

# Sugárérzékenységért felelős gének azonosítása, hatásmechanizmusuk vizsgálata

Doktori tézisek

**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

## **1. Bevezetés**

A jelen kor embereit érő sugárzások a természetes háttérsugárzásból és a mesterséges emberi tevékenységekből adódó többletsugárzásból adódnak össze.

### **1.1. Az elektromágneses sugárzás biológiai hatásai, sugárérzékenység**

Dolgozatom a diagnosztikában és gyógyászatban legtöbbször használt gamma- és röntgen-sugárzás hatásaira fókuszál. A sugárterápián átesett betegek 5-10 %-ában alakul ki a sugárzás következtében fellépő súlyos korai vagy késői mellékhatás. A sugárzás biológiai hatása függ attól, hogy milyen típusú sugárzás éri az embert, mekkora dózisban, az érintett sejtípustól (gyorsan osztódó vagy nyugalomban lévő), illetve milyen sejtalkotók roncsolódnak közben. A sugárkárosodást, s így az egyéni sugárérzékenységet módosító tényezők közé leginkább azok a szabályzó molekulák tartoznak, melyek a DNS hiba felismerésében, javításában vagy a sejtciklus szabályozásában működnek közre.

### **1.2. Az általunk vizsgált sugárválasz gének**

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, illetve az egyéni sugárérzékenységet befolyásoló hatásuk kutatásához: a GDF-15-öt és a TP53INP1-et (továbbiakban is in-vitro fibroblaszt modelleket használva).

## **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 idő függvényében)
2. Hogyan befolyásolja a sejtek ionizáló sugárzásra adott válaszreakcióit a GDF-15 és TP53INP1 gének működésének gátlása?

### 3. Módszerek

#### 3.1. Felhasznált sejtvonalak:

A sejtvonalak alapját egy humán bőrbioopsziából kitenyésztett (primer) fibroblaszt sejt kultúra (F11) képezte. E primer tenyészetből immortalizált sejt vonalat hoztunk létre (F11-hTERT) a humán telomeráz fehérje (hTERT) stabil bevitelével.

Ebből kiindulva különféle shRNS konstrukciók bevitelével további klónokhoz jutottunk: GDF-15 géncsendesített (MTP1/4), GDF-15-öt túltermelő (MTP2/3) és TP53INP1 géncsendesített (shTP53INP1 névvel jelölt) sejt vonalakoz.

#### 3.2. Génexpressziós vizsgálatok kvantitatív Polimeráz láncreakcióval (qPCR)

Attól függően, hogy genomi DNS-ről átíródó gén működését vizsgáljuk (a.), vagy a mitokondriális DNS töréseket mérjük (b.), a sejtekből először RNS-t vagy DNS-t kell izolálni. Előző esetben a láncreakciós mérésekhez cDNS-átírás is szükséges.

A.) esetben a sejteket 2 Gy  $\gamma$ -sugárzásnak vetettük alá, majd 2 h inkubációs idő után a sejtekből RNS-t izoláltunk, abból cDNS-t készítettünk, és ebből tettünk a PCR munkaelegyébe a következők szerint: a 25  $\mu$ l-es végtérfogatú reakcióelegy összetevői egy mintára és egy génre nézve: 12,5  $\mu$ l Maxima SYBR Green qPCR Master Mix, 2  $\mu$ l cDNS, 1,3  $\mu$ l primer pár (egy génhez tartozó *forward* és *reverz* irányú oligonukleotid elegye 12,5 pM-os koncentrációban), 9,2  $\mu$ l víz.

B.) esetben a mintából DNS-t izoláltunk, s azt raktuk össze a reakció elegy többi komponenséhez.

Szomszédási (bystander) hatás vizsgálatoknál a mérendő sejtek nem lettek besugározva, viszont 2 órán keresztül inkubálódtak a besugárzott sejtekről származó médiumban.

A reakciót Rotor-Gene, Corbett-3000 real-time PCR System típusú készülékben végeztük. A relatív génexpressziós változás kiszámításához a  $\Delta\Delta Ct$  értékeket használtuk fel. (Ct: ciklus küszöb)

### **3.3. Géncsendesítés hatékonyságának fehérje alapú ellenőrzése ELISA-val**

E módszerrel („Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”) a GDF-15 génmódosított sejtek felülúszóiból mértük a szekretálódott GDF-15 fehérjét. Tenyésztőedényenként (25 cm<sup>2</sup>) 1 millió sejt lett kioltva, majd egyes tenyészetekről leszedett médiumot kioltástól számított 24, 30, ill. 48 h-val később gyűjtöttük be. Ezeket bekoncentrálva használtuk a méréshez.

### **3.4. Sugárérzékenységi 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 sejtet szuszpenziót létrehozva azonos (kis) mennyiségű sejtet oltottunk ki, majd számoltuk a besugárzás után két héttel kinőtt (50 db < sejtet tartalmazó) telepek számát. A besugárzott telepszám nem besugározott telepszámhoz viszonyított értékei adták a túlélő frakciót (SF).

### 3.5. Sejtosztódás, sejtciklus analízis

Tanulmányoztuk, hogy a géncsendesítés hogyan befolyásolja a sugárzás kiváltotta sejtciklus folyamatokat. 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. Besugárzás után 6, 24, 48 és 72 órával a gyűjtöttük be a sejteket, majd festés után áramlási citométerrel (FACS) mértük a sejtciklusra jellemző DNS tartalmat.

### 3.6. Autofágia vizsgálatok

Kétféle módon is mértük a sugárzás következtében kialakuló autofágia mértékének változását.

1.) **Acridine Orange festéssel**, ahol fedőlemezekre oltott egysejtes szuszpenziót növesztettünk, 0 és 6 Gy-el besugaraztuk, majd 48 h –val később 1 µg/ml-es Acridine Orange-ot tartalmazó médiummal cseréltük le a tápjukat, és ebben inkubálódtak. Fluoreszcens mikroszkóppal számoltuk a narancsos pirosan fénylő autofág vakuólumok számát.

2.) **Áramlási citométerrel** az autofág vakuóla kialakulásában szerepet játszó LC3 molekula immunfluoreszcens festésével követtük nyomon a besugárzott és nem besugárzott sejtek közti különbséget.

### 3.7. Szenescencia mérések

Sugárzás következtében kialakuló sejthalál egyik formája a szenescencia, ennek mérésére szintén tárgylemezeken tenyésztettünk F11-hTERT és shTP53INP1 sejteket, 6 Gy-el besugaraztuk, s mosás, fixálási lépéseket követően (1 mg/ml 5-bromo-4-kloro-3-indolil-β-D-galaktozidot

tartalmazó) X-Gal oldatban inkubáltuk, ami által a pusztuló sejtek kék színűre festődtek. Fénymikroszkóppal számoltuk a kékre festődött sejtek arányát.

### **3.8. Kettős láncú DNS törések mérése $\gamma$ -H2AX festéssel**

A DNS kettős lánc-törések kimutatásának és mérésének egyik módszere a kettős törések helyéhez hozzákötő foszforilálódott hiszton fehérje, a  $\gamma$ -H2AX meghatározása a hozzá kötődő detektálható antitest mérésével. Egy egyszeri 6 Gy-es besugárzás után vizsgáltuk a sugárzás indukálta DNS törések javításának időkinetikáját 6 különböző időpontban (besugárzást követően azonnal, 1, 2, 4, 6, 24 h-t követően). A sejteket először mostuk, permeabilizáltuk, ezt követte az immunfestés, majd citometriás mérés.

### **3.9. 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. GDF-15 gén működésének változása direkt besugározott fibroblaszt sejtekben, illetve a közvetlenül nem besugározott (bystander) sejtekben**

A közvetlenül besugározott sejtek GDF-15 génkifejeződése a dózis emelésével nő, mely 0,5 és 2 Gy-nél szignifikánsan eltér a kontrollhoz képest (1,677 +/- 0,02 és 1,946 +/- 0,49). A nem besugározott befogadó sejteknél nem találtunk eltérést a kontrol sejtekhez képest egyik dózissnál sem.

### **4.2. GDF-15 fehérje termelés gátlása lentivírus vektor közvetített shRNS-ekkel**

Öt féle shRNS konstrukció felhasználása révén több, GDF-15-öt különböző mértékben legátolva termelő, géncsendesített fibroblasztokhoz jutottunk. 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 pusztultak el ionizáló sugárzás hatására (bár ezek nem szignifikáns mértékben), mint a módosítatlan F11-hTERT. Így elmondható, hogy a GDF-15 gén működési intenzitása hatással van a fibroblasztok sugárérzékenységére.



### **4.3. GDF-15 fehérje mennyiségi változása időben a különböző géncsendesített sejtekben**

A mérés megmutatta, hogy a géncsendesített sejteknél jóval kevesebb GDF-15 fehérje termelődik ( $8 \pm 2$  pg/ml), mint a normál sejtekben ( $213,5 \pm 8,5$  pg/ml), míg a túltermelőknél több mint háromszoros fehérjetermelést látunk ( $1366,47 \pm 70,53$ ). Továbbá az is látszik, hogy az idő múlásával is dúsul a sejtekben termelődő, s onnan a médiumba kibocsátódó citokin.

### **4.4. Sugárzás indukált GDF-15 génkifejeződés időfüggése**

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. Géncsendesített sejtvonal esetén a kontroll csoport alap GDF-15 kifejeződése jóval elmarad az normál sejtvonalhoz képest ( $0,33 \pm 0,1$ ), így igazolva lett a hatékony génkiütés. 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 ( $0,76 \pm 0,69$ ).

### **4.5. GDF-15 gén változtatásának hatása a besugárzás által indukált egyéb génekre**

A normál fibroblaszt sejtvonalban a TP53INP1 ( $2,56 \pm 0,21$ ), CDKN1A ( $2,61 \pm 0,28$ ) és GADD45A ( $1,433 \pm 0,14$ ) gén kifejeződése jelentősen emelkedik 2 Gy gamma-sugárzást követő 2 h után, míg a TGF- $\beta$ 1 ( $0,998 \pm 0,09$ ) nem változik.

A sejtekben gátlódott a GDF-15 gén kifejeződése, akkor a TGF- $\beta$ 1 kifejeződés értéke megemelkedett (1,41 +/- 0,21) míg a másik 3 géné nem változott jelentősen.

GDF-15 túlműködése nincs hatással se a TGF- $\beta$ 1, se a CDKN1A, se a GADD45A génkifejeződésre, a TP53INP1 alap kifejeződését viszont megemeli (3,07 +/- 0,75).

A GDF-15 működésének intenzitása ellentétesen befolyásolja a TGF- $\beta$ 1 és TP53INP1 gének működését. 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. Ellenben se a CDKN1A, se a TP53INP1 génkifejeződési értéke kevésbé emelkedett besugárzásra, ha a GDF-15 kisebb mennyiségben van jelen (1,36 +/- 0,17 és 1,74 +/- 0,33 a 2,47 +/- 0,57 helyett). 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.

#### **4.6. GDF-15 csendesítés hatása a sejtek sugárérzékenységére**

Található különbség GDF-15 termelés függvényében: 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.

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

A GDF-15 jelenléte vagy hiánya nem befolyásolja a mitokondriális DNS deléciójának mennyiségét a közvetlenül besugározott fibroblaszt sejteken 3 nappal a besugárzás után. Ha bystander sejtekben vizsgáltuk ugyan ezt a hatást, 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.

#### **4.8. GDF-15 gén csendesítésének hatása a sejtciklusra 2 Gy-el történő besugárzás esetében**

Nem mérhető szignifikáns változás az eltérő fázisokban lévő sejtpopulációs ráta között az egyes időpontokban. Ezt az ionizáló sugárzással való kezelés befolyásolja: 6 órával a besugárzás után a sejtek jelentős része G2-ben megreked, nem tud tovább haladni, szünetelt a sejtosztódás. GDF-15 gén csökkent működése esetén ebben a G2 fázisban történő leállás késleltetett, csak 48 h múlva jelentkezik és kisebb mértékben. Tehát a *GDF-15* jelenléte fontos a sejt regenerációjához, mert hiánya csökkenti a javításhoz szükséges G2 fázisban töltött idő mennyiségét.

#### **4.9. A TP53INP1 gén kifejeződésének változása közvetlenül besugározott és közvetlen sugárhatást el nem szenvedett humán fibroblaszt sejtekben**

A direkt sugárhatásnak kitett és a bystander sejtekben is növekedett a TP53INP1 átíródásának intenzitása (mely már 0,5 Gy-től szignifikáns eltérést adott).

#### **4.10. TP53INP1 génkifejeződés időfüggő változása 2 Gy besugárzásra**

2 Gy-el besugározott sejtenyészetben a TP53INP1 transzkripció 2 h-nál éri el a maximumát, majd ez a változás lassan csökkenni kezd, de 48 h múlva is még jelentős az eltérés a nem besugározott sejtekhez képest.

#### **4.11. A TP53INP1 gén csendesítése ún. short hairpin RNS (shRNS)-t kódoló lentivírussal, s az így létrejött sejtvonal sugárválaszában bekövetkező változások**

A nem besugározott sejtekben kevesebb, mint felére csökken a TP53INP1 gén kifejeződése a módosított sejtekhez viszonyítva. Ugyanakkor a sugárzás indukálta expressziós emelkedés 2,61 +/- 0,44 helyett csak 0,97 +/- 0,18 értéket mutatott.

#### **4.12. Sugárérzékenység vizsgálata kolónia-képző kísérlettel a TP53INP1 kifejeződés függvényében**

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.

#### **4.13. Ionizáló sugárzás okozta autofágia kialakulása eltérő mennyiségű *TP53INP1*-et kifejező fibroblasztokban**

Összehasonlítottuk az F11-hTERT és shTP53INP1 sejtekben az autofág vakuólumok számát, mely 6 Gy besugárzás hatására a normál fibroblasztokban majdnem 4-szeresére növekszik (8,718 +/- 2,66 %). TP53INP1 géncsendesített sejteknél ez az emelkedés csak kb. 2-szeres volt (2,608 +/- 0,842 %-ról 5,501 +/- 1,47 %-ra

Ha ugyanezen jelenségekört az autofág vakuólák kialakulását jellemző LC3 molekula immunfluoreszcens festésével vizsgáltuk, akkor is azt kaptuk, hogy a normál fibroblasztokban magasabb volt az LC3 molekulák aránya.

#### **4.14. Szeneszencia módosulása 6 Gy besugárzás után *TP53INP1* géncsendesített sejtekben**

6 Gy hatására a szeneszencia 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). A két sejtvonal között nincs számottevő eltérés.

#### **4.15. 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). 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 besugarazott sejtekhez képest.

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

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 sejtekben kialakuló alap expressziók között, vagyis nincs hatása a géncsendesítésnek e két gén kifejeződésre. Ellentétben ezzel, a GADD45A működése megnövekedett a TP53INP1 kiütése esetén. Ha viszont a sugárzás következtében fellépő expressziós változás eltéréseit nézzük, 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)

#### **4.17. Az ionizáló sugárzás hatására létrejött DNS kettős lánc-törések 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 1 óra elteltével még mindkét sejtvonal esetén sok hibás DNS van, az F11-hTRT besugarazott sejtjeiben azonban szignifikánsan kisebb

mértékben, mint az shTP53INP1-nél. 2 óra múlva már csak a géncsendesített sejtvonalban 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.

## **5. Következtetés**

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.

**5.1.** 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.

**5.2.** 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- $\beta$ 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 2Gy-el történő besugárzás indukálta sejtciklus gátlás időben késleltetett volt. A 2 Gy-es 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.

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

## 6. 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.** Int J Mol Sci, 16(10):25450-25465.

2.: Sándor N, Schilling-Tóth B, Kis E, Benedek A, Lumniczky K, Sáfrány G, Hegyesi H. (2015) **Growth Differentiation Factor-15 (GDF-15) is a potential marker of radiation response and radiation sensitivity.** Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen, 793:142-149.

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: Gomez Tejedor GG, Fuss MC. (edit.), Radiation Damage in Biomolecular System. Springer, 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. **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.** (2011) Mutat Res. 716(1-2):33-39.

2. Schilling-Tóth B, Sándor N, Walter FR, Bocsik A, Sáfrány G, Hegyesi H. (2014) **Role of GDF-15 in radiosensitivity of breast cancer cells.** Cent. Eur. J. Biol. 9(10):982-992

3. Sándor N, Walter FR, Bocsik A, Sántha P, Schilling-Tóth B, Léner V, Varga Z, Kahán Z, 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.** In: Done SJ (edit.), Breast Cancer - Recent Advances in Biology, Imaging and Therapeutics, InTech, 2011: Chapter 20.