

Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem
Természettudományi Kutatóközpont, Enzimológiai Intézet

**A 4-nitrokinolin 1-oxid mutagenikus hatásának vizsgálata
sejttenyészetben**

Engel Botond

Biomérnöki szak, I. évfolyam (MSc)

Témavezetők:

Dr. Németh Eszter, Dr. Szüts Dávid

36. OTDK Biológia Szekció

Budapest, 2023

Tartalomjegyzék

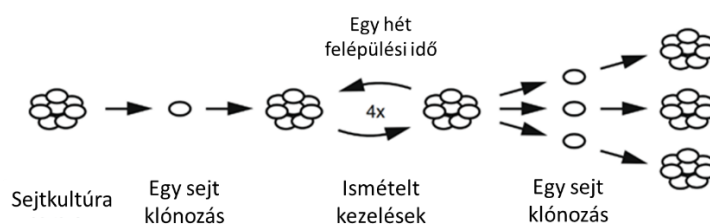
1. Bevezetés	2
2. Célkitűzés.....	3
3. Irodalmi áttekintés	3
3.1. A dohányzás, a mutációk és a rák kapcsolata.....	3
3.2. A 4-NQO tulajdonságai, hatásai, a mutációk kialakulásának mechanizmusa.....	4
3.3. A nukleotid kivágó javító mechanizmus	7
3.4. A 4-NQO mutációs spektruma	7
3.5. A 4-NQO apoptózist indukáló hatása	8
3.6. A 4-NQO mutációs tulajdonságai számos kérdést vetnek fel	9
4. Anyag és módszer	10
4.1. Sejtvonalak fenntartása.....	10
4.2. IC50 értékek meghatározása.....	10
4.3. A hosszútávú kezelés menete és az egysejt klónozás.....	11
4.4. Genomi DNS preparálása	12
4.5. Mutációk detektálása, adatelemezés.....	12
5. Eredmények	14
5.1. A 4-NQO toxicitása a TK6 és DT40 sejtekben	14
5.2. A sejtvonalak hosszú távú kezelése és a teljes genom szekvenálás	15
5.3. A 4-NQO mutagenikus hatása a TK6 sejtekben.....	17
5.3.1. Mutációk száma, detektálása.....	17
5.3.2. Mutációs spektrum és jellemzése	18
5.3.3. Mutációs mintázatok	22
5.4. A 4-NQO mutagenikus hatása DT40 sejtekben	25
5.4.1. Pontmutációk száma, detektálása	25
5.5. Eredmények értelmezése, kitekintés.....	27
6. Összefoglalás, konklúzió	28
7. Nyilatkozat.....	29
8. Hivatkozások.....	30

1. Bevezetés

A 4-nitrokinolin 1-oxid (4-NQO), a tudományos kutatásokban alkalmazott mutagén. Kezdetben UV-sugárzás mutagén hatásának mimikálására használták, pl. melanómás és egészséges emberi sejtekben [1]. Ugyanakkor szájüregi rák indukálására egerekben, illetve a dohányzás által kiváltott tumorok vizsgálatára is alkalmazták [2]. A humán tumorok DNS szekvenálási eredményeiből jól ismert, hogy ezen két folyamat teljesen eltérő mutációs mechanizmusokhoz köthető. Ahhoz, hogy a tumorigenezist modellező kísérletekben megbízhatóan alkalmazzunk egy mutagént, kiemelten fontos a szer által kiváltott mutációs folyamatok részletes ismerete. Az eddigiek alapján felmerül, hogy a 4-NQO jó modellje-e a dohányzás okozta mutagenézisnek.

A dohányzás számos úton kiválthat mutagenézist, leggyakrabban DNS adduktok keletkezése révén. Ez közvetett úton, például p53 vagy KRAS mutációk, sejtfelszíni receptorok aktiválása, vagy tumorszuppresszor gének gátlása útján is elősegítheti a tumor kialakulását. A 4-NQO a dohányfüst kémiai komponenseihez hasonló módon képez DNS-adduktokat, ezért is alkalmas a dohányzás hatásának mimikálására[3].

Kutatócsoportunkban a különböző citotoxikus anyagok hatásának vizsgálatára kifejlesztett módszer áll rendelkezésre, melynek alapja, hogy közös ősből indulva párhuzamosan kezelt izogenikus mintákat vizsgálunk (**1. ábra**).



1. ábra. A mutagének izogenikus sejtvonalakban történő vizsgálatának általános sémája. A párhuzamos klónok egyetlen közös ősből származnak, azonban a kezelések során egyedi mutációkat akumulálnak [4].

Ezt sikeresen használták már többek között csirke és humán sejtvonalakban a kollaterális mutagenézis vizsgálatára [5], vagy különböző platina alapú kemoterápiás gyógyszerek mutagén hatásának nagyságának és mechanizmusának összehasonlítására[6].

Munkám során hasonló módon vizsgáltam a 4-NQO hatását többféle sejtvonalon, és az eredményeket összevetettem humán tumorokból származó adatokkal.

2. Célkitűzés

Munkám célja a 4-NQO által kiváltott mutációk vizsgálata izogenikus sejtvonalakon teljes genom szekvenálással (Whole Genome Sequencing, WGS), DT40 csirke limfocita és TK6 humán limfocita sejtekben. Előbbi azért előnyös, mert többféle DNS javító hibás genotípus is rendelkezésre áll, így szükség esetén azok is vizsgálhatók, utóbbi pedig a humán sejtekben okozott változások megértéséhez releváns információkat nyújt.

További célom a mutagenézis hátterében álló mechanizmus részleteinek kiderítése a különböző modellrendszerekből és adatbázisokból származó adatok összevetése révén.

3. Irodalmi áttekintés

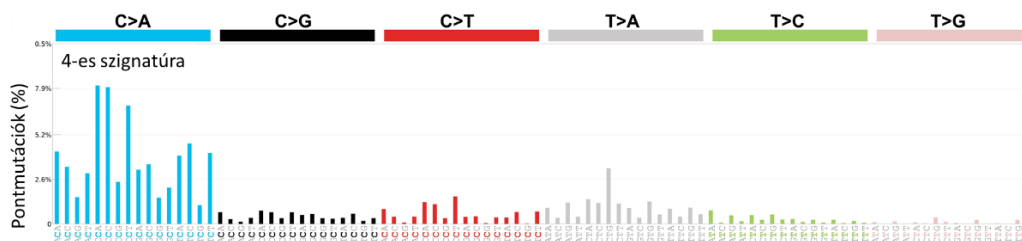
3.1. A dohányzás, a mutációk és a rák kapcsolata

A dohányfüst több ezer vegyület keveréke, melyek közül több mint 60 karcinogénként van számontartva. Egyik legkárosabb a 4-(metilnitrózamin)-1-(3-piridil)-1-butanon, amely biotranszformáció révén metil-diazohidroxiddá alakul, amely képes reagálni guaninmaradványokkal. Ezenkívül tartalmaz még policiklikus aromás szénhidrogéneket, mint például benzopirén, aromás aminokat, aldehideket, fenolokat és szénhidrogéneket [7]. A dohányzás évente több millió ember halálát okozza, és számos humán ráktípussal hozható összefüggésbe, mint például: szájüregi-, tüdő-, gyomor-, hasnyálmirigyrák és leukémia. Az eddigi kutatási eredmények alapján a dohányzó emberek szöveteiben a DNS-adduktok megjelenése sokkal gyakoribb, mint nem dohányzó emberekben[8].

A tumorokban detektált szomatikus mutációkat ún. mutációs spektrumon lehet ábrázolni, melyen az látható, hogy a különböző mutációs kategóriákból az adott mintában hány mutációt találnak. A kategóriákat a mutáció helyén meghatározott szekvencia triplet adja (referencia bázis a mutáció helyén az azt megelőző és követő bázissal). A mutációs spektrumokból mutációs mintázatokat származtattak, amelyek lineáris kombináció révén alkalmasak a különböző mutációs spektrumok leírására, feltárva a tumor kialakulásához vezető okokat [9].

Ludmil B. Alexandrov és munkatársainak eredményei alapján a báziscserék, dinukleotid mutációk, inzerciók, deléciók száma is szignifikánsan magasabb dohányos emberek tumoros elváltozásaiban [10]. A daganatok szomatikus mutációira jellemző mintázatoknak tulajdonítható mutációk számának összehasonlítása dohányzó és nem dohányzó emberekből

vett tumormintákban azt az eredményt adta, hogy a dohányzás szignifikánsan növeli a 4. és az 5. mutációs mintázathoz tartozó mutációk számát.



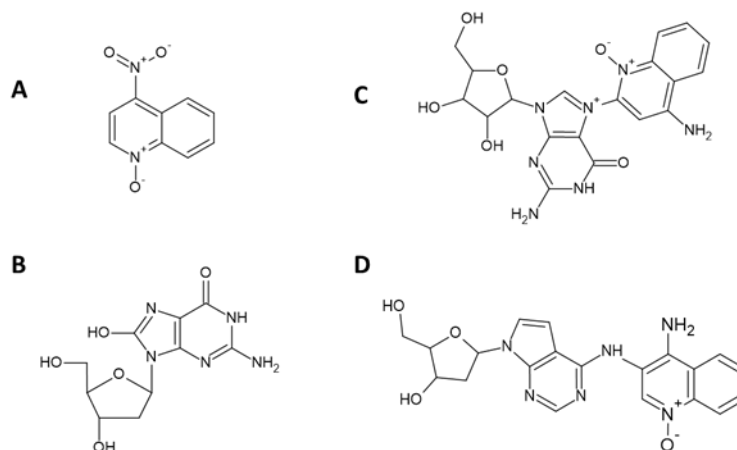
2. ábra. A dohányzásra jellemző 4-es mutációs mintázat a COSMIC adatbázisból. A hat alap mutációs kategória eltérő színekkel van ábrázolva, és tartalmazza a reverz komplementer mutációkat is. Az oszlopdiagram kategóriái a mutáció helye körüli szekvencia tripletből állnak [9].

A 4-es mutációs mintázat (**2. ábra**) szinte csak olyan tumorokban található meg, amely közvetlenül kitett volt a dohányfüstnek vagy amelyekben a dohányzás növeli a rák kialakulásának kockázatát. Ezen szignatúrát legjelentősebb mértékben a tüdő és a gégerákokban találták meg, de minden egyes tumorban jelentősebb a mértéke dohányzók esetében. Ebben a mintázatban a legnagyobb mértékben C>A mutáció van jelen, emellett T>A mutációk is számottevők.

Az 5. mintázat az összes ráktípusban megtalálható, legjelentősebb mértékben T>C és C>T mutációk dominálnak benne, előbbi mutáció esetében pedig dominál a transzkripció asszimetria jelensége. Nem dohányzó emberek tumormintáiban ezen szignatúra korrelál a diagnózis felállításának korával és hozzájárul a mutációk felhalmozódásához. Az 5. mintázat gyakorisága dohányzó emberek tumormintáiban jelentősen megnő, ami arra utal, hogy a dohányzás felgyorsítja a mutagenézis folyamatát. [10,11].

3.2. A 4-NQO tulajdonságai, hatásai, a mutációk kialakulásának mechanizmusa

A 4-NQO egy vízzoldható kinolin származék (**3. A ábra**), karcinogén vegyület, amely mutációkat és kromoszóma aberrációkat hoz létre a sejtekben. A különböző kinolinok és származékaik, így a 4-NQO is előfordulhat a környezetünkben ipari eredetű levegőszennyezőanyagként, de jellemzően szintetikus anyag és kutatási célokra használják [12].



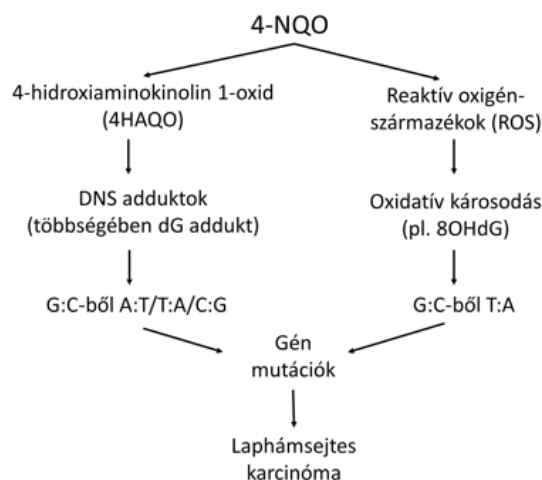
3. ábra. **A)** A 4-NQO szerkezeti képlete, **B)** 8-hidroxi-dezoxi-guanozin, a 4-NQO által okozott fő addukt **C, D)** N4-(guanozin-7-il-4AQO) és 3-(dezoxiadenozin-N6-il)-4AQO a mellékadduktok,

A vegyület mutagenikus hatását a nitrocsoport enzimatiskus redukciója indítja el, így 4-hidroxiaminokinolin 1-oxiddá (4-HAQO) alakul, amely kovalens kötést tud kialakítani a DNS-sel. A legnagyobb mennyiségben 8-hidroxi-dezoxi-guanozin (8OHdG) (**3. B ábra**) képződését mutatták ki, de N4-(guanozin-7-il-4AQO) (**3. C ábra**) és 3-(dezoxiadenozin-N6-il)-4AQO (**3. D ábra**) adduktok keletkezését is detektálták. A későbbi kutatások bebizonyították, hogy a 8OHdG addukt van túlsúlyban[13]. A 8OHdG a 4-NQO hatása során kialakuló reaktív oxigénszármazékok (ROS) révén is keletkezhet. Nunoshiba és munkatársa 4-NQO-val kezelt *Escherichia coli*-ban megnövekedett *soxS* (szuperoxid válasz gén) expressziót mutattak ki. Olyan *E. coli* mutáns törzsekben, amelyek hiányos szuperoxid-dizmutáz aktivitással, vagy más oxidatív károsodásokat javító enzim deficienciával rendelkeznek, szintén megnőtt ezen gén aktivitása, illetve érzékenyebbnek is bizonyultak a 4-NQO-val szemben[14].

A 4-NQO biotranszformáció során a glutationnal konjugálódik. A glutation koncentrációjának csökkenése a H_2O_2 lebontásának csökkenéséhez vezet, ami így hidroxilgyökké alakul, tehát oxidatív stresszt vált ki. Egerek nyelvén kimutatták az *NRF2* gén aktiválódását, amely több oxidatív stresszre adott válaszreakcióért felelős gén szabályozásáért felelős [15]. Ezenfelül kimutatták, hogy a 4-NQO a topoizomeráz I DNS hasító komplexek kialakulását is indukálja, amely a replikációt gátolva szintén elősegítheti a karcinogenezis folyamatát.

Arima és munkatársai szintén vizsgálták a fenti mechanizmusokat humán fibroblaszt sejtekben, és kimutatták, hogy antioxidáns hozzáadása csökkenti 8OHdG mennyiségét a sejtekben. Kataláz hatására teljesen megszűnt a 8OHdG képződése, míg szuperoxid-dizmutáz

(SOD) lelassította ezen addukt keletkezését. Ennek az lehet a magyarázata, hogy SOD hatására H_2O_2 keletkezik, amely szintén ROS, így kiválthatja a DNS károsodását [13].



4. ábra. A 4-NQO két fő útvonalon fejt ki mutagén hatását a sejtben: közvetlenül adduktot képez a DNS-sel vagy oxidatív stresszt vált ki, és az így felszabaduló reaktív oxigénszármazékok reagálnak el a DNS bázisaival [15]

A 4-NQO-t hatékonyan alkalmazzák a fej és nyak laphám tumorok modellezésére [16]. Ez a tumortípus különösen gyakori a dohányzó páciensek körében, ami a dohánytermékekben található aromás vegyületek által kiváltott mutagenézishez köthető. Ezek túlnyomóan C>A mutációkat jelentenek, hasonlóan a 4-NQO által kiváltott mutagenézishez. A sejtekben mind a 4-NQO, mind a dohányzás által kiváltott DNS léziók javítása polimeráz δ függő nukleotid kivágó javítással (nucleotide excision repair, NER) történik. Az eddigi kutatások azt mutatták, hogy a 4-NQO és a dohányzás hatására egyaránt csökken a POLD4 expressziója. Ez a Pol δ egyik alegysége, tehát a NER javító képessége csökken. Ezen feltételezést megerősítette, hogy azon sejtek, amelyekben siRNS-el csökkentették a POLD4 expresszióját, érzékenyebbek voltak a 4-NQO-ra. [3]

Kimutatták azt is, hogy a 4-NQO-val kezelt sejtekben megnőhet a kettős szálú törések gyakorisága, és HPV+ és HPV- HNSCC (fej-nyaki laphámsejtes karcinóma) sejtvonalakon a kettős szálú töréseket javító homológ rekombináció fehérjéinek nagymértékű aktiválódását figyelték meg [17].

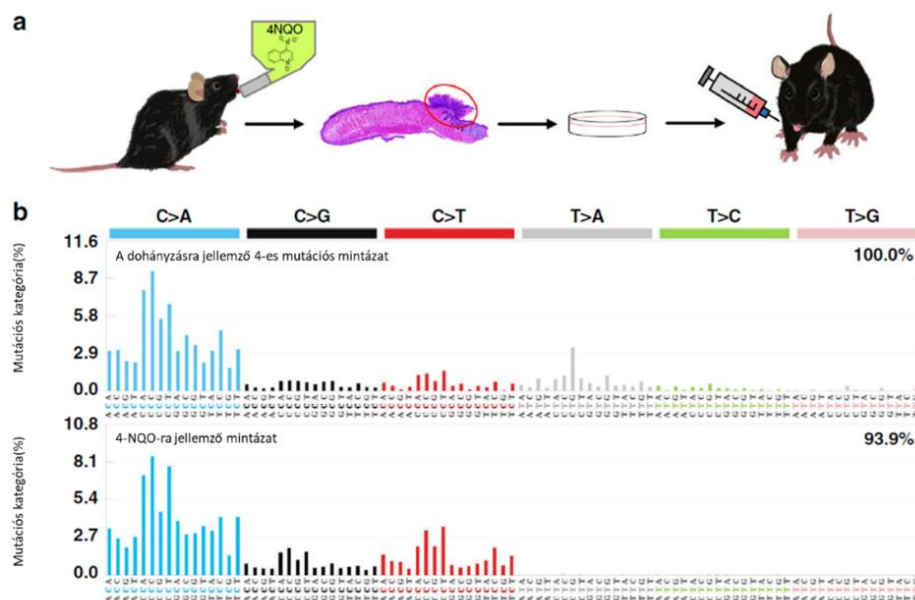
3.3. A nukleotid kivágó javító mechanizmus

A nukleotid kivágó javító mechanizmus (NER) a 4-NQO által kiváltott mutációk fő javítási útvonala. A NER-nek két fő útvonala van: globális és transzkripcióhoz kötött, és leggyakrabban olyan léziókat javít, amelyek csak a DNS egyik szálát érintik. Előbbi esetben a szenzorfehérje az XPC, míg utóbbi esetben az RNS polimeráz. A két útvonal ezután ugyanúgy folytatódik tovább, az XPA fehérje az XPB és XPD fehérjéket aktiválja, amelyek a lézió körül kitekerik a DNS szakaszt, elválasztják a sérült szálát a komplementerétől. Ezután az XPF/ERCC1 és XPG fehérjék kivágják a hibás szakaszt, egy DNS polimeráz kitölti a hézagot, majd az eredeti és az új DNS szakaszt egy ligáz összeköti egymással [18].

3.4. A 4-NQO mutációs spektruma

Elsőként Downes és munkatársai foglalkoztak a 4-NQO által kiváltott mutációk vizsgálatával *Aspergillus nidulans* gombában teljes genom szekvenálást alkalmazva [19]. A kutatás eredményei azt mutatták, hogy a mutációk eloszlása a genomban véletlenszerű, és az azonosított mutációk 95%-a guaninon, míg 5%-a adeninen történt. Mindkét esetben kimutatták, hogy 4-NQO hatására a tranzíciós mutációk kis mértékben gyakoribbak, mint a transzverziók, Leggyakoribb mutációnak a C>T bizonyult, a mutációk 56%-a ebbe a kategóriába esik [19]

A 4-NQO mutációs spektrumát Wang és munkatársai egereken végzett kutatások alapján teljes exom szekvenálással vizsgálták [2] (5. ábra).



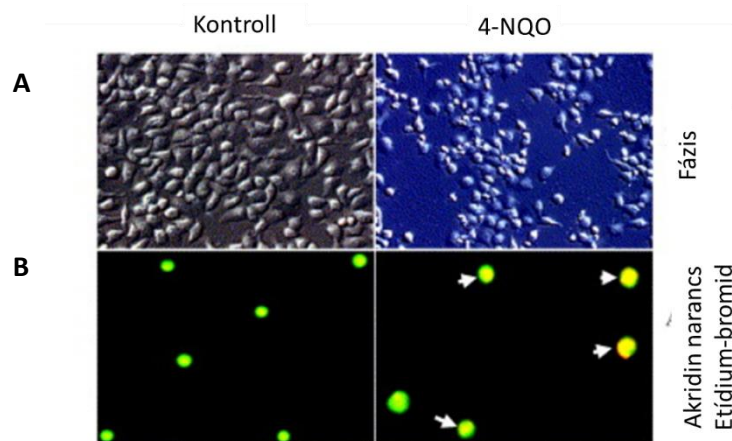
5. ábra. A 4-NQO mutációs spektruma [2]. Az ábra x tengelyén a mutációk 96, triplet alapú kategóriája szerepel. Mutáció típusonként (az ábrán színenként) 16 kategória van, a mutált bázist megelőző és követő bázis (4-4 lehetőség) típusa alapján. Az y tengelyen az adott mutációs kategória százalékos előfordulása szerepel.

A kísérlet során 4-NQO oldatot itattak egerekkel 16 héten keresztül, majd 6 hét után a keletkező tumorokból sejteket izoláltak, tenyésztettek, majd vad típusú C57Bl/6 egerek nyelvébe ültették be [2]. Az eredményeik azt mutatták, hogy annak ellenére, hogy a dohányfüst több mint 60 karcinogén anyagból áll, a 4-NQO-val való kezelés elegendő volt a karcinogén hatásának mimikálásához, a mutációs spektruma 94%-os hasonlóságot mutat a dohányzás spektrumával. A C>A mutációk mintázata mindkét esetben azonos, azonban a C>G és C>T mutációk aránya nagyobb, míg a T>A mutációk aránya kisebb a 4-NQO-val kezelt mintákban a dohányzó betegek tumoraiban kimutatott 4-es számú mutációs mintázathoz képest, ez utóbbi esetben a legnagyobb különbség a CTG mutációk számában van. A C>A mutációs kategóriában a legmagasabb csúcsok a: CCA, CCC és CCT. Emellett azt is kimutatták, hogy a transzkripció során átírt szálon nagyobb a domináns C>A mutációk száma, mint a nem átírt szálon, vagyis a transzkripciós aszimmetria jelensége is megfigyelhető [2].

He és munkatársai kutatócsoportunkkal együttműködésben a *Brca1*^{+/-}, *Trp53*^{+/-} heterozigóta háttéren kialakuló nyelöcsőrák kialakulását vizsgálták egérmodellekben. A 4-NQO-t a replikációs stressz előidézésére használták fel, amely a tumorok kialakulását a kísérleti modellben jelentősen felgyorsította, a 4-es mutációs mintázatra jellemző C>A mutációk kialakulása mellett [20].

3.5. A 4-NQO apoptózist indukáló hatása

Más kutatásokban a 4-NQO apoptózist indukáló hatását vizsgálták. Han és munkatársai epidermoid karcinóma sejtvonalon (KB sejtek) kutatták a 4-NQO hatását, a kezelést követően natív körülmények között és akridin narancssal, etidium-bromiddal történő festést követően is vizsgálták a sejtek morfológiájában bekövetkező változásokat [21]. A **6. ábrán** jól láthatóak az apoptózis morfológiai jellemzői: a sejtek zsugorodása, a sejtmag zöldről narancssárgára történő megváltozása. Ezt Annexin V-FITC-el történő festéssel is megerősítették, az Annexin V az apoptózis egyik markerfehérjéje. Mindezek mellett vizsgálták a p53 szerepét a 4-NQO által kiváltott folyamatokban három sejtvonalon: normál humán bőr fibroblaszt (NH3T), KB és spontán módon transzformált, két p53 mutációt hordozó HaCaT humán keratinocita sejtvonalakon. A p53 expressziós szintje a kezelést követően csak az utóbbi esetben nem emelkedett, vagyis jelentős szerepe lehet a 4-NQO által kiváltott apoptózis modulálásában. Ezenfelül a kaszpáz 6 és 9 fehérjék expressziója is megemelkedett a KB sejtek esetén, amelyek az apoptózis kulcsfehérjéi, illetve a mitokondriális membránpotenciál is csökkent, vagyis a mitokondrium membránja károsodott. Tehát a 4-NQO apoptózist indukálhat, ha a DNS károsodás nem javítható [21].



6. ábra. A 4-NQO által indukált morfológiai elváltozások [21] **A)** Natív körülmények között végzett megfigyelés fáziskontraszt-mikroszkóppal. A kezelt és a kontroll sejteket összehasonlítva az apoptózis jellegzetes morfológiai jelei: sejtsugorodás, lekerekedés, a membrán felhólyagosodása **B)** Akridin narancssal és etidium-bromiddal történő festés után az apoptózist elkövető sejtek sárga színűek, míg az egészségesek zöldek

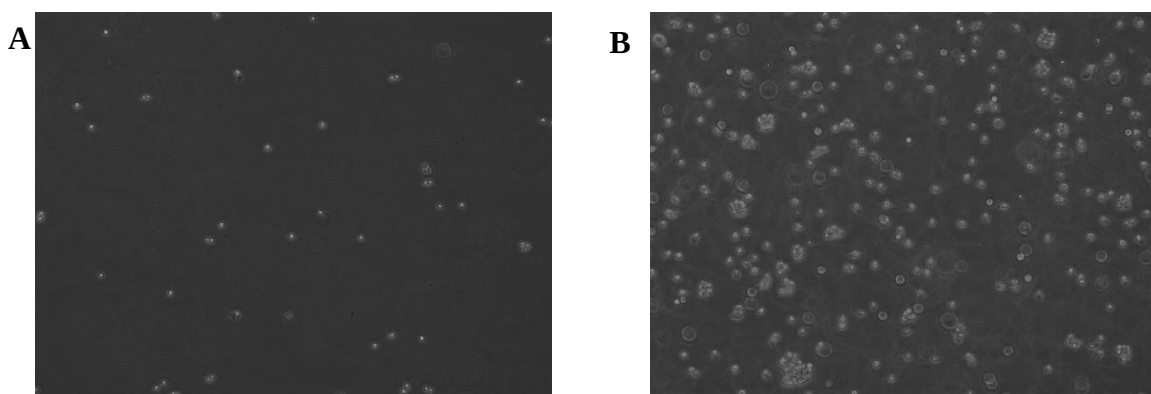
3.6. A 4-NQO mutációs tulajdonságai számos kérdést vetnek fel

A 4-NQO egér mintában meghatározott mutációs spektrumát a 4-es mintázattal összevetve felmerül a kérdés, hogy miért van jelentős eltérés a C>A/C>T mutációk arányában, mivel közvetlen humán sejtekben mért adat még nem áll rendelkezésre. Emellett az eddigi teljes exom szekvenálásokban 4-NQO nem kódoló régiókban történő mutagenikus hatásáról nincs információ. Teljes genom szekvenálással összehasonlíthatóvá válik a mutagenézis a kódoló és nem kódoló régiókban, a sejtvonalakon végzett kísérletek pedig kontrollálhatóbb körülményeket jelentenek, melyekben más mutációs folyamatok interferáló hatása nélkül vizsgálható a mutagenézis.

4. Anyag és módszer

4.1. Sejtvonalak fenntartása

A két sejtvonalat, a DT40-et (**7. A ábra**) és a TK6-ot (**7. B ábra**) egyaránt 37°C-on és 5% CO₂-ot tartalmazó atmoszférában tartottam fenn inkubátorban. A vad típusú DT40 sejteket Dr. Julian E. Sale laboratóriumából (MRC Molekuláris Biológia Laboratórium, Cambridge, Egyesült Királyság) kaptuk, amelyek eredetileg a Pirbright Intézetből származnak. A sejteket 7% magzati szarvasmarha szérummal, 3% csirkeszérummal, 50 µM merkapto-etanolal és 1% penicillin/sztreptomicin oldattal kiegészített RPMI-1640 tápoldatban (Gibco, Life Technologies) tenyésztettem. A vad típusú TK6 sejteket a TK6 Mutants Consortiumtól szereztük be. Ezen sejteket szintén RPMI-1640 táptalajban tenyésztettem, 10% magzati szarvasmarha szérummal és 1% penicillin/sztreptomicin oldattal kiegészítve.



7. ábra. **A)** DT40 és **B)** TK6 vad típusú, kezeletlen sejtek, mikroszkóppal, 10-szeres nagyítású lencsével készítve.

4.2. IC₅₀ értékek meghatározása

Az IC₅₀ meghatározást DT40 sejtek esetén 6 edényes lemezen, míg TK6 sejtek esetén 24 edényes lemezen végeztem el, előbbi esetben 180000 sejt/ml, utóbbi esetben 125000 sejt/ml volt a koncentráció edényenként. A 4-NQO (gyártó: Sigma-Aldrich) koncentráció 0-400 nM tartományban változott, a 0 nM kontrollhoz 0,4 V/V% DMSO-t adtam. A kezelés 1 órán keresztül tartott, 37°C-on 5% CO₂-ot tartalmazó atmoszférában, ezt kétszeri PBS-ben történő mosás követte. A sejtek koncentrációját aznap, illetve 24 és 48 óra múlva meghatároztam Vi-CELL™ XR sejtleképzésség-elemző készülékkel. Ez az eljárás sejtvonalak következetes és pontos elemzését teszi lehetővé. A készülék az elpusztult sejtek festésére tripánkék festéket

használ, így ezen sejtek sejtmagja és citoplazmája is kék színben tűnik fel. A szoftver a sejtszám mellett a viabilitás értéket is kiszámolja, amely az élő sejtek és az összes sejtek számának hányadosával egyenlő.

4.3. A hosszútávú kezelés menete és az egysejt klónozás

A közös ős és a kontroll kezelés szekvenálási adatai mindkét sejtvonal esetén már rendelkezésre álltak. A kontroll kezelés során a sejtvonalak szintén 50 napig voltak fenntartva a 4.1. fejezetben ismertetett körülmények között. Munkámat így az IC50 meghatározás után egyből a kezeléssel folytattam. A kezelés 4 héten keresztül zajlott, mely során minden héten egy dózis 4-NQO-val inkubáltam a sejteket a már meghatározott IC50 értéket közelítő koncentrációkon, ami DT40 esetén 30 nM, TK6 esetén 75 nM volt. A kezelés minden héten ugyanazon nap, ugyanazon napszakban zajlott, 1 órán keresztül, FACS-csőben, 1.000.000 sejt felhasználásával 1 ml szuszpenzióban. A kezelések után kihigítottam a 4-NQO-t 1 ml friss médiummal, a sejteket lecentrifugáltam (10 perc, 200 g), tápoldatot cseréltem, új flaskába helyeztem és 37°C-on 5% CO₂-ot tartalmazó atmoszférában tartottam fent a következő kezelésig.

A kezelés lejárta után a következő lépés az egysejt klónozás. Első lépésként Bürker-kamrával megszámláltam a sejteket, majd mindkét sejtvonal esetében 1 ml 10.000 sejt/ml koncentrációjú szuszpenziót készítettem, amelyből elkészítettem a lemezekhez szükséges 5 sejt/ml, 10 sejt/ml és 25 sejt/ml koncentrációjú szuszpenziókat. A szuszpenziókból három-három darab 96 lyukú lemezre 200 µl-t pipettáztam. Így mindkét sejtvonal négyszer kezelt mintája három különböző hígításban került kiosztásra: 1 sejt, 2 sejt és 5 sejt került egy-egy lemez lyukaiba. A klónokat a 'Sejtvonalak fenntartása' fejezetben leírt módon tartottam fent, egy műanyag dobozban, melyben a megfelelő páratartalmat nyitott főzőpohárban tartott CuSO₄ oldat biztosította.

A klónok felnövése TK6 sejtek esetén nagyon hamar megtörtént, így el is kezdhettem a genomi DNS preparálását. DT40 sejtek esetén a sejtek pusztulását figyeltem meg, így más módszerrel újraklónoztam a sejteket: hagyományos médium helyett 1% metilcellulóz tartalmú tápoldatban klónoztam a csirke sejteket, 6 lyukú lemezen. Ebben az esetben az előbbivel hasonló módon 1 ml 1000 sejt/ml koncentrációjú szuszpenziót készítettem. Két-két lyukba 200, 100 és 50 µl-t pipettáztam 5 ml, előre felmelegített metilcellulózba, ügyelve a sejtek jó eloszlására. A klónozás ebben az esetben sikeresnek bizonyult, 2 hét után telepeket figyelhettünk meg, melyeket mikroszkóp alatt izoláltunk.

Mindkét esetben a genomi DNS kinyerése előtt, a megfelelő klónokat előbb 24 lyukú lemezre majd kis flaskába vittem át. Azon klónok bizonyultak megfelelőnek, amelyeknek szép, szabályos körvonaluk volt, így valószínűleg egyetlen egy darab sejt osztódása révén keletkeztek.

4.4. Genomi DNS preparálása

A DNS kinyerésénél mindkét sejtvonal esetén klónonként 1,5 millió sejtet használtam fel. A preparálás első lépése a sejtek lízise, amely során egy 2 perces, 5000 RPM-es centrifugálási lépést követően a felülúszó leöntése után lízis puffert (1M Tris-HCl, 0,5 M EDTA, 10% SDS, víz) adtam a mintákhoz. Mindegyik mintához, 1 μ l, 10 mg/ml koncentrációjú RNáz enzimet adtam, majd inkubáltam őket 37°C-on, 30 percig. A minták lehűlése után 100 μ l fehérjék kicsapására szolgáló oldatot (5 M ammónium-acetát) adtam a mintákhoz, amelyeket rázás után 16000 g-n 6,5 perc alatt lecentrifugáltam. Ezen lépések célja a mintában levő RNS és fehérje minták eltávolítása volt.

A preparálás utolsó lépése a DNS kicsapása: a felülúszók új Eppendorf-csőbe való öntése után, 500 μ l, 100%-os izopropanolt adtam a mintákhoz, majd homogenizáltam és lecentrifugáltam oldatokat (16000 g, 1 perc). A visszamaradt pelletekhez 300 μ l 70%-os etanolt adtam. Az etanol eltávolítása után, megszáritottam a DNS pelleteket, mindegyik mintához 65°C-ra előmelegített 50 μ L EB pufferoldatot (5 mM Tris-HCl pH 8,0) adtam, majd 1 órát 65°C-on inkubáltam őket.

A genomi DNS tisztaságát és az esetleges DNS fragmentálódást Nanodroppal és agaróz gélelektroforézissel ellenőriztem. Nanodroppal való mérés esetén az OD 260/280 és OD 260/230 arányok a tisztaság minőségi mutatói, előbbi protein, RNS vagy egyéb 280 nm-en abszorbeáló szennyeződés jelenlétére utalhat, utóbbi partikuláris szennyeződésekre. Ha 260/280 arány kisebb, mint 1,8 vagy értéke 2 körüli, vagy a 260/230 arány az 1,8-2,2 tartományon kívül esik, az jelzi a kontaminációt. Az én mintáim esetében mindkettő megfelelő volt. A szekvenálást csoportunknak egy külső szolgáltató cég, a Novogene végezte el Illumina platformon.

4.5. Mutációk detektálása, adatelemezés

A nyers szekvenálási adatok feldolgozását a Trimmomatic program segítségével kezdtük, ami szekvenálás során a DNS szálakhoz ligált adapter szekvenciákat távolítja el. A trimmelés után a BWA-MEM programmal a minták referencia genomhoz illesztését hajtottuk végre. A DT40 szekvenciákat az Ensembl adatbázisból letöltött csirke (*Gallus Gallus*) Galgal

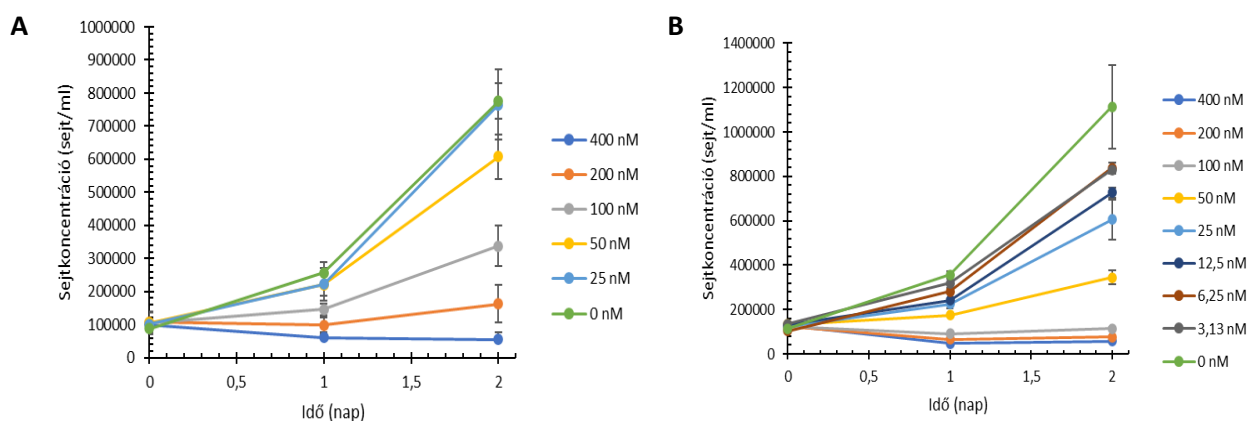
4.73 referenciagenomhoz, míg a TK6 szekvenciákat a GRCh38 humán referenciagenomhoz illesztettük. Az illesztés után az IsoMut programmal detektáltuk a pontmutációk (SNV) és az 50 bázispárnál rövidebb inzerciók, deléciók előfordulását. Az elemzéshez TK6 sejtek esetén 21 darab izogenikus TK6 minta szekvenálásból nyert adatokat használtunk fel [20].

A mutációdetektálás után meghatároztuk azt a ponthatárt, egy valószínűségi értéket, amely felett a talált mutációkat valósnak fogadjuk el. Az így kapott mutációkon pedig különböző elemzéseket hajtottunk végre RStudio segítségével. A kiértékelés során használt kontroll kezelt sejtvonalak szekvenálási adatai már rendelkezésre állnak a kutatócsoport korábbi munkái alapján.

5. Eredmények

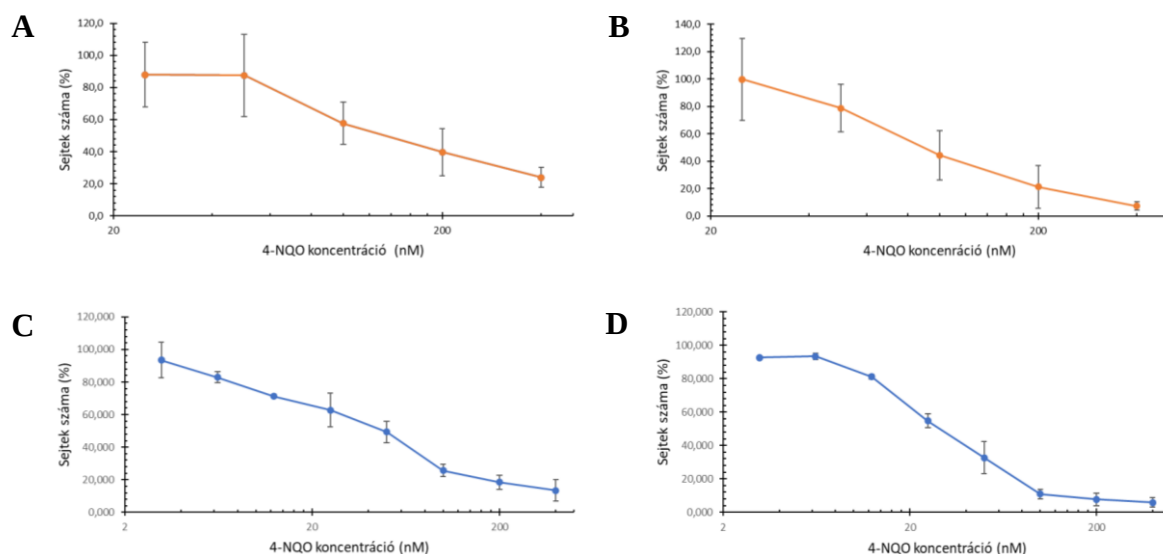
5.1. A 4-NQO toxicitása a TK6 és DT40 sejtekben

A 4-NQO toxikus hatását sejtleletkéességi mérésekben határoztam meg. A sejteket egy órán keresztül inkubáltam 4-NQO különböző dózisaival, majd egy ill. két nap friss médiumban történő tenyésztés után meghatároztam az élő sejtek számát. A maximális dózis optimalizása után három párhuzamos kísérletet végeztem el mindkét sejtvonal esetén (**8. ábra**). A 4-NQO toxikus mindkét sejtvonalra, a koncentráció növekedésével a túlélő sejtek száma a kezeletlen kontrollhoz képest csökken. DT40 sejtek esetén a 100 nM, TK6 sejtek esetén 400 nM koncentráció feletti 4-NQO dózis a sejtek nagymértékű pusztulását okozza.



8. ábra. A sejtkoncentráció változása az idő és a 4-NQO koncentráció függvényében **A)** DT40 sejtvonal **B)** TK6 sejtvonal. A 4-NQO toxikus a sejtekre, két nap után DT40 esetén 50 nM, TK6 esetén 100 nM 4-NQO a kontrollhoz képest a sejtek több, mint felének pusztulását okozta.

A 4-NQO IC₅₀ értékét mindkét esetben nemlineáris regresszióval határoztam meg, szigmoid görbe illesztésével (nyers adatok: **9. ábra**). A túlélő sejtek számát a kezelés után azonnal, 24 és 48 órával később is megmértem annak céljából, hogy a szer milyen időintervallumban fejti ki a hatását. TK6 esetén 24 óra után az IC₅₀ értéke 110,3 nM, 48 óra után 84,9 nM. DT40 esetén 24 óra a 4-NQO IC₅₀ értéke 38,2 nM, míg 48 óra után 28,6 nM. Mindkét esetben csökkent az idő előrehaladtával az IC₅₀ értéke, ami arra utal, hogy a 4-NQO csökkent mértékben, de a kezelés után 24-48 órával is kifejti még mutagén hatását.



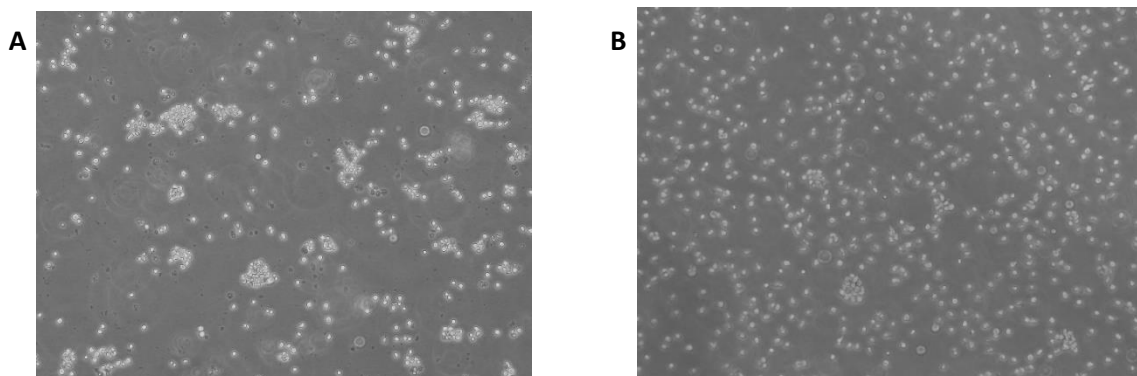
9. ábra. A 4-NQO IC₅₀ értékének meghatározása a két sejtvonalban **A)** TK6 - 24 óra után **B)** TK6 - 48 óra után **C)** DT40- 24 óra után **D)** DT40 – 48 óra után

Az eddigi eredmények alapján a DT40 sejtek érzékenyebbek 4-NQO-ra, mint a TK6 sejtek, amit a további toxikus vegyületekkel szemben mutatott érzékenyséjük alapján vártunk is [5]. Katja Brüsehafer és munkatársai kutatási eredményei alapján TK6 sejtekben az IC₅₀ 0,02 µg/ml, vagyis 1050 nM [22]. Ez az érték jóval magasabb az általunk meghatározottnál, amely azzal magyarázható, hogy a kezelés időtartama esetünkben 4 óra volt, amit egy Cytochalasin B-vel történő kezelés is követett. Tetsuya Suzuki és munkatársai eredményei alapján DT40 sejtekben az IC₅₀ 74,6 nM, ami szintén a jóval hosszabb kezelési idő (48 óra) miatt lehet magasabb, mint a mi kísérletünkben[23].

5.2. A sejtvonalak hosszú távú kezelése és a teljes genom szekvenálás

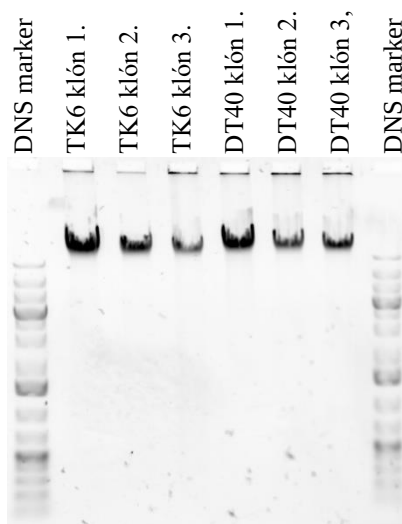
Az IC₅₀ értékek meghatározását követően mindkét sejtvonalat 4 héten keresztül heti egy alkalommal kezeltem egy dózis 4-NQO-val, a kezelések közötti 1 hét regenerálódási idő mellett. Az alkalmazott dózis, DT40 esetén 30 nM, TK6 esetén 75 nM, kisebb volt, mint a meghatározott IC₅₀ értéke. A dózis enyhe csökkentésével az volt a cél, hogy a kultúrákban mindenképpen maradjon elég élő sejt a négyszeres kezelést követően a genom szekvenáláshoz. A kezelés során megfigyeltem, hogy a humán sejtek kisebb károsodását szenvedtek, kevesebb volt a sejtörmelék (**10. ábra**). A DT40 sejtek kultúráiban ezzel szemben az életképesség nagy

mértékű csökkenését tapasztaltam, a szuszpenzió nagy mennyiségben tartalmazott sejtörmelékét. Mindkét sejtvonal esetén kisebb sejtcsoportok megfigyelhetők voltak.



10. ábra. **A)** DT40 sejtek az első kezelést követően, jelentős mennyiségű sejtörmelék figyelhető meg, illetve a sejtek összecsomósodtak **B)** TK6 sejtek az első kezelést követően, egy-két kisebb sejtcsoport megfigyelhető, de a sejtek egészségesnek néznek ki. Mindkét esetben a képek mikroszkóppal készültek, 10-szeres nagyítású lencsével.

A kezelés után egy sejt klónozást végeztem, majd a megfelelő klónok kiválasztása után DNS kinyerést hajtottam végre. Az így kapott minták minőségét Nanodroppal és agaróz gélelektroforézissel ellenőriztem, amik alapján a minták nem tartalmaztak jelentős mennyiségű szennyezőket, és DNS fragmentumokat.



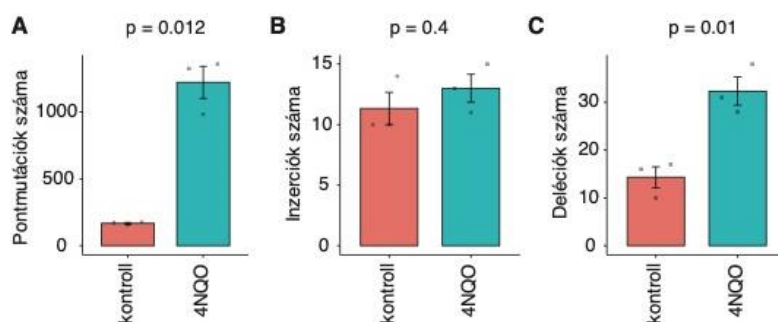
11. ábra. A három-három DT40 és TK6 klón agaróz gélelektroforézis képe a genom preparálását követően. A futtatás 1% agaróz gélen történt.

A **11. ábrán** látható a genom preparálás után készített agaróz gélelektroforézis képe. Látható, hogy mindegyik sáv egy adott tartományban van, nincsenek máshol sávok vagy elmosódás, amelyek a DNS fragmentálódására utalnának. Tehát a minták megfelelnek a teljes genom szekvenálás minőségi feltételeinek. A preparált genomokat a Novogene céghez küldtük teljes genom szekvenálásra. A nyers szekvenálási adatokat feldolgoztuk, a leolvasott szekvenciákat illesztettük a megfelelő humán és csirke referenciagenomokra, a mutációkat az IsoMut nevű programmal határoztuk meg. Az IsoMut [24] egy izogenikus sejtvonalakon bekövetkező mutációk vizsgálatára alkalmas robosztus eszköz, parallel klónokban pedig nagy valószínűséggel találja meg az egyedi mutációkat, így kiszűrve a polimorfizmusokat és a szekvenálási zajt. Előnyei közé tartozik, hogy nagyon gyors és a fals pozitív arány a hagyományos eszközökhöz képest sokkal kisebb. Az IsoMut Fisher-egzakt próbájának alapján eltávolítja az összes pozitív hamis hívást a kontrollmintákból, vagyis a referenciagenomhoz képest heterozigóta mutációkat keres, és kiszűri azokat a helyeket, ahol más minták is eltérnek a referenciagenomtól. Az illesztési hibákat pedig többmintás szűréssel távolítjuk el [24].

5.3. A 4-NQO mutagenikus hatása a TK6 sejtekben

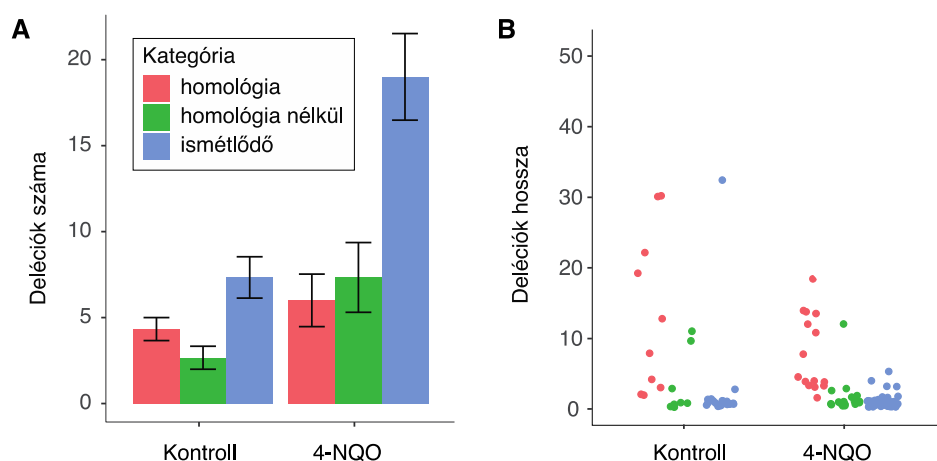
5.3.1. Mutációk száma, detektálása

A három párhuzamos TK6 klónban detektált pontmutációk, inzerciók, deléciók számát oszlopdiagramon ábrázoltuk. A kontroll kezelés hatására a pontmutációk számának átlaga 168, míg a 4-NQO hatására a számuk jelentősen, több mint hétszeresére növekszik átlaguk 1222-re nő (**12. A ábra**).



12. ábra. Mutációk száma az egyes mintákban az 50 napos kontroll kezelés és a négy dózis 4-NQO hatására. Mindkét esetben három-három klónban levő mutációk számának átlagát ábrázoltuk, az egyes minták mutációs számait szürke pöttyök jelölik. **A)** pontmutációk száma, **B)** rövid inzerciók száma, **C)** rövid deléciók száma. Szignifikáns, ha $p < 0.05$.

Az inzerciók számában nincs szignifikáns változás, azonban a deléciók száma a négyszer 4-NQO-val kezelt mintákban jelentősen megnövekedett a kontroll kezeléshez képest (**12. B és C ábra**). Számuk 14-ről 32-re növekedett, ami több, mint kétszeres növekedés. A rövid deléciókat három kategóriába soroltuk attól függően, hogy a DNS milyen szekvenciakörnyezetében estek ki bázisok: homológ, nem homológ és ismétlődő. Első esetben a hiányzó szakasz egyik végén maradt DNS szekvencia azonos a törölt szakasz végével, második esetben nincs ilyen ismétlődés, míg utóbbi esetben ismétlődő bázisok közül hiányzik egy vagy néhány. A kezelés hatására (**13. A ábra**) mindhárom kategóriában nőtt a deléciók száma, legjelentősebb mértékben az ismétlődő szakaszokban, ez esetben több, mint kétszeres növekedés történt. A deléciók hosszát is vizsgálva a fenti kategóriákban (**13. B ábra**) az látható, hogy a 4-NQO csak rövid, 25 bázisnál rövidebb deléciókat okozott. A kontroll kezelés során is hasonló hosszúságú deléciók figyelhetők meg, a deléciók hossza kizárólag a homológ kategóriában nagyobb, mint a kezelt sejtek esetén.



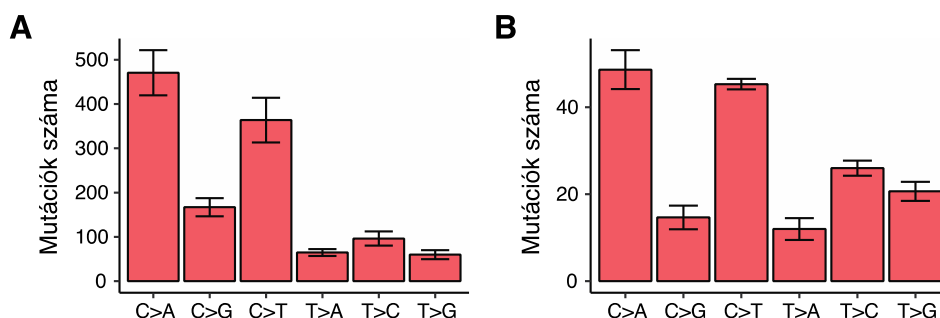
13. ábra. A) Deléciós kategóriák TK6 sejtekben B) A mintákban előforduló egyes deléciók hossza, a klón számától függetlenül ábrázolva. Minden pont egy detektált deléciónak felel meg. A különböző kategóriák színezése a két ábrán megegyezik.

Összességében tehát a 4-NQO a pontmutációk számát növelte meg legnagyobb mértékben, emellett jelentős a deléciók számának növekedése is.

5.3.2. Mutációs spektrum és jellemzése

A mutációs spektrum készítése során a mintákban detektált mutációkat besoroltuk a 6 fő mutációs kategóriákba aszerint, hogy a kezletlen minta alapján milyen bázis milyenre

változott (**14. ábra**). A C és T referencia kategóriákat tüntetjük csak fel, G és A bázisok mutációja esetén a reverz komplementert (a DNS másik szálát) tüntetjük fel. Ezek egyenértékűek, mivel nem tudjuk, hogy melyik szálon indult a lézió révén a mutáció. Külön-külön meghatároztuk a kontroll kezelés és a 4-NQO kezelés utáni spektrumot. A spektrum alapján a három leggyakrabban bekövetkező mutáció: C>A, C>T és C>G. Ez az eredmény megfelelt az előfeltevéseknek, hiszen a citozin a guanin bázis komplementere, amely az irodalmi adatok alapján leggyakrabban szenved mutációt, illetve a 4-NQO guanin adduktja is jól ismert. A spektrum hasonlít a kontroll kezelés mutációs mintázatához.

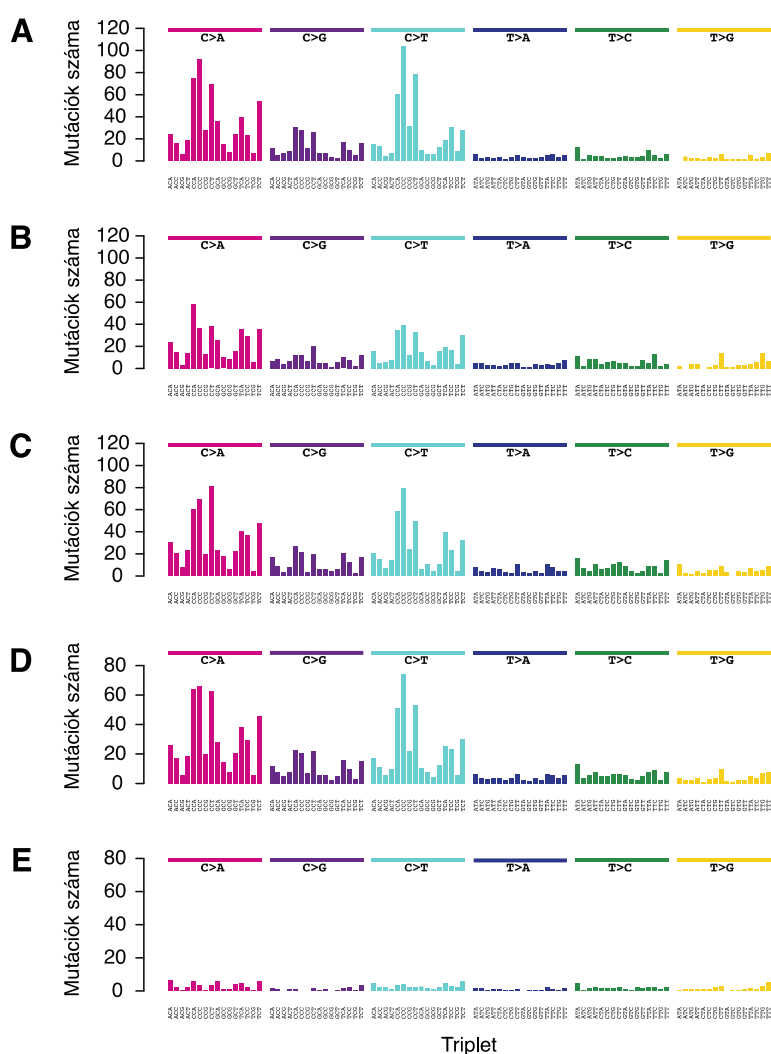


14. ábra. 6 kategóriás mutációs spektrum TK6 sejtekben **A)** 4-NQO kezelés, **B)** kontroll kezelés. A 4-NQO hatására a C>A, C>T és C>G mutációk száma jelentősen megnövekedett, ugyanakkor a csúcsok mintázata hasonlít egymásra. A T>A, T>C és T>G mutációk száma csak kis mértékben növekedett, ezek közül a legjelentősebb a T>C.

Hogy a mutációk mintázatának különbségeit részletesebben feltárjuk, a mutált bázisok szomszédjait is figyelembe véve besoroltuk a mutációkat a 96 alkategóriába. A **14. ábrán** látható egyetlen kategória (pl. C>A) helyett így 16 kategória fog szerepelni aszerint, hogy milyen bázis előzi meg (4 lehetőség) és milyen követi (további 4 lehetőség) az adott bázist. Külön-külön meghatároztuk a kontroll kezelés és a 4-NQO kezelés utáni mutációs spektrumot, utóbbit mindhárom klón esetén feltüntettem az ábrán a pontosabb elemzés érdekében.

A **15. A, B és C** ábra mutatja a három párhuzamos 4-NQO-val kezelt klón mutációs spektrumát. A spektrumok átlagán (**15. D ábra**) a COSMIC 4-es szignatúrára jellemző C>A mutációk túlsúlya megfigyelhető, ugyanakkor a C>T és C>G mutációk sokkal nagyobb mértékben vannak jelen. Mindhárom kategóriában a legjelentősebb csúcsok a következők: CCA, CCC, CCT, TCT, ami arra utal, hogy a mutagenézis ugyanazon lézió javítása miatt jött létre. A domináns C>A mutációk esetén megvizsgáltuk, hogy a mutált bázis szomszédai miként befolyásolják a mutáció kialakulását. Ha a mutált bázis után guanin helyezkedik el, akkor történik a legkevesebb mutáció, ez azzal magyarázható, hogy genomban a CpG dinukleotidok

aránya jelentősen kisebb, mint a többi dinukleotidé, emiatt a mutációjuk is ritkább. Ha a bázis előtt adenin vagy timin található, akkor a legtöbb mutáció abban az esetben következik be, ha a következő bázis adenin vagy timin. Ezzel szemben, ha citozin van a bázis előtt, minden esetben jelentősen megnő a mutációk száma. Hasonló mintázat a C>T és C>G mutációk esetén is megfigyelhető. A kontroll kezelés spektrumával (**15. E ábra**) összevetve megfigyelhető a háttérmutagenézis, a T>A, T>C és T>G kategóriák spektrumának mintázat nagyfokú hasonlóságot mutat, ugyanazon csúcsok dominálnak. Ezenkívül látható, hogy legnagyobb mértékben a kontroll kezeléshez képest is a C>A és C>T mutációk száma nőtt meg jelentősen.

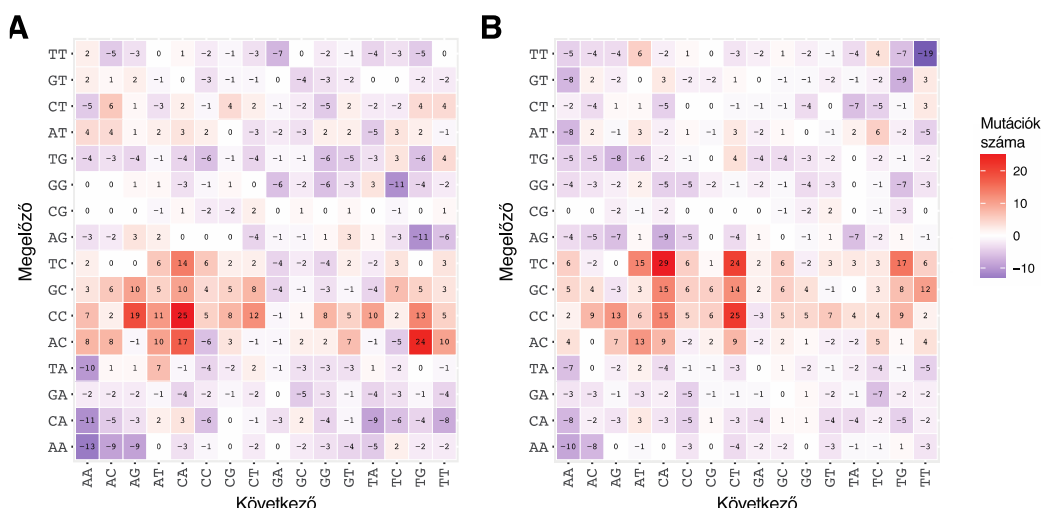


15. ábra. A 96 kategóriás mutációs spektrumot a mutált bázisok szomszédjait figyelembe véve határoztuk meg. **A)** 4-NQO-val kezelt 1. TK6 klón, **B)** 4-NQO-val kezelt 2. TK6 klón, **C)** 4-NQO-val kezelt 3. TK6 klón, **D)** 4-NQO kezelés átlagos spektruma, **E)** Kontroll kezelés átlagos spektruma.

A három kezelt klón spektrumát (**15. A, 15. B és 15.C ábra**) összehasonlítva elmondható, hogy az 1-es és 3-as klón spektruma nagymértékben hasonló, ezen klónokban

történt a legtöbb mutáció, a legjelentősebb csúcs a CCC. A 2-es klónban a mutációk száma kisebb, a domináns csúcsok csak kisebb mértékben emelkedtek meg a hátermutagenézishoz képest. Ezen eredmény összhangban van a pontmutációk számával a különböző mintákban, legkevesebbet a kettes mintában találtunk.

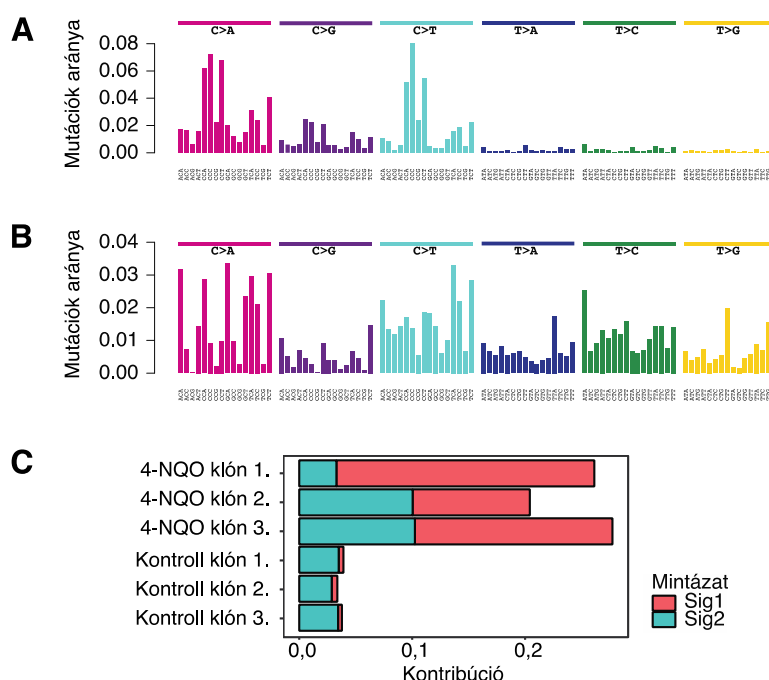
A C>A és C>T mutációkat szélesebb kontextusban (**16. ábra**) is értelmeztük, vagyis megvizsgáltuk, hogy vannak-e olyan jellemző pentanukleotid szekvenciák, amelyek a statisztikailag vártnál gyakrabban mutálódnak. Először meghatároztuk a mintában található mutációk körüli -2 - +2 bázispár szekvenciakontextust, majd az összmutációs számmal megegyező mennyiségű random pozíciót generáltunk a genomon irányított módon, mely során minden random pozíció egy detektált mutáció közelében van. Ezzel a nagy léptékű genomi különbségek, pl. Kromatin befolyásoló hatását küszöböltük ki. A mintában és random pozíciókban összeszámolt pentanukleotid szekvenciák különbségét szemlélteti a **16. ábra**. A triplet spektrumoknak megfelelően itt is megfigyelhető, hogy mind a C>A, mind a C>T mutációk esetén, ha mutált bázis előtt citozin van, akkor a legmagasabb a mutációk aránya. A mutációhoz képest -2 bázispár pozícióban a CC>CA mutációkat leggyakrabban C, míg a CC>CT mutációkat leggyakrabban CT előzi meg. A +2 bázispár pozícióban pedig kiemelt gyakorisággal szerepel A bázis. Tehát kis mértékben a szélesebb kontextus is befolyásolja a mutagenézist.



16. ábra. A) C>A, B) C>T mutációk a vizsgálata a mutált bázis pentanukleotid környezetében. Az y-tengelyen a mutációhoz képest -2 és -1 bázispár helyén található bázisok lehetőségei, az x-tengelyen a +1 és +2 pozícióban található bázisok lehetőségei szerepelnek. Az egyes értékek a mintában mért pentanukleotid számok és egy random módon generált háttér pozíció lista pentanukleotid számainak különbségei. A pozitív érték dúsulást (piros), a negatív csökkent gyakoriságot (kék) jelent.

5.3.3. Mutációs mintázatok

Nem negatív mátrix faktorizációt (NMF) alkalmazva a minták mutációs spektrumából kiindulva meghatároztuk a háttérmutagenézis és a 4-NQO mutációs mintázatát (**17. A ábra**) és mintánként a kezelés és a háttérmutagenézis hatására bekövetkező mutációk számát (**17. B ábra**). Az NMF alapja az, hogy egy mátrixot két másik mátrixra bont fel, vagyis faktorizál, figyelembe véve, hogy egyik mátrixnak sincs negatív eleme.

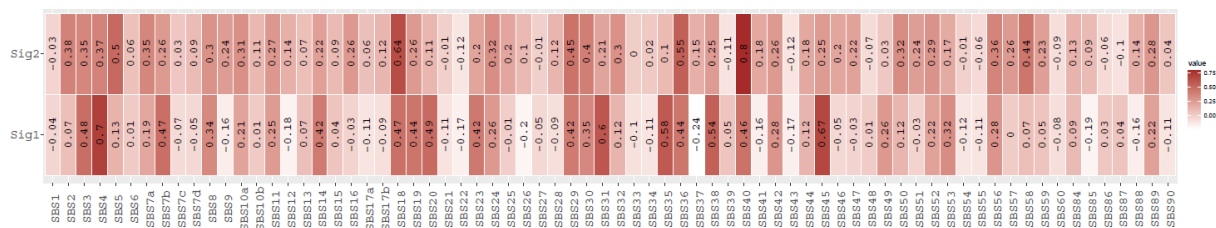


17. ábra. *De novo* pontmutációs mintázatok (szignatúrák). **A)** 4-NQO kezelésnek tulajdonítható mintázat (Sig1) **B)** háttérmutagenézisnek tulajdonítható mutációs mintázat (Sig2). **C)** A kontroll kezelés és a 4-NQO kezelés hatására bekövetkező mutációk száma a 4-NQO hatása (Sig1) és a háttérmutagenézis (Sig2) szerint csoportosítva

A *de novo* mutációs mintázatok (**17. A és B ábra**) közül az egyik megfelel a 4-NQO mutációs spektrumának, a másik pedig a háttérmutagenézisnek. Fontos, hogy a **17. A** ábrán látható 4-NQO mintázat már nem egy mintákból származó spektrum, hanem egy matematikailag meghatározott komponens, ami független az egyéb mutációs folyamatoktól. A 4-NQO mintázaton is látszik, hogy a 4-NQO a hatását leginkább a C>A és C>T mutációk keletkezése révén feje ki, a C>G mutációk száma közepesen magas, míg a többi elhanyagolható mértékű. A *de novo* spektrumokat felhasználtuk a mutációs spektrumok részletes elemzésére (**17. C ábra**). A mutációs spektrumok komponensekre történő felbontása alapján a 4-NQO-hoz

köthető komponens mellett a háttérmutagenézis is jelentősen megnövekedett a kezelt mintákban, ez alól kivételt csak az 1-es minta jelent, ugyanakkor a 4-NQO hatása minden esetben jelentősnek bizonyult. Korábban hasonló jelenséget tapasztaltak kutatócsoportunkban TK6 sejtek platina komplexekkel történő kezelését követően [6].

Ezután a kapott 4-NQO mutációs spektrumot összehasonlítottuk a különböző COSMIC mintázatokkal (**18. ábra**). Az összehasonlítás alapja a koszinusz hasonlóság, amely szerint két vektor hasonló, ha a köztük levő szög 0° , vagyis a koszinusz hasonlóság 1, illetve teljesen különböző, a szög 90° , vagyis a hasonlóság 0.

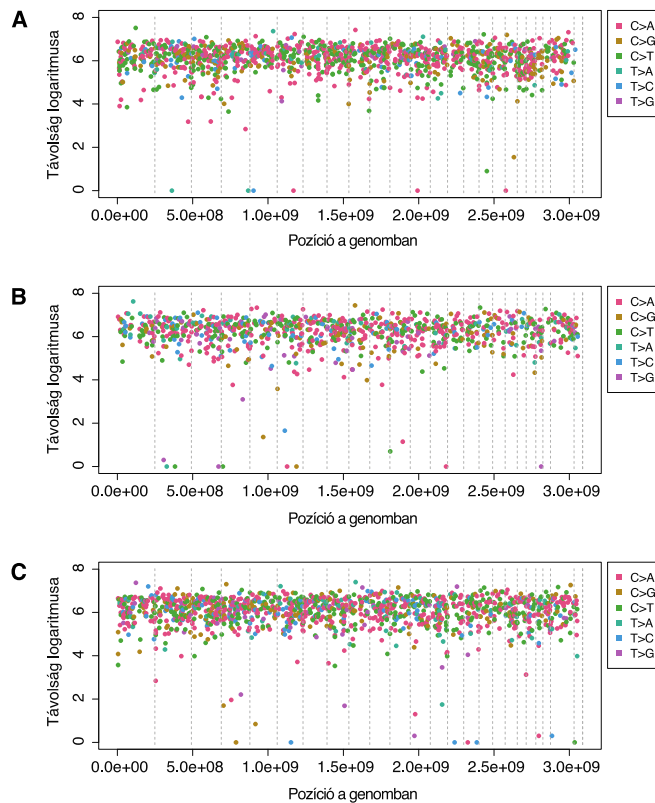


18. ábra: A 4-NQO és a háttérmutagenézis mutációs mintázatának összehasonlítása a COSMIC adatbázisban található mutációs mintázatokkal. Az összehasonlítás alapja a koszinusz-hasonlóság, két mintázat teljesen megegyezik, ha 1, illetve különbözik, ha 0. A 4-NQO mintázata legjobban a 4-es mintázatra hasonlít, ami a dohányzásra jellemző

Ez alapján az általunk meghatározott 4-NQO mintázat legnagyobb mértékben a COSMIC adatbázis 4-es és 45-ös mintázatára hasonlít, míg a háttér mintázata a 40-es mintázatra, amelyet nem a 4-NQO okoz. A 4-es mintázat a dohányzásra jellemző, ezt az eredményt vártuk. A 45-ös mintázat szekvenálási műtermék, melyet valószínűleg a szekvenálás során keletkező 8-oxo-guanin idéz elő. Eredményeink megerősítik ezt a feltevést. A 40-es mintázat pontos okának ismerete még nem ismert, ugyanakkor egyes tumorokban korrelál a páciensek életkorával, vagyis még egészséges sejtekben, a tumorigenezis előtt hosszú idő alatt alakul ki.

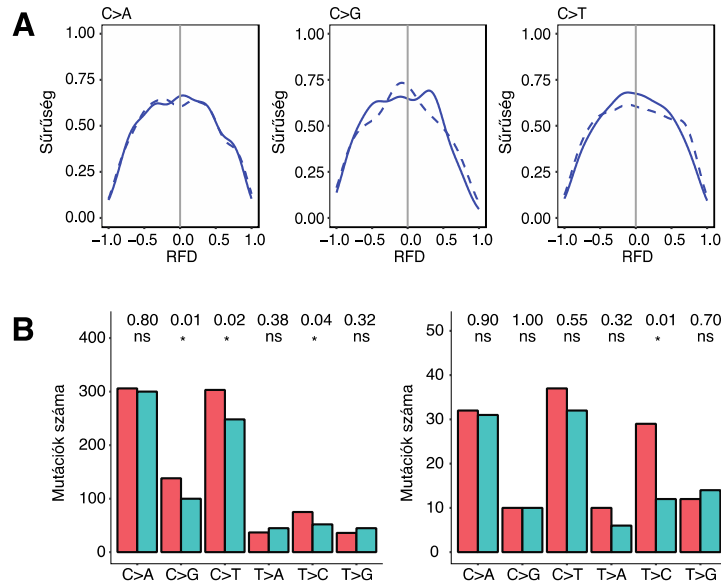
5.3.4. A pontmutációk tulajdonságai

A mutációk egyenletesen oszlanak meg a DNS teljes szakaszán mindhárom klón esetében, mutációs klaszterek vagy más egyenlőtlenségek nem figyelhetők meg (**19. ábra**). Egyéb mellett levő ún. dinukleotid mutációk azonban megfigyelhetők, amit a dohányzáshoz köthető tumorokban is detektáltak. Dinukleotid mutációból 144 típus képzelhető el (12 alap mutációs kategória mindkét pozícióban), mi összesen 20-at detektáltunk és ebből 4 esik a CC>AA vagy GG>TT kategóriába, amelynek feldúsulását a dohányzó emberek tüdőrák mintáiban szintén megfigyelték [9].



19. ábra. A mutációk eloszlása a genomban a 3 klónban. Az x tengelyen a kumulált genomai pozíció szerepel, a kromoszómahatárokat szaggatott szürke vonalak jelölik. Az y-tengelyen a szomszédos mutációk távolságának tízes alapú logaritmusát tüntettük fel.

A mutációk genomai pozíciói esetén elérhető adatokból meghatározhatjuk az adott pontban a replikáció irányát. Így megkülönböztethetjük, hogy pl. a mintában detektált C>A és G>T mutációk közül a C>A inkább a vezető vagy inkább a követő szálon fordul elő. Amennyiben van ilyen különbség, úgy a mutációk és azok reverz komplementereinek pozícióhoz köthető RFD (replication fork directionality, replikációs villa iránya) eloszlása aszimmetrikus. Ilyen jellegű replikációs aszimmetria (**20. A ábra**) egyik mutációs kategória esetén sem lép fel, vagyis a 4-NQO által okozott mutációk nem replikációfüggő úton alakulnak ki.



20. ábra. A) A replikációs aszimmetria vizsgálata. A három párhuzamos mintában detektált mutációk eloszlási sűrűségét tüntettük fel az RFD (replication fork directionality) érték függvényében. A szimmetrikus eloszlás jelzi, hogy a folyamat független a replikációtól. **B)** A transzkripció aszimmetria vizsgálata. Piros oszlopok mutatják az átírt szálon detektált C és T mutációk számát, zöld a nem átírt szálon detektált C és T mutációk számát. A G és A bázisok mutációi reverz komplementaritásnak megfelelően össze vannak vonva az előbbi kategóriákkal.

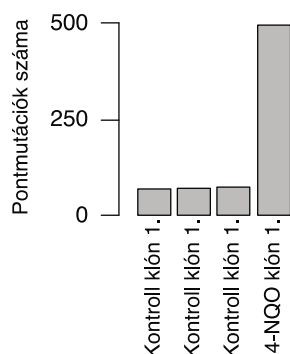
A gének genombeli irányának ismeretében azt is meghatározhatjuk, hogy a C vs. G illetve az A vs. T mutációk egyenlően oszlanak-e el, vagy közülük valamelyik feldúsul az átírt szálon a másikhoz képest. A transzkripció aszimmetria (**20. B ábra**) a kontroll kezelések esetén nem mutatható ki, kivétel a T>C mutációk esetén figyelhető meg, vagyis ebben az esetben az átírt régiókban magasabb a mutációk száma. A 4-NQO-ra jellemző C>A, C>G és C>T mutációk esetében a transzkripció aszimmetria az utóbbi két esetben bizonyult statisztikailag szignifikánsnak, vagyis ez esetben jelenthető ki, hogy az átírt szálon több mutáció van C bázisnál, azaz a nem átírt szálon több mutáció van G bázisnál, tehát ezen mutációkat okozó G adduktokat a TC-NER javítja.

5.4. A 4-NQO mutagenikus hatása DT40 sejtekben

5.4.1. Pontmutációk száma, detektálása

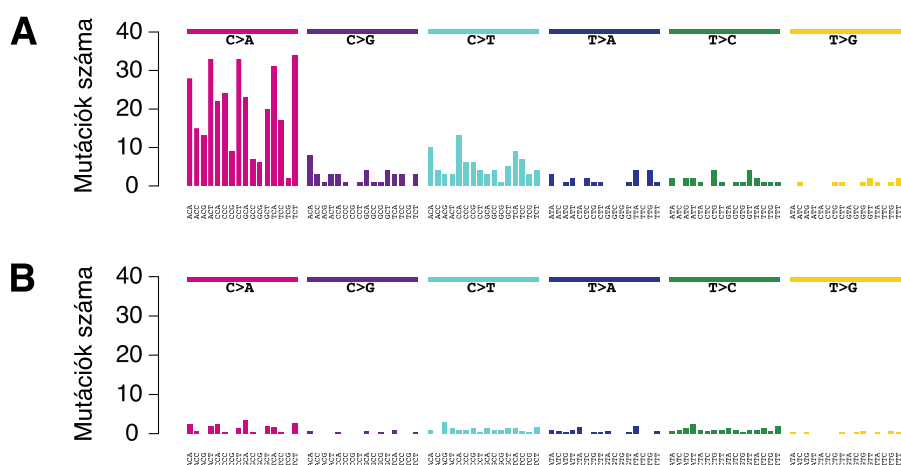
A DT40 sejtek a 4-NQO kezelést rosszul viselték, sejtosztódási rátájuk jelentősen lecsökkent, ebből kifolyólag a kezelés utáni egy sejt klónozás is lassabb folyamat volt. A fenti

nehézségek miatt eddig egy klónt sikerült szekvenálni, a további klónok szekvenálása folyamatban van. A sikeresen szekvenált klónban, és a kontroll mintákban előforduló pontmutációk számát oszlopdiagramon ábrázoltuk (**21. ábra**). A kezelés hatására a pontmutációk számának jelentős növekedését tapasztaltuk.



21. ábra. Pontmutációk száma az egyes mintákban az 50 napos kontroll kezelés és a négy dózis 4-NQO hatására.

A 96 kategóriás mutációs spektrumot (**22. ábra**) az 5.3. fejezetben leírt módszer alapján készítettük el. A spektrum alapján a C>A és C>T mutációk száma a legjelentősebb, a TK6 eredményekhez hasonlóan. Ez esetben is a CpG dinukleotidok esetében történt a legkevesebb mutáció, mert ezek kisebb arányban fordulnak elő a genomban. A C>A mutációk spektrumát elemezve megállapítható, hogy ha a mutált bázis előtt adenin, citozin vagy timin van, akkor egy jellegzetes mintázat figyelhető meg, a mutációk számának csökkenése a mutált bázist követő bázis alapján a következő: timin, adenin, citozin és guanin.



22. ábra: A 96 kategóriás mutációs spektrumot a mutált bázisok szomszédjait figyelembe véve határoztuk meg. **A)** 4-NQO-val kezelt DT40 klón **B)** Kontroll kezelés átlagos spektruma.

A C>A mutációk spektruma összességében különbözik mind a TK6, mind a dohányzáshoz köthető 4-es szignatúra mintázatától, azonban a -1 bázispár pozíció szerinti négyes csoportok mintázata egyenként hasonló és csak ezek egymáshoz mért aránya tér el. A C>T mutációk környezetében a mutált bázis után leggyakrabban adenin található.

5.5. Eredmények értelmezése, kitekintés

A két sejtvonalban előforduló mutációk számát összehasonlítva elmondhatom, hogy a TK6 sejtvonalban keletkező pontmutációk száma jelentősen magasabb, mint DT40 sejtekben, ezenfelül a C>A, C>T és C>G mutációk számának aránya is jelentősen nagyobb humán sejtekben, mint csirke sejtekben. Azonos mutagén esetén meglepő az eltérő mutációs spektrum.

A pontmutációk száma jelentősen megnőtt mindkét sejtvonalban a 4-NQO kezelés hatására. A pontmutációk jelentős szerepet játszanak az onkogén driver mutációk kialakulásában, ami többek között különböző receptorok és protein kinázok aktiválásához vezethet. Ezek a folyamatok elvezethetnek a sejt kontrollálhatatlan növekedéséhez, sejtosztódásához, tehát a tumor kialakulásához. Ezen esetekben sokszor egy pontmutáció elegendő a folyamat elindításához, így érdemes megvizsgálni, hogy ezen driverekben mely mutációk vezetnek el a tumor kialakulásához, és hogy a 4-NQO okoz-e ezen helyeken mutációkat. A leggyakoribb ilyen jellegű mutációk tüdő adenokarcinómában az EGFR és KRAS génekben történnek [25]. A gnomAD adatbázis alapján ezen génekben csökkenő sorrendben C>T, T>G és C>A mutációk fordulnak elő (1. táblázat) [26].

1. táblázat: Az EGFR és KRAS gének patogén elváltozást okozó mutációi a gnomAD adatbázis alapján [26].

Gén	Mutáció	Fehérje mutáció	Hatás
EGFR	C>T	Arg255Ter	Patogén
	C>T	Gly428Asp	Patogén
	C>A	Glu513Ter	Patogén
	T>G	-	Valószínűleg patogén
	C>T	Pro753Ser	Valószínűleg patogén
	C>T	Asp761Asn	Valószínűleg patogén
KRAS	C>A	Gly60Val	Patogén/Valószínűleg patogén
	T>G	Lys117Asn	Patogén
	T>G	Gln61His	Patogén
	C>T	Gly12Asp	Patogén
	C>T	Gly13Gly	Valószínűleg patogén

Összehasonlítva a DT40, TK6, egér és humán tumor adatokat szembetűnő, hogy a C>A/C>T arány változik. A fentiekből következik, hogy a 4-NQO a különböző modellrendszerekben eltérő valószínűséggel indukál onkogén mutációkat. A dohányzás hatására leggyakrabban a tumorsejtekben C>A mutációk jelennek a COSMIC adatbázis 4-es mutációs mintázata alapján, a 4-NQO ezzel szemben jelentős számú C>T mutációt okozott a humán sejtekben. Így felvetődik a kérdés, hogy a 4-NQO tényleg alkalmas-e a dohányzás hatásának mimikálására. Ezentúl az is felmerül, hogy a dohányzáshoz köthető daganatokban tényleg hiányzanak-e a DNS adduktok miatt kialakuló C>T mutációk. Előfordulhat, hogy a túl sok változó miatt a teljes daganat kohortokon átívelő elemzésekből nem tűntek ki ezek a mutációk, de célzottan keresve felismerhetők. Terveink között szerepel azt megvizsgálni, hogy a C>T mutációk milyen arányban vannak tüdőrákos sejtekben.

6. Összefoglalás, konklúzió

Kimutattuk, hogy 4-NQO erős mutagén, a pontmutációk és a deléciók számának jelentős növekedését tapasztaltuk. A 4-NQO a dohányzáshoz hasonlóan jelentős mennyiségű C>A mutációt okozott mindkét sejtvonalon, ugyanakkor más típusú mutációk száma is jelentősen megnövekedett a kezelés hatására: a C>T mutációk száma mindkét esetben megnőtt, humán sejtekben pedig a C>G mutációk száma is megnövekedett.

A TK6 sejtvonala esetében NMF segítségével meghatároztuk a 4-NQO és a háttérmutagenézis mutációs mintázatát. Megfigyeltem, hogy a kezelt mintákban a 4-NQO-ra jellemző komponens mellett kis mértékben a háttér mintázata is megnövekedett. A 4-NQO mintázata a COSMIC adatbázis 4-es és 45-ös, míg a háttéré a 40-es mintázatára hasonlít. A 4-es mintázat a dohányzás hatásának tudható be.

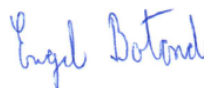
A 4-NQO kiváltott mutációk megoszlása a genomban egyenletes, az egymás mellett levő mutációk ritkák, de a dohányzáshoz köthető daganatok genomjaihoz hasonló módon előfordulnak. Kimutattuk, hogy ezen mutációk nem a replikáció során keletkeznek, és többségük a TC-NER által javítható G lézióhoz köthető, hiszen az átírt szálon kisebb mennyiségű G mutációt detektáltunk.

Összegezve megerősítettük, hogy a 4-NQO alkalmas lehet a dohányzás hatásának mimikálására. Az eredmények értékelésénél ugyanakkor figyelembe kell venni, hogy nemcsak a dohányzás által kiváltott mutációkat okoz, hanem modellrendszerrel függően más típusúakat is.

7. Nyilatkozat

Alulírott **Engel Botond** hallgató (Neptun kód: CHGB9P) nyilatkozom, hogy **A 4-nitrokinolin 1-oxid mutagenikus hatásának vizsgálata sejttenyészetben** című dolgozatom elkészítése során én végeztem a sejtvonalak fenntartását, a sejtleletképességi vizsgálatokat, ezek optimalizálását, a sejtvonalak 4-NQO-val történő kezelését, az egy sejt klónozásokat és a genomi DNS minták preparálását. A nyers szekvenálási adatok bioinformatikai úton történő feldolgozását témavezetőm, Dr. Németh Eszter végezte, az eredmények elemzésében aktívan részt vettem.

Budapest, 2022. 10. 10.



.....

Engel Botond

8. Hivatkozások

- [1] L. E. Wang et al.: 4-Nitroquinoline-1-oxide-induced mutagen sensitivity and risk of cutaneous melanoma: A case-control analysis, *Melanoma Research*, 26(2), 181–187, **2016**
- [2] Z. Wang et al.: Syngeneic animal models of tobacco-associated oral cancer reveal the activity of in situ anti-CTLA-4, *Nature Communications*, 10, **2019**
- [3] Q. M. Huang et al.: 4-Nitroquinoline-1-oxide effects human lung adenocarcinoma A549 cells by regulating the expression of POLD4, *Biomedical Reports*, 4(3), 345–348, **2016**
- [4] B. Szikriszt et al.: A comprehensive survey of the mutagenic impact of common cancer cytotoxics, *Genome Biology*, 17, **2016**
- [5] Á. Póti et al.: Characterisation of the spectrum and genetic dependence of collateral mutations induced by translesion DNA synthesis,” *PLoS Genet*, 18(2), **2022**
- [6] B. Szikriszt et al.: A comparative analysis of the mutagenicity of platinum-containing chemotherapeutic agents reveals direct and indirect mutagenic mechanisms, *Mutagenesis*, 36(1), 75–86, **2021**
- [7] G. Gutiérrez-Venegas et al.: Effects of flavonoids on tongue squamous cell carcinoma, *Cell Biology International*, 44(3), 686–720, **2020**
- [8] D. H. Phillips et al.: DNA and protein adducts in human tissues resulting from exposure to tobacco smoke, *International Journal of Cancer*, 131(12), 2733–2753, **2012**
- [9] L. B. Alexandrov et al.: The repertoire of mutational signatures in human cancer, *Nature*, 578, 94–101, **2020**
- [10] L. B. Alexandrov et al.: Mutational signatures associated with tobacco smoking in human cancer, *Science*, 354(6312), 618–622, **2016**
- [11] D. H. Phillips: Mutational spectra and mutational signatures: Insights into cancer aetiology and mechanisms of DNA damage and repair, *DNA Repair*, 71, 6–11, **2018**
- [12] K. Osei-Sarfo et al.: The molecular features of tongue epithelium treated with the carcinogen 4-nitroquinoline-1-oxide and alcohol as a model for HNSCC, *Carcinogenesis*, 34(11), 2673–2681, **2013**
- [13] Y. Arima et al.: 4-Nitroquinoline 1-oxide forms 8-hydroxydeoxyguanosine in human fibroblasts through reactive oxygen species, *Toxicological Sciences*, 91(2), 382–392, **2006**
- [14] T. Nunoshiba et al.: Potent Intracellular Oxidative Stress Exerted by the Carcinogen 4-Nitroquinoline-N-oxide,” *Cancer Research*, 53(14), 3250-3252, **1993**
- [15] A. Lan et al.: Chemoprevention of oxidative stress-associated oral carcinogenesis by sulforaphane depends on NRF2 and the isothiocyanate moiety, *Oncotarget*, 7(33), 53502-53514, **2016**

- [16] G. C. de O. Zigmundo et al.: 4-nitroquinoline-1-oxide (4NQO) induced oral carcinogenesis: A systematic literature review, *Pathology Research and Practice*, 236, **2022**
- [17] G. Shishodia et al.: 4NQO enhances differential activation of DNA repair proteins in HPV positive and HPV negative HNSCC cells, *Oral Oncology*, 122, **2021**
- [18] D. Szüts: A mutagenesis mechanizmusai, MTA doktori értekezés, **2020**
- [19] D. J. Downes et al.: Characterization of the mutagenic spectrum of 4-nitroquinoline 1-oxide (4-NQO) in *Aspergillus nidulans* by whole genome sequencing, *G3(Bethesda)*, 4(12) 2483–2492, **2014**
- [20] Ye He et al.: BRCA1/Trp53 heterozygosity and replication stress drive esophageal cancer development in a mouse model, *PNAS*, 118, **2021**
- [21] H. Han et al.: 4-NQO induces apoptosis via p53-dependent mitochondrial signaling pathway, *Toxicology*, 230(2–3), 151–163, **2007**
- [22] K. Brüsehafer et al.: The clastogenicity of 4NQO is cell-type dependent and linked to cytotoxicity, length of exposure and p53 proficiency, *Mutagenesis*, 31(2), 171–180, **2016**
- [23] T. Suzuki et al.: The role of DNA polymerase ζ in translesion synthesis across bulky DNA adducts and cross-links in human cells, *Mutation Research*, 791–792, 35–41, **2016**
- [24] O. Pipek et al.: Fast and accurate mutation detection in whole genome sequences of multiple isogenic samples with IsoMut, *BMC Bioinformatics*, 18, 73, **2017**
- [25] S. Li et al.: Comprehensive Characterization of Oncogenic Drivers in Asian Lung Adenocarcinoma, *Journal of Thoracic Oncology*, 11(12), 2129–2140, **2016**
- [26] Genom Aggregation Database (gnomAD): <https://gnomad.broadinstitute.org/>