eredményre jutottak (85).

5.2. A *GDF-15* tumorbiológiai hatásai, válasza az ionizáló sugárzásra

A *GDF-15*-ről, mely tagja a *TGF- β* szupercsaládnak, ismert, hogy hozzájárul a sejtek differenciálódásához és növekedésük fenntartásához, gyulladáshoz, gyulladásos folyamatok szabályozásához, és számos betegség kialakulásával is összefüggésbe hozható, pl. szív- és érrendszeri betegség, kettestípusú diabétesz, vese károsodások, stb. (86). Gén kifejeződése megemelkedhet különféle kémiai toxinok, sugárzás, vagy egyéb stressz-indukáló hatásokra, ami azt jelenti, hogy fontos szerepe van a sejtek homeosztázisának fenntartásában (86-88). Ezt erősíti meg az az észrevétel, hogy két *p53* kötőhelyet is azonosítottak szekvenciájában, így sejtciklus szabályzásba és DNS hibajavítási folyamatokba is beleszólhat, mint ahogy azt mi is bemutattuk (89). Ebből adódóan a tumorok kialakulására is van befolyása, máig nem teljesen tisztázott, összetett módon. Hatása függhet a szövettípustól, tumor stádiumától, ill. a kezelés módjától is. Korábbi

tanulmányokban leírták, hogy e fehérje megemelkedett mennyisége hasnyálmirigy rákosoknál hozzájárulhat a proapoptotikus folyamatokhoz (90), más esetekben (SMA-560 glióma sejtekben) növekedést serkentő hatása is ismertté vált (91). Asne R. Bauskin azt tapasztalta, hogy prosztatata és hasnyálmirigy rákban szenvedők tumor-szövetében magasabb *GDF-15* kifejeződést találtak a normál szövethez képest. Mások arról számolnak be, hogy prosztatata, petefészek és vastagbél rákosok szérumban is megemelkedett e citokin mennyisége (92). Modlich és mts-i. (93) primer mellrákban szenvedők kemoterápiás kezelése alatt mérte a betegek génexpressziós profilját, s azt találta, hogy számos gén, köztük a *GDF-15* kifejeződése megnövekedett a kezelés után 24 h-val, a kezelés előtt közvetlenül mérthez képest. Okazaki kutatócsoportja vastagbélrák sejtvonalat vizsgálva (HCT116) azt találta, hogy sugárzás hatására nő a *GDF-15* kifejeződése (94). Shimizu munkacsoportja (95) szintén kolorektális rák sejtvonalakat vizsgált. Az 5-fluorouracil-rezisztenciáért felelős géneket keresett microarray-el, s azt találta, hogy a kemorezisztens tumorokban jelentősen magasabb volt a *GDF-15* génkifejeződés, mint a kezelésre érzékenyen reagáló csoportban. Hasonló eredményre jutott Mimeault is (87). Petefészek rák (SKOV3), ill. prosztatata rák sejtvonal (PC3) p53 indukcióval nöött a *GDF-15* mennyisége, s ezzel együtt csökkent a tumorsejtek motilitása, mely hatás csökkent, ha a *GDF-15*-öt legátolták (92). Ugyanakkor mesterséges túlműködtetése a *GDF-15* génnek kemo-rezisztenciához vezetett docetaxellel és mitoxantronnal szemben (83). *HER2*- túlexpresszázó emlő tumoros sejtekben is növekedett a trastuzumabra való érzékenység, ha a *GDF-15* gén működését legátolták (96). Más esetekben viszont pont a *GDF-15* fejt ki tumor ellenes hatást (97).

A fentiekből is kitűnik, hogy a *GDF-15* mennyiségi alakulása a szervezetben alapvető sejtbioológiai folyamatokat érint, szintje hatással van az életminőségre. Kimutatták, hogy koncentrációja a vérben szoros kapcsolatban áll a gyomorrákos betegek mortalitásával (98).

A mi eredményeink is növekedett *GDF-15* génműködést mutatnak sugárhatásra normál humán fibroblasztok esetén. Kimutattuk, hogy kis és nagy dózissal kezelve is megváltozik a működése, méghozzá idő- és dóziszfüggést mutatva (ami alkalmassá teheti egy korán kialakuló sugárzási markerként való felhasználásra –ha nem történt egyéb,

toxikus anyaggal vagy más stresszfaktorról való érintkezés-). Ha azonban a nem besugározott, szomszédos fibroblasztokat nézzük, azoknál nem találunk eltérést egyik dózisonál sem.

5.3. Génexpressziós gátlás shRNA-kkal, s ennek sugárérzékenységre gyakorolt hatása

A gén jelentőségének és funkcióinak alaposabb megértése végett jelen tanulmányban a *GDF-15* gén gátlását tűztük ki célul. Ennek egy hatékony módja, a post-transzkripciósi eljárás, mikor shRNA-kat juttatunk be a sejtbe, így a génről átíródó mRNA-k gátlásával a gén stabil működését érjük el (99).

shRNA bevitelre többféle megoldás is létezik, kezdetben liposzómákat alkalmaztak leginkább, de ennek hatása nem maradt meg hosszú távon (100). Később plazmidokat és vírusvektorokat használtak inkább, így az információ a genomba beépülve folyamatosan fennálló shRNA termelődést eredményezett (még a nem osztódó sejteknél is). Ennek következménye a stabilan módosított sejtvonalak létrejötte. Tapasztalataink szerint a vírus vektor hatékonyabban működött a mi rendszerünkben, mint a plazmid, ezért mi ez előbbi használatánál maradtunk. Hasonlóan, Yang és mts-i is vírus vektort alkalmazva jutottak leghatékonyabban a TBR1 (kettéstípusú TGF- β receptor) csendesített vese epitél sejtekhez ill. fibroblasztokhoz (101).

A különféle shRNA-kkal, melyek mind a *GDF-15*-ről átíródó mRNA-t célozták meg, különböző mértékben gátolt fibroblaszt klónokat alakítottunk ki. Ezek közül kiválasztottuk a leghatékonyabban működő konstrukciót (MTP1/4, 66 %-os csökkenéssel), valamint egy olyat, mely nem várt módon, ismeretlen mechanizmus révén nem csökkentette, hanem erőteljesen megnövelte a szóban forgó gén kifejeződését (MTP2/3, közel 300 %-ra). Ez az esemény nem egyedi, mások is találkoztak hasonló esettel, pl. Stephan P. Persengiev, mikor Hela S3 (humán cervix adenokarcinóma) sejtenyészeten vizsgált génműködés profilokat különböző szekvenciájú és különböző koncentrációjú shRNA-kkal kezelve az in-vitro sejt kultúráját (102).

Rendszerünkben a legátolt *GDF-15* működést qPCR-rel, illetve fehérje szinten szendvics ELISA módszerrel is validáltuk.

Továbbiakban kimutattuk, hogy az ilyen *GDF-15* csendesített fibroblasztok sugárérzékenysége megnő, vagyis sugárzás után kevesebb a több generáción keresztül is fennmaradó, életképes sejtek mennyisége, mint a nem csendesített kontrollokban. Ugyanerre a következtetésre jutottunk, ha egér emlő tumor sejteket sugaraztunk be (103). Mások is találtak hasonló eredményeket, pl. a kínai Chang 2007-es publikációjában, arról ír, hogy fej-nyak tumor sejtek in-vitro tenyésztésében szintén kevesebben éltek túl a 4 - 12 Gy-es besugárzást, ha legátolták a *GDF-15* termelésüket (104).

Kimértük, hogy a normál fibroblasztokban a *GDF-15* gátlásával egyidejűleg a *TGF- β 1* aktívabbá vált, ami egy lehetséges oka lehet a géncsendesített sejtek megnövekedett sugárérzékenységének, hiszen egy korábbi tanulmányban Vodovotz már leírta, hogy *TGF- β 1* túltermelő egerek kevesebben éltek túl a 2 - 8 Gy-es egész test besugárzást, mint a normál társaik (105). Ezzel együtt szintén felmerül, hogy a *GDF-15* indukált tumor növekedés gátlása a *TGF- β* útvonalon keresztül történhet (106). Erre utal Dong-Dong Liu cikke is, melyben 3 - 4 hetes C57Bl/6 egerek cortexét vizsgálta, s utal rá, hogy a *GDF-15* a *TGF- β* receptor Smad-függő és független jelátviteli útvonalán, ez esetben az Akt/mTOR és MAPK/ERK útvonalon keresztül is képes kifejteni hatását (107).

Ezzel együtt azt is igazoltuk, hogy a *GDF-15* túlműködése esetén a *TP53INP1* gén kifejeződése is megemelkedik. Ezt egészíti ki továbbá az a megfigyelés is, hogy a sugárzásra kialakuló plusz *TP53INP1* termelődése se alakul ki, hiszen 2 Gy közlése után ellentétben a normál *GDF-15*-öt termelő (F11-hTERT) sejtekkel, működése nem emelkedik tovább a kontrollhoz képest.

5.4. *GDF-15* hatása a bystander hatásra

A mellékhatások kialakulása szempontjából fontos kérdés lehet a bystander hatás, melynél a sugárzást elszenvedő, sérült és haldokló sejtek különféle stresszfaktorok kibocsátásával halálszignált indíthatnak be a sugárzás által nem érintett sejtekben,

szövetekben is. Ez többféle mechanizmuson keresztül is megvalósulhat, pl. intercelluláris kommunikációval (un. gap junction), az extracelluláris térbe szekretáló a hírvivő anyagokkal (NO, citokinek, fehérjék, vagy a mostanában nagy hangsúlyt kapó extracelluláris vezikulák által). (28, 108-110)

Mivel a GDF-15 egy szekretálódó citokin, ezért joggal vethetjük fel, hogy esetleg közre játszhat a szomszédsági hatás kiváltásában is. Ezidáig ugyanis számos cikk született, melyben a citokinek szerepét vetik fel, mint bystander hatást közvetítő molekulák, de azok közül a GDF-15-öt senki nem vizsgálta rajtunk kívül (111), csak a TGF- β 1-et (112).

5.5. A GDF-15 fehérje hatása a mitokondriális DNS sérülésekre

Ismert, hogy sugárzás hatására a mitokondriális DNS-ben sérülések jöhetnek létre (8). Megvizsgálva a GDF-15-öt gyengén és normál módon termelő sejtekben a sugárzás okozta mitokondriális DNS deléciók mennyiségét, mi is azt találtuk, hogy ennek a citokinnek van köze a „danger szignál” kialakításában. Legalábbis ez látszik abból, hogy csökkentve a GDF-15 termelést kis és nagy dózisok után sem alakul ki annyi deléció a mitokondriumok DNS-ében, mintha a sejt normál mennyiségű citokint termelne, noha ez csak a nagy dózisonál szignifikáns.

A GDF-15 és mitokondriális sérülések kapcsolatáról Susana Graciela Kalko munkacsoportja közölt tanulmányt. Mitokondriális betegségben szenvedő gyerekek szérumában és izomszövetében mért GDF-15 szintjének mérései alapján kimondja, hogy e fehérje alkalmas biomarkere lehet a mitokondrium működési zavarának felderítésében (113, 114).

A bystander folyamatok nem csak a sugárválaszban fontosak, hanem a kemo- és radioterápiára adott válaszban is (115). Egy hatékony radioprotektív szer kialakítása érdekében hasznos lenne tovább vizsgálni a szervezetnek ezen tulajdonságát, miszerint a sejtek képesek stressz-rezisztenciát kialakítani egyes biomolekulák hatására (pl. GDF-15), melyek nem csak saját magukat védik meg, hanem szétterjesztve a környező sejtekben is kialakíthatják a védelmet.

5.6 Sejtciklus időtartamának változása és annak változása GDF-15 gén hiányában

További kísérletekben kimutattuk, hogy ionizáló sugárzás hatására normál fibroblasztoknál a GDF-15 termelésben gátolt fibroblasztokban a sugárzás hatására normál esetben kialakuló G2 ellenőrzési pont bekapcsolása csak később és kisebb mértékben valósul meg, így a sejteknek nincs idejük az örökítő anyag tökéletes helyreállítására, ami gyengébb és életképtelenebb sejteket eredményez. Azóta már mások is leírták, hogy fibroblasztok sugárzás hatására ideiglenesen megrekednek a sejtsztódásnál, bár Truong-ék a G1/G0 ellenőrzési pontnál találtak felhalmozódást (116), de a GDF-15 szerepét nem vizsgálták. Joseph Tung-Chieh Chang azt találta, hogy fej-nyak tumoros sejtekre épp ellentétes hatást vált ki a GDF-15 hiánya, hiszen mikor legátolta a *GDF-15* gén működését, a sejtek megrekedtek G2/M fázisban. (47)

Vagyis a GDF-15 védő hatása ezzel is összefüggésbe hozható. Ennek pontos okát egyelőre nem sikerült kideríteni, de az elmondható, hogy a CDKN1A, a *TP53INP1* és (bár nem 5 %-os szignifikancia szinttel) a *GADD45A* kifejeződése is változott a GDF-15 mennyisége függvényében, melyek már kapcsolatba hozhatók a p53-al és más, a sejtciklust befolyásoló szabályzó molekulával. Sőt, Shaban H. írásából kiderül, hogy a GDF-15 közvetlenül is serkenti a p53 aktivációját (117).

Tehát elmondható, hogy normál humán fibroblasztokban az ionizáló sugárzás korai következményeképpen emelkedik a *GDF-15* gén kifejeződése, a dózist növelve egyre nagyobb mértékben, így alkalmassá válhat egy korai sugárzási biomarkerként való alkalmazásra.

Kimértük, hogy a GDF-15 citokin növeli a fibroblaszt sejtek túlélését, ha azokat ionizáló sugárzás éri, mely fontos tényező lehet egy sugárzás okozta mellékhatást kiküszöbölő terápiás szer kialakításában. Fontos kérdés, hogy vajon a tumorsejtek is hasonlóan reagálnának-e egy ilyen módosított genetikai háttérrel, hiszen ez jelentősen előre vihetné a sugárkezelések hatékonyságát. Mindamellet azt is szem előtt kell tartani, hogy sugárrezisztenciát nem csak a normál sejtekben okoz, hanem a tumorsejteknél is (ld. Eik Schiegnitz cikke (118)).

A sugárzásnak közvetlenül nem kitett, de a besugározott területen lévő sejtekkel kapcsolatban álló GDF-15 hiányos fibroblasztokban az egyébként kialakuló mitokondriális DNS deléciók kis dózisoknál eliminálódnak.

GDF-15 az egy p53 szabályozása alatt álló fehérje, ugyanakkor képes a p53-at is indukálni, s más p53-függő szabályzó molekulák mennyiségét is képes befolyásolni, így komplex módon vesznek részt a sejt szabályozó és önjavító mechanizmusában. Ha gátoljuk a szóban forgó *GDF-15* kifejeződését, akkor a sugárzás következtében létrejövő G₂/M sejtciklus blokkolás késik, vagy meg is szűnhet, s így a sejtek nem marad ideje a sérüléseket helyreállítani, mutációk halmozódhatnak fel, vagy sejtpusztuláshoz is vezethet a folyamat. Tehát a sejtszintű és szervezet szintű túlélésnek egy fontos feltétele a *GDF-15* gén megfelelő működése.

5.7. A TP53INP1 fehérjének sugárhatást befolyásoló hatásai

Áttérve a másik fontos sugárválasz génre, a *TP53INP1*-re, elmondható, hogy szintén szerepe lehet az egyéni sugárválaszban és sugárérzékenységben, hiszen stressz-válasz közvetítésben van szerepe. Nemcsak sugárzásra, hanem gyulladáskor, illetve más stresszfaktorok jelenlétében is aktiválódik (pl. UV-sugárzás, oxidatív stressz, hidrogén-peroxid, kemoterápiás szer expozíció vagy hősokk hatására) (59, 119). Ezt a megállapítást követik a mi méréseink is, miszerint a *TP53INP1* kifejeződése normál humán fibroblasztban γ -sugárzás hatására dózis-függő módon emelkedik. Ezt alátámasztják azon 3D-s bőrmockokon végzett kísérletek, melyekben teljes sugárválasz génextpressziós profilt vettek fel 0,1 Gy, 2 Gy és 10 Gy-es kezelést követően. Tőlünk eltérően e cikk szerzői úgy találták, hogy kis dózisa a TP53INP1 kifejeződése nem emelkedik, ami adódhat a modell összetevőinek eltéréseiből, illetve hogy más dózisteljesítménnyel dolgoztak (66).

E gén működése kapcsolatban áll a p53 fehérjével (58). Mindkettő hat egymás működésére, nem csak a *TP53INP1* transzkripcióját szabályozza a p53, de TP53INP1 is visszahat a p53 aktivitására, így a sejtciklus szabályozásra és sejthalálra is. (59, 61) Ugyanakkor a *TP53INP1* génnek p53-tól független szabályozása is van: p73-on keresztül, illetve E2F1 transzkripció faktoron keresztül is aktiválódhat és a sejthalál szabályozásában van szerepe (120, 61).

Hogy mélyrehatóbb ismereteket szerezzünk a *TP53INP1* gén szerepéről, kísérleti rendszerünkben egy TP53INP1-géncsendesített fibroblaszt sejtvonalat hoztunk létre a már leírt shRNS transzfekciós módszerrel. Ezzel az eljárással elértük a fibroblaszt modellünk *TP53INP1* gén gátlását, s ezzel kifejeződésének kevesebb, mint felére való csökkenését.

Ezzel együtt azt is detektáltuk, hogy ezen géncsendesített sejtek sugárérzékenyebbek lettek, vagyis e gén működése segíti a sugárzás káros hatásainak eliminálását. Ezt az eredményt kapta Wang kutatócsoportja, mikor miR-205-tel gátolták le a *TP53INP1* működését: azt kapták, hogy nőtt a prosztata tumor sejtek sugárérzékenysége, ha alacsony volt a TP53INP1 mennyisége, mindeközben az autofágia mértéke is csökkent. (121). Ez szintén egybeesik a mi adatainkkal, ahol a fibroblasztban 3,74-szeresről 2,1-szeresre csökkent a sugárzás indukálta autofágia mértéke, ha legátoltuk a szóban forgó gén kifejeződését.

A tumor képződésben is nagy jelentőséggel bír, jelentősen befolyásolva egyes daganatok életképességét és agresszivitását. Ezt sugallja Pei-Hong Jiang egy közleménye is, melyben gyomorrákos páciensek tumoros szöveteit vizsgálta és vetette össze a túlélési adatokkal. Összehasonlítva a TP53INP1-pozitív és negatív régióit a már említett tumoros szövetnek azt találta, hogy a pozitív régiók apoptotikus indexe magasabb volt, a sejtek elpusztultak, és ez a páciens hosszabb túlélésével is együtt járt (122). Hasnyálmirigy rákból nyert sejtvonalban is csökkent működését írták le a vizsgált génnek, mely gátolta a tumor további növekedését (62). Más esetben azonban, pl. Hela sejtvonalban és prosztata rákban, erősen megnövekedett kifejeződést mutat, mely indukálja a tumor növekedését és gátolja az apoptózist (123).

A sugárzás indukált sejthalál egy igen komplex folyamat. Sejtípustól függően történhet apoptózis, nekrozis, autofágia, szenescencia vagy mitotikus sejthalál (124-126). A túlélés szempontjából azonban lényegesebb inkább, hogy milyen gyorsan következik be a pusztulás (127, 8). A legtöbb sejtünk késői sejthalállal pusztul el, napokkal, vagy hetekkel a károsodás után.

Humán fibroblasztok esetén a sugárzás indukált apoptózis nem jellemző, sokkal inkább a mitotikus sejthalál, ill. szenescencia (128, 129).

5.8. TP53INP1 gén hatása a sugárzás indukálta sejthalálra

A szeneszencia egy végleges sejtproliferáció leállás, mely lassan a sejt öregedéséhez, majd pusztulásához vezet. Ennek kiváltó okai lehetnek pl. hibás telomerázok vagy az örökítő anyag szomatikus sérülései, oxidatív stressz vagy onkogének mutációi. Összefüggésben van továbbá az autofágia mértékével is, mivel ezek kölcsönösen hatnak egymásra (130).

Jelen munkámban először azt mutattuk ki, hogy immortalizált humán fibroblasztokban a sugárzás indukálta szeneszenciát nem befolyásolja a *TP53INP1* gén gátlása. Ezzel szemben Geara és mts-i humán embrionális tüdő fibroblasztokat vizsgálva azt kapták, hogy 5 Gy ¹³⁷Cs gamma-sugárzás után szignifikánsan csökkent a szeneszencia sejtek száma, ha mikroRNS-ekkel gátolták a *TP53INP1* kifejeződését (131). E különbség valószínűleg a két különböző sejtvonal eredetének eltéréseiből adódhat.

A besugárzáskor kialakuló autofágia hatásai ellentétes irányúak lehetnek: segíthetik, vagy épp gátolhatják a sejtet a túlélésben (131-135). Ez függhet a sejttípustól, az aktuális mikrokörnyezettől, tumorsejt esetén a tumor stádiumától (136). Ahogy erről számos cikkben olvashatunk, az autofágia citoprotektív hatású is lehet. (137, 138) A mi kísérleti rendszerünkben az shTP53INP1 sejtvonal csökkent autofágiás képessége egyfajta magyarázat lehet a megnövekedett sugárérzékenységre, ha arra gondolunk, hogy a kisebb mértékű autofágia miatt a sejtek nem tudták megfelelően eltávolítani károsodott sejtalkotóikat, ami felborult sejtműködéshez, hosszú távon pedig pusztulásukhoz vezetett.

A *TP53INP1* génnek szerepe van az autofágia következtében kialakuló sejthalálhoz (60, 65), ahogy erről Wang is beszámolt: prosztata rákos sejtvonal sugárérzékenysége nőtt, amikor a TP53INP1 létrejöttét gátolva csökkentették az autofágia kialakulását (121). Ezen eredményeket a mi kutatásaink is megerősítik. Megvizsgáltuk, hogy a *TP53INP1* működése hogyan befolyásolja az autofágia kialakulását humán fibroblasztok esetében. Először azt határoztuk meg, hogy 6 Gy sugárzás hatására mennyivel emeli meg az autofágia mértékét normál fibroblaszt tenyészetben. Ezt követően kimutattuk (mind mikroszkópos, mind áramlási citométeres módszerrel mérve), hogy a géncsendesített sejtvonalon ez az emelkedés kisebb mértékű volt

ugyanannyi dózissal kezelve a sejteket. Ha a besugarazatlan állapotában hasonlítottuk össze a sejtvonalakat, akkor a géncsendesített fibroblasztokban így is kisebb mértékű autofágia volt jellemző, mint a normál sejtekben, ami szintén az autofágiával való kapcsolat tényét erősíti. Humán embrionális vese és oszteoszarkómás sejtvonalakban azt találták, hogy a TP53INP1 hozzákapcsolódva az LC3 molekulához elősegíti az autofág vakuolák létrejöttét, ami később ezekben a sejtvonalakban a tenyészet egy részének pusztulásához is vezetett (60).

5.9. TP53INP1 és az oxidatív egyensúly

Mint arról már sokan írtak, a *TP53INP1* gén jelentős szerepet kap a redox homeosztázis fenntartásában, több helyen is antioxidáns hatásúként említik (25, 61). A p53-at foszforilálva képes szabályozni a sejtet ért stressz folyamatok kimenetelét.

Clara E. Cano és munkatársai például leírták, hogy megemelkedett intracelluláris ROS hatására a p53 fehérje két hullámban fejt ki tumorelles és sejtvédő hatását: elsőként antioxidáns géneket (pl. glutation-peroxidáz (*GPXI*), *Sesn2*, Mn-szuperoxid-diszmutáz (Mn-SOD), aldehyd- dehidrogenáz (*ALDH4*) (139)) és sejtciklus leállításában részt vevő géneket (pl. *CDKN1A*, *GADD45A*, *14-3-3*) (140) gátolja. Ha az oxidatív stressz nem volt nagy, akkor a sejtnek így van ideje eliminálni az oxidatív gyököket. Ha túl nagy volt a stressz, akkor második lépésként a p53 indukálni kezdi az apoptózist indukáló géneket (pl. *Puma*, *Bax*), ezzel elérve a menthetetlen sejt kiiktatását. (61). Ezek és más p53 által szabályozott gének okozhatják a módosult sejtciklust, befolyásolva ezzel a DNS hibajavítás minőségét, a sejtpusztulási program beindítását, ezzel eldőlhet a sejt további sorsa, majd az egész szervezet életminőségére is kihatással lehet.

További megfigyelés szerint a *TP53INP1*^{-/-} egér embrionális fibroblaszt sejtvonalon (MEF) sejtvonalban ROS felhalmozódást, illetve a p53 cél-génjeinek (így az előbb említett antioxidáns és sejtciklus szabályozó gének) csökkent kifejeződését figyelték meg, ami együtt jár emelkedett tumor incidenciával is, míg túltermeltetve e sejtvonalban a *TP53INP1*-et ROS csökkenés alakult ki (61). Julien Gommeaux is megerősíti a *TP53INP1* antioxidáns hatását egy 2007-es cikkében, melyben arról ír, hogy *TP53INP1* hiánya reaktív oxigén gyök felhalmozódáshoz és súlyosabb kolorektális tumor incidenciához vezetett (64).

A mitokondriális DNS sérülések vizsgálatai egybe vágnak a korábban összefoglaltakkal, hiszen azt találtuk, hogy a *TP53INP1* csendesített sejtekben kis és nagy dózisokra is jobban megemelkedik a deléciót szenvedett mitokondriális DNS aránya, aminek hátterében a megemelkedett ROS mennyisége is állhat. Az ilyen sejteknek alacsonyabb a túlélési rátájuk, vagyis sugárérzékenyebbek. Ezt okozhatja még a genomiális DNS kettős lánctörések lassabb hibajavitása is. Hasonlóan, mások beszámolnak arról is, hogy az autofágia indukálásával csökkent a mitokondriális DNS mutációk száma (141-143).

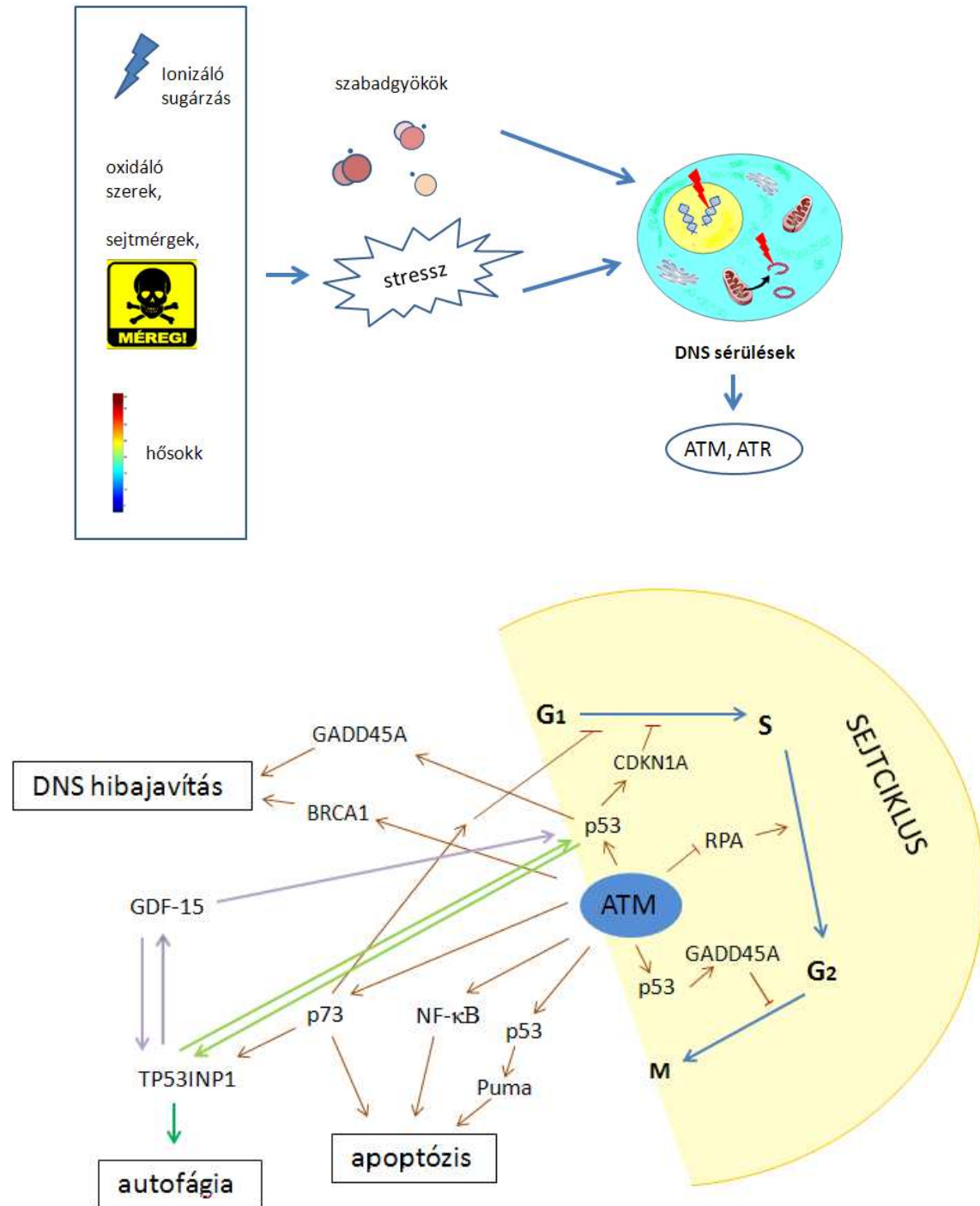
5.10. TP53INP1 fehérje mennyiségének összefüggés más szabályozó fehérjék termelődésével

Kiegészítve a fentieket fontos megemlíteni azt is, hogy méréseink alapján a sugárzás indukálta GDF-15 és CDKN1A gének működése kevésbé jelent meg TP53INP1 hiányában, mint normál esetben, mely gének hozzájárulnak a sejtciklus gátlásához is. (144). Összességében azt feltételezzük, hogy TP53INP1 által is szabályozott autofágia részt vehet a (pl. ionizáló sugárzás következtében kialakuló) oxidatív stressz által okozott sejtpusztulás regulációjában, leállíthatja a sejtciklust G₁ ponton, hogy megvédje a károsodott sejtorganelumokat, DNS-t, illetve túl nagy károsodás esetén a sejt halálához vezessen (25, 59, 61, 120).

ATP53INP1 génről elmondható tehát, hogy egy stressz-válasz gén, mely a p53 fehérjével kölcsönhatásban szabályozza a sejt túlélését. A sejtkárosító hatás súlyosságától függően vagy leállítja a sejtciklust a G₁ ellenőrzési ponton, és autofágia mechanizmusával serkenti a károsodott részek eltávolítását, s a kettős szálú DNS törés javítását, vagy ha túl nagy a sérülés, akkor serkenti a proapoptotikus gének működését, humán fibroblasztok esetén inkább a mitotikus sejthalált. Sugárzás indukálta szeneszcencia mértékére nincs hatással. A sejtben felhalmozódó szabadgyökök eliminálását is elősegíti, ezáltal a mitokondriális DNS-t is védi. Éppen ezért a TP53INP1 hiányos fibroblasztok sugárérzékenyebbekké válnak, s kevesebb lesz a túlélő sejtek száma besugárzás után.

Mivel e génnek jelentős szerepe van a sugárválaszban (mind a normál fibroblasztok túlélésében, mind pl. a tüdő fibrózis kialakulásában (145)), ezért feltételezzük, hogy az egyéni sugárérzékenység erősen függ e gén adott működésének mértékétől.

Összefoglalva a mondottakat mindkét általunk választott gén (GDF-15 és TP53INP1) sugárválasz gén, mely nagyban hozzájárul a testünk egész felületét behálózó bőrszövet fibroblaszt sejtjeinek túléléséhez, illetve ezen sejtekben sugárzás hatására bekövetkező roncsolódások kijavításához. A 32. ábra szemlélteti a lehetséges folyamatokban való részvétel módjait. Megemelkedett expressziós értékei figyelmeztethetnek egy esetleges sugárhatás megtörténte, továbbá tumoros betegek sugárterápiára adott válaszána minősége is függhet e gének aktivitásától, illetve számos mellékhatás kialakulását akadályozhatja meg megfelelő mértékű működésük. Új sugárérzékenyítő szerek egyik lehetséges módja lenne továbbá, ha célzottan a tumorokban le tudnák csökkenteni kifejeződésüket. Ezáltal javítható lenne a rákos betegek gyógyulási rátája is.



32. ábra: a sejtek túlélését befolyásoló gének hálózata (részben az Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology adatai, részben saját méréseim alapján).

6. Következtetések

Mind a GDF-15, mind a TP53INP1 gén sugárválaszban fontos szereppel bír, mindkét gén hozzájárul a fibroblaszt sejtek besugárzást követő túléléséhez, mely fontos tényező lehet új sugárérzékenyítő szerek kialakításában, illetve a normál szöveteket ért sugárzás következtében kialakuló mellékhatások enyhítésében. Ezáltal javítható lenne a rákos betegek gyógyulási rátája, illetve a kisebb mértékű mellékhatások által javítható lenne a későbbi életminőségük.

1. Megállapítottuk, hogy a fibroblasztokat ért ionizáló sugárzás hatására növekvő dózissal nőtt a GDF-15 és a TP53INP1 gének expressziója.

A GDF-15 gén kifejeződése 2 Gy-es besugárzást követően 2 h-nál érte el maximumát, utána 48 óra múlva tért vissza a besugárzás előtti normál szintre.

A TP53INP1 génnél ugyan ekkora dózis hatására szintén 2 óra múlva mértünk maximális emelkedést, mely még 48 h után is magasabb értéket mutatott, mint a kontroll sejtekben

Mindkét gén esetén igaz, hogy hiányos működésük növelte a fibroblaszt sejtek sugárérzékenységét.

2. A GDF-15 gén hiányának következményei a sugárválaszban:

A CDKN1A, és a GADD45A gének működését nem befolyásolta a GDF-15 (se akkor, ha gátolva volt, se akkor, ha túltermeltetve). A TGF- β 1 kifejeződése ellenben megnőtt, ha a fibroblaszt sejtekben gátoltuk a GDF-15 gén kifejeződését. A TP53INP1 gén működésére a GDF-15 felülexpresszációja serkentőleg hatott.

A GDF-15 hiánya befolyásolta a CDKN1A és TP53INP1 gének sugárválaszát 2 órával egy 2 Gy-es besugárzást követően, illetve hiányában a 2 Gy-el történő besugárzás indukálta sejtciklus gátlás időben késleltetett volt. A 2 Gy-e besugárzást követő mitokondriális DNS törések számát a közvetlenül besugárzott sejtekben nem befolyásolta a GDF-15 gátlása, viszont a bystander sejteknél kevesebb DNS deléció detektálható a GDF-15 géncsendesített sejtvonalban, mint a normál sejtvonalban.

3. A TP53INP1 gén hiánya a besugározott fibroblaszt sejtek sugárválaszában azt találtuk, hogy 6 Gy-es besugárzás következtében kialakuló szenescencia mértékére nem volt hatása ellenben kevesebb volt az autofágiás sejtek mennyisége 2 Gy besugárzás után.

A mitokondriális DNS sugárzás okozta sérüléseinek mértékére TP53INP1 hiányában magasabb értékeket adott 2 Gy-el történő besugárzása által, mint a normál TP53INP1 termelő kontroll csoportban, a genomiális DNS hibák javításának időkinetikája lassabb, időben elnyújtottabb volt.

A TP53INP1 génnek a GDF-15 és CDKN1A gének sugárválaszára van befolyása 2 órával egy 2 Gy-es besugárzást követően, a GADD45A-éra nincs.

7. Összefoglalás

Az ionizáló sugárzás diagnosztikai és terápiás alkalmazásának bevezetése óta egyre tágabb embercsoportot érint a gyógyászati beavatkozásból vagy más, sugárzással kapcsolatos munkakörből (pl. kutató laborok, ipar) eredő többlet dózis terhelés. Ennek következményei lehetnek a hosszú és rövid távú sugárhatások kialakulása. A sugárzás dózisától és az egyéni sugárérzékenységtől függően súlyosabb vagy kevésbé súlyos mellékhatások alakulhatnak ki radioterápiával kezelt daganatos betegek között. Ezért fontos lenne kialakítani egy hatékonyabb, egyénre szabott besugárzási protokollt, mely figyelembe veszi a különböző egyének sugárzással szembeni érzékenységét.

Ehhez szeretnék ezzel a dolgozattal hozzájárulni, melyben két, általunk kis és nagy dózisokra is reagáló sugárválasz gént vizsgáltunk humán fibroblaszt sejtkultúra modellben.

Először megvizsgáltuk a *GDF-15* és *TP53INP1* gén működésének dózis- és időfüggését, majd azt mértük meg, hogy hogyan változtatja a fibroblaszt sejtek sugárérzékenységét, ha egyik vagy másik gén kifejeződését legátoltuk, illetve mi állhat a kapott eredmények hátterében.

Azt találtuk, hogy legátolva a *GDF-15* fehérje termelődését a sugárzásnak kevésbé ellenálló sejtekhez jutottunk. Ennek hátterében többek között más (sugárzás okozta sejtkárosodás kijavításához hozzájáruló) génekkel való kölcsönhatása, s az ezzel együtt kialakuló sugárzás okozta sejtciklus leállás késlekedése áll. Mindez arra utal, hogy a *GDF-15*-nek az ionizáló sugárzás okozta sejtkárosodás kivédésében van szerepe.

TP53INP1 gén csendesítése következtében a besugárzott sejtek között kisebb volt az autofágia mértéke, így a fibroblasztokban felhalmozódhattak a ki nem javított, sugárzás következtében károsodott sejtorganellumok. Ehhez hozzájárul az is, hogy az ilyen *TP53INP1*-et alig termelő sejtek genomialis DNS törései lassabban tudtak csak regenerálódni, ahogy a mitokondriális DNS hibák is nagyobb mértékben voltak kimutathatók sugárzás után. Ennek a génnek is van befolyása a sejtosztódás leállításában közreműködő *CDKN1A* génre és a *GDF-15*-re is.

Mindkét vizsgált fehérje alkalmas lehet tehát sugárérzékenységi markerként vagy sugárérzékenységet befolyásoló (tumor sejtek esetén érzékenyítő, normál sejtek esetén sugárrezisztenciát okozó) terápiás molekulák fejlesztéséhez.

8. Summary

Since the use of ionizing radiation as a diagnostic and therapeutic agent, a wider group of people is concerned with excess radiation dose (exceeding natural background radiation) due either to clinical diagnostics, treatment or other application options (research, industrial application). As a consequence early and late radiation effects might occur. Depending on the dose and their intrinsic radiation sensitivity, patients undergoing radiation therapy also might develop early or late side effects of different gravity. This justifies the introduction of a new, personalized, more efficient radiation treatment protocol which takes into consideration the individual sensitivity of the patient.

The aim of our work was to contribute to the individualisation of radiation therapy by studying two radiation response genes which react on both low and high radiation doses in human fibroblast cell culture.

First dose and time dependency of *GDF-15* and *TP53INP1* gene expression was studied. The effect of expression inhibition on the radiation sensitivity of fibroblast cell lines was also investigated, and we also checked the background processes.

By the inhibition of GDF15 protein production we got a radiation sensitive cell line. In the background we found interactions with other proteins which have a role in the repair of radiation caused damage and the cell cycle delay caused by these processes. These results suggest that GDF-15 plays a role in the prevention of cellular damage caused by ionizing radiation.

As a result of silencing the *TP53INP1* gene, the degree of autophagy processes decreased and radiation damaged cell components accumulated in fibroblast cells. Genomic DNA damage repair slowed down and the number of mitochondrial DNA damage also elevated following radiation treatment. This gene has an effect on *CDKN1A* gene, with a role in cell cycle arrest induction and also on GDF15.

Both studied proteins would be suitable either as radiation sensitivity biomarkers or for the development of sensitizing agents for radiation therapy (increasing tumor response, but causing resistance in normal cells).

9. Irodalomjegyzék

- 1.** Freiler Á. A természetes radioaktivitás és a geológiai háttér kapcsolatának vizsgálata a soproni hegységben és környékén. (szakdolgozat, ELTE TTK), Budapest. 2011: 1-56
- 2.** Gentner NE, Crick MJ. (2010) Sources and effects of ionizingradiation (UNSCEAR report). New York, 4.
- 3.** Gászó L. Sáfrány G. Köteles Gy. Az ionizáló sugárzás biológiai hatásai. In: Köteles Gy (szerk.), Sugáregészségtan. Medicina, 2002: 41-95.
- 4.** Pesznyák Cs. Sugárfizikai és sugárkémiai alapismeretek. In: Pesznyák Cs, Sáfrány G. (szerk.), Sugárbiológia. 2013: 58-60.
- 5.** Sáfrány G, Lumniczky K. Sejtszintű sugárkárosodások, a lineáris energiatranszfer és a relatívbiológiai hatás. In: Pesznyák Cs, Sáfrány G. (szerk.), Sugárbiológia. 2013: 63-69.
- 6.** IAEA: Radiation Biology: A Handbookfor Teachers and Students. Vienna, 2010: 95.
- 7.** Sottili M, Mangoni M, Terziani F, Trombetta L, Loi M, Cappelli S, Di Brina L, Livi L. (2015). Biological basis of radiation-induced pulmonary fibrosis. Journ. of Tum, 3(3): 325-331.
- 8.** Sáfrány G, Lumniczky K. A sugárbiológiában alkalmazható tudományos módszerek az egyéni sugárérzékenység becslésére. In: PesznyákCs, Sáfrány G. (szerk.), Sugárbiológia. 2013: 380-383.
- 9.** Remouchamps VM, Vicini FA, Sharpe MB, Kestin LL, Martinez AA, Wong JW. (2003) Significant reductions in heart and lung doses using deep inspiration breath hold with active breathing control and intensity-modulated radiationtherapy for patients treated with locoregional breast irradiation. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 55(2): 392-406.
- 10.** Patrick M, Linda H, Frederik W and Carsten H. (2016) Cellular Pathways in Response to Ionizing Radiation and Their Target ability for Tumor Radiosensitization. Int J Mol Sci, 17: 1-32.

11. Suryadinata R, Sadowski M, Sarcevic B. (2010) Control of cell cycle progression by phosphorylation of cyclin-dependent kinase (CDK) substrates. *Biosci Rep*, 30(4): 243-255.
12. Geoffrey MC. The Eukaryotic Cell Cycle. In: Geoffrey MC (szerk.), *The Cell*, 2nd edition, Boston University 2000: Chapter 14.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9876/>
13. Radiology Key, Fastest Radiology Insight Engine, Radiosensitivity and Cell Age in the Mitotic Cycle. <https://radiologykey.com/radiosensitivity-and-cell-age-in-the-mitotic-cycle/> 2018.05.30.
14. Bockstaele L, Kooken H, Libert F, Paternot S, Dumont JE, de Launoit Y, Roger PP, Coulonval K. (2006) Regulated activating Thr172 phosphorylation of cyclin-dependent kinase 4 (CDK4): its relationship with cyclins and CDK "inhibitors". *Mol Cell Biol*, 26(13): 5070-5085.
15. Kopper L. A sejtproliferáció és a sejthalál szabályozásának zavarai. In: Kopper L, Jenei A. (szerk.), *Onkológia – A géntől a betegágyig*. Medicina, Budapest, 2003: 25-48.
16. Caracciolo V, Reiss K, Khalili K, De Falco G, Giordano A. (2006) Role of the interaction between large T antigen and Rb family members in the oncogenicity of JC virus. *Oncogene*, 25(38): 5294-5301.
17. Reinhardt HC, Schumacher B. (2012) The p53 network: cellular and systemic DNA damage responses in aging and cancer. *Trends Genet*, 28(3): 128-136.
18. 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.
19. Kim GJ, Fiskum GM, Morgan WF. (2006). A role for mitochondrial dysfunction in perpetuating. *Cancer Res*, 66: 10377–10383.
20. Schon EA, Rizzuto R, Moraes CT, Nakase H, Zeviani M, Di Mauro S. (1989). A direct repeat is a hotspot for large-scale deletion of human mitochondrial DNA. *Science*, 244(4902): 346-349.

- 21.** Hur W, Yoon SK. (2017) Molecular Pathogenesis of Radiation Induced Cell Toxicity in Stem Cells, 18(12): 1-13
- 22.** Robert TA. (2001) Cell cycle check point signaling through the ATM and ATR kinases. *GenesDev*, 15(17): 2177-2196.
- 23.** Smith J, Tho LM, Xu N, Gillespie DA. (2010) The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 pathways in DNA damage signaling and cancer. *AdvCancer Res*, 108: 73-112.
- 24.** Hao Q, Cho WC. (2014) Battle against cancer: an everlasting saga of p53. *Int J Mol Sci*, 15(12): 22109-22127.
- 25.** Seillier M, Peugot S, Dusetti JN, Carrier A. (2012) Antioxidant Role of p53 and of Its Target TP53INP1. Open Access book, <https://www.intechopen.com/books/antioxidant-enzyme/antioxidant-role-of-p53-and-of-its-target-tp53inp1> 2018.06.12.
- 26.** Yorimitsu T, Klionsky DJ. (2015) Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell Death Differ*, 12 Suppl 2: 1542-1552.
- 27.** Gautam D, Bhupendra VS, and Eric HB. (2012) Regulation and Function of Autophagy during Cell Survival and Cell Death. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 4(6): a008813
- 28.** Tan X, Lambert PF, Rapraeger AC, Anderson RA. (2016) Stress-induced EGFR trafficking: mechanisms, functions, and therapeutic implications. *Trends Cell Biol*, 26(5): 352-366.
- 29.** Venkata Narayanan I, Paulsen MT, Bedi K, Berg N, Ljungman EA, Francia S, Veloso A, Magnuson B, di Fagagna FD, Wilson TE, Ljungman M. (2017) Transcriptional and post-transcriptional regulation of the ionizing radiation response by ATM and p53. *SciRep*, 7(43598): 1-11.
- 30.** Vocka M, Langer D, Fryba V, Petrtyl J, Hanus T, Kalousova M, Zima T, Petruzalka L. (2018) Growth/differentiation factor 15 (GDF-15) as new potential serum marker in patients with metastatic colorectal cancer. *Cancer Biomark*, 21(4): 869-874.

- 31.** Böttner M, Laaff M, Schechinger B, Rappold G, Unsicker K, Suter-Crazzolara C. (1999) Characterization of therat, mouse, and human genes of growth/differentiation factor-15/ macrophage inhibiting cytokine-1 (GDF-15/MIC-1). *Gene*, 237(1): 105-111.
- 32.** 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 USA*, 94(21): 11514–11519.
- 33.** Xiong Y, Walker K, Min X, Hale C, Tran T, Komorowski R, Yang J, Davda J, Nuanmanee N, Kemp D, Wang X, Liu H, Miller S, Lee KJ, Wang Z, Véniant MM. (2017) Long-acting MIC-1/GDF15 molecules to treat obesity: Evidence from mice to monkeys. *Sci Transl Med*, 9(412): 1-11
- 34.** Gene Cards –Human genedatabase (<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=GDF15>) 2018.05.11.
- 35.** Shi M, Zhu J, Wang R, Chen X, Mi L, Walz T, Springer TA. (2011) Latent TGF- β structure and activation. *Nature*, 474(7351): 343-349.
- 36.** Baek SJ, Horowitz JM, Eling TE. (2001) Molecular cloning and characterization of human non steroidal anti-inflammatory drug-activated gene promoter. Basal transcription is mediated by Sp1 and Sp3. *J Biol Chem*, 276(36): 33384-33392.
- 37.** Tiwari KK, Moorthy B, Lingappan K (2015) Role of GDF15 (Growth and Differentiation factor 15) In Pulmonary Oxygen Toxicity. *ToxicolIn Vitro*, 29(7): 1369-1376.
- 38.** Alexander EB. (2015) Growth-Differentiation Factor-15 at Risk Stratification in Diabetes Patients: Usefulness, Discrepancies, and Hype. *Int Arch of EndocrinClin Res*, 1(1): 1-4.
- 39.** Pavo N, Wurm R, Neuhold S, Adlbrecht C, Vila G, Strunk G, Clodi M, Resl M, Brath H, Prager R, Luger A, Pacher R, Hülsmann M. (2016) GDF-15 Is Associated with Cancer Incidence in Patients with Type 2 Diabetes. *Clin Chem*, 62(12): 1612-1620.

- 40.** Frimodt-Møller M, von Scholten BJ, Reinhard H, Jacobsen PK, Hansen TW, Persson FI, Parving HH, Rossing P. (2018) Growth differentiation factor-15 and fibroblast growth factor-23 are associated with mortality in type 2 diabetes - An observational follow-up study. *PLoS One*, 13(4): 1-13.
- 41.** Mullican SE, Lin-Schmidt X, Chin CN, Chavez JA, Furman JL, Armstrong AA, Beck SC, South VJ, Dinh TQ, Cash-Mason TD, Cavanaugh CR, Nelson S, Huang C, Hunter MJ, Rangwala SM. (2017) GFRAL is the receptor for GDF15 and the ligand promotes weight loss in mice and non human primates. *Nat Med*, 23(10): 1150-1157.
- 42.** Chen SJ, Karan D, Johansson SL, Lin FF, Zeckser J, Singh AP, Batra SK, Lin MF. (2007) Prostate-derived factor as a paracrine and autocrine factor for the proliferation of androgen receptor-positive human prostate cancer cells. *Prostate*, 67(5): 557-571.
- 43.** 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*, 63(15): 4648-4655.
- 44.** Senapati S, Rachagani S, Chaudhary K, Johansson SL, Singh RK, Batra SK. (2010) Overexpression of macrophage inhibitory cytokine-1 induces metastasis of human prostate cancer cells through the FAK-RhoA signaling pathway. *Oncogene*, 29(9): 1293-1302.
- 45.** Boyle GM, Pedley J, Martyn AC, Banducci KJ, Stratton GM, Brown DA, Breit SN, Parsons PG. (2009) Macrophage inhibitory cytokine-1 is overexpressed in malignant melanoma and is associated with tumorigenicity. *J Invest Dermatol*, 129(2): 383-391.
- 46.** 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: 2159–2163.
- 47.** Kempf T, Björklund E, Olofsson S, Lindahl B, Allhoff T, Peter T, Tongers J, Wollert KC, Wallentin L. (2007) Growth-differentiation factor-15 improves risk

stratification in ST segment elevation myocardial infarction. *Eur. Heart J*, 28: 2858–2865.

48. Moore AG, Brown DA, Fairlie WD, Bauskin AR, Brown PK, Munier ML, Russell PK, Salamonsen LA, Wallace EM, Breit SN. (2000) The transforming growth factor superfamily cytokine macrophage inhibitory cytokine-1 is present in high concentrations in the serum of pregnant women. *J Clin Endocrinol Metab*, 85(12): 4781-4788.

49. Kleinert M, Clemmensen C, Sjøberg KA, Carl CS, Jeppesen JF, Wojtaszewski JFP, Kiens B, Richter EA. (2018) Exercise increases circulating GDF15 in humans. *Mol Metab*, 9: 187-191.

50. Adela R, Banerjee SK. (2015) GDF-15 as a Target and Biomarker for Diabetes and Cardiovascular Diseases: A Translational Prospective. *J Diabetes Res*, 2015(490842): 1-14.

51. Liu DD, Lu JM, Zhao QR, Hu C, Mei YA. (2016) Growth differentiation factor-15 promotes glutamate release in medial prefrontal cortex of mice through upregulation of T-type calcium channels. *SciRep*, 6(28653): 1-13.

52. Li S, Zhang QZ, Zhang DQ, Feng JB, Luo Q, Lu X, Wang XR, Li KP, Chen DQ, Mu XF, Gao L, Liu QJ. (2017) GDF-15 gene expression alterations in human lymphoblastoid cells and peripheral blood lymphocytes following exposure to ionizing radiation. *Mol MedRep*, 15(6): 3599-3606.

53. Chauhan V, Howland M. (2014) Gene expression responses in human lung fibroblasts exposed to alpha particle radiation. *Toxicol In Vitro*, 28(7): 1222-1229.

54. 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): 230-235.

- 55.** Akiyama M, Okano K, Fukada Y, Okano T. (2009) Macrophage inhibitory cytokine MIC-1 is upregulated by short-wavelength light in cultured normal human dermal fibroblasts. *FEBS Lett*, 583(5): 933-937.
- 56.** Shahbazi J, Lock R, Liu T. (2013) Tumor Protein 53-Induced Nuclear Protein 1 Enhances p53 Function and Represses Tumorigenesis. *Front Genet*, 4(80):1-7
- 57.** Tomasini R, Samir AA, Vaccaro MI, Pebusque MJ, Dagorn JC, Iovanna JL, Dusetti NJ. (2001) Molecular and functional characterization of the stress-induced protein (SIP) gene and its two transcripts generated by alternative splicing. SIP induced by stress and promotes cell death. *J Biol Chem*, 276(47): 44185-44192.
- 58.** Okamura S, Arakawa H, Tanaka T, Nakanishi H, Ng CC, Taya Y, Monden M, Nakamura Y. (2001) p53DINP1, a p53-inducible gene, regulates p53-dependent apoptosis. *Mol Cell*, 8(1): 85-94.
- 59.** Tomasini R, Samir AA, Carrier A, Isnardon D, Cecchinelli B, Soddu S, Malissen B, Dagorn JC, Iovanna JL, Dusetti NJ. (2003). TP53INP1s and homeodomain-interacting protein kinase-2 (HIPK2) are partners in regulating p53 activity. *J Biol Chem*, 278(39): 37722-37729.
- 60.** Seillier M, Peugeot S, Gayet O, Gauthier C, N'Guessan P, Monte M, Carrier A, Iovanna JL, Dusetti NJ. (2012) TP53INP1, a tumor suppressor, interacts with LC3 and ATG8-family proteins through the LC3-interacting region (LIR) and promotes autophagy-dependent cell death. *Cell Death Differ*, 19(9): 1525-1535.
- 61.** Cano CE, Gommeaux J, Pietri S, Culcasi M, Garcia S, Seux M, Barelier S, Vasseur S, Spoto RP, Pébusque MJ, Dusetti NJ, Iovanna JL, Carrier A. (2009). Tumor protein 53-induced nuclear protein 1 is a major mediator of p53 antioxidant function. *Cancer Res*, 69(1): 219-226.

- 62.** Gironella M, Seux M, Xie MJ, et al. (2007). Tumor protein 53-induced nuclear protein 1 expression is repressed by miR-155, and its restoration inhibits pancreatic tumor development. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104: 16170–16175.
- 63.** Jiang F, Liu T, He Y, Yan Q, Chen X, Wang H, Wan X. (2011). MiR-125b promotes proliferation and migration of type II endometrial carcinoma cells through targeting TP53INP1 tumor suppressor in vitro and in vivo. *BMC Cancer*, 11(425): 1-12.
- 64.** Gommeaux J, Cano C, Garcia S, Gironella M, Pietri S, Culcasi M, Pébusque MJ, Malissen B, Dusetti N, Iovanna J, Carrier A. (2007) Colitis and colitis-associated cancer are exacerbated in mice deficient for tumor protein 53-induced nuclear protein 1. *Mol Cell Biol*, 27(6): 2215-2228.
- 65.** Sancho A, Duran J, García-España A, Mauvezin C, Alemu EA, Lamark T, Macias MJ, DeSalle R, Royo M, Sala D, Chicote JU, Palacín M, Johansen T, Zorzano A. (2012). DOR/Tp53inp2 and Tp53inp1 constitute a metazoan gene family encoding dual regulators of autophagy and transcription. *PLoS One*, 7(3): 1-19.
- 66.** Tilton SC, Markillie LM2, Hays S3, Taylor RC2, Stenoien DL (2016). Identification of Differential Gene Expression Patterns after Acute Exposure to High and Low Doses of Low-LET Ionizing Radiation in a Reconstituted Human Skin Tissue. *Radiat Res*, 186(5): 531-538.
- 67.** Amundson SA, Fornace AJ. (2001) Gene expression profiles for monitoring radiation exposure. *Jr. Rad Prot Dosimetry*, 97(1): 11–16.
- 68.** Amundson SA. (2008) Functional genomics in radiation biology: a gateway to cellular systems-level studies. *Radiat Environ Biophys*, 47: 25–31.
- 69.** Khodarev NN, Park JO, Yu J, Gupta N, Nodzenski E, Roizman B, Weichselbaum RR. (2001) Dose-dependent and independent temporal patterns of gene responses to ionizing radiation in normal and tumor cells and tumor xenografts. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98(22): 12665-12670.

- 70.** Ding LH, Shingyoji M, Chen F, Hwang JJ, Burma S, Lee C, Cheng JF, Chen DJ. (2005) Gene expression profiles of normal human fibroblasts after exposure to ionizing radiation: a comparative study of low and high doses. *Radiat Res*, 164(1): 17-26.
- 71.** Franco N, Lamartine J, Frouin V, Le Minter P, Petat C, Leplat JJ, Libert F, Gidrol X, Martin MT. (2005) Low-dose exposure to gamma rays induces specific gene regulations in normal human keratinocytes. *Radiat Res*, 163(6): 623-635.
- 72.** Tsuyama N, Mizuno H, Katafuchi A, Abe Y, Kurosu Y, Yoshida M, Kamiya K, Sakai A. (2015) Identification of low-dose responsive metabolites in X-irradiated human B lymphoblastoid cells and fibroblasts. *J Radiat Res*, 56(1): 46-58.
- 73.** Hu ZP, Kim YM, Sowa MB, Robinson RJ, Gao X, Metz TO, Morgan WF, Zhang Q. (2012) Metabolomic response of human skin tissue to low dose ionizing radiation. *Mol Biosyst*, 8(7): 1979-1986.
- 74.** Chih-Chen H, Bing-Ying H, Tzu-Ming P. (2012) Modulation of Proinflammatory Cytokines by Red Mold *Dioscorea* Ethanol Extract in Radioactive Cobalt-60 Exposure. *Journ. of Food and Drug Anal*, 20(2): 516-523.
- 75.** Castillo GM, Nishimoto-Ashfield A, Jones CC., Kabirov KK, Zakharov A, Lyubimov AV. (2017) Protected graft copolymer-formulated fibroblast growth factors mitigate the lethality of partial body irradiation injury. *PLoS One*, 12(2): 1-25.
- 76.** Haiping Z, Takayama K, Uchino J, Harada A, Adachi Y, Kura S, Caicun Z, Tsuzuki T, Nakanishi Y. (2006) Prevention of radiation-induced pneumonitis by recombinant adenovirus-mediated transferring of soluble TGF- β type II receptor gene; *Canc. Gene Ther*, 13(9): 864-872.
- 77.** Chen B, Na F, Yang H, Li R, Li M, Sun X, Hu B, Huang G, Lan J, Xu H, Tong R, Mo X, Xue J, Lu Y. (2017) Ethyl pyruvate alleviates radiation-induced lung injury in mice. *Biomed Pharmacother*, 92: 468-478.
- 78.** Rajan Radha R, Chandrasekharan G. (2017) Pulmonary injury associated with radiation therapy – Assessment, complications and therapeutic targets. *Biom. Pharmac*, 89: 1092-1104.

- 79.** Wang W, Luo J, Sheng W, Xue J, Li M, Ji J, Liu P, Zhang X, Cao J, Zhang S. (2016) Proteomic Profiling of Radiation-Induced Skin Fibrosis in Rats: Targeting the Ubiquitin-Proteasome System. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 95(2): 751-760.
- 80.** Gomez-Casal R, Epperly MW, Wang H, Proia DA, Greenberger JS, Levina V. (2015) Radioresistant human lung adenocarcinoma cells that survived multiple fractions of ionizing radiation are sensitive to HSP90 inhibition. *Oncotarget*, 6(42): 44306-44322.
- 81.** Siva S, MacManus M, Kron T, Best N, Smith J, Lobachevsky P, Ball D, Martin O. (2014) A Pattern of Early Radiation-Induced Inflammatory Cytokine Expression Is Associated with Lung Toxicity in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer. *PLoS One*, 9(10): 1-10.
- 82.** Karthikeyan R, Kanimozhi G, Prasad NR, Agilan B, Ganesan M, Mohana S, Srithar G. (2016) 7-Hydroxycoumarin prevents UVB-induced activation of NF- κ B and subsequent overexpression of matrix metalloproteinases and inflammatory markers in human dermal fibroblast cells. *J Photochem Photobiol B*, 161: 170-176.
- 83.** Huang CY, Beer TM, Higano CS, True LD, Vessella R, Lange PH, Garzotto M, Nelson PS. (2007) Molecular Alterations in Prostate Carcinomas that Associate with In vivo Exposure to Chemotherapy: Identification of a Cytoprotective Mechanism Involving Growth Differentiation Factor15. *Clin. Canc. Res*, 13(19): 5825-5833.
- 84.** van Horssen R, Ten Hagen TL, Eggermont AM. (2006) TNF- α in Cancer Treatment Molecular Insights Antitumor Effects and Clinical Utility. *Oncol*, 11(4): 397-408.
- 85.** Mutou-Yoshihara Y, Funayama T, Yokota Y, Kobayashi Y. (2012) Involvement of bystander effect in suppression of the cytokine production induced by heavy-ion broad beams. *Int J Radiat Biol*, 88(3): 258-266.
- 86.** Alexander EB. (2015) Growth-Differentiation Factor-15 at Risk Stratification in Diabetes Patients: Usefulness, *Int. Arch. Endocrinol. Clin. Res*, 1:002
- 87.** Mimeault M, Batra SK. (2010) Divergent Molecular Mechanisms Underlying the Pleiotropic Functions of Macrophage Inhibitory Cytokine-1 in Cancer. *J Cell Physiol*, 224(3): 626-635.

- 88.** Rodemann HP, Bamberg M. (1995) Cellular basis of radiation-induced fibrosis. *Radiother Oncol*, 35(2): 83-90.
- 89.** Li PX, Wong J, Ayed A, Ngo D, Brade AM, Arrowsmith C, Austin RC, Klamut HJ. (2000) Placental Transforming Growth Factor- β Is a Downstream Mediator of the Growth Arrest and Apoptotic Response of Tumor Cells to DNA Damage and p53 Overexpression. *J Biol Chem*, 275(26): 20127-20135.
- 90.** Jutooru I, Chadalapaka G, Chintharlapalli S, Papineni S, Safe S. (2009) Induction of Apoptosis and Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drug-Activated Gene 1 in Pancreatic Cancer Cells by a Glycyrrhetic Acid Derivative. *Mol Carcinog*, 48(8): 692-702.
- 91.** Roth P, Junker M, Tritschler I, Mittelbronn M, Dombrowski Y, Breit SN, Tabatabai G, Wick W, Weller M, Wischhusen J. (2010) GDF-15 contributes to proliferation and immune escape of malignant gliomas. *Clin Cancer Res*, 16(15): 3851-3859.
- 92.** Cheng JC, Chang HM, Leung PC. (2011) Wild-type p53 attenuates cancer cell motility by inducing growth differentiation factor-15 expression. *Endocrinol*, 152(8): 2987-2995.
- 93.** Modlich O, Prisack HB, Munnes M, Audretsch W, Bojar H. (2005) Predictors of primary breast cancers responsiveness to preoperative Epirubicin/Cyclophosphamide-based chemotherapy: translation of microarray data into clinically useful predictive signatures. *J Transl Med*, 3(32): 1-18.
- 94.** Okazaki R, Moon Y, Norimura T, Eling T. (2006) Ionizing radiation enhances the expression of the nonsteroidal anti-inflammatory drug-activated gene (NAG1) by increasing the expression of TP53 in human colon cancer cells. *Radiat Res*, 165(2): 125-130.
- 95.** Shimizu D, Ishikawa T, Ichikawa Y, Togo S, Hayasizaki Y, Okazaki Y, Danenberg PV, Shimada H. (2005) Prediction of chemosensitivity of colorectal cancer to 5-fluorouracil by gene expression profiling with cDNA microarrays. *Int J Oncol*, 27(2): 371-376.

- 96.** Joshi JP, Brown NE, Griner SE, Nahta R. (2011) Growth Differentiation Factor 15 (GDF15)-Mediated HER2 Phosphorylation Reduces Trastuzumab Sensitivity of HER2-Overexpressing Breast Cancer Cells. *Biochem Pharmacol*, 82(9): 1090-1099.
- 97.** Baek SJ, Horowitz JM, Eling TE. (2001) Molecular cloning and characterization of human nonsteroidal anti-inflammatory drug-activated gene promoter. *J Biol Chem*, 276(36): 33384-33392.
- 98.** Buendgens L, Yagmur E, Bruensing J, Herbers U, Baeck C, Trautwein C, Koch A, Tacke F. (2017) Growth differentiation factor-15 Is a predictor of mortality in critically ill patients with sepsis. *Dis Markers*, 2017(5271203): 1-10.
- 99.** Agrawal N, Dasaradhi PV, Mohmmmed A, Malhotra P, Bhatnagar RK, Mukherjee SK. (2003) RNA Interference: Biology, Mechanism, and Applications *Microbiol Mol Biol Rev*, 7(4): 657-685.
- 100.** Czauderna F, Fechtner M, Dames S, Aygün H, Klippel A, Pronk GJ, Giese K, Kaufmann J. (2003) Structural variations and stabilising modications of synthetic siRNAs in mammalian cells. *Nucleic Acids Res*, 31(11): 2705-2716.
- 101.** Yang T, Zhang B, Pat BK, Wei MQ, Gobe GC. (2010) Lentiviral-mediated RNA interference against TGF-Beta receptor type II in renal epithelial and fibroblast cell populations in vitro demonstrates regulated renal fibrogenesis that is more efficient than a nonlentiviral vector. *J Biomed Biotechnol*, 2010:859240: 1-12.
- 102.** Persengiev SP1, Zhu X, Green MR. (2004) Nonspecific, concentration-dependent stimulation and repression of mammalian gene expression by small interfering RNAs (siRNAs). *RNA*, 10(1): 12-18.
- 103.** Hegyesi H, James RL, Sándor N, Schilling-Tóth B, and Sáfrány G (2011) Validation of Growth Differentiation Factor (GDF-15) as a Radiation Response Gene and Radiosensitizing Target in Mammary Adenocarcinoma Model ISBN: 978-953-307-730-7

- 104.** 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.
- 105.** Vodovotz Y, Lucia MS, DeLucca AM, Mitchell JB, Kopp JB. (2000) Reduced hematopoietic function and enhanced radiosensitivity of transforming growth factor- β 1 transgenic mice *J. Cancer*, 90: 13-21.
- 106.** Tan M, Wang Y, Guan K, Sun Y. (2000) TGF- β , a type β transforming growth factor (TGF- β) superfamily member, is a p53 target gene that inhibits tumor cell growth via TGF- β signaling pathway. *Proc. Natl Acad Sci USA*, 97(1): 109-114.
- 107.** Liu DD, Lu JM, Zhao QR, Hu C, Mei YA. (2016) Growth differentiation factor-15 promotes glutamate release in medial prefrontal cortex of mice through upregulation of T-type calcium channels. *Sci Rep*, 6:28653. 1-13.
- 108.** Laiakis EC, Baulch JE, Morgan WF. (2007) Cytokine and chemokine responses after exposure to ionizing radiation: Implications for the astronauts *Adv. in Space Res*, 39(6): 1019-1025.
- 109.** 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.
- 110.** Szatmári T, Kis D, Bogdándi EN, Benedek A, Bright S, Bowler D, Persa E, Kis E, Balogh A, Naszályi LN, Kadhim M, Sáfrány G, Lumniczky K. (2017) Extracellular Vesicles Mediate radiation-induced systemic Bystander signals in the Bone Marrow and spleen. *Front Immunol*, 8(347): 1-20.
- 111.** Freeman SM, Ramesh R, Shastri M, Munshi A, Jensen AK, Marrogi AJ. (1995) The role of cytokines in mediating the bystander effect using HSV-TK xenogeneic cells *Cancer Lett*, 92(2): 167-174.
- 112.** Marín A, Martín M, Liñán O, Alvarenga F, López M, Fernández L, Büchser D, Cerezo L. (2015) Bystander effects and radiotherapy. *Rep Pract Oncol Radiother*, 20(1): 12–21.

- 113.** Kalko SG, Paco S, Jou C, Rodríguez MA, Meznaric M, Rogac M, Jekovec-Vrhovsek M, Sciacco M, Moggio M, Fagiolari G, De Paepe B, De Meirleir L, Ferrer I, Roig-Quilis M, Munell F, Montoya J, López-Gallardo E, Ruiz-Pesini E, Artuch R, Montero R, Torner F, Nascimento A, Ortez C, Colomer J, Jimenez-Mallebrera C. (2014) Transcriptomic profiling of TK2 deficient human skeletal muscle suggests a role for the p53 signalling pathway and identifies growth and differentiation factor-15 as a potential novel biomarker for mitochondrial myopathies. *BMC Genomics*, 15(91): 1-22.
- 114.** Yatsuga S, Fujita Y, Ishii A, Fukumoto Y, Arahata H, Kakuma T, Kojima T, Ito M, Tanaka M, Saiki R, Koga Y. (2015) Growth Differentiation Factor 15 as a Useful Biomarker for Mitochondrial Disorders. *Ann Neurol*, 78(5): 814-823.
- 115.** Lumniczky K, Sáfrány G. (2006) Cancer gene therapy: combination with radiation therapy and the role of bystander cell killing in the anti-tumor effect. *Pathol Oncol Res*, 12(2): 118-124.
- 116.** Truong K, Bradley S, Baginski B, Wilson JR, Medlin D, Zheng L, Wilson RK, Rusin M, Takacs E, Dean D. (2018) The effect of well-characterized, very low-dose x-ray radiation on fibroblasts. *PLoS One*, 13(1): 1-16.
- 117.** Abd El-Aziz SH, Endo Y, Miyamaori H, Takino T, Sato H. (2007) Cleavage of growth differentiation factor 15 (GDF15) by membrane type 1-matrix metalloproteinase abrogates GDF15-mediated suppression of tumor cell growth. *Cancer Sci*, 98(9): 1330-1335.
- 118.** Schiegnitz E, Kämmerer PW, Rode K, Schorn T, Brieger J, Al-Nawas B. (2016) Growth differentiation factor 15 as a radiation-induced marker in oral carcinoma increasing radiation resistance. *J Oral. Pathol. Med*, 45(1): 63-69.
- 119.** Tomasini R, Samir AA, Pebusque MJ, Calvo EL, Totaro S, Dagorn JC, Dusetti NJ, Iovanna JL. (2002) p53-dependent expression of the stress-induced protein (SIP). *Eur J Cell Biol*, 81(5): 294-301.
- 120.** Tomasini R, Seux M, Nowak J, Bontemps C, Carrier A, Dagorn JC, Pébusque MJ, Iovanna JL, Dusetti NJ. (2005) TP53INP1 is a novel p73 target gene that induces cell

cycle arrest and cell death by modulating p73 transcriptional activity. *Oncogene*, 24(55): 8093-8104.

121. Wang W, Liu J, Wu Q. (2016) MiR-205 suppresses autophagy and enhances radiosensitivity of prostate cancer cells by targeting TP53INP1. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 20(1): 92-100.

122. Jiang PH, Motoo Y, Garcia S, Iovanna JL, Pébusque MJ, Sawabu N. (2006) Down-expression of tumor protein p53-induced nuclear protein 1 in human gastric cancer. *World J Gastroenterol*, 12(5): 691-696.

123. Wei Q, Li YX, Liu M, Li X, Tang H. (2012) MiR-17-5p Targets TP53INP1 and Regulates Cell Proliferation and Apoptosis of Cervical Cancer Cells. *IUBMB Life*, (8): 697-704.

124. Cozzarini C. (2015). Radiation Induced Lymphocyte Apoptosis: An Effective Way of “Tailoring” Radiotherapy to the Right Patients Only? *E Bio Medicine*, 2(12): 1852-1853.

125. Wang Y, Boerma M, Zhou D. (2016) Ionizing Radiation-Induced Endothelial Cell Senescence and Cardiovascular Diseases. *Radiat Res*, 186(2): 153-161.

126. Buboltz JB, Dulebohn SC. (2018) Hyperbaric, Brain Radiation Necrosis Stat Pearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing LLC, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK431083/>

127. Wouters BG. (2009) Cell death after irradiation: how, when and why cells die. *Basic Clinical Radiobiology*. 4th ed. London

128. Papadopoulou A, Kletsas D. (2011) Human lung fibroblasts prematurely senescent after exposure to ionizing radiation enhance the growth of malignant lung epithelial cells in vitro and in vivo. *Int J Oncol*, 39(4): 989-999.

129. Tsai KK, Stuart J, Chuang YY, Little JB, Yuan ZM. (2009) Low-Dose Radiation-Induced Senescent Stromal Fibroblasts Render Nearby Breast Cancer Cells Radioresistant. *Radiat Res*, 172(3): 306-313.

- 130.** Kang C, Elledge SJ. (2016) How autophagy both activates and inhibits cellular senescence. *Autophagy*, 12(5): 898-899.
- 131.** Wang Y, Scheiber MN, Neumann C, Calin GA, Zhou D. (2011) MicroRNA regulation of ionizing radiation-induced premature senescence. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 81(3): 839-848.
- 132.** Chang L, Graham PH, Hao J, Ni J, Bucci J, Cozzi PJ, Kearsley JH, Li Y. (2014) PI3K/Akt/mTOR pathway inhibitors enhance radiosensitivity in radioresistant prostate cancer cells through inducing apoptosis, reducing autophagy, suppressing NHEJ and HR repair pathways. *Cell Death Dis*, 2014(5): 1-10.
- 133.** Tam SY, Wu VW, Law HK. (2017) Influence of autophagy on the efficacy of radiotherapy. *Radiat Oncol*, 12(57): 1-10.
- 134.** Mo N, Lu YK, Xie WM, Liu Y, Zhou WX, Wang HX, Nong L, Jia YX, Tan AH, Chen Y1, Li SS, Luo BH. (2014) Inhibition of autophagy enhances the radiosensitivity of nasopharyngeal carcinoma by reducing Rad51 expression. *Oncol Rep*, 32(5): 1905-1912.
- 135.** Tai G, Zhang H, Du J, Chen G, Huang J, Yu J, Cai J, Liu F. (2015) TIGAR overexpression diminishes radiosensitivity of parotid gland fibroblast cells and inhibits IR-induced cell autophagy. *Int J Clin Exp Pathol*, 8(5): 4823-4829.
- 136.** Zhou S, Zhao L, Kuang M, Zhang B, Liang Z, Yi T, Wei Y, Zhao X. (2012) Autophagy in tumorigenesis and cancer therapy: Dr. Jekyll or Mr. Hyde? *Cancer Lett*, 323(2): 115-127.
- 137.** Yang C, Kaushal V, Shah SV, Kaushal GP. (2008) Autophagy is associated with apoptosis in cisplatin injury to renal tubular epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol*, 294(4): F777-787.

- 138.** Choi SE, Lee SM, Lee YJ, Li LJ, Lee SJ, Lee JH, Kim Y, Jun HS, Lee KW, Kang Y. (2009) Protective role of autophagy in palmitate-induced INS-1 beta-cell death. *Endocrinology*, 150(1): 126-134.
- 139.** Sablina AA, Budanov AV, Ilyinskaya GV, Agapova LS, Kravchenko JE, Chumakov PM. (2005) The antioxidant function of the p53 tumor suppressor. *Nat Med*, 11(12): 1306-1313.
- 140.** Ashraf D, David W, Nicholas L, Etsuko S, Anindya D. (2014) 14-3-3 Proteins Play a Role in the Cell Cycle by Shielding Cdt2 from Ubiquitin-Mediated Degradation. *Molecul. and Cellul. Biol*, 34(21): 4049-4061.
- 141.** Gomes LC, Di Benedetto G, Scorrano L. (2011) During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability. *Nat Cell Biol*, 13(5): 589-598.
- 142.** Dutta D, Calvani R, Bernabei R, Leeuwenburgh C, Marzetti E. (2012) Contribution of impaired mitochondrial autophagy to cardiac aging: mechanisms and therapeutic opportunities. *Circ Res*, 110(8): 1125-1138.
- 143.** Paglin S, Hollister T, Delohery T, Hackett N, McMahill M, Spiccas E, Domingo D, Yahalom J. (2001) A novel response of cancer cells to radiation involves autophagy and formation of acidic vesicles. *Cancer Res*, 61(2): 439-444.
- 144.** Park H, Kim CH, Jeong JH, Park M, Kim KS. (2016) GDF15 contributes to radiation-induced senescence through the ROS-mediated p16 pathway in human endothelial cells. *Oncotarget*, 7(9): 9634-9644.
- 145.** Sanders YY, Ambalavanan N, Halloran B, Zhang X, Liu H, Crossman DK, Bray M, Zhang K, Thannickal VJ, Hagood JS. (2012) Altered DNA methylation profile in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 186(6): 525-535.

10. Saját közlemények

A doktori dolgozat témájához kapcsolódó közlemények:

- 1.: Sandor N, Schilling-Toth B, Kis E, Fodor L, Mucsanyi F, Safrany G, Hegyesi H: (2015) **TP53inp1 Gene Is Implicated in Early Radiation Response in Human Fibroblast Cells.** INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES 16:(10) pp. 25450-25465.
- 2.: Sándor N, Schilling-Tóth B, Kis E, Benedek A, Lumniczky K, Sáfrány G, Hegyesi H. **Growth Differentiation Factor-15 (GDF-15) is a potential marker of radiation response and radiation sensitivity.** (2015) MUTATION RESEARCH-GENETIC TOXICOLOGY AND ENVIRONMENTAL MUTAGENESIS 793:pp. 142-149.
- 3.: Hegyesi H, Sándor N, Schilling B, Kis E, Lumniczky K, Sáfrány G. **Differentially expressed genes associated with low-dose gamma radiation: Growth Differentiation Factor (GDF-15) as a radiation response gene and radiosensitizing target** In: Gustavo Garcia Gomez Tejedor, Martina Christina Fuss (szerk.) Radiation Damage in Biomolecular System. Heidelberg; London; New York. (2012) 359-370.

Nem a doktori dolgozat témájához kapcsolódó közleményeim:

1. 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):33-9
2. Schilling-Tóth B, , Sáfrány G, Hegyesi H. (2014) **Role of GDF15 in radiosensitivity of breast cancer cells.** Cent. Eur. J. Biol. 9(10), p.982-992,
3. Sándor N, Walter FR, Bocsik A, Sántha P, Schilling-Tóth B, 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)

4. Hegyesi H, Lambert JR, Sándor N, Scilling-Tóth B, Sáfrány G.

Validation of Growth Differentiation Factor (GDF-15) as a Radiation Response Gene and Radiosensitizing Target in Mammary Adenocarcinoma Model.

Susan J. Done (eds.), Breast Cancer - Recent Advances in Biology, Imaging and Therapeutics, InTech. 2011 (Chapter 20.)

11. Köszönet nyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani minden kedves volt és jelenlegi munkatársamnak, akik segítettek a munkámat, név szerint: Balázs Katalinnak, Dr. Balogh Andreának, Benedek Anettnek, Bogdándi Enikő Noéminek, Csabádi Mariannának, Fekete Erzsébetnek, Fodor Bettinek, Frigyesi Marcsinak, Halász Juditnak, Jendrolovits Kittynek, Kis Enikőnek, Kis Dávidnak, Léner Violetának, Lőkös Ritának, Dr. Lumniczky Katalinnak, Persa Eszternek, Dr. Schilling-Tóth Boglárkának, Dr. Szatmári Tündének, Szőlőssi Lacinak, közülük is leginkább belső opponensemnek, Dr. Hargitai Ritának sok-sok türelméért.

Továbbá két témavezetőmnek, Dr. Hegyesi Hargitának és Dr. Sáfrány Gézának, akik kiterjedt szakmai tudásukkal és bölcs javaslataikkal nagyban támogatták a dolgozatom elkészültét. Az intézet vezetőjének (szintén Dr. Sáfrány Gézának) aki anyagilag is hozzájárult PhD fokozatom megszerzéséhez.

Családom és barátaim kitartó türelméért és támogatásáért.