36. OTDK Biológia szekció

A redoxrendszerek hatása a sugárérzékenységre emberi sejtvonalban vizsgálva

OTDK-dolgozat

készítette:
Paller Éva

biológia alapszak, 3. évfolyam

küldő intézmény: Eötvös Loránd Tudományegyetem
kutatási intézmény: Országos Onkológiai Intézet

témavezetők:

Dr. Kocsis Zsuzsa PhD
klinikai sugárbiológus

Dr. Jurányi Zsolt MD PhD
osztályvezető főorvos

EÖTVÖS LORÁND TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR
BIOLÓGIAI INTÉZET

Budapest, 2022.

Tartalomjegyzék

Rövidítésjegyzék 3
1. Bevezetés 5
1.1. Sugárterápia 5
1.2. ROS és sugárrezisztencia 6
1.3. Sugárérzékenység kutatása 7
1.4. A ROS-t ellensúlyozó antioxidánsrendszerek és fehérjék 9
2. Célkitűzések 11
3. Anyagok és módszerek 12
3.1. Sejtvonal és tenyésztési körülmények 12
3.2. Sugárrezisztens emlőkarcinóma vonal létrehozása 12
3.3. Glutation kit 13
3.4. Superoxid-dizmutáz kit 13
3.5. Flow citométeres sejtciklus fázis meghatározás (FACS) 14
4. Eredmények 15
4.1. Korábbi eredmények: klonogenitási assay és SRB 15
4.1.1. Klonogenitási assay 15
4.1.2 Szulforodamin B kolorimetriás assay 16
4.2. Glutation assay 17
4.3. Szuperoxid-dizmutáz assay 18
4.4 Flow citométeres sejtciklus fázis meghatározás 19
5. Diszkusszió 22
6. Összefoglaló 24
7. Köszönetnyilvánítás 25
8. Szerzői hozzájárulás 26
9. Irodalomjegyzék 27

Rövidítésjegyzék

60Gy- HCC1954 emlőkarcinóma sugárrezisztens alvonala

DNS- dezoxiribonukleinsav

ED_{50}- effektív dózis

Ex/Em- excitációs/emissziós maximumok

FACS- flow (áramlási) citométer/ fluorescence-activated cell sorting

FBS- szarvasmarha magzati vérszérum / foetal bovine serum

GSH- glutation / glutathione

GSR- glutation-reduktáz /gluthatione reductase

GSS- glutation szintetáz / glutathione synthetase

GSSG- glutation-diszulfid / glutathione disulfide

GST- glutation-S-transzferázok /glutathione-S-transferases

Gy- gray

H_2O_2- hidrogén-peroxid

HO^-- hidroxilgyök

K562- eritroid leukémia sejtvonal

KO- knockout

L-Glu- L-glutamin /L-glutamine

mRNS- hírvivő RNS / messenger RNA

NF-KB- nukleáris faktor-kappa B / nuclear factor-kappa B

no IR- besugárzás nélküli kontroll / no ionizing radiation control

Nrf2- eritroid 2-vel kapcsolatos nukleáris faktor / nuclear factor-erythroid factor 2-related factor 2

O_2^-- szuperoxid anion

OPA- o-ftálaldehid / o-pthalaldehyde

PBS- foszfáttal pufferolt sóoldattal / phosphate buffered saline

PCA- perklórsav / perchloric acid

PenStrep- penicillin-sztreptomicin oldat

PI- propídium-jodid / propidium-iodide

RFU- relatív fluoreszcens egység / relative fluorescent unit

RNS- ribonukleinsav

ROS- reaktív oxigéngyök / reactive oxygen species

RPM- fordulat per perc / rotation per minute

RPMI-1640- sejttenyésztéshez használt médium

siRNS- rövid interferáló RNS / short interfering RNA

Sod1/2/3- szuperodix-dizmutáz1/2/3-at kódoló gén

SOD1/2/3- szuperoxid-dizmutáz1/2/3 / superoxide-dismutase1/2/3

SRB- szulforodamin B assay / sulforhodamine B assay

WT- HCC1954 emlőkarcinóma vad sejtvonala

1. Bevezetés

1.1. Sugárterápia

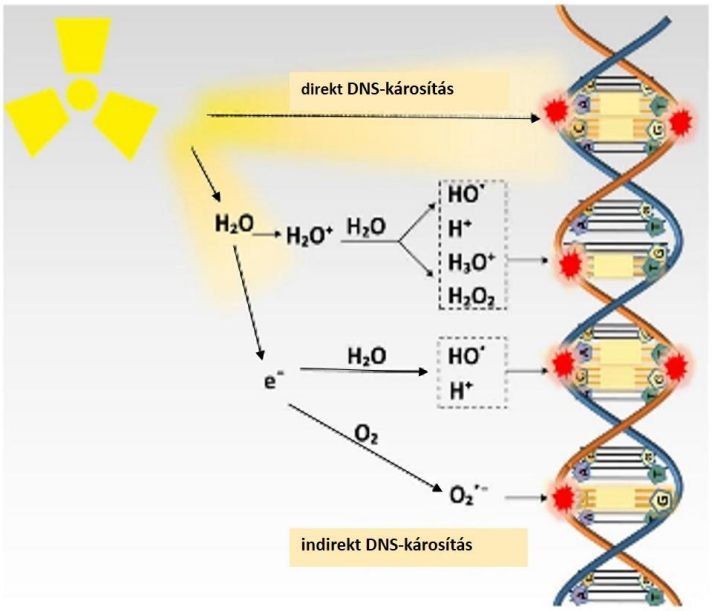
A sugárterápia egy olyan onkológiai eljárás, mely során meghatározott területekre ionizáló sugárzást bocsátanak. Leggyakrabban rosszindulatú daganatok esetében alkalmazzák abból a célból, hogy a ráksejteket megölje, illetve hogy a daganat zsugorodjon.

A sugárzás mennyiségét gray-ben (Gy) fejezzük ki, ami egy joule felvett energia egy kilogrammra vonatkoztatva. A leadott dózis függ a daganat stádiumától és szövettani profiljától, teleterápia esetén a dózis általában 20 Gy és 80 Gy között van, amit a beteg általában 1,5-2,5 Gy-es frakciókban kap meg.

A sugárterápia hatásmechanizmusa az besugárzás sejteket károsító hatásán alapszik. Amint egy sejtet sugárzás ér, annak örökítőanyaga károsodik, amik közül a legfontosabb fellépő hibák a szimpla- és a duplaszálú DNS-törések. Mivel ezeket a töréseket ki kell javítani mielőtt a sejt osztódhatna, a sejt megreked ciklusának G2-es szakaszában és stacioner növekedési fázisba lép. A ráksejtek természetüknél fogva differenciáltságtól függően multi- vagy akár pluripotensek is lehetnek (a jól differenciált ráksejtek jobban hasonlítanak normál szöveti sejtekhez, míg a rosszul differenciáltak pluripotencia felé tendálnak). A multi- és pluripotens sejtekre jellemző a gyors osztódás és a csökkent hibajavító képesség, így egy duplaszálú DNS-törés ritkábban azonnali sejthalált vagy gyakrabban mitotikus katasztrófát eredményezhet. Szimpla szálú DNS-törés esetében a sejt tovább osztódhat, de a genetikai hibák hamar felgyülemlenek a gyorsan osztódó daganatsejtekben, ezért rövid időn belül ez is sejthalált vagy lassú osztódási sebességet eredményezhet. Az egészséges szöveti sejtek sokkal jobban differenciáltak, mint a ráksejtek, ezért bár lassabban osztódnak, a fejlettebb hibajavító mechanizmusuk segítségével eredményesebben képesek felépülni a káros sugárhatásokból.

Két fő sugárzásfajtát különböztetünk meg, a töltött részecske (ion, proton és elektron) sugárzást és a fotonsugárzást, amik a DNS-t különböző módon károsítják (1). A töltött részecskék relatív nagy tömegűek, a szövetben kevésbé szóródnak, és közvetlenül képesek duplaszálú DNS-törést létrehozni. Ez a jelenség a direkt DNS-károsítás. A fotonsugárzás, amit fizikai tulajdonságai miatt sokkal elterjedtebben alkalmaznak a tumorok kezelésére, a sejtekben található vízből reaktív szabadgyököket, főképp reaktív oxigéngyököket (ROS) hoz létre, amik megtámadják

és eltörik a DNS-t. Mivel ehhez szükségesek a reaktív szabadgyökök, ezt indirekt DNS-károsításnak hívják. Az 1. ábrán megfigyelhető a direkt és indirekt DNS roncsolás folyamata. Ebből a mechanizmusból következik, hogy mivel a daganat gyakran túlnőheti a vérellátását, így oxigénhiányos –hipoxiás– környezet alakul ki. Az oxigén hiánya miatt pedig kevés ROS keletkezik, ezért az indirekt DNS-károsítás csökken. Mivel oxigénhiányos állapotban sokkal kisebb lesz a DNS-károsodás, ezért a ROS rendszer kutatása igen fontos lehet (2).



1. ábra: A direkt és indirekt DNS-károsítás hatása. A direkt DNS-károsítás képes a közvetlen DNS-törés létrehozására, míg az indirekt DNS-károsítás a vízből képzett ionok és szabadgyökök segítségével károsítja a DNS-t. Az ábra Wang H., et al, 2019 cikkből lett átemelve.

1.2. ROS és sugárrezisztencia

A ROS egy, a sejtben alapesetben is megtalálható, agresszív oxigénszármazékok gyűjtőneve. Két fő csoportja van, a szabadgyökök, amiknek vannak párosítatlan vegyértékelektronjai – például szuperoxid anion (O_2^-) és hidroxilgyök (HO^-)–, és olyan molekulák, amelyek szabadgyök képzésre képesek, például hidrogén peroxid (H_2O_2).

A ROS egészséges sejtben az oxigén metabolizmusa során keletkezett melléktermék, illetve a terminális oxidáció során a mitokondrium termeli, és szintjétől függően kettős szerepet lát el. A ROS alacsony, állandó szinten megtalálható normál sejtekben, ahol homeosztázis-fenntartó

és másodlagos jelátviteli funkciót tölt be, továbbá elősegíti a sejtosztódást és differenciálódást, emellett az oxidatív stresszhez való alkalmazkodást. Ezzel ellentétben magas szintje indukálhat autofágiát vagy visszafordíthatatlan oxidatív stresszt, és ezáltal fehérje-, lipid- és nukleinsavkárosodást okozhat. Mivel a magas ROS-szint oxidatív károkat okoz a DNS-ben – ezzel elősegítve a mutációt–, aktiválhat onkogéneket, genomikus instabilitást okozhat, amivel közvetlenül indukálhat karcinogenezist. Magas ROS-szintek a ROS-keletkezés növekedésével vagy a ROS-eltávolítás csökkenésével is kialakulhatnak. A ROS-keletkezés lehet endogén vagy exogén, például stresszfaktorokra adott válaszreakció vagy ionizáló sugárzás. A ROS eltávolításáért pedig az antioxidáns védekező rendszer felel, így ennek hibája is ROS-szint emelkedést okozhat.

Daganatsejtekre is igaz, hogy alacsony szinten a ROS sejtszaporodást okoz, hiszen vannak olyan növekedési faktor receptorok és sejtnövekedést szabályzó szignalizációs útvonalak, amelyeket reaktív oxigéngyökök aktiválnak. A nagyon magas ROS-szint a daganatsejtekben is sejthalált vagy oxidatív stresszt eredményez, de egy közepesen magas szint a fent említett módon segíti az onkogenezist. Mivel a daganatsejtekre a gyors osztódásuk miatt jellemző a gyors metabolizmus és a ROS egy metabolikus melléktermék, a ráksejtek általában magasabb ROS-stressznek vannak kitéve.

Mivel a sugárzás DNS-károsító hatásának nagyjából kétharmadát okozza ROS, a sejtek ROS-eltávolító képessége nagyban meghatározza egy tumor sugárérzékenységét. A daganatsejtek a ROS-szint kiegyensúlyozását többféle módon érhetik el: metabolikus adaptációval, antioxidánsrendszer enzimexpresszióinak és -aktivitásainak diszregulációjával és hipoxiás válaszreakcióval (3).

1.3. Sugárérzékenység kutatása

A tumor sugárérzékenységének nevezzük a besugárzásra adott válaszreakcióját, amit a regresszió mértékével és gyorsaságával, valamint az esetleges kiújulásig eltelt időtartammal lehet számszerűsíteni. A sugárérzékenységet in vivo genetikailag módosított egereken, ex vivo biopsziával nyert szövetmintákon, in vitro pedig az egérmodellekhez hasonlóan genetikailag módosított sejtvonalakon lehet modellezni.

Az in vivo modelleknél előnyt és hátrányt is jelent, hogy a daganat tulajdonságait egy összetett rendszerben vizsgálják. Előnyeik, hogy komplex multicelluláris és élettani választ lehet rajtuk megfigyelni, így a sugárérzékenyítő szereknek nem csak a hatékonyságát, hanem a toxicitását is lehet vizsgálni. Hátrányaik, hogy az élő rendszer befolyásolhatja a daganat viselkedését, így például az immunrendszer hatása nem elkülöníthető a sugárérzékenységből adódó hatásoktól, emellett a daganatot ért pontos dózis nehezebben meghatározható. A genetikailag módosított állatokban jól modellezhetők az emberi betegségek, de az emberre adaptálhatóság így sem problémamentes: a sugárérzékenyítő szerek felszívódása, eloszlása, metabolizmusa és ürülése emberben és különböző modelleken nagyban eltérhet.

Az ex vivo modellek (ebben az esetben tumor biopsziás mintavétel) előnye, hogy összetett multicelluláris választ képesek adni, továbbá jól meghatározható a daganatot ért pontos dózis, a módszer anyaghatékony és jobban modellezi az in vivo körülményeket. Hátránya, hogy általában egyszer történik mintavétel, így a tumor viselkedését idő és kezelés függvényében nem lehet feltérképezni, továbbá nagy a munkaigénye. A biopszia előnye, hogy a másik két módszerhez képest relatív gyorsan lehet szövetmintához jutni, de hátránya, hogy egy jobban differenciált, heterogén daganatból vett minta nem reprezentatív jellegű az egész tumorra tekintve. Emellett az eredményeket itt is befolyásolhatja a betegek különbözősége, ebből fakadóan problémás lehet a mintákat egymással összehasonlítani.

Az in vitro modellek mindkét előbb említett modellnél kisebb komplexitásúak. Ez hátrányt és előnyt is jelent, hiszen például élettani hatásokat nem lehet rajtuk vizsgálni, de éppen amiatt, hogy a szervezet szerv- és immunrendszere nincs rá kihatással, a sejtekben történő változások tükrözik a besugárzás hatását. A sejteket ért pontos dózis könnyen meghatározható, a módszer költség- és anyaghatékonyabb mind az in, mind az ex vivo modellrendszereknél, viszont az emberre adaptálhatóság kevésbé egyértelmű. Két fő sugárrezisztens sejtvonal létrehozási módszer létezik. Az egyik során a sejtet vagy az átírt antioxidánsfehérjéinek expresszióját célzottan genetikailag módosítjuk. A géntechnológiával előállított sejtvonal előnye, hogy tudjuk a génhiba pontos helyét. Ennek többféle technikája létezik: KO, knock-in valamint a knockdown. A knockout során a vizsgált organizmusokban egy gént kiütünk – ez lényegében célzott deléció–, és ezután a KO-egyedek fenotípusos változását vizsgálhatjuk, ezzel szemben a knock-in esetében a vizsgált organizmus genetikai állományába egy kisebb génszekvenciát illesztünk – ez lényegében célzott inzerció–. Knockdown egyedek esetében egy vagy több gént csendesítünk, azaz azok expressziójának mértékét csökkentjük, ezt rövid interferáló RNS-sel (siRNS) végezzük, ami egy rövid duplaszálú RNS. A másik módszer a sejtvonal indukált

mutációja, ami úgy készül, hogy a sejteket besugarazzák, majd a túlélő sejteket hagyják szaporodni a következő besugárzásig (kb. 30 ciklus). Munkánk során mi is ezt a módszert alkalmaztuk. Ennek előnye, hogy sokkal jobban visszaadja a természetes módon kialakuló sugárrezisztencia tulajdonságait, viszont hátránya, hogy ezzel a módszerrel egy véletlenszerű mutáns sejtvonalat hoznak létre, ami akár minden ugyanolyan módon végzett és ugyanolyan kiindulási törzsből előállított rezisztens sejtvonal létrehozásánál különböző eredménnyel járhat.

1.4. A ROS-t ellensúlyozó antioxidánsrendszerek és fehérjék

Mivel a ROS eltávolításáért és alacsony szinten tartásáért az antioxidáns enzimrendszerek és ezek fehérjéi felelnek, ezek gátlása ROS-szint emelkedést és ezzel sejthalált okozhat ráksejtekben (4). Ezért különösen fontos ezen rendszerek útvonalainak és fehérjéinek megismerése a hipoxiás válaszreakció ellenében is ható terápiás szerek kifejlesztéséhez (5).

A szuperoxid dizmutázok (SOD) a O_2^- saját magával történő reakcióját katalizálják, ami O_2^--ból H_2O_2-t és O_2-t eredményez. A O_2^- nem erős oxidálószer, de közvetetten nagyobb károsodást és toxicitást tud okozni, mint a H_2O_2. Kompartmentalizációjuk alapján emlősökben három SOD-típus van: a sejtplazmában SOD1, a mitokondriális mátrixban SOD2 és az extracelluláris térben SOD3. K562 (eritroid leukémia) sejtvonalban a SOD-dal inkubált tenyészet hamarabb felépült besugárzás után valamint már a sugárzás utáni első órában szignifikánsan emelkedett a kataláz, glutation-peroxidáz és SOD koncentrációja, ezzel védve az azonnali káros sugárhatás ellen (6). *Sod1* KO egérben komoly oxidatív károsodásokat és rövid élettartamot figyeltek meg, a *Sod2* KO pedig letális. *Sod3* KO egérben a tüdő és véredények károsodása volt megfigyelhető magasabb oxigénnyomás alatt (7). Továbbá emberi emlőadenokarcinóma sejtvonalakban vizsgálva megfigyelték, hogy a SOD2 steady-state szintje magasabb sugárrezisztens sejtekben, mint a sugárérzékeny vonalakban (8). Emellett nyelőcsőrákos betegekből vett mintákban a SOD2 a kemorezisztanciát is befolyásolta, és a SOD2 siRNS transzfekciójával ciszplatin-érzékenység volt megfigyelhető (9).

A glutation (GSH) az egyik legfontosabb antioxidánsfehérje; két fő formája van: a redukált forma (GSH) és az oxidált forma (GSSG). Ezeknek a homeosztázisa azért fontos, mert a redukált forma magas szinten sejtszaporodást, kemo- és sugárrezisztenciát okoz, ezzel ellentétben az alacsony GSH-szintű rák sejtvonalak sokkal érzékenyebbek voltak besugárzásra

(10). Ezt az egyensúlyt többek között a glutation-reduktáz (GSR), a glutation szintetáz (GSS) és a glutation-S-transzferázok (GSTk) tartják fent (11). Ennek megfelelően egy GSS génkészlet-dúsított E. coli törzsben nagyobb rezisztencia volt megfigyelhető a letális sugárhatásokkal szemben, mint a vad törzsben (12). Továbbá melanómás egérmodellekben a GSR gátlása gyengébb metasztatikus, migrációs és inváziós tulajdonságokat eredményezett (13).

2. Célkitűzések

Kutatásunk célja különböző antioxidánsfehérjék mérése és összehasonlítása vad (WT) és sugárrezisztens (60Gy) sejtvonalban, e dolgozat keretein belül a GSH és SOD fehérjék vizsgálatára kerül sor. Célunk volt továbbá a sejtek besugárzás utáni sejtciklus-fázisbeli elhelyezkedésének vizsgálata flow citométerrel (FACS).

A glutation vizsgálata során a teljes GSH szintet fogjuk összehasonlítani a besugárzás utáni 1., 2., 4., 6. és 8. órában, célunk, hogy vizsgáljuk, észlelhető-e különbség a WT és 60Gy sejtvonal GSH-szintje között.

A SOD vizsgálata során célunk a O2- ROS szintek összehasonlítása vad és sugárrezisztens sejtvonalban a besugárzástól eltelt idő függvényében, valamint annak meghatározása, hogy a SOD fehérjék játszanak-e szerepet a sugárrezisztencia kialakulásában.

A FACS analízis során célunk, hogy meghatározzuk a WT és 60Gy vonalban besugárzás után a sejtek a sejtciklus-stádiumának százalékos arányát, és ez alapján következtetéseket vonhassunk le a sejtvonalak oxidatív stressz alatt megfigyelhető sejtciklus ellenőrző pont aktivitásáról és DNS hibajavító képességeiről.

3. Anyagok és módszerek

3.1. Sejtvonal és tenyésztési körülmények

A kísérletekhez emberi emlőkarcinóma (HCC1954) sejtvonalat és sugárrezisztens alvonalát használtunk, amit komplettált RPMI-1640 Medium (Gibco) tenyésztőmédiumban növesztettünk. A komplettálás során a végtérfogat 10%-ával megegyező mennyiségű szarvasmarha magzati vérszérumot (FBS, Gibco), majd 1% 10000 egység/mL penicillin és 10000 µg/mL sztreptomicin keverékét (PenStrep, Gibco) és ugyanennyi 200 mM-os L-Glutamint (L-Glu) adtunk a tápoldathoz. A sejteket Thermo Fisher Scientific Nunclon flaskákban növesztettük, amiket 37 °C-os, 95% párásított levegő és 5% CO_2 tartalommal rendelkező termosztátban tároltunk.

Mivel ennek a sejtvonalnak a kétszereződési ideje ~45 óra, 2-3 naponta passzálni kellett őket, hogy a sejtkultúra növekedése ne lépjen stacioner fázisba. A passzálás során a sejteken lévő komplettált tápot leszívjuk, majd átmossuk vele a flaskát, hogy a halott sejteket eltávolítsuk. Ez után még egy mosási lépés következik, ahol foszfáttal pufferolt sóoldattal (PBS) mossuk át a flaskát háromszor, majd a sejteket tripszines emésztés segítségével visszük szuszpenzióba. A tripszines emésztés után tápban szuszpendáljuk a sejteket, majd lecentrifugáljuk és a felülúszó leszívása és a sejtek tápban való szuszpendálása után új flaskába tesszük ki őket és kiegészítjük komplettált táppal.

3.2. Sugárrezisztens emlőkarcinóma vonal létrehozása

A fent említett sugárrezisztens emlőkarcinóma vonalat (60Gy) a kutatócsoportunk már korábban létrehozta a vad típusú szülői vonalból. A tenyészetre összesen 60 Gy sugárzást adtak le, 2 Gy frakciódózissal. A sugárzás alatt a sejtek PBS-sel feltöltött flaskában 60%-os konfluenciaszinten voltak, a frakciódózist 6 MV gyorsítóenergia és 500 monitorunit/perc (a dózisteljesítmény beállítható mértékegysége, kb. 5Gy/perc) beállítás mellett adták le. Ezután a sejteken tápcsere történt, majd miután 90%-os konfluenciaszintre növekedett, a sejteket

passzálták és új flaskákba helyezték, majd miután elérték a 60%-os konfluenciaszintet, megint besugarazták. Ezt a folyamatot 30-szor ismételték meg.

3.3. Glutation kit

A mérésekhez BioVision Glutathione Fluorometric Assay Kit-et használtunk.

A mérés előtt a kontrollok kivételével a sejteket ($7.5*10^6$ db/ 75 cm^2 flaska) a fent leírt beállítások mellett PBS-el feltöltve 2 Gy-vel besugarazzuk. Besugárzás után a tápot, amiben nőtt a sejtvonal visszatesszük a maradék tenyésztési időtartamra, hogy ne a tápcsere határozza meg a végbemenő folyamatokat. A mintavétel időpontjában (1, 2, 4, 6, 8 óra) sejttenyésztő flaskából eltávolítjuk a tápoldatot, majd 7 mL PBS-sel mossuk. Ezután eltávolítjuk az összes folyadékot, majd 300 µL PBS-t pipettázunk bele és sejtkaparóval lekaparjuk a sejteket, majd Eppendorf csőben azonnal jégre tesszük. A sejteket Countess 3 (Invitrogen Countess 3 FL Automated Cell Counter) sejtszámolóval számoljuk meg, majd $3*10^6$ db sejtet kimérünk és 5 percig 4 °C-on 1000 forgás per percen (RPM) lecentrifugáljuk. A felülúszót leszívjuk, majd a pelletre 100 µL assay puffert mérünk, majd szuszpendáljuk. Ezután Bransen 250 Sonifier szonikátorral szonikáljuk az oldatot, amiből majd 60 µL-t mérünk egy 20 µL perklórsavat (PCA) tartalmazó Eppendorfba, amit ezután 2 percig 4 °C-on 13000 RPM-en centrifugálunk. A felülúszót leszívjuk, feliratozott Eppendorfba tesszük és -80 °C-on tároljuk.

A fluorimetriás méréshez a mintákból 10 µL-t egy fekete 96-lyukú plate-be oltunk, ezután assay pufferrel kiegészítjük 90 µL-re, majd 10 µL o-ftálaldehid (OPA) probe oldatot mérünk rá és 60 percig inkubáljuk szobahőn. Egy fluoreszcens plate olvasóval Ex/Em=340/420-as beállítással lemérjük a fluoreszcencia értékeket.

3.4. Superoxid-dizmutáz kit

A mérésekhez Enzo ROS-ID® Superoxide Detection Kit-et használtunk.

A sejteket passzáljuk, majd a sejtek számát a szuszpenzióba vitelük után meghatározzuk. A sejteket Countess 3 (Invitrogen Countess 3 FL Automated Cell Counter) sejtszámolóval számoljuk meg, majd a vad típusból (WT) 6650 db/well, a 60Gy alvonalból pedig 6832 darabot/well mérünk ki három fekete és egy fehér 96-lyukú plate-re a mérés előtti napon és 100 µL tápot mérünk rá. A mérés napján ~70%-os konfluenciaszinten kell mindkét vonalnak lennie (ezt SRB assay-vel ellenőrizzük a fehér plate-en), ezután a fent leírt beállítások mellett a kontrollok kivételével a plate-eket PBS-el feltöltve 2 Gy-vel besugarazzuk, majd visszapipettázzuk a tápoldatot. A mérési időpontokban 1 µL szuperoxid detektáló oldatot mérünk a sejtekre. A sejteket ezután 60 percig 37 °C-on, sötétben inkubáljuk. A negatív kontroll mintákra a festék előtt 30 perccel ROS gátlót (1.2 µL), a pozitív kontroll mintákra a mérés előtt 20 perccel ROS indukáló szert mérünk (1.0 µL). Egy fluoreszcens plate olvasóval Ex/Em=535/610-es beállítással lemérjük a plate-eket.

3.5. Flow citométeres sejtciklus fázis meghatározás (FACS)

A mérés előtt a kontrollok kivételével a mintákat a fent leírt beállítások mellett 2 Gy-vel besugarazzuk. A sejttenyésztő flaskából eltávolítjuk a tápoldatot, majd 3 mL PBS-sel mossuk. A sejteket tripszines emésztés segítségével visszük szuszpenzióba, sejttenyésztő flaskánként 1,5 mL tripszint használunk és 6 percig hagyjuk állni. Ezután 3 mL tápot mérünk rá, szuszpendáljuk, majd 1000 RPM-en 5 percig centrifugáljuk. A felülúszó eltávolítása után 3 mL PBS-ben vesszük fel a sejteket, majd 1000 RPM-en ismét 5 percig centrifugáljuk. Ezután a felülúszót megint eltávolítjuk, majd a mintákra 3 mL 75%-os etanolt mérünk és -20 °C-on tároljuk.

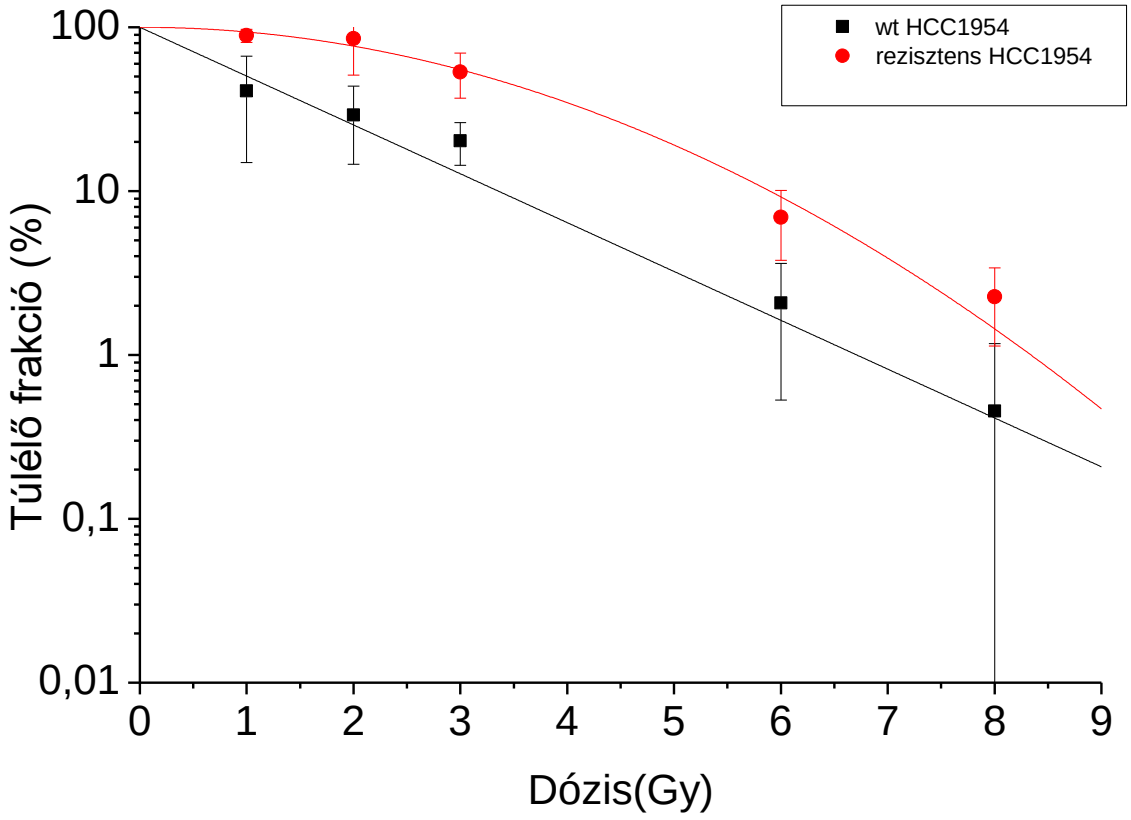
A méréshez a mintákat lecentrifugáljuk 1500 RPM-en 5 percig, majd 1 mL festéket mérünk rájuk. A festéket mintánként 1 mL PBS-ből, 40 µL propídium-jodidból (PI) és 1 µL RNáz A-ból (Qiagen) keverjük ki. A mintákat szűrős kupakos FACS csövön szűrjük át, majd flow citométeren mintánként 10000 eseménnyel lemérjük.

4. Eredmények

4.1. Korábbi eredmények: klonogenitási assay és SRB

4.1.1. Klonogenitási assay

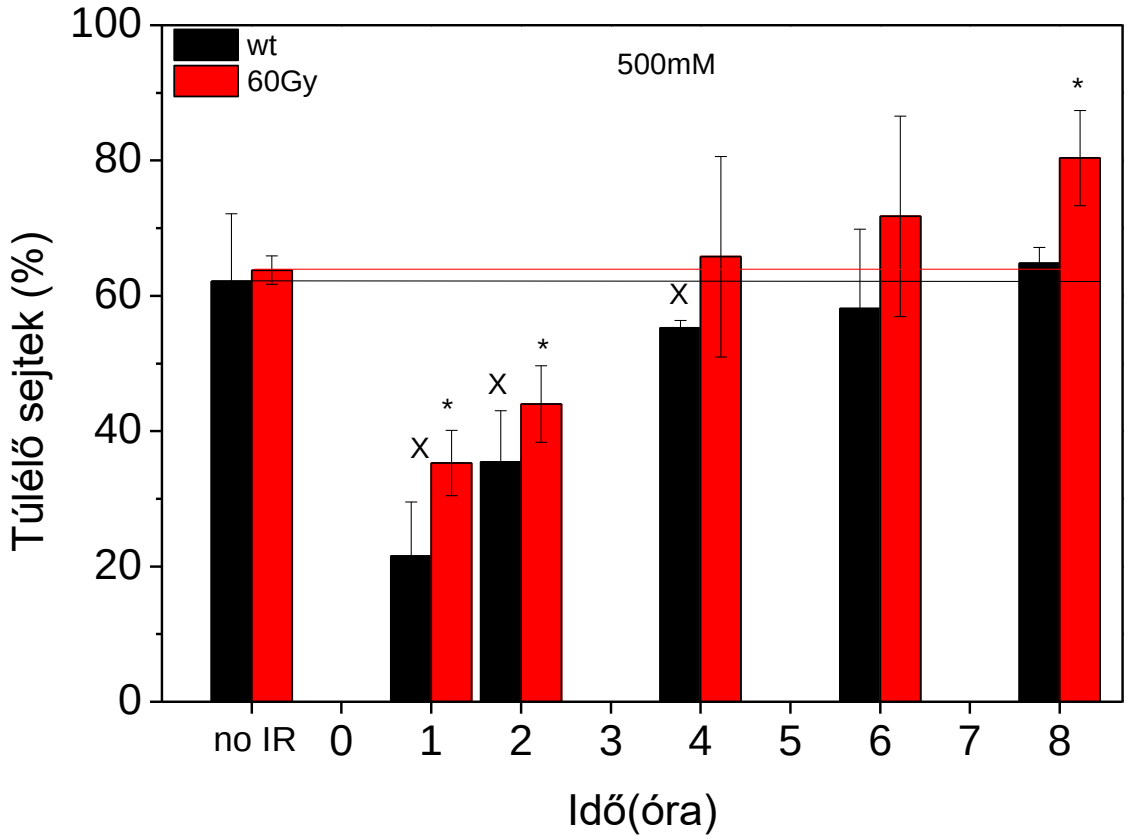
A kutatócsoportunk egy sugárrezisztens emlőkarcinóma alvonal létrehozását kísérelte meg ismételt besugárzással és a túlélő sejtek tenyésztésével. Ezen az alvonalon klonogenitási assay-vel bebizonyították, hogy az alvonal a sugárzás indukálta mutáció hatására valóban sugárrezisztens lett (2. ábra). A medián effektív dózis (ED_{50}) a két vonalban jelentősen eltért: a WT vonalban 1,6 Gy sugárzás elég volt a sejtek felének elpusztulásához, a 60Gy vonalban azonban ugyanehhez a hatáshoz 3,7 Gy volt szükséges. Az továbbá megfigyeltük, hogy 1 Gy sugárzás hatására a WT sejtek 59,23%-a elpusztult, míg a 60Gy esetében csupán a 11,08%-a, tehát szignifikánsan kevesebb sejt halálát okozta ugyanaz a dózis.



2. ábra: A klonogenitási assay eredményei. Az ábrán megfigyelhető, hogy a 60Gy vonalban nagyobb mértékben található életképes sejt, mint a WT vonalban. Az x tengelyen a leadott sugárdózis látható Gy-ben, az y tengelyen pedig az összes sejt túlélő frakciója százalékban mérve. A vörös szín a 60Gy, a fekete pedig a WT sejtvonalat jelöli.

4.1.2 Szulforodamin B kolorimetriás assay

Következő lépésként szulforodamin B (SRB) kolorimetriás assay használatával az oxidatív stresszre adott választ vizsgálták, mely során besugárzás után 500 mM H_2O_2 hozzáadásával értek el oxidációs stresszt. A mérés során megállapították, hogy a 60Gy sejtvonal a sugárzástól eltelt 4. órában már ugyanolyan oxidációs stressztűrő-képességgel rendelkezik, mint besugárzás nélküli (no IR) kontroll, ezzel ellentétben a WT sejtvonalnak az oxidációs stressztűrő-képesség helyreállításához ennél több időre, 6-8 órára van szüksége (3. ábra).



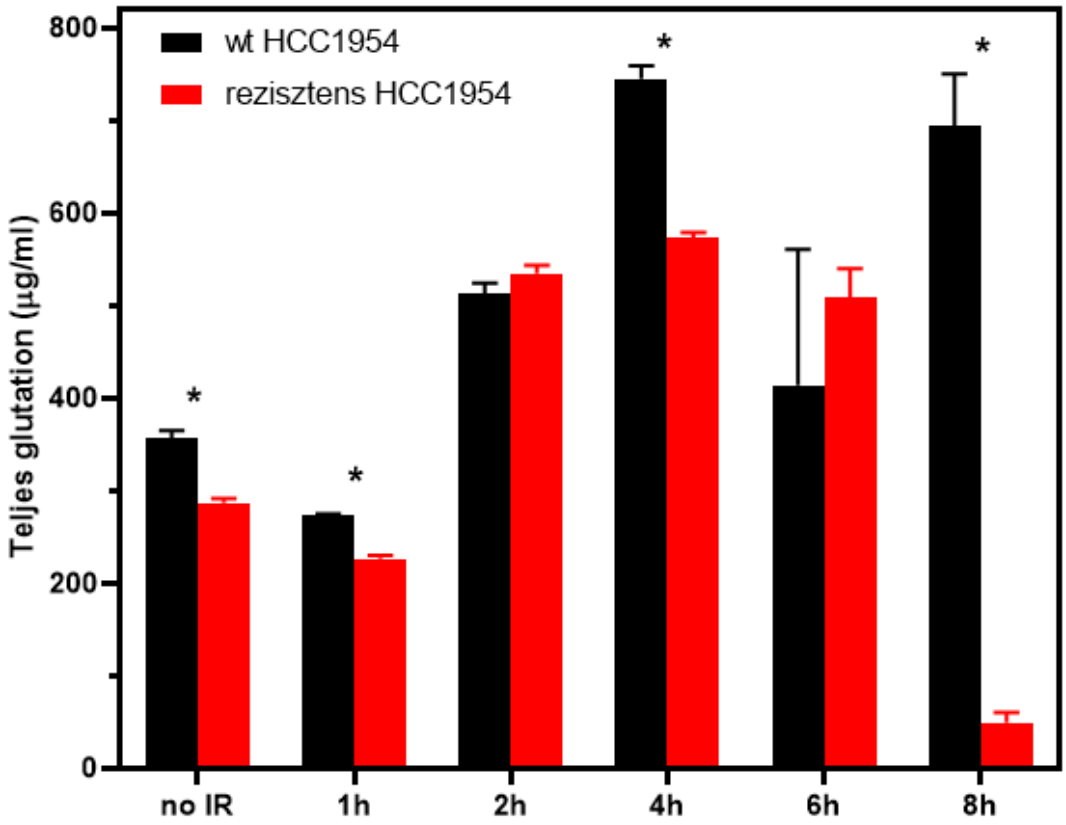
3. ábra: A SRB assay eredménye (az error bar-ok a SD-t jelölik, az X-ek a WT esetén a szignifikáns különbséget jelölik a besugarazatlan kontrollhoz képest, a csillagok ugyanezt a 60GY vonal esetében). Eredményeink alapján elmondható, hogy a 60Gy vonalnak a sugárzástól eltelt 4. órában már nem figyelhető meg szignifikáns különbség a túlélésben (oxidációs stressz tűrésben) a be nem sugarazott kontrollhoz képest, míg a WT vonalban a különbség később, a 6.-8. órában szűnik meg.

4.2. Glutation assay

A glutation mérésnél a sejtek teljes glutation mennyiségét (redukált és oxidált forma is, µg/ml) vizsgáltuk sugárhatás után mindkét vonalban. Kontrollnak mindkét vonalból a sugárzást nem kapott mintákat használtuk. Ezt a mérést egyszer végeztük el, ezért további mérések szükségesek ebben a témában a pontos kép felmérése érdekében.

A mérési eredmények mutatják, hogy a besugárzás utáni 1. órában szignifikánsan alacsonyabb a teljes GSH szint mindkét vonalban, majd ezt követően kezd el nőni. A besugárzás után a 4. és a 8. órában mutatkozik szignifikáns különbség a 60Gy és a WT vonal GSH szintje között (4. ábra).

A 60Gy vonalban általánosan alacsonyabb a GSH szintje. Ebben a vonalban a besugárzás utáni 1. órában szignifikánsan alacsonyabb volt a teljes GSH szintje, de a 2. órától fogva jelentősen megnőtt és nagyjából konstans szintet mutatott a 8. óráig. A 4. órában észleltük a legjelentősebb különbséget a WT és a 60 GY GSH szintje között (úgy gondoljuk, hogy a 8 óránál mért 60GY-es érték mérési hiba). A WT vonal GSH-szintje szintén a fent említett tendenciát mutatja, de a sugárzás után eltelt 2. óra után a GSH szintje ingadozik, továbbá a WT vonalra általánosan jellemző a magasabb GSH-szint.

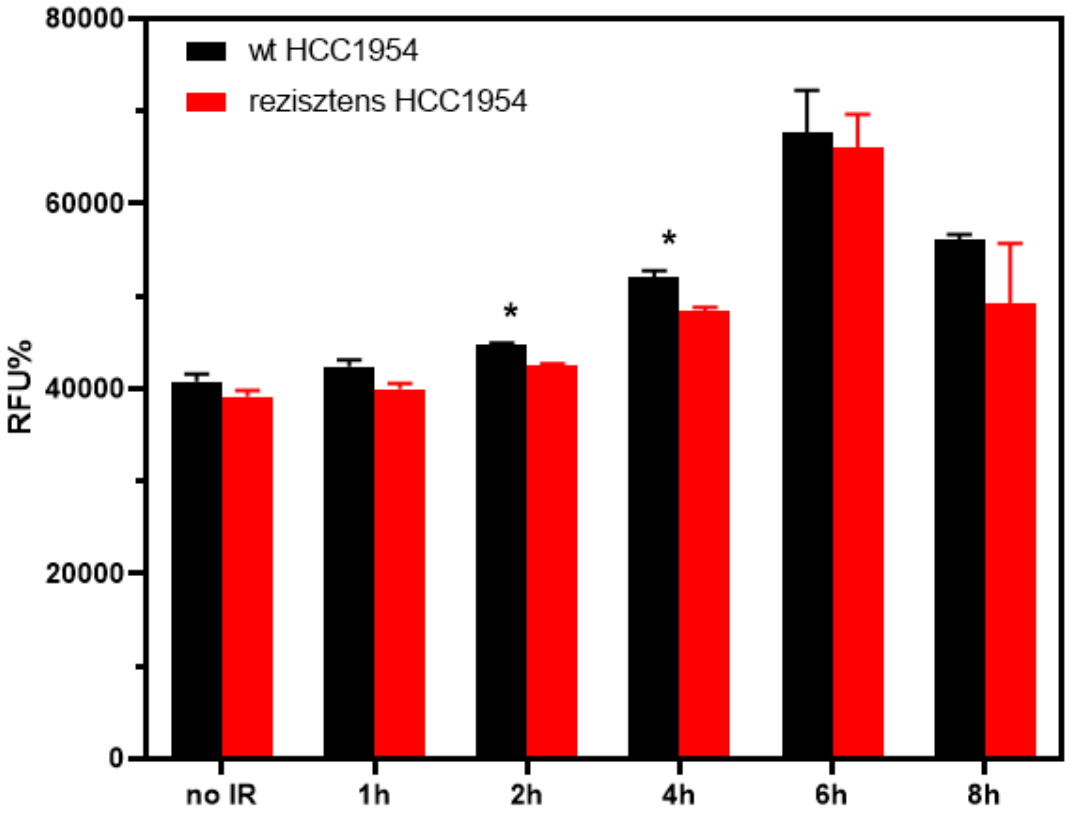


4. ábra: A GSH szintjének változása no IR kontroll és sugárzás utáni eltelt idő függvényében WT és 60GY sejtvonalak estében (az error bar-ok a SD-t jelölik). A sugárzás után eltelt 1. órában jelentősen csökkent a teljes GSH szint, majd ezt követően mindkét vonal GSH szintje nőni kezdett. A sugárzás utáni 4. órában észleltük a legnagyobb mértékű különbséget a WT és a 60Gy vonalak között.

4.3. Szuperoxid-dizmutáz assay

A mérés során a O_2^- ROS mennyiségét vizsgáltuk sugárzás után mindkét sejtvonalban.

A O_2^- ROS mennyisége sugárzás hatására megemelkedett majd a SOD rendszer fehérjéinek hatása miatt csökkeni kezdett. Azonban a besugárzást követő nyolc óránál még nem tapasztaltuk a besugarazatlan sejtek szintjére való visszatérést. A vad törzsben nagyobb O_2^- mennyiséget figyeltünk meg az egész mérés alatt, mint a rezisztens törzsben, ez a különbség a sugárzás után eltelt 2. és 4. órában szignifikáns (5. ábra). Ennek oka valószínűsíthetően az hogy a sugárrezisztens sejtvonalban hatékonyabbak a ROS-eltávolító mechanizmusok, és ezzel hozzájárulnak a sugárrezisztencia kialakulásához.



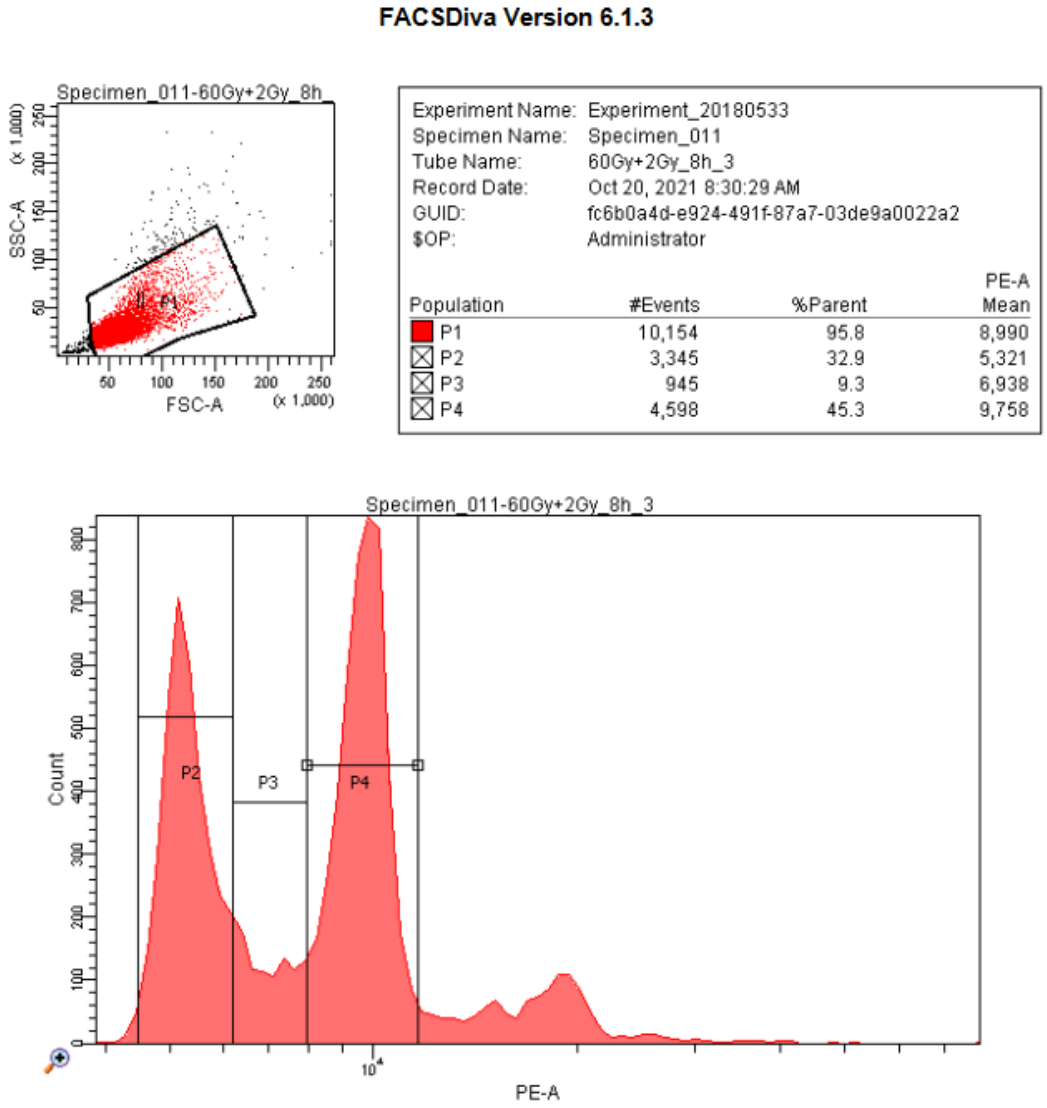
5. ábra: A relatív fluoreszcens egység (RFU) változása no IR kontroll és sugárzás utáni eltelt idő függvényében WT és 60GY sejtvonalak estében (az error bar-ok a SD-t jelölik). A szuperoxid species mennyiségét reprezentáló relatív fluoreszcencia a besugárzás után nő, majd a SOD enzimaktivitásnak köszönhetően csökkenésbe kezd.

4.4 Flow citométeres sejtciklus fázis meghatározás

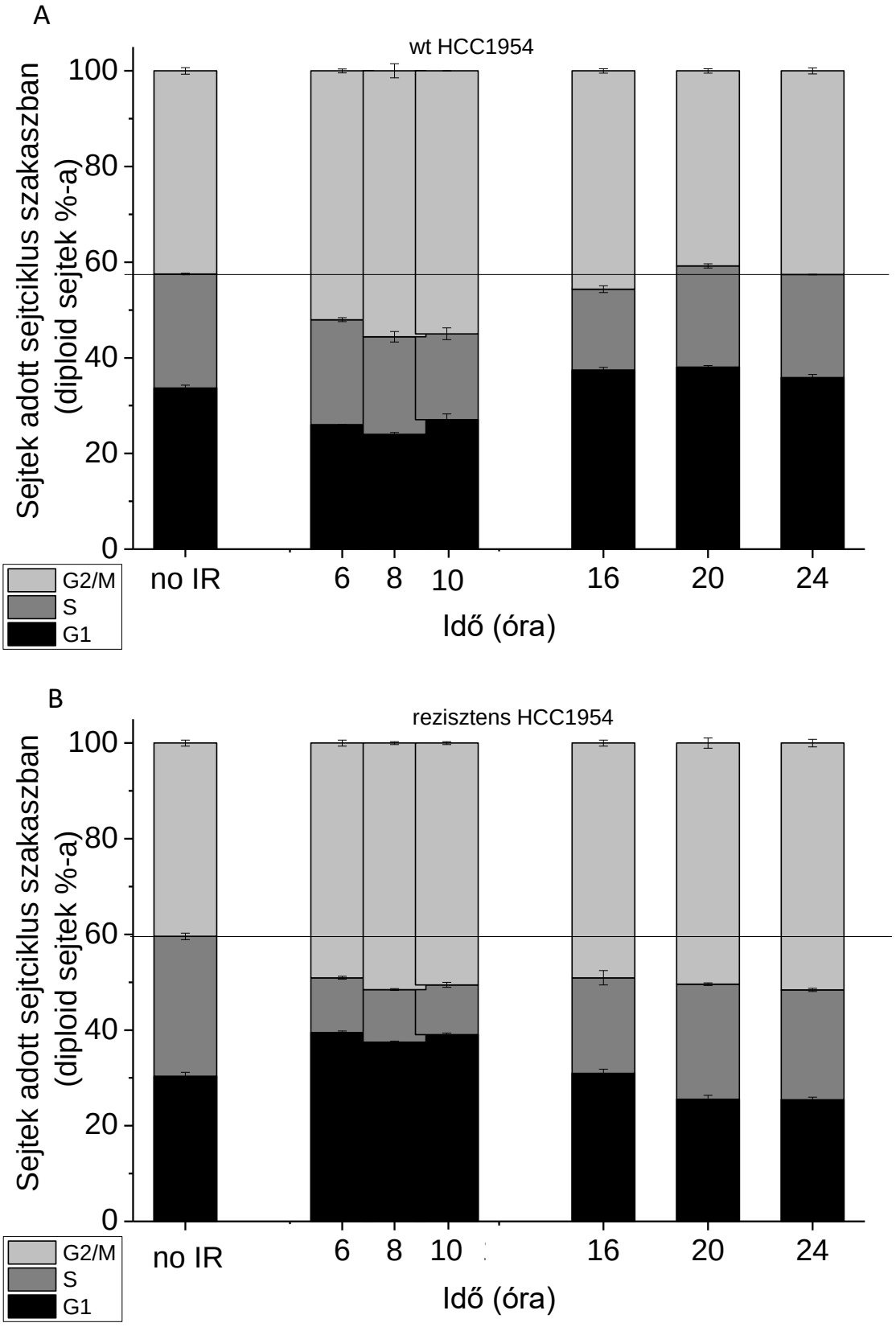
A FACS mérés során a WT és 60Gy vonalakban vizsgáltuk, hogy besugárzás után a sejtek a sejtciklus mely stádiumában helyezkednek el. Az eredményeket a diploid plusz tetraploid sejtek százalékaként is megadtuk (relatív %), mert ez a sejtvonal nagy százalékban poliploidizálódik. A méréseket egy passzálásból származó, de külön sejttenyésztő flaskákban tenyésztett sejtkultúrákon, 3-3 párhuzamos mérésben végeztük el.

A sejtciklus 4 fő fázisból áll: G1, S, G2 és M. G1 során a sejt növekedik, DNS mennyiségét tekintve diploid. S-fázisban DNS-szintézis folyik, tehát a DNS mennyisége növekszik. G2-fázisban a sejt már tetraploid, a mitózisra készülve kijavítja a DNS-hibákat és az M-fázis során történik meg a sejtosztódás.

A besugarazatlan (no IR) kontrollban megfigyeltük, hogy a 60Gy vonalban kevesebb sejt található ciklusának G1 fázisában, (átlag: 25,03%, relatív átlag: 30,35%), mint a WT vonalban (átlag: 28,77%, relatív átlag: 33,70%), ami Welch-próbával szignifikáns eltérést mutatott (p=0,05, t=-3,2591). Megfigyeltük továbbá, hogy a 60Gy vonalban az S fázisban lévő sejtek mennyisége a sugárzás óta eltelt 6. és 10. óra között jelentősen lecsökkent (6. ábra). Szintén ebben a vonalban a sejtek G2-es fázisból jóval lassabban lépnek ki, mint a WT vonal sejtjei (7. ábra).



6. ábra: A FACS mérés menete egy reprezentatív mintán a sejtciklus különböző fázisaiban lévő sejtek százalékos arányával. Az ábrán a P2 a G1, a P3 az S és a P4 a G2/M-es sejtfázist jelölik. Az ábrán egy 60Gy minta mérési eredménye látható, amin megfigyelhető az S fázisban lévő sejtek jelentősen alacsony szintje.



7. ábra: A sejtek mennyisége sejtciklusuk különböző szakaszaiban százalékosan megadva, idő függvényében ábrázolva (az error bar-ok a SD-t jelölik). A WT (A) vonalra jellemző volt, hogy több sejt található G1-es fázisban és hamarabb kilép a G2 fázisból, míg a 60Gy (B) vonalban megfigyeltük, hogy az S fázisban a sugárhatás utáni 6-10. órában csökkent a sejtek száma, valamint lassabban lép ki a G2 fázisból.

5. Diszkusszió

Az SRB assay eredményeit tekintve, a legnagyobb különbség a 60Gy és WT vonalak között a besugárzástól számított 4. óránál mérhető. Ez azt jelenti, hogy az oxidációs stressz elhárítása a sugárrezisztens sejtvonalban még ez előtt az időpont előtt történik meg. Tudomásunk szerint ezt az eredményt mi írtuk le először, így nincs irodalmi adat, amihez eredményeinket hasonlítani tudnánk.

A GSH assay során az SRB-hez hasonlóan szintén a besugárzás utáni 4. órában észleltük a legnagyobb különbséget a két vonal között. Megfigyeltük, hogy a GSH szint besugárzás után nő, ami korrelál az irodalmi adatokkal (14). Méréseink során a WT vonalban magasabb GSH szint mutatkozott, mint a 60Gy alvonalban, aminek több indoka is lehet. Első sorban a ráksejtek összetett antioxidánsrendszerei közül a GSH csak az egyik, ami azt jelenti, hogy ennek a vonalnak a sugárrezisztenciájáért nem biztos, hogy ez az útvonal felelős. Emellett megfigyelték, hogy alacsony GSH szintű vonalakban az eritroid 2-vel kapcsolatos nukleáris faktor (Nrf2) upregulálja a befolyása alatt álló antioxidáns géneket (10), ez a helyzet ebben a vonalban is fennállhat. Egy másik lehetséges magyarázat az, hogy a kiindulási fehérjemennyiség nem az egyetlen sugárrezisztenciát befolyásoló tényező a GSH rendszerben, hanem lehetséges a rezisztens sejtben a sugárhatás után egy gyorsabb válaszreakció, például a GSH rendszer működésének gyorsabb volta (pl. oxidált formák gyorsabb visszaalakulása itt vagy kapcsolódó rendszerekben). Lehetséges sugárrezisztencia mechanizmus a DNS károsodás tűrése is. Ebben az irányban csoportunk további vizsgálatokat tervez.

A SOD mérés során az eredményeink részben ütköztek az irodalmi adatokkal. A SOD koncentráció a sugárzás után eltelt 2. órában ugrott csak meg, míg az egyetlen irodalomban található adat szerint ez már az 1. órában megtörténik (6), de ez a különbség lehet a különböző sejtvonalak vizsgálatának eredménye. Szintén megfigyeltük, hogy a 60Gy vonalban kevesebb a O_2^- ROS mennyisége, ami magasabb SOD aktivitásra utal, ez egybecseng az irodalmi adatokkal (8).

A FACS mérés során megfigyeltük, hogy a 60Gy vonalban kevesebb G1 fázisban található sejt található. Ez azt jelentheti, hogy a sugárrezisztencia és az agresszív terjedés egymással kapcsolatban van, ezt irodalmi adatok is alátámasztják (15). Emellett megfigyeltük, hogy a G2-es megtorpanás a 60Gy sejtvonalban hosszabb ideig tart. Ezt okozhatja az, hogy az indukált

mutáció a sejtvonal hibajavító képességére is hatással volt, így a DNS-hibajavítás tovább tart, mint a WT vonalban.

Összefoglalóan megállapíthatjuk, hogy a rezisztenciához hozzájáruló oxidációs stressztűrő kapacitás a 60GY vonal esetében már a besugárzást követő negyedik órában teljes (a besugárzás előtti) azonban ekkor még sem a szuperoxid szpeciesz, sem a glutation fehérje mennyiség nem állt vissza kiindulási állapotra. Tehát a stressztűrő képességben nem ezek a rendszerek játsszák a fő szerepet, de a sugárrezisztenca kialakulásában bár valószínűleg a glutation fehérjék mennyiségének növekedése nem, de lehetséges, hogy a SOD fehérjék aktivitásának növekedése szerepet játszhat. Szintén lehetséges, hogy a sejtciklus ellenőrző pontok is szerepet játszanak sejtvonalunk rezisztenciájában, de az időfüggő mérésekből megállapítható volt, hogy a sejtfolyamatok egy későbbi fázisában lehet ennek jelentősége.

6. Összefoglaló

A sugárterápia az egyik leggyakrabban alkalmazott onkológiai kezelés, de a tumorsejtek rezisztenssé válhatnak rá. A terápia DNS-károsításán keresztül hat, aminek körülbelül kétharmadáért a reaktív oxigéngyökök (ROS) felelősek.

A kutatás célja az, hogy feltérképezzük a ROS eltávolításáért felelős redox útvonalakat és ezek fehérjéit sugárrezisztens sejtvonalban.

Ehhez egy frakcionáltan besugárzott sejtvonalat (60Gy) használtunk fel, és ennek tulajdonságait klonogenitási vizsgálatokkal, szulforodamin módszerrel (SRB) és flow citométer segítségével térképeztük fel.

A vizsgálatok megerősítették, hogy a sejtvonal sugárrezisztenssé vált. Megállapítottuk, hogy a 60Gy vonal a besugárzás után már 4 órával helyreállt oxidatív stressztűrés szempontjából a vad sejtvonallal ellentétben, ami ekkor még nem épült fel a besugárzás okozta ROS-stresszből. Továbbá a 60Gy vonal nagyobb százalékban volt a sejtciklusának G2/M fázisában besugárzás után.

A kutatás eredményei azt mutatják, hogy a besugárzás után 4 óráig érvényesül legjobban redox útvonalak közvetlen hatása (pl. stressztűrés), és a vad és 60Gy vonal között is ebben az időintervallumban figyelhető meg a legnagyobb különbség.

7. Köszönetnyilvánítás

Elsősorban szeretném megköszönni **Dr. Polgár Csabának** a lehetőséget, hogy az Országos Onkológiai Intézetben dolgozhattam.

Szeretném megköszönni témavezetőimnek, **Dr. Kocsis Zsuzsának és Dr. Jurányi Zsoltnak**, hogy ezen az érdekes témán dolgozhattam és készséges segítségüket a kísérletek kivitelezése és a dolgozat megírása alatt.

Emellett szeretném megköszönni **Dr. Sándor Gyöngyvérnek** a dolgozat megírásában és a konferenciára való felkészülésben nyújtott készséges segítségét.

Továbbá köszönettel tartozom a kísérletes munkám segítségéért a laboratóriumi asszisztenseknek, **Kiss Krisztinának** és **Vass Nagyesdának**.

Végül szeretném megköszönni a sok segítséget és a jó hangulatú közös munkát az **Országos Onkológiai Intézet Klinikai Sugárbiológiai és Onkocytogenetikai Osztály összes munkatársának**.

8. Szerzői hozzájárulás

Alulírott Paller Éva a dolgozatban végzett munkafolyamatok közül az alábbiakat végeztem el.

- A sejtek tenyésztését és passzálását.
- A GSH-assayt, mely során a sugárzás után eltelt 1. órában jelentősen csökkent a teljes GSH szint, majd ezt követően mindkét vonal GSH szintje nőni kezdett.
- A SOD-assayt, mely a során relatív fluoreszcencia a besugárzás után nő, majd a SOD enzimaktivitásnak köszönhetően csökkenésbe kezd.
- Valamint a flow citométeres sejtciklus fázis meghatározást a hozzátartozó Welch-próbával, mely szignifikáns különbséget mutatott ki a két vonal kontroll G1 fázisban lévő sejtjeinek százalékos aránya között.

Paller Éva

9. Irodalomjegyzék

1. Ballay, L., Deme, S.,. (2010) *Védekezés a külső sugárterhelés ellen*, Eötvös Kiadó, Budapest
2. Gazsó, L., Sáfrány, G, Köteles, Gy. (2002) *Az ionizáló sugárzás biológiai hatásai.*, Medicina, Budapest
3. Kim, W., Lee, S., Seo, D., Kim, D., Kim, K., Kim, E., Kang, J., Seong, K. M., Youn, H., and Youn, B. (2019) Cellular Stress Responses in Radiotherapy. *Cells* **8**
4. Wang, H., Jiang, H., Van De Gucht, M., and De Ridder, M. (2019) Hypoxic Radioresistance: Can ROS Be the Key to Overcome It? *Cancers (Basel)* **11**
5. Heng Jiang, H. W., Mark De Ridder. (2018) Targeting antioxidant enzymes as a radiosensitizing strategy. *Elsevier* **438**
6. Bogdanovic, V., Spasic, S., Rutonjski, L., Djan, M., and Mrdjanovic, J. (2014) Dose-dependent survival of K562 cells subjected to irradiation, time course of endogenous enzyme activity and protective effect of applied superoxide dismutase. *J BUON* **19**, 554-561
7. Wang, Y., Branicky, R., Noe, A., and Hekimi, S. (2018) Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. *J Cell Biol* **217**, 1915-1928
8. Guo, G., Yan-Sanders, Y., Lyn-Cook, B. D., Wang, T., Tamae, D., Ogi, J., Khaletskiy, A., Li, Z., Weydert, C., Longmate, J. A., Huang, T. T., Spitz, D. R., Oberley, L. W., and Li, J. J. (2003) Manganese superoxide dismutase-mediated gene expression in radiation-induced adaptive responses. *Mol Cell Biol* **23**, 2362-2378
9. Zuo, J., Zhao, M., Liu, B., Han, X., Li, Y., Wang, W., Zhang, Q., Lv, P., Xing, L., Shen, H., and Zhang, X. (2019) TNFalphamediated upregulation of SOD2 contributes to cell proliferation and cisplatin resistance in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* **42**, 1497-1506
10. Traverso, N., Ricciarelli, R., Nitti, M., Marengo, B., Furfaro, A. L., Pronzato, M. A., Marinari, U. M., and Domenicotti, C. (2013) Role of glutathione in cancer progression and chemoresistance. *Oxid Med Cell Longev* **2013**, 972913
11. Umar, M., Qian, W., Liu, Q., Xing, S., Li, X., Yang, X., Fan, Y., Ma, D., Jiang, P., and Li, M. (2020) Study on the pharmacological character of an insulin-mimetic small molecular compound of vanadyl trehalose. *Physiol Res* **69**, 481-490

12. Moore, W. R., Anderson, M. E., Meister, A., Murata, K., and Kimura, A. (1989) Increased capacity for glutathione synthesis enhances resistance to radiation in Escherichia coli: a possible model for mammalian cell protection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 1461-1464
13. Li, X., Wu, J., Zhang, X., and Chen, W. (2018) Glutathione reductase-mediated thiol oxidative stress suppresses metastasis of murine melanoma cells. *Free Radic Biol Med* **129**, 256-267
14. Navarro, J., Obrador, E., Pellicer, J. A., Aseni, M., Vina, J., and Estrela, J. M. (1997) Blood glutathione as an index of radiation-induced oxidative stress in mice and humans. *Free Radic Biol Med* **22**, 1203-1209
15. Aiello, N. M., and Kang, Y. (2019) Context-dependent EMT programs in cancer metastasis. *J Exp Med* **216**, 1016-1026