

Szegedi Tudományegyetem Természettudományi és Informatikai Kar

&

Szegedi Biológiai Kutatóközpont

Genetikai Intézet

CHRAC1-túltermelő tumorok lehetséges terápiás
támadáspontjának
azonosítása

37. OTDK Biológia Szekció

Vásárhelyi Rebeka

Molekuláris biológia MSc, II. évfolyam

Témavezető: Dr. Czibula Ágnes

Tudományos főmunkatárs, Egyetemi adjunktus

Szeged, 2024

1. Tartalom

2.	BEVEZETÉS.....	3
3.	IRODALMI ÁTTEKINTÉS	4
3.1	ATP-FÜGGŐ KROMATIN-ÁTRENDZŐ KOMPLEXEK	4
3.2	AZ ISWI CSALÁD KOMPLEXEI	5
3.3	CHAC1-POLE3 HETERODIMER JELLEMZÉSE	6
		7
3.4	ATR GÁTLÓSZEREK TERÁPIÁS LEHETŐSÉGEI	8
4.	CÉLKITŰZÉS.....	9
5.	ANYAGOK ÉS ESZKÖZÖK	10
5.1	ALKALMAZOTT TÁPKÖZEGEK, TÁPOLDATOK, ANTIBIOTIKUMOK.....	10
5.2	ALKALMAZOTT ENZIMEK.....	10
5.3	FELHASZNÁLT ELLENANYAGOK.....	10
5.4	A KÍSÉRLETEK SORÁN FELHASZNÁLT OLDATOK	11
5.5	PCR PRIMEREK	12
5.6	ALKALMAZOTT PLAZMIDOK	12
5.7	A KÍSÉRLETEK SORÁN HASZNÁLT SEJTVONALAK.....	13
6.	ALKALMAZOTT MÓDSZEREK.....	14
6.1	CHAC1 TÚLTERMELŐ STABIL SEJTVONAL LÉTREHOZÁSA FLP-IN T-REX RENDSZERREL.....	14
6.1.1	<i>pcDNA5/FRT/TO-CHAC1 plazmidkonstrukció előállítása</i>	14
6.2	EMLŐSEJT TENYÉSZTÉS.....	17
6.2.1	<i>Hygromycin érzékenység vizsgálata</i>	17
6.2.2	<i>„Host” sejtvonal kotranszfekciója X-fect-tel</i>	17
6.2.3	<i>Poliklonális szelekció</i>	18
6.2.4	<i>Sejtkultúrák fenntartása</i>	18
6.2.5	<i>Sejtek felolvasztása és fagyasztása</i>	18
6.3	A CHAC1 TÚLTERMELŐ U2OS SEJTVONAL JELLEMZÉSE	19
6.3.1	<i>RNS izolálása és átírása cDNS-sé</i>	19
6.3.2	<i>qPCR</i>	19
6.3.3	<i>Western blot</i>	19
6.4	SEJTEK TÚLÉLÉSI VIZSGÁLATA AZ ATR INHIBITOR KEZELÉS SORÁN.....	21
7.	EREDMÉNYEK ÉS KIÉRTÉKELÉSÜK.....	22
7.1	CHAC1 TÚLTERMELŐ STABIL SEJTVONAL LÉTREHOZÁSA	22
7.2	HYGROMYCIN ÉRZÉKENYSÉG VIZSGÁLATA	25
7.3	A CHAC1-TÚLTERMELŐ SEJTVONAL JELLEMZÉSE	26
7.4	POLE3-POLE4 WESTERN-BLOT.....	29
7.5	ATR GÁTLÓSZER IRÁNTI ÉRZÉKENYSÉG MEGHATÁROZÁSA	31

8. DISZKUSSZIÓ	34
9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	37
10. IRODALOMJEGYZÉK.....	38

2. Bevezetés

Több tanulmány és klinikai adat is kapcsoltba hozza a *CHRAC1* (Chromatin Accessibility Complex Subunit 1) amplifikációját a daganatképződéssel végbél-, tüdő- és mellrák esetén. Az adatok alapján a tüdőrákos betegeknél a tumorban a *CHRAC1* magas expressziója rossz prognózist jelent, ezért a *CHRAC1* ígéretes daganatterápiás célpont lehet a jövőben.

A *CHRAC1* a kromatinszerkezet szabályozásában résztvevő fehérje, ami a *POLE3*-hoz köt. A *POLE3* ugyanakkor a DNS polimeráz epsilon komplex-ben is megtalálható, ahol a *POLE4*-gyel együtt alkot dimert. A *POLE3* és *POLE4* knockout sejtek fokozott érzékenységet mutatnak a replikációs stresszre, ami rámutat azok fontos szerepére a replikációs folyamatok szabályozásában. Miután mind a *CHRAC1*, mind a *POLE4* a *POLE3* fehérjével alkot dimert, a *CHRAC1* fehérje mennyiségének változása hatással lehet a *POLE3*-*POLE4* dimer mennyiségére, és ezáltal a replikációs stresszválaszra.

A *CHRAC1* túltermelődés hatásait az általunk ismert szakirodalom szerint mások még nem vizsgálták. Kutatásunk célja egy *CHRAC1* fehérjét túltermelő sejtvonal létrehozása volt, amely segítségével tanulmányozható, hogy a *CHRAC1* expressziója hogyan befolyásolja a *POLE3*-*POLE4* dimer mennyiségét és ezen keresztül a replikációs stressz toleranciát.

A kísérletek során *CHRAC1*-et indukálható módon túltermelő stabil sejtvonalat hoztunk létre. A stabil transzfektáns sejtvonal létrehozásához szükséges *CHRAC1* cDNS-t tartalmazó plazmidkonstrukciót a SLIC klónozási technikával állítottuk elő, majd a pozitív klónokat kolónia-PCR-rel választottuk ki, és szekvenálással ellenőriztük. A létrehozott sejtvonalakban a *CHRAC1* indukálható túltermelését kvantitatív valós idejű PCR-rel és Western blottal validáltuk. Kimutattuk, hogy a *CHRAC1*-túltermelő sejtekben a *POLE4* expressziója szignifikánsan lecsökken, míg a *POLE3*-é növekszik, ami a különböző komplexek kompetitív módon történő összeszerelődését jelzi. Majd megvizsgáltuk a replikációs stresszt indukáló ATR gátlószer hatását a *CHRAC1*-túltermelő sejtek életképességére. A túlélési kísérlet azt mutatják, hogy a *CHRAC1* túltermelő sejtek fokozottan érzékenyek az ATR inhibitorokkal szemben.

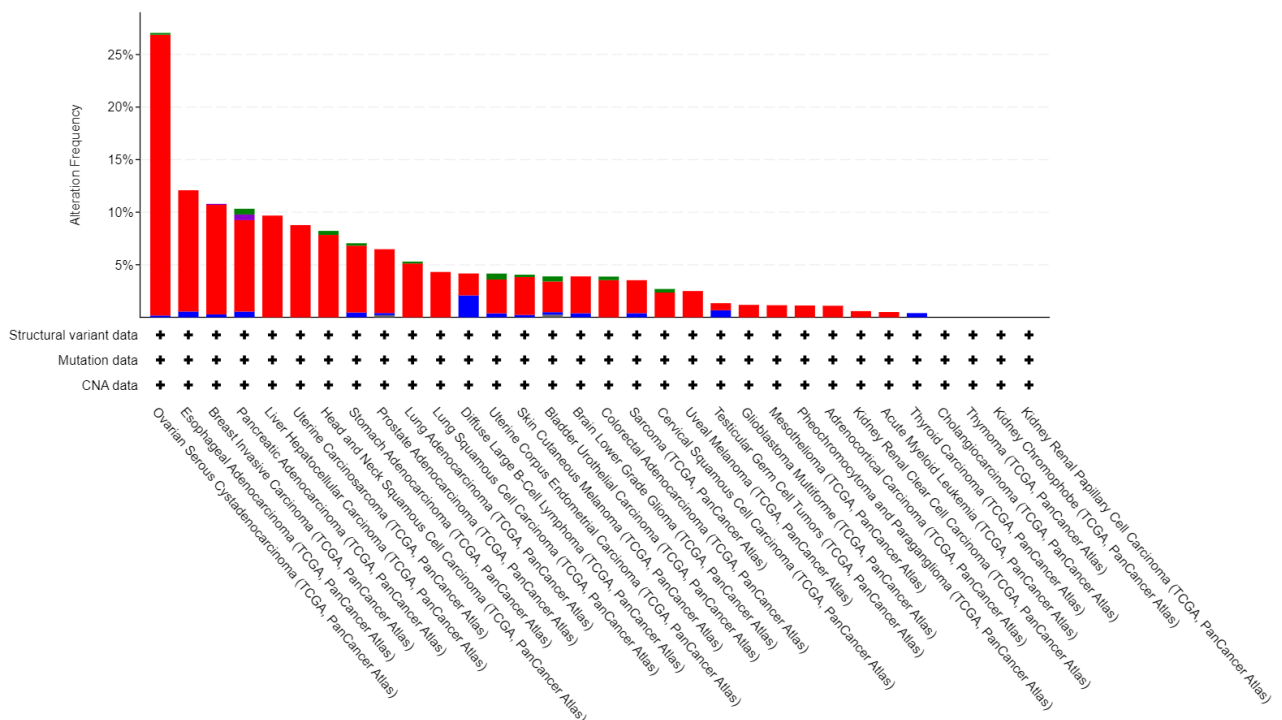
Az eredményeink alapján arra következtethetünk, hogy az ATR gátlószer alkalmazásának akár terápiás jelentősége is lehet a *CHRAC1*-túltermelő tumorok kezelésében.

3. Irodalmi áttekintés

3.1 ATP-függő kromatin-átrendező komplexek

Az ATP-függő kromatin-átrendező komplexek a kromatin organizáció első szintjének, az ún. gyöngyfűzér-struktúrájának nélkülözhetetlen szabályozó enzimei. Ezen komplexek közös tulajdonsága, hogy rendelkeznek egy konzervált ATPáz doménnal, amely ATP-hidrolízis révén energiát biztosít a nukleosómák eltávolításához, összeszereléséhez és csúsztatásához a DNS-szál mentén. Ezen kromatin-átrendező aktivitásuk révén fontos szerepet töltenek be a replikációban, transzkripcióban és a DNS hibajavító folyamatok szabályozásában.[1][2][3]

Az ISWI (Imitation SWItch) ATP-függő kromatin-átrendező komplexek abnormális kifejeződését és aktivitását több tumorban is kimutatták.[4] A családhoz tartozó CHRAC komplex egyik alegysége, a CHRAC1 (Chromatin Accessibility Complex Subunit 1) szerepet tölthet be egyes daganatok képződésében és progressziójában, amit jelez az abnormális kifejeződése számos tumortípus esetén (1. ábra).



1. ábra. *CHRAC1* gén érintettségének gyakorisága különböző ráktípusokban. A petefészekrákos esetek közel egyharmadára jellemző a *CHRAC1* abnormális amplifikációja.[7]

A TCGA (The Cancer Genome Atlas) adatbázis elemzései kimutatták, hogy a CHRAC komplex alegységei, az ACF1, CHRAC1 és POLE3 expressziója magas különböző

tumortípusokban, mint a nyelőcsőrák, hepatocelluláris karcinóma, emlőrák.[4] A CHRAC1-et továbbá driver génként azonosították mellrákban, ahol magas expressziója esszenciális a tumorsejtek osztódásához és életben maradásához.[5] Mindemellett a CHRAC1 fehérje emelkedett szintjét figyelték meg végbél- és tüdőrák szövetekben, továbbá azonosították a CHRAC1 gén egyik mutációját, a D121Y-öt, mely végbél rákra jellemző. [6][7][8]

Ezek az eredmények ígéretes daganatterápiás célponttá teszik a CHRAC1-et és így a rá irányuló kutatások hozzájárulhatnak a rákos betegségek megértéséhez és kezeléséhez.

3.2 Az ISWI család komplexei

Az ATP-függő kromatin-átrendező komplexeket négy családba sorolják a konzervált ATPáz doménjük függvényében: ISWI, CHD, SWI/SNF és INO80. Az ISWI család tagjai kiemelkedően fontos szerepet töltenek be a DNS-hibajavításban, ezáltal pedig a genom integritás és stabilitás fenntartásában. A DNS-károsodás típusának függvényében különböző hibajavító útvonalak aktiválódnak, az eddigiekben három DNS-hibajavító útvonal, a HR (homológ rekombináció), NHEJ (nem-homológ végillesztés) és NER (nukleotid kivágó javítás) szereplőjeként azonosították az ISWI komplexeket.[3]

Az ISWI-típusú ATPáz domént tartalmazó kromatin-átrendező komplexeket elsőként *Drosophila melanogaster* embriókból izolálták. Ezek a komplexek a NURF (Nucleosome Remodeling Factor), CHRAC (Chromatin Accessibility Complex) és ACF (ATP-utilizing Chromatin Assembly and Remodelling Factor).[9] A későbbiekben további négy ISWI komplexet találtak: WICH, NORC, RSF, CERF[3].

Az ISWI kromatin-átrendező komplexek központi egységei a SMARCA5 és SMARCA1 katalitikus aktivitással rendelkező fehérjék, melyek N-terminális ATPáz doménből és egy C-terminális szubsztrátfelismerő HSS doménből állnak. Az utóbbit a HAND, SANT és SLIDE aldomének alkotják, melyek az ATPáz domén aktivitásának és specifikitásának szabályozásában vesznek részt. Az ISWI komplexek nukleoszóma csúsztató aktivitással rendelkeznek, melyet „nucleosome sliding” -nak nevez az angol szakirodalom. Ezen aktivitásuk által beállítják a nukleoszómák sűrűségét a DNS-szál mentén, illetve szabályozzák a különböző faktorok (pl: transzkripció faktorok, DNS-hibajavító faktorok) hozzáférését a célszekvenciához. [3][9][10]

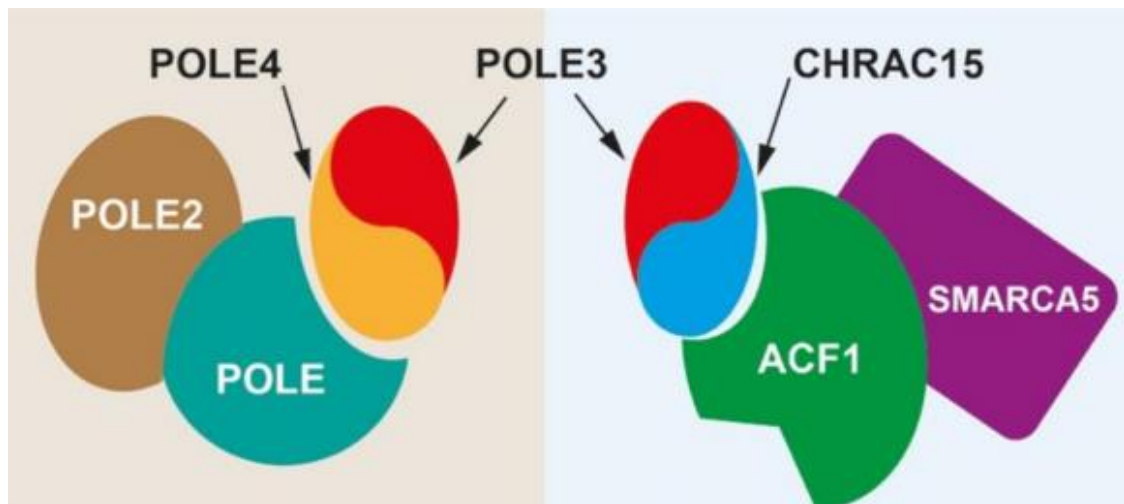
Az **ACF (ATP-utilizing chromatin assembly and remodelling factor)** önmagában is egy kromatin-átrendező komplex, mely a SMARCA5 és ACF1 fehérjékből áll. Az ACF1 alegység stimulálja a SMARCA5 működését, ezáltal pedig jelentősen nő a komplex nukleoszóma csúsztató aktivitása. Emellett az ACF1 egység szabályozó funkciót is ellát azáltal, hogy

meghatározza a SMARCA5 templátspecifitását, és a nukleoszóma csúsztatás irányát.[9][11] Az ACF komplex nélkülözhetetlen részét képezi a NHEJ és HR hibajavító útvonalaknak. Kettős szálú DNS törés bekövetkeztekor, az alegységei, a SMARCA5 és ACF1, egymástól függetlenül a törés helyénél felhalmozódnak ADP-ribosziláció függő módon. Továbbá az ACF komplex a heterokromatikus régiók replikációja során is fontos szerepet tölt be, azáltal, hogy átrendezi a kromatin struktúráját, amivel lehetővé teszi a replikációs apparátus haladását.[12]

Az ACF-hez kis méretű hiszton-fold fehérjék kapcsolódhatnak, ezáltal egy új funkcióval rendelkező komplex áll össze, melyet 1997-ben izoláltak először *Drosophila* embrióból és a **CHRAC (Chromatin Accessibility Complex)** elnevezést kapta[9][10]. A *Drosophila* CHRAC-ben az ISWI ATPáz-hoz kapcsolódik az Acf1 két hiszton-fold fehérjével, a CHRAC14-gyel és CHRAC16-tal [13]. Raymond és társai HeLa sejtek nukleáris extraktumából tisztították a humán CHRAC-et, és azonosították a *Drosophila* hiszton-fold fehérjéinek homológjait, melyek a molekulasúlyuknak megfelelően a CHRAC15 (másik nevén CHRAC1) és CHRAC17 elnevezést kapták.[14] A CHRAC1 és CHRAC17 hiszton-fold fehérjék dimert alkotva segítik az ACF1-ISWI egység nukleoszóma átrendező és összeszerelő aktivitását. Egyes feltételezések szerint, a CHRAC1/17 fehérjék részt vesznek a kettős szálú DNS törések javításában azáltal, hogy a helyszínre vonzzák és kötik az ACF1-et és a NHEJ egyik kulcsfaktorát, a KU heterodimer Li Lan és társai kísérletesen igazálták, hogy mind a SMARCA5, ACF1 és CHRAC1/17 szükséges be a NHEJ és HR hibajavító útvonalakhoz, ennek fényében a cikk szerzői úgy gondolják, hogy az ACF helyett inkább a CHRAC komplex vesz részt a DNS hibajavításban.[11]

3.3 CHRAC1-POLE3 heterodimer jellemzése

A CHRAC1 és POLE3 fehérjét 2000-ben azonosították elsőként Raymond és társai, a humán CHRAC kromatin-átrendező komplex részeként.[14] A két fehérje H2A-H2B típusú „histone fold” doménnel rendelkezik, melyen keresztül képesek a DNS-t kötni, illetve egymással heterodimert formálni. A CHRAC komplexben dimer formában van jelen a CHRAC1-POLE3. A POLE3 ugyanakkor a DNS polimeráz epsilon komplex-ben is megtalálható, ahol egy másik „histone fold” fehérjével, a POLE4-gyel alkot heterodimert [18]. A DNS polimeráz epsilon a DNS vezető száljának szintéziséért felel S-fázis alatt.[14]



2. ábra. A POLE3 fehérje két komplexben is megtalálható, a CHRAC-ben és a DNS polimeráz epszilon holoenzimben.[18]

A POLE3 fehérje élesztő ortológja (Dpb4) kettős szerepet tölt be replikáció során az epigenetikai öröklődésben, annak függvényében, hogy melyik komplex tagja. A DNS polimeráz epszilon részeként a heterokromatikus régiók átörökítéséhez járul hozzá. Ezt a POLE3-POLE4 dimer H3-H4 hiszton chaperon aktivitása révén teszi, mely által a replikáció-kapcsolt nukleoszóma összeszerelésben vesz részt.[15] A CHRAC komplex tagjaként az eukromatikus régiók átörökítésében vesz részt a Dpb4, azonban ennek pontos mechanizmusa még nincs feltárva.[16] A Dpb4 fehérje továbbá részt vesz a DNS károsodás kontrollpontjának aktiválásában. [17]

A DNS polimeráz epszilon holoenzim négy alegységből áll: a POLE 1-4. A POLE1 fehérje rendelkezik a polimeráz és a „proofreading” 3’-5’-exonukleáz aktivitással, míg a POLE3-POLE4 „histone fold” fehérjék kötik a komplexet a DNS-hez. *S. cerevisiae*-ben detektálták, hogy a POLE3 és POLE4 ortológjai (Dpb4 és Dpb3) nem esszenciálisak az életben maradáshoz, azonban hiányuk megnövelte a mutációs rátát Dpb4-Dpb3 deléciós mutáns törzsekben. Bizonyos feltételezések szerint ennek háttérében a DNS polimeráz epszilon-DNS kötés meggyengülése áll, mely a repliszóma defektes működését eredményezi, viszont nem vezet a replikációs villa megállásához és nem vált ki replikációs stresszt. Replikációs stressz fennállásakor azonban a POLE3-POLE4 nélkülözhetetlenné válik a sejtek túléléséhez.[17] [18][19]

3.4 ATR gátlószerek terápiás lehetőségei

Az ATR (ataxia telangiectasia and Rad3-related) fehérje a G2/M kontrollpont egyik központi kináza, melyet egyes szálú DNS törések aktiválnak, és nélkülözhetetlen szerepet tölt be a replikációs stressz kezelésében és tolerálásában.[21][22] A DNS törések akadályozzák a replikációs apparátus haladását a DNS szálon, ezért a replikációs villa lassulását vagy megállását vonják maguk után. Ezt az állapotot replikációs stressznek nevezi a szakirodalom.[20] Az ATR fehérje replikációs stressz esetén leállítja a sejtciklust, megakadályozva a sejtek korai mitózisba lépését, mely replikációs katasztrófához és sejthalálhoz vezetne. Emellett gátolja a replikációs origók tüzelését és stabilizálja a replikációs villát. Ezen létfontosságú funkciói az ATR fehérjét ígéretes tumorterápiás célponttá teszik.[22][24]

Az legelső ATR inhibitor közel két éve került felfedezésre, ma már pedig két ígéretes ATR inhibitor, az AZD6738 és VX-970, I/II fázisú klinikai tesztek alatt áll.[23] A klinikai vizsgálatokat nyilvántartó webhely (www.clinicaltrials.gov) alapján az AZD6738 (Ceralasertib) gátlószerezrel 8 befejezett, 16 most futó, aktív és 27 szervezés alatt álló, javarészt II fázisú vizsgálat folyik napjainkban. Kicsit kevesebb számú klinikai tesztelés van folyamatban a Berzosertibbel (VX-970) 4 befejezett és 13 aktív klinikai fázis I/II vizsgálatot tartanak számon. A rák kialakulásában gyakran DNS-hibajavító és sejtciklus szabályozó gének mutációi vesznek részt, melyek megzavarják a replikáció folyamatát és replikációs stresszt váltanak ki.[22] Magas replikációs stresszel rendelkező ráksejtekkel szemben alkalmazhatóak az ATR inhibitorok monoterápiában.[20]

Ígéretes terápiás eljárás az ATR inhibitorok PARP inhibitorokkal való kombinált alkalmazása, mely jelenleg klinikai tesztek alatt állnak és 2 befejezett, 3 aktív és 8 toborzás alatt álló klinikai kipróbálást jelez a ClinicalTrials.gov adatbázis. Az ATR kináz gátlása jelentősen növeli a PARP inhibitorok citotoxicitását azáltal, hogy lehetővé teszi az éretlen, hibás sejtek mitózisba lépését, mely replikációs katasztrófát és a mitózisos defektet eredményez.[22] A kombinált terápia egyik hátulütője, hogy kellemetlenebb mellékhatásokat okoz. A mellékhatások csökkenthetőek olyan genetikai változatok azonosításával, melyek egyes tumorfajtákra fogékonyabbá és szelektívebbé teszik a kezelést.

4. Célkitűzés

Jelenleg kutatócsoportunk egyik fő kutatási területe a DNS polimeráz epszilon és CHRAC komplex hiszton-fold fehérjéinek vizsgálata és újabb terápiás eljárások fejlesztése DNS-javítást célzó inhibitorok alkalmazásával. Munkám célja egy CHRAC1 fehérjét túltermelő sejtvonal létrehozása volt annak érdekében, hogy megvizsgálhassuk, hogyan befolyásolja a CHRAC1 expressziója a POLE3-POLE4 dimer mennyiségét és a replikációs stressz toleranciát. A CHRAC1-túltermelő sejtvonal előállításához a Flip-In T-REx rendszer módszerét választottuk. Ehhez a következő vizsgálatokat terveztük elvégezni:

1. Létre kívántuk hozni a pcDNA5/FRT/TO-CHRAC1 plazmidkonstrukciót, ennek érdekében a *CHRAC1* gén pcDNA5/FRT/TO expressziós vektorba való integrálását terveztük elvégezni.
2. A pcDNA5/FRT/TO-CHRAC1 plazmidkonstrukció és a pOG44 Flp rekombinááz expressziós vektor kotranszfekciójával a CHRAC1-et indukálható módon termelő U2OS sejtvonal megalapítását.
3. Terveztük a létrehozott CHRAC1-túltermelő sejtvonal jellemzését, CHRAC1 kifejeződésének vizsgálatát.
4. Célunk volt annak vizsgálata, hogy a CHRAC1 expressziója hogyan befolyásolja a POLE3-POLE4 dimer mennyiségét.
5. Terveztük a CHRAC1-túltermelő sejtvonal ATR gátlószerekkel szembeni érzékenységét meghatározni.

5. Anyagok és eszközök

5.1 Alkalmazott tápközegek, tápoldatok, antibiotikumok

Luria-Bertani (LB) tápoldat/táptalaj 100 µg/ml Ampicillin-nel kiegészítve: A tápközeget a transzformáns 2T1 *E. coli* sejtek szelekciójához, illetve mini és midi prep készítéséhez használtuk.

SOB tápoldat: 2T1 *E.coli* sejtek transzformálása során, a hősokkot követő egy órás inkubáció alatt használtuk.

Transzfekciós médium (Opti-MEM): U2OS „host” sejtvonala kotranszfekciója során volt alkalmazva.

DMEM/10%FCS 250 µg/ml Hygromycin-nel és 4 µg/ml Blastidin-nel kiegészítve: Stabil klónok poliklonális szelekciójához és fenntartásához alkalmaztuk.

Doxiciklin: CHRAC1 expresszió indukálás során 1 µg/ml végkoncentrációban adtuk a sejt kultúrához.

Túlélési kísérletek során alkalmazott tápoldatok:

- DMEM/10%FCS ATR inhibitorral (VE 821, Selleck Chemicals) kiegészítve a következő végkoncentrációkban: 5, µM, 2,5 µM, 1,25 µM, 0,63 µM, 0,31 µM, 0,16 µM

CHRAC1 expresszió indukálása során 1 µg/ml végkoncentrációban Doxiciklin-nel egészítettük ki.

5.2 Alkalmazott enzimek

- Q5® High-Fidelity DNS Polimeráz (NEB, M0491S)
- 20 U/ml DnpI enzimet (NEB, R0176S)
- 5 U/µl T4 DNS Polimeráz (ThermoFisher, EP0061)
- GoTaq® DNS Polimeráz (Promega, M3001)
- Pierce Universal Nuclease for Cell Lysis (ThermoFisher, 88700)
- RevertAid reverz transzkriptáz (ThermoFisher, EP0441)

5.3 Felhasznált ellenanyagok

A Western blot során felhasznált ellenanyagokat az 1. táblázat foglalja össze:

Antigén	Származási organizmus	Jelölés	Gyártó	Katalógusszám	Hígítás mértéke
POLE3	nyúl	-	ABclonal	A6469	1:1000

POLE4	nyúl	-	ABclonal	A9882	1:1000
CHRA1	nyúl	-	ABclonal	A14896	1:1000
GAPDH	nyúl	-	Proteintech	10494-1-AP	1:5000
nyúl	kecske	HRP	ThermoFisher	G-21234	1:10000

1. táblázat. Western blot során alkalmazott ellenanyagok

5.4 A kísérletek során felhasznált oldatok

- SDS denaturáló lízis puffer:

Anyagok:	Végkoncentráció:	10 ml-hez:
10% SDS	4%	4 ml
1 M Tris-HCl, pH=7,4	50 mM	500 µl
1 M MgCl ₂	4 mM	40 µl
4 M NaCl	100 mM	250 µl
MQ víz		5,21 ml

2. táblázat. SDS lízis puffer komponensei

- 13%-os akrilamid gél:

Anyagok:	Összetevők 2 gél-hez:
MQ víz	6,5 ml
1,5 M Tris, pH=8,8	4 ml
akrilamid	5,2 ml
10% SDS	160 µl
10% APS	160 µl
TEMED	16 µl

3. táblázat. táblázat: 13%-os akrilamid gél komponensei

- 6%-os akrilamid gél:

Anyagok:	Összetevők 2 gél-hez:
MQ víz	3,48 ml
0,5 M Tris pH=6,8	1,5 ml
akrilamid	0,9 ml
10% SDS	60 µl
10% APS	60 µl
TEMED	6 µl

4. táblázat. 6%-os akrilamid gél komponensei

- 1% SDS futtató puffer: 28.8 g Glycine, 6.04 g Tris alap, 20 ml 10% SDS
- Transzfer puffer: 100 ml 10x Transzfer puffer, 100 ml metanol, 800 ml MQ víz
- 1x TBS-Tween puffer: 10xTBS puffer, 0,05% TWEEN20
- 5%-os tejes telítő: 12 ml TBS-Tween puffer, 0,6 g zsírmentes tejpor
- PBS oldat: (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, and 2 mM KH₂PO₄, pH7.4).
- Tripszin EDTA (0.05% tripszin) (Biosera)

5.5 PCR primerek

A vizsgálatok során alkalmazott PCR primereket az 5. táblázat foglaltam össze:

1.	SlicCHRAC1FOR	5'-AAGCTTGGTACCGAGCTCAGATCTCGAGATGGCGGACG-3'
2.	SlicCHRAC1StopREV	5'-CCACACTGGACTAGTGGATTCAGGAGTCAGCTTCATCATGG TCACTTTC-3'
3.	SlicpcDNAFOR	5'- GATCCACTAGTCCAGTGTGGTG -3'
4.	ori rev	5'-CACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGC-3'
5.	<u>SlicpcDNAREV</u>	5'-CGAGCTCGGTACCAAGCTTAAG -3'
6.	<u>ori forw</u>	5'-GCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTG-3'
7.	CMV for	5'- CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG- 3'
8.	CHRAC1 colonyRev2	5'- ACTGCCGTGTCTGTAGGAATAGGTG- 3'
9.	qPCR-HsCHRAC1for	5'- GAGGTGTCCAGCATCAACCA- 3'
10.	qPCR-HsCHRAC1rev	5'- TTCCACTGCCGTGTCTGTAG - 3'
11.	qPCR-HsRPL27for	5'- CGCAAAGCTGTCATCGTG - 3'
12.	qPCR-HsRPL27rev	5'- GTCACCTTGCGGGGGTAG - 3'

5. táblázat. PCR primerek

Az inszert amplifikálása a pCHRAC1-EGFP (1222) plazmidról történt az 1-2. primerek felhasználásával. A pcDNA5/FRT/TO vektor előállítása során két különálló PCR-rel amplifikáltuk a teljes szekvenciát (vektor1, vektor2). A vektor1 amplifikálásához a 3-4., míg a vektor2-höz az 5-6. primerpárt alkalmaztuk. A kolónia PCR során a 6-7. primereket alkalmaztuk a klónok tesztelésére. A qPCR-ben az expressziós szintek meghatározásához a CHRAC1-hez a 9-10., míg a háztartási génhez (RPL27) a 11-12 primerek voltak alkalmazva.

5.6 Alkalmazott plazmidok

- pCHRAC1-EGFP (1222): a laborban korábban létrehozott plazmid.

- pcDNA5-FRT-TO
- pcDNA5-FRT-TO CHRAC1
- pOG44: Flp rekombinááz expressziós vektort.

5.7 A kísérletek során használt sejtvonalak

- U2OS Flp-In T-REx „host”: Két plazmid transzfektálásával lett létrehozva: A pFRT/lacZeo egy specifikus FRT-helyet hordoz, míg a pcDNA6/TR plazmid a Tet represszort fejezi ki.
- U2OS Flip-In T-REx CHRAC1: Átalunk létrehozott sejtvonal, mely Hygromycin és Blasticidin rezisztens.
- U2OS Flip-In T-REx empty vector: Átalunk létrehozott sejtvonal, melybe az üres pcDNA5/FRT/TO plazmid volt transzfektálva.
- 2T1 *E. coli*

6. Alkalmazott módszerek

6.1 CHRAC1 túltermelő stabil sejtvonal létrehozása Flp-In T-REx rendszerrel

6.1.1 pcDNA5/FRT/TO-CHRAC1 plazmidkonstrukció előállítása

6.1.1.1 Polimeráz láncreakció

A *CHRAC1* gént tartalmazó inszert PCR reakcióval lett előállítva, mely során a 4.3. és 4.6. fejezetben megadott primerek és templát plazmidok voltak használva. Az 50 µl-es PCR reakció a következő komponenseket tartalmazta: 1 ng tempát plazmid, 2,5-2,5 µl 10 µM primer, 10 µl 5X Q5 puffer (NEB, B9027S), 1 µl 10 mM dNTP (NEB, N0447S), 0,5 µl Q5® High-Fidelity DNS Polimeráz (NEB, M0491S) és nukleázmentes víz.

Alkalmazott PCR program:

Elődenaturáció: 98°C, 30 mp

30x: Denaturáció: 98°C, 5 mp

Hibridizáció: 63°C, 10 mp

Extenzió: 72°C, 10 mp (30 ciklus)

Végső extenzió: 72°C, 2 perc

A pcDNA5/FRT/TO vektort két részletben amplifikáltuk (vektor1, vektor2) két külön PCR reakcióban. A PCR reakcióhoz a 4.3. fejezetben megadott primerek voltak használva. Az 50 µl-es PCR reakciók a következő komponenseket tartalmazták: 1 ng templát plazmid, 2,5-2,5 µl 10 µM primer, 10 µl 5X Q5 puffer (NEB, B9027S), 1 µl 10 mM dNTP (NEB, N0447S), 0,5 µl Q5® High-Fidelity DNS Polimeráz (NEB, M0491S), nukleázmentes víz.

Alkalmazott PCR program:

Elődenaturáció: 98°C, 30 mp

30x: Denaturáció: 98°C, 5 mp

Hibridizáció: vektor1*: 68°C, 10 mp

vektor2*: 70°C, 10 mp

Extenzió: 72°C, 1,5 perc

Végső extenzió: 72°C, 2 perc,

A T_m-ek a NEBT_m Calculator-ral voltak kiszámolva. A PCR termékekből 5 µl-t 1%-os agaróz gélen futtattunk a reakció ellenőrzéseként.

6.1.1.2 Agaróz gélelektroforézis

Agaróz gélelektroforézissel a PCR reakciók sikerességét ellenőriztük. A vizsálatokhoz 1% agaróz gélét készítettünk. Az agarózt TBE pufferben oldottuk fel forralással. A DNS láthatóvá tétele céljából etídium-bromidot adtunk a gélhez 1000x-es hígításban. A mintákat konstans ~100 V-on futtattuk. Molsúly markerként a Lambda DNA/HindIII (Thermo Scientific, SM0101) 1 kb-os létrát alkalmaztuk. Futtatást követően a gél UV fény alatt vizsgáltuk.

6.1.1.3 Restriktációs emésztés DpnI-gyel

A templát plazmid eliminálása érdekében 1 µl 20,000 U/ml DpnI enzimet (NEB, R0176S) adtunk a PCR termékekhez, majd 37 °C-on 1 órát inkubáltuk a mintákat.

6.1.1.4 PCR termék tisztítása

A PCR termékeket a NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kittel (Macherey-Nagel) a hozzá tartozó protokolt használva tisztítottuk. A PCR fragmentumok mennyiségét NanoDropp Spektrofotométerrel határoztuk meg.

6.1.1.5 Szekvencia- és Ligálás-független klónozás (SLIC)

	<i>Kiindulási koncentráció [ng/µl]</i>	<i>Reakcióhoz adott mennyiség [µl]</i>	<i>Végső koncentráció [ng/µl]</i>
Vektor1 (2555 bp)	20,2	4,4	8,8
Vektor2 (2611 bp)	26,6	3,4	9,0
Inszer (440 bp)	24,5	0,6	1,5
10X Fermentas puffer		1	
T4 DNS pol (5 U/µl, ThermoFisher)		0,5	
H ₂ O		kiegészítés 10 µl-re	

6. táblázat. SLIC reakció komponensei

A vektor1, vektor2 fragmentumok és CHRAC1 gént tartalmazó inszer 1:1:1 molekulaarányban lettek összemérve a SLIC reakcióhoz. Ennek megfelelően a SLIC reakció a

6. táblázat feltüntetett komponenseket tartalmazta: A reakció összemérését követően az elegy 2,5 percet szobahőmérsékleten volt tartva, majd 10 percre jégre téve a reakció leállításához.

6.1.1.6 Kompetens *E. coli* sejtek transzformálása

200 µl kompetens 2T1 *E. coli* sejtekhez 1-5 µl-t lett hozzáadva a SLIC reakcióelegyből, majd 20 percet jégen inkubálódtak. Ezután 40 másodpercig 42 °C-on hő sokknak tettük ki a baktériumokat, majd 2 percet jégre helyeztük. Ezt követően 800 µl SOB táoldatot adtunk 200 µl sejthez és 1 órát, 37 °C-on inkubáltuk rázatás mellett. Végezetül ampicillinnel kiegészített LB lemezekre szélesztettük a sejteket 1x-es, 10x-es és 100x-os hígításban és 37 °C-os termosztátban növesztettük ~16 órát.

6.1.1.7 Kolónia PCR és emésztés restriktációs enzimekkel

A klónozás kolónia PCR-rel lett ellenőrizve. A baktérium telepekből fogpiszkálóval PCR csövekbe juttattunk egy kis mennyiséget. A kolónia PCR- a 4.5. fejezetben megadott primerek használatával lett kivitelezve. A reakció a következő komponensekből állt: templát baktérium minta, 10-10 pmol primer, 4 µl 5x Green GoTaq Flexi reakció puffer (Promega, M8911), 1 µl 25 mM MgCl₂ (Promega, A3511), 0,5 µl 10 mM dNTP (Promega, U1515), 0,1 µl GoTaq® DNS Polimeráz (Promega, M3001), MQ víz. A 20 µl-es reakciókat vortexeltük, majd a PCR készülékbe helyeztük.

Alkalmazott PCR program:

Elődenaturáció:	95°C, 2 perc
30x:	Denaturáció: 95°C, 30 mp
	Hibridizáció: 60°C, 30 mp
	Extenzió: 72°C, 45 mp
Végső extenzió:	72°C, 5 perc
	4 °C, ∞

A PCR termékeket 1 %-os agaróz gélen futtattuk. A gélekép elemzésével három minta ki választottunk ki és küldtük el szekvenáltatni.

6.1.1.8 Mini prep készítés és plazmid tisztítás

A transzformálást követően kinőtt baktérium telepek fogpiszkálóval le lettek oltva 2-2 ml ampicillines LB tápfolyadékba, majd 37°C -on rázatás mellett egy éjszakán át voltak növesztve. A felnőtt miniprepekből a Macherey-Nagel cég által forgalmazott Plasmid Extraction Mini Kit-tel plazmidot tisztítottunk a hozzá tartozó protokolnak megfelelően. A plazmid mennyiségét NanoDrop Spektrofotométerrel határoztuk meg.

6.1.1.9 Midi prep készítés és plazmid preparálás

A pozitív klónokból midi prep lett készítve. Ehhez, a kész mini prepekből 100-100 µl volt leoltva 100 ml ampicillines LB médiumba, majd egy éjszakán át 37 °C-on voltak a sejtek növesztve rázatás mellett. Ezt követően plazmidot tisztítottunk a Macherey-Nagel cég által forgalmazott Plasmid Extraction Midi Kit-tel a hozzá tartozó protokollnak megfelelően.

6.2 Emlőssejt tenyésztés

6.2.1 Hygromycin érzékenység vizsgálat

Annak érdekében, hogy meghatározzuk a stabil klónok szelekciójához szükséges optimális Hygromycin koncentrációt, tesztet végeztünk a U2OS Flip-In T-REx „host” sejteken. A sejtek 6 lyukú lemezre lettek kiültetve úgy, hogy ~25%-os konfluenciával rendelkezzenek. A sejteket Hygromycinnel kiegészített DMEM/10% FCS médiumban növesztettük. A Hygromycin koncentráció lyukanként eltért, a következő koncentrációk mellett teszteltük a sejtek növekedését: 150, 200, 250, 300, 350, 400 mg/ml Hygromycin B. A 4. napon lett médium cserélve a sejteken.

6.2.2 „Host” sejvonal kotranszfekciója X-fect-tel

A transzfekcióhoz ~70%-os konfluenciával rendelkező lemezeket használtunk. Egy órával a transzfekció előtt az antibiotikumos médium el lett távolítva a lemezekről, és a sejtek 2x át lettek mosva PBS-sel. Ezután transzfekciós médium lett a sejtekhez adva. 300 µl X-fect reakció pufferhez 18 µg pOG44 és 2 µg pcDNA5/FFT/TO-CHRA1 plazmidot adtunk, majd 5 mp-et vortexeltük az elegyet. Kontrollként az üres pcDNA5/FRT/TO plazmidot használtuk. További 300 µl reakció pufferhez 6 µl X-fect polimert adtunk. A két elkészített oldatot

elegyítettük, majd 10 percet szobahőmérsékleten inkubáltuk. Cseppenként, egyenletesen elosztatva a lemezen, a teljes 600 µl-es mennyiség hozzá lett adva a sejtekhez.

6.2.3 Poliklonális szelekció

A transzfekció után 48 órával a sejteket leemésztettük és áttettük 5 db 10 cm átmérőjű sejtenyésző csészébe, hogy a konfluenciájuk ne legyen nagyobb 20%-nál. A stabilan transzfektálódott klónokat 250 µg/ml Hygromycinnel és 4 µg/ml Blastidinnel kiegészített médiumban szelektáltuk. Az egy sejtől kinőtt telepek külön növesztésére nem volt szükséges, mivel a pcDNS5/FRT/TO-CHRA1 egyazon lokuszon épül be a genomba minden egyes klónnál, ezáltal izogén klónok keletkeznek.

6.2.4 Sejtkultúrák fenntartása

A kísérletek ideje alatt a U2OS sejtek szövettenyésző kultúrában vannak DMEM + 10% FCS médiumban, 37 °C-on, 5%-os CO₂ mellett a termosztátban, és 2-3 naponta osztjuk őket. Passzálás során a letapadt sejteket 0.5%-os trypsin oldattal kezeltük. Miután a sejtek felváltak a tenyésztőcsésze aljáról, 2/3-át eltávolítottuk és csak az 1/3-át helyeztük vissza egyenletesen elosztatva. Ezután friss médiumot (DMEM/10% FCS) adtunk a lemezhez, a megfelelő antibiotikum kiegészítéssel.

6.2.5 Sejtek felolvasztása és fagyasztása

A sejtek tárolása hosszú távon folyékony nitrogénben történik. A munkához szükséges sejtek nitrogén tartályból való kivételüket követően 37 °C-os vízfürdőre lettek helyezve míg felolvadtak. A fagyasztó médium eltávolítása végett, a felolvasztott sejtek 9 ml DMEM/10% FCS médiumban le lettek centrifugálva (10 perc, 1400 rpm), majd a médium le lett szívva. A sejteket 2 ml friss médiumban felfuszpendáltuk, majd lemezre kiültettük. A sejtek felhasználása előtt vártunk 2-3 passzálást, addig a sejtek osztódtak és magukhoz tértek.

Fagyasztás előtt a sejtek fel lettek trypsinezve, majd ~6 ml médiumban le lettek centrifugálva (10 perc, 1400 rpm). A fugalást követően a régi médium le lett szívva és a sejtpellet újra lett szuszpendálva fagyasztó médiumban. A fagyasztó médium összetétele a következő: 900 µl DMEM/10% FCS +100 µl DMSO. A DMSO vortexelés közben cseppenként lett a médiumhoz adagolva. A csövekbe 1-1 ml sejtes médium került, majd izopropanolos tartályban -80 °C -ra lettek eltelve. 24 óra elteltével a sejtek át lettek helyezve nitrogénbe.

6.3 A CHRAC1 túltermelő U2OS sejtvonal jellemzése

A vizsgálatokhoz U2OS Flip-In T-REx CHRAC1 és a U2OS Flip-In T-REx empty sejteket ültettünk ki két-két lemezre DMEM/10% FCS médiumban. Egy 3 cm átmérőjű lemezre $2,5 \times 10^5$ sejt került kiültetésre. 24 órával a kiültetést követően egy-egy lemezen mindkét sejttypusból Doxiciklinnel indukáltuk a CHRAC1 expresszióját. A médium 1 µg/ml Doxiciklint tartalmazott. 24 óra elteltével begyűjtöttük a sejteket.

6.3.1 RNS izolálása és átírása cDNS-sé

A különféle sejtvonalakból RNS-t izoláltunk a NucleoSpin RNA nevezetű RNS izoláló kittel (Macherey-Nagel) a hozzá tartozó protokollt követve. A tisztított RNS mennyisége NanoDrop spektrofotométerrel lett meghatározva.

A cDNS átíráshoz RevertAid First Strand cDNA Synthesis kittet (Thermo Scientific, K1621) használtuk, a következő komponenseket mértük össze: 1-1 µl Random Hexamer Primer és Oligo(dT)₁₈ Primer, 1 µl RiberLock RNáz inhibitor, megfelelő mennyiségben RNáz-mentes víz, 1 µg RNS, 6 µl puffer, 3 µl 10 mM dNTP, 1 µl RevertAid reverz transzkriptáz. A következő reakciókörülmények mellett ment a reakció végbe a PCR készülékben: 1: 70 °C, 5 perc, 2: 25 °C, 5 perc, 3: 42 °C 59 perc, 4: 70 °C, 10 perc, 5: 4 °C ∞.

6.3.2 qPCR

A cDNS-t tartalmazó mintákat 20x-ra hígítottuk, majd a következő qPCR reakciót mértük össze: 2,5 µl 20x cDNS, 2,5 µl primer mix, 5 µl master mix (SYBR for CFX). 200 µl primer mix komponensei: 28-28 µl 10 µM forward és reverse primer, 144 µl nukleázmentes víz. Két primer párral végeztük a vizsgálatot: HsRPL27, HsCHRAC1 (4.5. fejezet). A mérés a Rotor-Gene Q qPCR készülékkel történt, a következő reakciókörülmények mellett: 1: 95 °C, 5 perc, 2. 30 ciklus: 95 °C, 15 másodperc, 60 °C 15 másodperc, 72 °C 30 másodperc, 3: 60°C-99 °C közt 1 °C –onként emelkedő hőmérséklet. A 3. lépésben az amplikon szálszétválását detektáltuk. A Ct értékeket a Rotorgene Q (software version 2.3.5 Build:1) program segítségével határoztuk meg és a Livak [25] módszer alkalmazásával analizáltuk az eredményeket.

6.3.3 Western blot

A CHRAC1 fehérjekifejeződését Western blot-tal vizsgáltuk.

Minták előkészítése: A sejtek feltárása 4%-os SDS lízis pufferrel (4.4. fejezet) történt, melyhez alkalmazás előtt 2,5 U Pierce Universal Nuclease for Cell Lysis (ThermoFisher, 88700) lett hozzáadva. A sejtekről először el lett távolítva a médium, majd 2x át lettek mosva PBS-sel. A lízis pufferből 40 µl lett hozzáadva a sejtekhez és sejtkaparó segítségével összegyűjtve reakciócsövekbe. NanoDrop Spektrofotométerrel OD 280-on mért abszorbancia értékek alapján egységes koncentrációra állítottuk be az összes mintát, majd hozzáadtunk 4x-es Laemmli puffert. A mintákat forralással denaturáltuk 5-10 percen keresztül 95 °C-on

SDS-poliakrilamid gélelektroforézis: A futtatás során 13%-os szeparáló gél és 6%-os tömörítő gél készítettünk, az ehhez szükséges mennyiségeket a 4.4 fejezetben tüntettem fel. A mintákat denaturálás után vittük fel a gélre. A következő markert használtuk: PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific, 26619). A futtatás 1% SDS futtató pufferben (4.3. fejezet) 110 V-on történt 1-2 órán keresztül.

Fehérjetranszfer: A blotting „szendvics” összeállítása során először transzferpufferbe áztattuk a kazetta szivacsait, a szűrőpapírokat és a Protran nitrocellulóz membránt, majd a kazetta pozitív oldalára helyeztük a következő sorrendben: 2 db szivacs, 2 db 8x9-es szűrőpapír, nitrocellulóz membrán, gél, 2 db szűrőpapír, 2 db szivacs. A kazettát összezárva a transzfer tankba helyeztük, melybe transzferpuffert töltöttünk (4.3. fejezet). Konstans 100 mA-en, 4 °C-on történt a blottolás 16 órán keresztül.

Immunodetekció: A transzfert követően a membrán 2%Ponceau-festékkal lett kezelve, majd a felesleges festéket TBS-Tween pufferes mosással eltávolítottuk. A membrán blokkolása 5%-os tejben történt, mely során 1 órát himbára helyeztük egy lefedett edényben. Ezután hozzáadtuk az elsődleges ellenanyagot a membránhoz, melyet 5%-os tejben hígítottunk és 1,5 órát inkubáltuk himbán. Az elsődleges ellenanyagokat és az alkalmazott hígítást az 1. Táblázatban tüntettem fel. Ezután a membránokat 3x10 percig TBS-Tween oldatban mostuk. A mosást követően hozzáadtuk a másodlagos antitesteket is a membránhoz és 1-1,5 órán keresztül inkubáltuk enyhén rázatva. Ezután ismét 3x10 perces TBS-Tween-nel való mosás következett.

A detektálás során kemilumineszcens szubsztrát kittet használtunk, a következő két reagenssel: Peroxidáz oldatot (Thermosciencific, REF: 1863096) és Luminol enhanszert (thermosciencific, REF: 1863096). A HRP-konjugált másodlagos antitest a luminolt hidrogénperoxidáz jelenlétében átalakítja termékké, közben kemilumineszcens jel keletkezik. A detektálás előtt 1:1 arányban összemértük a két reagenst, majd eloszlattuk a membránon. A

kemilumineszcens jelet az ALLIANCE Q9 képalkotó rendszer (UVITEC) segítségével detektáltuk.

6.4 Sejtek túlélési vizsgálata az ATR inhibitor kezelés során

A kísérletek során az ATR inhibitor hatását vizsgáltuk a U2OS Flip-In T-Rex CHAC1 stabil sejtvonal életképességére. 96 lyukú lemezre soronként 50 µl DMEM/10%FCS-ben ráértük az ATR inhibitor a következő végkoncentrációkban: 5, µM, 2,5 µM, 1,25 µM, 0,63 µM, 0,31 µM, 0,16 µM. Ezután lyukanként 1000-1000 sejtet adtunk hozzá 50 µl DMEM/10%FCS -ben. Két sejtípussal végeztük a vizsgálatot: U2OS Flip-In T-Rex CHAC1 és U2OS Flip-In T-Rex empty vector. Egy-egy sejtípusból 24 Doxiciklinnel kezelt és 24 kezeletlen lyukat igényelt a kísérlet, ezért 60 lyukra számoltuk ki a sejteket. Mindkét sejtvonalból 6×10^4 sejtet mértünk ki 3 ml médiumban. melyet ketté osztottunk és az egyik feléhez 1000x-es hígításban hozzámértük a Doxiciklint. Ezután a megfelelő oszlopokba 50-50 µl-enként lettek kimérve a sejtek. Az élő sejtszámot automatizált sejtszámláló készülékkel (BioRAD TC1) határoztuk meg, mely során 10 µl-t kivettünk a tripszinezett tenyészetből és 1:1 arányban vegyítettük 0.4%-os tripánkék festékkel. A sejt kultúrát egy héten keresztül növesztettük, és a 3. napon cseréltünk médiumot. A sejtek túlélését Resazurin teszttel határoztuk meg. A módszer a sejtek metabolikus aktivitását jelző Resorufin mennyiséget méri, mely a Resazurin festék sejten belüli redukciójával keletkezik mitokondriális enzimek közreműködésével. A teszt során 100 µl 25 µg/ml Resazurin oldatot (Leibovitz médium + 1,8 ml 150 µg/ml Resazurin mértünk lyukanként a sejt kultúrára, majd 25 percen keresztül inkubáltuk 37 °C -os termosztátban, fóliával lefedve. A keletkező Resorufin abszorbanciáját Biotek Synergy H1 mikrotiter olvasó segítségével mértük 530/590 nm-es filtert használva. A három párhuzamos mérés átlagos fluoreszcencia értékeit ábrázoltuk és t-tesztet használtunk a szignifikancia vizsgálatára. Az IC50 értékeket az online elérhető "Quest Graph™ IC50 Calculator" programmal (AAT Bioquest, Inc) határoztuk meg (<https://www.aatbio.com/tools/ic50-calculator>).

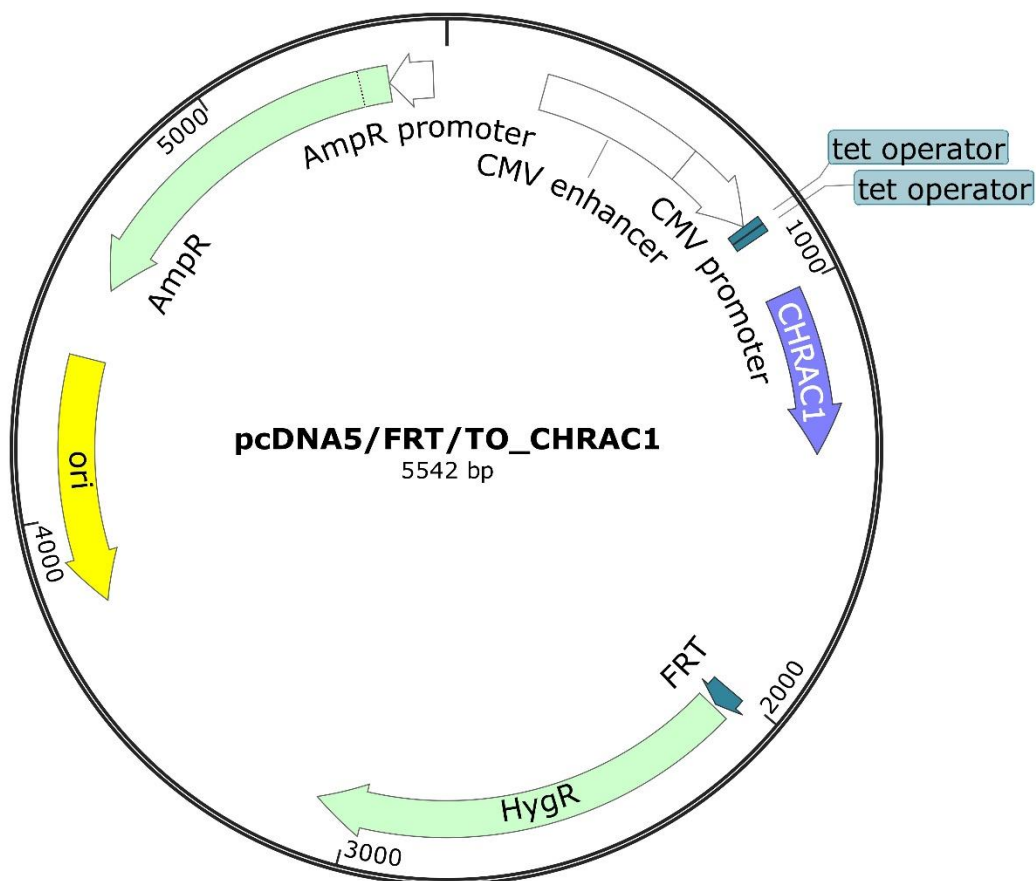
7. Eredmények és kiértékelésük

7.1 CHRAC1 túltermelő stabil sejtvonal létrehozása

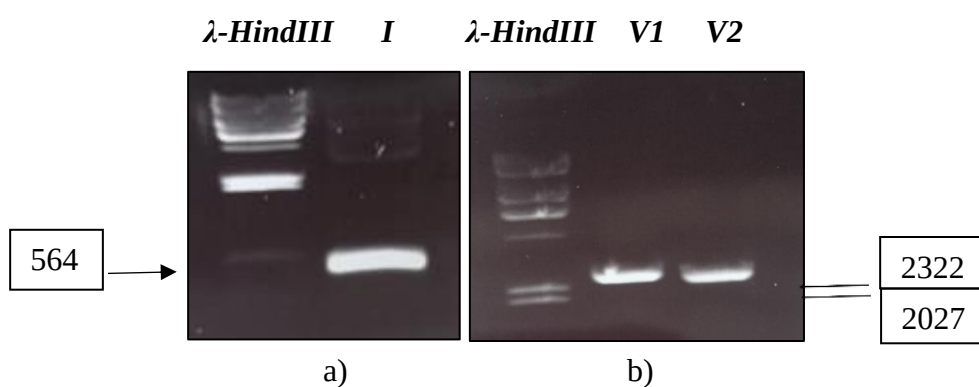
A CHRAC1 túltermelő sejtvonal létrehozásához a Flp-In™ T-REx™ rendszer-t alkalmaztuk. Ez a rendszer olyan emlős sejtvonalak létrehozására lett tervezve, melyek stabilan és indukálhatóan expresszálják a vizsgálatokra kiválasztott fehérjét, mely esetünkben a CHRAC1 volt. A a Flp-In™ T-REx™ stabil sejtvonalunkat a következő fő lépések mentén hoztuk létre: a *CHRAC1* gént integráltuk a pcDNA5/FRT/TO expressziós vektorba. Az ezáltal létrehozott pcDNA5/FRT/TO-CHRAC1 plazmidkonstrukciót és a pOG44 Flp rekombinááz expressziós vektort kotranszfektáltuk a U2OS Flp-In™ T-REx™ „host” sejtvonalunkba. A transzfekeciót követően a pOG44-ről kifejeződik az Flp rekombinááz és egy rekombinációs eseményt katalizál, mely során a pcDNA5/FRT/TO-CHRAC1 integrálódik a genomba az FRT-helyen. A stabil, izogén klónokat hygromycinre és blasticidinre szelektáltuk, végül a létrehozott sejtvonalon elvégeztük a kísérleteinket, mely során a CHRAC1 kifejeződését doxiciklinnel indukáltuk.

Első lépésben célunk, a *CHRAC1* gén pcDNA5/FRT/TO vektorba történő bevitele volt úgy, hogy a CMV promóter szabályozása alá kerüljön (3. ábra). A klónozást a Szekvencia- és Ligálás-független klónozás (SLIC) módszerrel hajtottuk végre, az ehhez szükséges primerek tervezése a SNAPGene program segítségével történt. Az inzertet az 1222 pCHRAC-EGFP plazmidról amplifikáltuk fel polimeráz-láncreakcióval. Ehhez a primerek úgy lettek tervezve, hogy az 5' túlnyúló végei rendelkezzenek egy ~20 bp hosszúságú, a vektor végeivel homológ karral. Az 1222 pCHRAC-EGFP plazmidot Eva Pinto-tól kaptuk, az elució pufferben oldott plazmid koncentrációja 400 ng/ul volt. A vektort a pcDNA5/FRT/TO plazmid linearizálásával állítottuk elő. Ennek során két félre osztottuk fel a plazmidszekvenciát (vektor1, vektor2), majd ezeket különálló PCR-rel amplifikáltuk. A PCR reakciók sikerességét agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük. A reakciók sikeresnek bizonyultak, mivel tiszta és erős bandeket kaptunk a megfelelő mérettartományban, az inszert esetén 440 bp-nál, a vektor1 esetén 2611 bp-nál és a vektor2 esetén 2555 bp-nál (4. ábra). A továbbiakban a templát plazmidot DpnI enzimmel elemésztettük, majd a PCR termékeket Macherey-Nagel oszlopon tisztítottuk. A tisztított DNS fragmentumok mennyiségét NanoDrop spektrofotométerrel határoztuk meg. A következő koncentrációkat mértük:

$$C(\text{Inszer}) = 24,5 \text{ ng/ul}, C(\text{Vektor1}) = 20,2 \text{ ng/ul}, C(\text{Vektor2}) = 26,6 \text{ ng/ul}$$



3. ábra. A pcDNA5/FRT/TO-CHRA1 plazmidkonstrukció szekvenciaterképe.

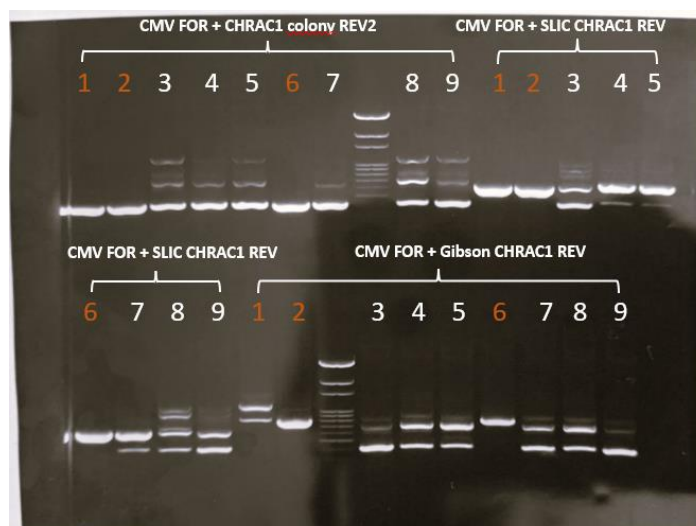


4. ábra. A klónozáshoz előállított inzert és vektor gélelektroforézise. a) 1222 pCHRA1-EGFP templátról felamplifikált inzert gélelektroforézise. b) pcDNA5/FRT/TO plazmidról előállított vektor1 és a vektor2 fragmentum gélelektroforézisei láthatóak. A gélelektroforézisekhez a Lambda DNA/HindIII molekulásúly markert alkalmaztuk (8 fragmentum[bp]: 23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027, 564, 125).

A klónozás a SLIC technikával lett kivitelezve. A módszer a klasszikus eljárással szemben, restrikciós emésztés helyett polimeráz-láncreakciót alkalmaz az inzert előállításához. Ehhez olyan primerek szükségesek, melyek a linearizált vektor végeivel homológ régiókat tartalmaznak. Az inzert és vektor homológ karjait a T4 DNS-polimeráz exonukleáz aktivitása révén ragadós végekké formálja, majd szobahőmérsékleten a végek hibridizálnak. Az ezáltal nyert cirkuláris konstrukció nem teljes, előfordulhatnak „nick”-ek a szekvenciában. A lyukak befoltozása a baktériumsejt saját DNS hibajavító rendszere által történik. A SLIC reakciót kompetens 2T1 *E.coli* sejtekbe transzformáltuk és ampicillines Luria-Bertani lemezekre szélesztettük. Az ampicillin rezisztenciagén megatálható a pcDNA5/FRT6TO-CHRC1 konstrukcióban, így a létrejött klónok ampicillinnel kiegészített agarlemezen szelektálhatóak. A következő napra sok telepet kaptunk a lemezeken, ami azt jelzi, hogy a transzformálás hatékony volt. A kontroll klónozás során, melynél a T4 DNS-polimeráz hiányzott a SLIC reakcióból, majdnem ugyanannyi telepet kaptunk mint a rendes klónozás esetén, így arra a következtetésre jutottunk, hogy a T4 DNS-polimeráz nem játszik lényeges szerepet ebben a módszerben. 9-9 telepből fogpiszkálóval mintát vettünk és kolónia PCR-rel ellenőriztük a transzformálás sikerességét. Ehhez olyan primer párokat alkalmaztunk, melynél a forward primer a CMV promóterhez, a reverse primer pedig a CHRC1 génhez hibridizál (5. táblázat). A PCR termékeket agaróz gélen futtattuk, majd a gélképet elemezve kiválasztottunk három mintát (#1-, #2- és #6-os) mely megbízhatónak tűnt (5. ábra). Ezekből a mintákból folyadékkultúrát hoztunk létre, plazmidot izoláltunk, majd a tisztított plazmidot tovább küldtük szekvenálásra. Mindhárom elküldött klón az általunk megtervezett szekvenciát tartalmazta.

A U2OS Flip-In T-Rex „host” sejtvonal transzfekciójához nagy mennyiségű pcDNA5/FRT/TO-CHRC1 plazmidra volt szükségünk. A három szekvenálással visszaigazolt klón közül kiválasztottunk egyet, melyből endotoxin mentes Midi prepet készítettünk az emlős sejtek transzfektálásához. NanoDrop spektrofotométer segítségével meghatároztuk a tisztított plazmid mennyiségét, mely 420 ng/ul volt.

A Flp-In™ T-REx™ „host” sejtvonal korábbról már rendelkezésünkre állt. A „host” sejtvonalunk két plazmid betranszfektálásával lett létrehozva: pFRT/lacZeo egy specifikus FRT-helyet hordoz, mely eredetileg a *Saccharomyces cerevisiae*-ből lettek izolálva és az Flp rekombináza kötőhelyül szolgál. A pcDNA6/TR plazmid a Tet represszort fejezi ki.



5. ábra. *Három különböző primer párral kivitelezett kolónia PCR gélelektorofrézise.*

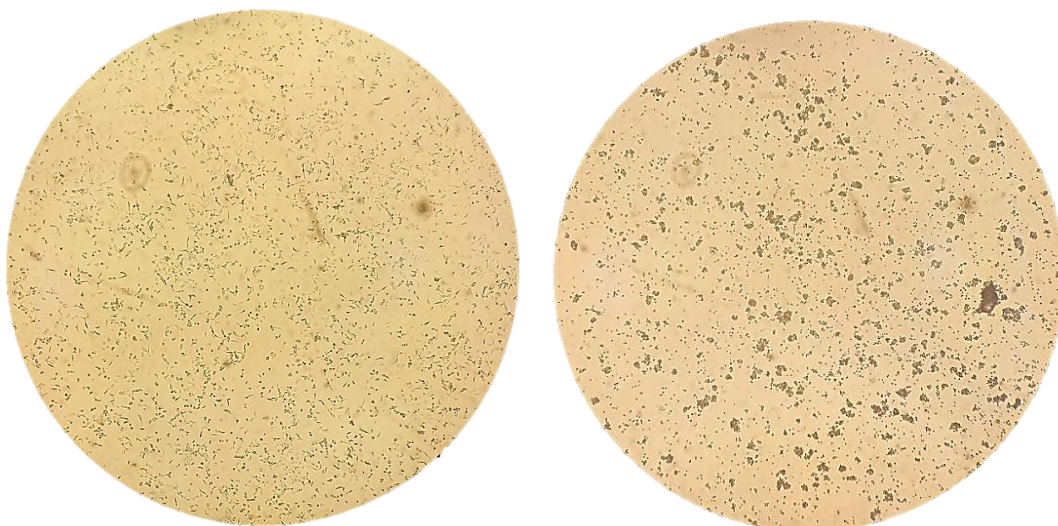
MolekuAz #1-, #2- és #6-os mintákat választottuk ki szekvenáltatásra, illetve további munkánkhoz. A gélelektroforézishez a Lambda DNA/HindIII molekulasúly markert alkalmaztuk (8 fragmentum[bp]: 23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027, 564, 125).

A U2OS Flp-In™ T-REx™ 293 „host” sejtekbe kotranszfektáltuk az általunk létrehozott pcDNA5/FRT/TO-CHRAC1 plazmidkonstrukciót és a pOG44, Flp rekombinááz expressziós vektort. A transzfekeciót követően a pOG44-ről kifejeződik az Flp rekombinááz és katalizálja az FRT helyek homológ rekombinációját. Ennek eredményeként a pcDNA5/FRT/TO-CHRAC1 integrálódik a genomba az FRT-helyen. Mivel a pcDNA5/FRT/TO-CHRAC1 egyazon lókuszon épül be a genomba minden transzfektánsnál, izogén klónok keletkeznek. A hygromycin és blasticidin rezisztenciagén a pcDNA5/FRT/TO-CHRAC1 és a pcDNA6/TR plazmid integrálódása után megtalálható a klónok genomjában. A továbbiakban 2-3 héten keresztül szelektáltuk a stabil klónokat 250 µg/ml hygromycint, és 4 µg/ml blasticidint tartalmazó szelektív médiumban.

7.2 Hygromycin érzékenység vizsgálata

Annak érdekében, hogy meghatározzuk a stabil klónok szelekciójához szükséges optimális hygromycin koncentrációt, tesztet végeztünk a U2OS Flp-In T-REx „host” sejteken. Célunk annak a minimális koncentrációnak a megállapítása volt, mely szükséges a nem transzfektált Flp-In T-REx „host” sejtvonalak elpusztításához ~1 hét alatt. Ennek érdekében különböző hygromycin koncentrációk mellett mikroszkóppal követtük a „host” sejtek túlélését egy héten keresztül. Megfigyeléseink alapján a 250 µg/ml koncentráció mellett a sejtek nagy része elpusztult egy hét alatt. Ezt abból lehetett megállapítani, hogy az elpusztult sejtek

felváltak a lemez aljáról, és csomósodva úsztak a médiumban (6. ábra). A következő koncentrációk mellett teszteltük a sejtek növekedését: 150, 200, 250, 300, 350, 400 $\mu\text{g/ml}$ Hygromycin B.



6. ábra. *Hygromycin kezelés hatása a U2OS Flip-In T-REx „host” sejtekre. A jobb oldali mikroszkópos képen 150 $\mu\text{g/ml}$ hygromycinnel, a bal oldali képen 250 $\mu\text{g/ml}$ hygromycinnel voltak a sejtek kezelve.*

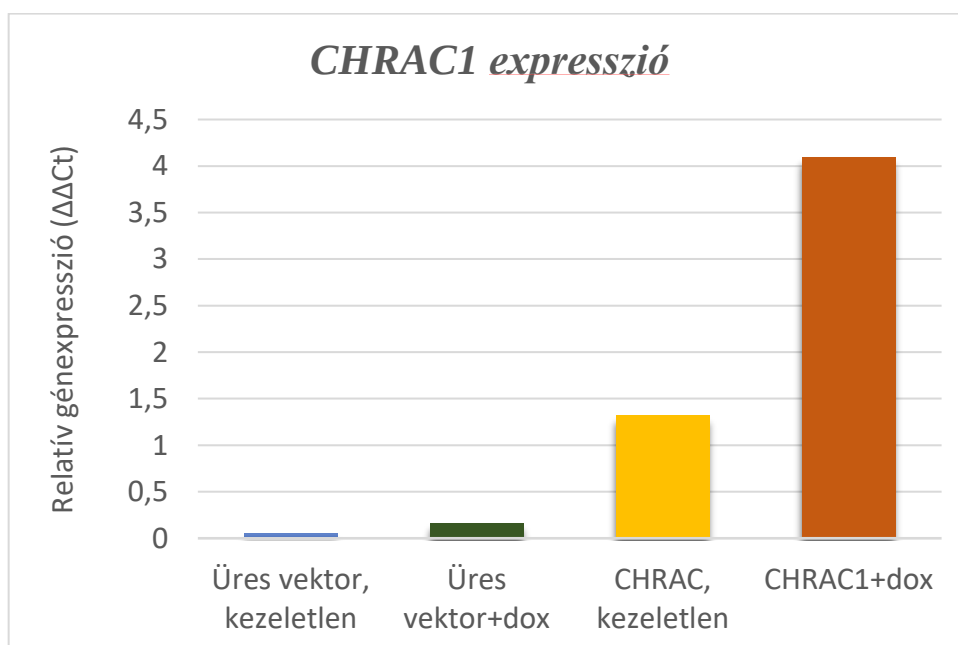
7.3 A CHRAC1-túltermelő sejtvonal jellemzése

Az általunk létrehozott U2OS Flip-In T-REx-CHRAC1 sejtvonal CHRAC1 túltermelő képességét ellenőriztük RNS-szinten kvantitatív real-time PCR-rel, illetve fehérje-szinten Western blottal. Kontrollként egy olyan sejtvonalat alkalmaztunk, melybe a CHRAC1-et kifejező plazmidkonstrukció helyett üres vektort transzfektáltunk a U2OS „host” sejtvonalunkba.

A *CHRAC1* indukálható módon fejeződik ki a létrehozott U2OS Flip-In T-REx stabil sejtvonalban. Ennek hátterében a következő mechanizmus áll: A CHRAC1 olyan cytomegalovirus (CMV) promóter szabályozása alatt áll, amihez tet operátor 2 (TetO_2) szekvenciája csatlakozik. Tetraciklin/doxiciklin hiányában a pcDNA6/TR plazmidról expresszálandó Tet represszor homodimert formál és köt a TetO_2 szekvenciához, ezáltal represszálja CHRAC1 kifejeződését. Az indukció során a tetraciklin/doxiciklin nagy affinitással képes kötni a Tet homodimerekhez, melynek szerkezetében ezáltal konformációváltozás következik be. Ennek hatására a Tet represszor dimerek disszociálnak a CMV promóterről lehetővé téve a CHRAC1 kifejeződését.

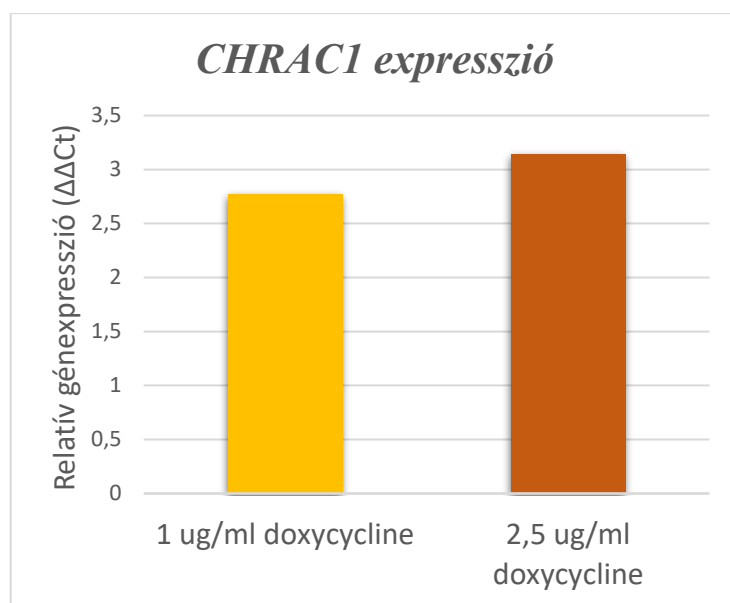
A kvantitatív valós idejű PCR-el végzett kísérleteink során 24 órán keresztül indukáltuk a sejtek *CHRAC1* expresszióját 1-2,5 µg/ml doxiciklinnel. A sejteket ezután begyűjtöttük és RNS-t izoláltunk belőlük a Macherey-Nagel cég által forgalmazott NucleoSpin RNA nevezetű kittel. A tisztított RNS mennyiségét NanoDrop spektrofotométerrel határoztuk meg, majd mintánként 1-1 µg RNS-t reverz transzkriptázzal cDNS-sé írtuk át. A cDNS-t tartalmazó mintákat 20x-ra hígítottuk, majd egyenként 2,5 µl-t kimértünk egy-egy qPCR reakcióhoz belőlük templátnak. Mintánként három technikai párhuzamossal végeztük a kísérleteket. Normalizációs kontrollként a RPL27 háztartási gént használtuk.

Az első vizsgálat során 1 µg/ml végkoncentrációban alkalmaztuk a doxiciklint. A qPCR kiértékelésénél a génexpressziót a kezeletlen, üres vektort hordozó sejtek mRNS mennyiségéhez viszonyítottam. A kapott eredmények alapján megállapítottuk, hogy a doxiciklin kezelés az üres vektort tartalmazó kontrollban nem volt hatással a *CHRAC1* expresszióra. Ezzel szemben a *CHRAC1* túltermelő sejtvonalakban a doxiciklin kezelés mintegy 17-szeresére emelte ($2^{4.09}$) növelte a *CHRAC1* expressziót a kontroll, kezeletlen üres vektorral transzfektált sejtekhez képest. A *CHRAC1* túltermelő sejtvonal indukátlan állapotában is 2,5-szeresére ($2^{1.32}$) emelkedett a *CHRAC1* kifejeződése a kontroll sejtvonalhoz képest. Ezt a jelenséget „leaky” génexpressziónak nevezi a szakirodalom és gyakori problémát jelent biológiában. (7. ábra)



7. ábra. *CHRAC1* expressziójának vizsgálata qPCR-rel. A sejteket indukciója 1 µg/ml doxiciklinnel, 24 órán keresztül történt. A génexpresszió a Kezeletlen kontroll mRNS mennyiségéhez lett viszonyítva az ábrázolás során.

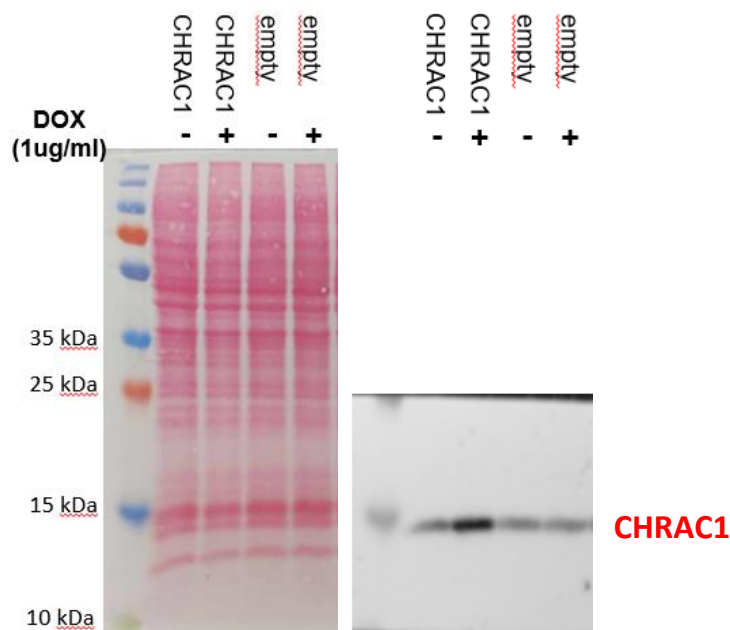
A Flip-In T-REx rendszerrel generált sejtvonalak egyik előnyös tulajdonsága, hogy a GOI (gene of interest) expressziója szabályozható a megfelelő indukáló ágens (doxiciklin/tetraciklin) koncentrációjának állításával. A második vizsgálatunk során a doxiciklin mennyiségét 2,5 µg/ml-re emeltük annak reményében, hogy a CHRAC1 túltermelő sejtvonalnál magasabb CHRAC1 expressziót érünk el. Kis mértékben nőtt a CHRAC1 transzkriptek mennyisége, nem tapasztaltunk jelentős hatásbéli változást az 1- és 2,5 µg/ml doxiciklin kezelések között abban az esetben, ha a kezeletlen CHRAC1 U2OS CHRAC1 sejtekhez hasonlítjuk a kétféle koncentrációban alkalmazott doxiciklint (8. ábra).



8. ábra. 1 µg/ml és 2,5 µg/ml doxiciklin indukció hatásának összehasonlítása qPCR-el, CHRAC1 túltermelő sejtvonalon. A génexpresszió a kezeletlen CHRAC1 túltermelő sejtek mRNS-szintéhez lett viszonyítva.

Következő kísérletünkben Western blot technikával vizsgáltuk a CHRAC1 kifejeződését. A sejtkultúrákat 1 µg/ml doxiciklinnel kezeltük 24 órán keresztül. Ezután a sejteket 4%-os SDS lízis pufferrel lizáltuk és begyűjtöttük.

A fehérjéket méret szerint elválasztottuk SDS-PAGE technikával, majd nitrocellulóz membránra blottoltuk. A CHRAC1 fehérjét specifikus ellenanyagokkal detektáltuk. A membránról készült képen szépen látszik a CHRAC1 fehérje fokozott kifejeződése az indukált, CHRAC1 túltermelő sejteknél (9. ábra).

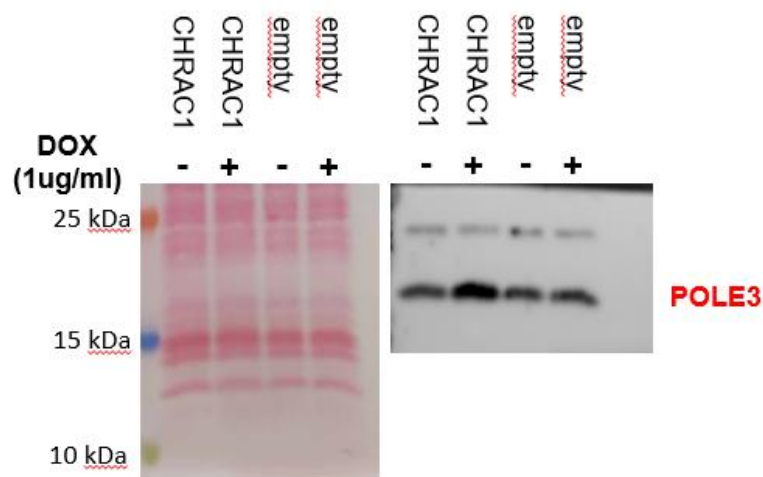


9. ábra. *CHRAC1 fehérje detektálása Western blottal.* A bal oldali képen a *Poneceae*-vel való festés látható, a jobb oldali képen a detektált CHRAC1 fehérje 15 kDa-os mérettartományban. A sejtek indukciója 1 µg/ml doxiciklinnel, 24 órán keresztül történt.

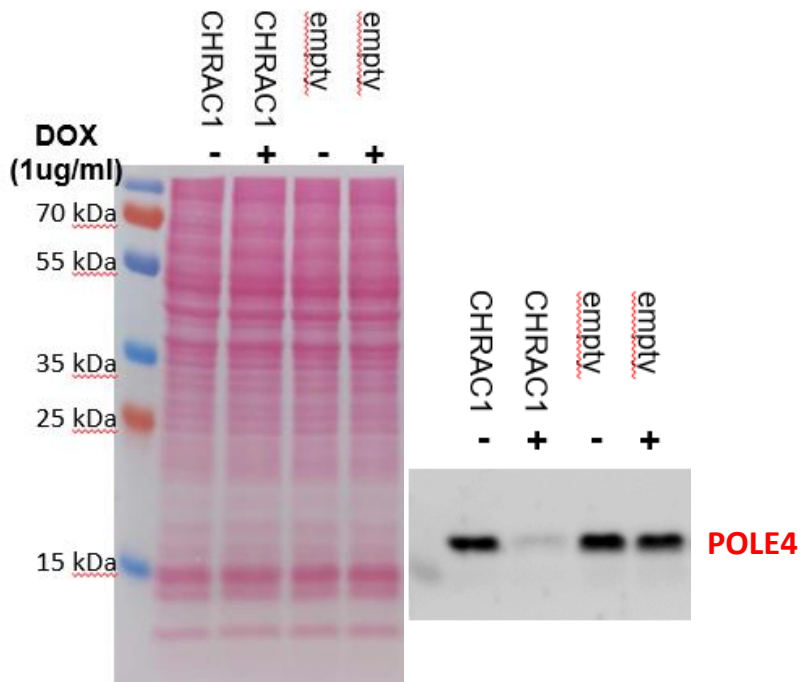
7.4 POLE3-POLE4 Western-blot

A POLE3 és POLE4 knockout sejtek fokozott érzékenységet mutatnak a replikációs stresszre, ami rámutat azok fontos szerepére a replikációs folyamatok szabályozásában. Miután mind a CHRAC1, mind a POLE4 a POLE3 fehérjével alkot dimert, a CHRAC1 fehérje mennyiségének változása hatással lehet a POLE3-POLE4 dimer mennyiségére, és ezáltal a replikációs stresszválásra. Kísérleteink során Western blot technikával tanulmányoztuk, hogy a CHRAC1 magas expressziója hogyan befolyásolja a POLE3-, illetve POLE4 mennyiségét. A 24 órás 1 µg/ml doxiciklinnel történő CHRAC1 túltermelés hatására a POLE3 expressziója jelentősen növekedett (10. ábra), míg a POLE4 fehérje szintje lényegesen csökkent (10. ábra). A POLE3, POLE4 és CHRAC1 fehérjék heterodimereket alkotnak és kifejeződési szintjeik is hatnak egymásra. A munkacsoportunk közlés alatt álló publikációja alapján, amikor knockout technikával elimináljuk a POLE3-t akkor a POLE3 KO sejtekben mind a POLE4, mind a CHRAC1 fehérje eltűnik, mivel a közös partnerük hiánya instabilitásukat okozza (2. ábra). További megfigyelés volt, hogy a POLE4 KO sejtekben a CHRAC1 fehérje szintje nő, ami érdekes egyezést mutat azzal, amit a dolgozatomban bemutattam, hogy a CHRAC1 túltermelése viszont csökkenti a POLE4 szintjét. A POLE4 fehérje eltűnése hátterében a feltehetőleg az állhat, hogy megemelkedett CHRAC1 szint miatt több POLE3/CHRAC1 komplex képződik és

a DNS polimeráz epszilon komplexből kevesebb, így a POLE4/POLE3 heterodimer nem tud létrejönni. Mivel a heterodimerizáció fontos a POLE3 és POLE4 stabilitásához [26] az egyedül maradt POLE4 lebomlik, amint a 11. ábrán látható.



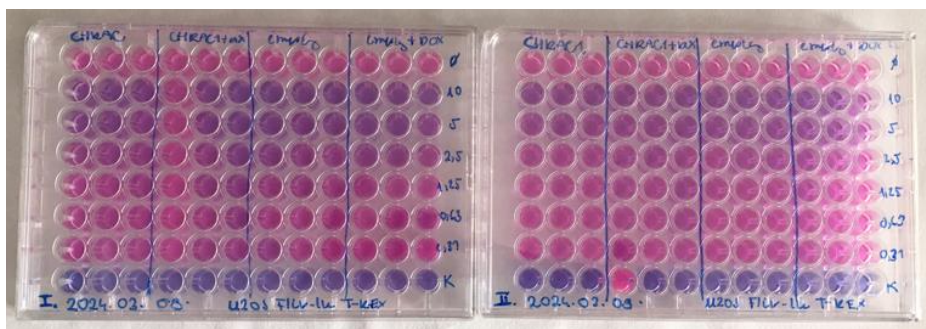
10. ábra. *POLE3 fehérje detektálása Western blottal* A bal oldali képen a Ponceau-vel való festés látható, a jobb oldali képen a detektált POLE3 fehérje 17 kDa-nál A sejteket 24 órát indukáltuk 1 µg/ml doxiciklinnel.



11. ábra. *POLE4 fehérje detektálása Western blottal.* A bal oldali képen a Ponceau-vel való festés látható, a jobb oldali képen a detektált POLE4 fehérje 17 kDa-os mérettartományban.

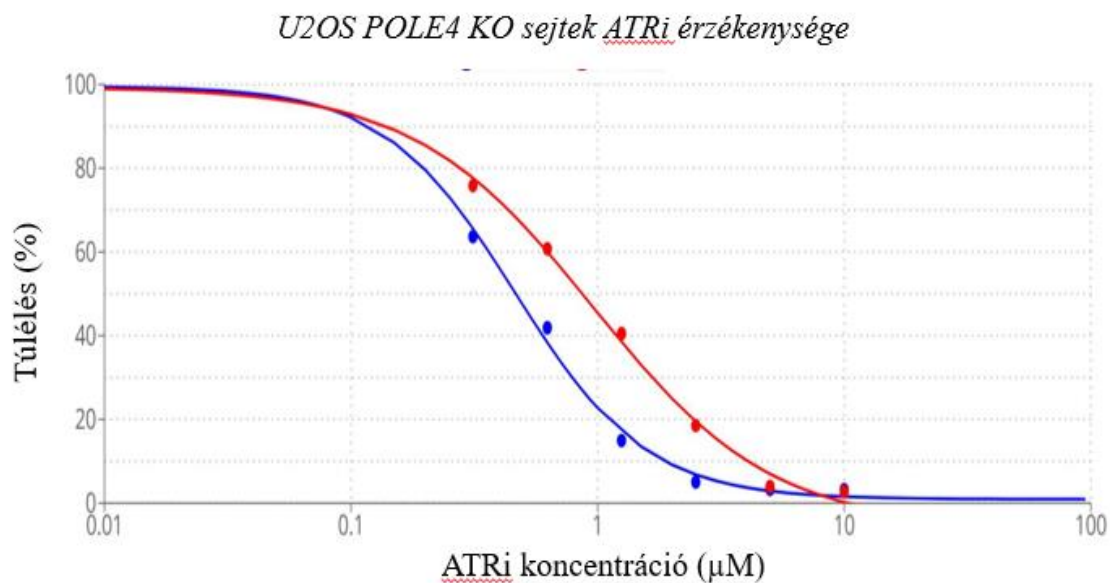
7.5 ATR gátlószer iránti érzékenység meghatározása

A további kísérleteink során az ATR inhibitor (ATRi) (VE-821) hatását vizsgáltuk a U2OS Flip-In T-Rex CHRA1 stabil sejtvonal életképességére mind CHRA1 indukció előtt, mind utána. Az ATR gátlása a rákos sejtekben replikációs stresszt indukál, ami a sejtek pusztulását okozza. Resazurin teszttel mérhető meg, hogy különböző koncentrációban alkalmazott ATRi hogyan hat a sejtek túlélésére. Az ATRi érzékenység meghatározását 3 technikai párhuzamos kísérletben hajtottam végre.



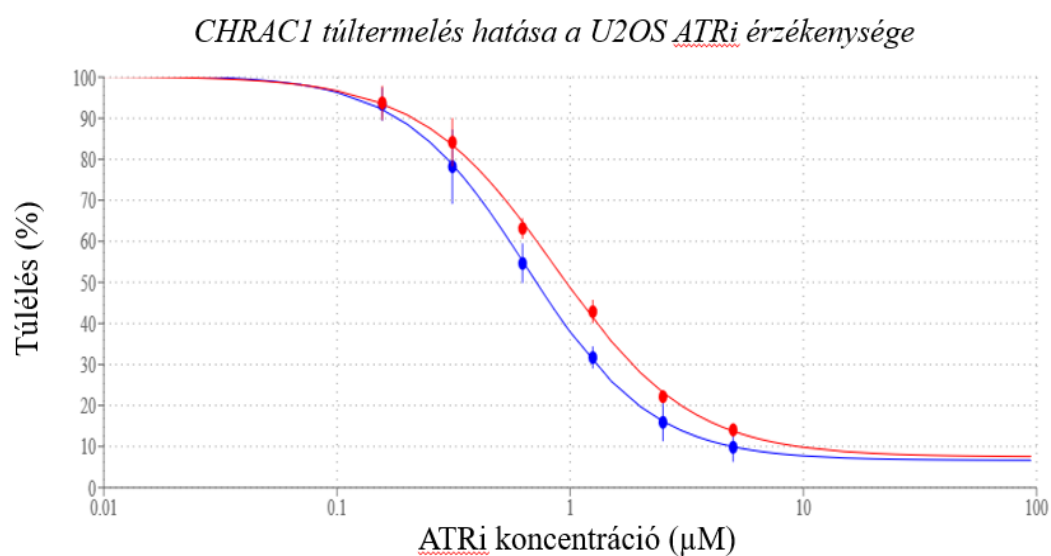
12. ábra. A túlélési kísérlet 96 lyukú lemezei a Resazurin hozzáadása után 2 órával.

A munkacsoportunk egyik korábbi kísérletben meghatározta a U2OS POLE4 KO sejtek ATRi érzékenységét. (13. ábra) Az IC₅₀ érték azt a gátlószer koncentrációt jelöli, amelynél a sejtek 50%-a elpusztul, és ezt mérőszámot használják leggyakrabban egy drog hatásosságának mérésére. Megállapítottuk, hogy a POLE4 KO sejtek IC₅₀ értéke: 0.4624 μ M alacsonyabb, mint a vad típusú U2OS sejteké (IC₅₀: 0.9564 μ M), tehát a POLE4 hiánya érzékennyé teszi a sejteket az ATR gátlószerre. Mivel a CHRA1-túltermelő sejteknél lecsökken a POLE4 fehérjeszintje (11. ábra) kíváncsiak voltunk, hogy az ATR gátlásban is látszik-e a hasonlóság a POLE4 KO sejtekkel.



13. ábra. A POLE4 KO sejtek fokozott érzékenységet mutatnak az ATR inhibitorokra (Dr. Fajka-Boja Roberta mérése)

A túlélési kísérleteink során az ATR inhibitorral való fokozott érzékenységet detektáltunk a CHRAC1-túltermelő sejteknél is (14. ábra). A U2OS Flip-In T-REx CHRAC1 sejteknek IC50 értéke a 0.8593 μM-nak adódott a doxiciklin kezelés nélkül és a CHRAC1 túltermelés után az IC50= 0.6515 μM, tehát szintén nőtt a sejtek érzékenysége úgy, mint azt a POLE4 KO esetén láttuk.



14. ábra. A CHRAC1 túltermelő sejtek fokozott érzékenységet mutatnak az ATR inhibitorokra

Eredményeink alátámasztják, hogy a CHAC1-túltermelő tumorok esetén az ATR inhibitorral történő kezelés ígéretes terápiás támadáspont lehet. A CHAC1 magas expressziója biomarkerként szolgálhat olyan, petefészek-, tüdő- és mellrák tumorfajták azonosításához, melyeknél az ATR inhibitorral történő kezelés alkalmazható lehetne. Mivel a CHAC1 túltermelés bizonyos ráktípusokban viszonylag gyakori, például a petefészekrákos esetek 1/3-ára jellemző, érdemes további kutatásokat végezni a hatékonyabb terápiás célpontok meghatározására. Mivel előzetes eredményeink vannak arra nézve, hogy a PARP gátlással együtt alkalmazott replikációs stressz fokozza a POLE4 KO sejtek érzékenységet a jövőben a CHAC1 túltermelő U2OS sejteken a PARP és ATR kombinált gátlásának hatását kívánjuk tanulmányozni.

8. Diszkusszió

Kutatásom középpontjában a CHRAC1 (Chromatin Accessibility Complex Subunit 1) fehérje állt, mely ígéretes daganatterápiás célpont lehet a jövőben. A CHRAC1 a kromatinszerkezet szabályozásában résztvevő fehérje, mely a SMARCA5 kromatin átrendező komplexen belül a POLE3-hoz köt. A POLE3 fehérje ugyanakkor a DNS polimeráz epsilon komplex-ben is megtalálható, ahol a POLE4-gyel együtt alkot heterodimert. Laborunkban végzett korábbi kutatások alapján [18] a POLE3 és POLE4 knockout sejtek fokozott érzékenységet mutatnak a replikációs stresszre, ami rámutat azok fontos szerepére a replikációs folyamatok szabályozásában. Miután mind a CHRAC1, mind a POLE4 a POLE3 fehérjével alkot dimert, a CHRAC1 fehérje mennyiségének változása hatással lehet a POLE3-POLE4 dimer mennyiségére, és ezáltal a replikációs stresszválásra.

A kísérleteink során a Flp-In™ T-REx™ rendszer-t alkalmazva létrehoztunk egy CHRAC1-et indukálható módon túltermelő stabil sejtvonalat. Ez a rendszer olyan emlős sejtvonalak létrehozására lett tervezve, melyek stabilan és indukálhatóan expresszálják a vizsgálatokra kiválasztott fehérjét, mely esetünkben a CHRAC1 volt. Azért választottuk ezt a módszert, mert a GOI (gene of interest) szekvencia minden transzfektáns esetében egyazon lókuszon integrálódik a genomba, így izogén klónok jönnek létre.

A CHRAC1-túltermelő sejtvonal létrehozása során előállítottunk egy plazmidkonstrukciót, mely a CHRAC1 cDNS-ét tartalmazza a pcDNA5 FTR/TO vektorban, majd transzfektáltuk a U2OS „host” sejtvonalunkba. Végül a sikeres genomintegrációt hordozó sejteket poliklonális módon szelektáltuk hygromycinre és blasticidinre. Kísérleteink során a CHRAC1 kifejeződését a tet represszorok hatását semlegesítő doxiciklin 1 µg/ml koncentrációban történő adásával indukáltuk.

A CHRAC1-túltermelő sejtvonal transzfekciós validálását RNS szinten qPCR-rel, fehérje szinten pedig Western blot technikával végeztük. A CHRAC1-túltermelő sejtvonalban a doxiciklin kezelés mintegy 17-szeresére növelte a CHRAC1 mRNS-expressziót. A CHRAC1-túltermelő sejtek indukálatlan állapotában is 2,5-szeresére emelkedett a CHRAC1 kifejeződése az üres vektort hordozó sejtekhez képest. Ezt a jelenséget „leaky” génexpressziónak nevezi a szakirodalom, és gyakori problémát jelent toxikus fehérjét kódoló gének esetén, mivel ekkor lassú sejtnövekedést és sejtpusztulást eredményez.

Western blot technikával tanulmányoztuk, hogy a CHRAC1 emelkedett expressziója hogyan befolyásolja a POLE3-POLE4 dimer mennyiségét. A munkacsoportunk közlés alatt álló

publikációja alapján, amikor knockout technikával elimináljuk a POLE4-et HELA, méhnyak karcinóma sejtekben, akkor a POLE4 KO sejtekben a CHAC1 expressziója megnövekszik, míg a POLE3-é lecsökkent.[18] Ennek hátterében feltételezéseink szerint az állhat, hogy a POLE3-ért versengés folyik CHAC1 és a POLE4 fehérje között, ezért a POLE4 elimináció hatására több CHAC1-POLE3 heterodimer tud létrejönni. A versengésből következik, hogy a fehérjék kifejeződési szintjei hatással vannak egymásra, így a CHAC1-túltermelő tumorok esetén a CHAC1 fehérje mennyiségének változása hatással lehet a POLE3-POLE4 dimer mennyiségére. A Western blot-tal végzett vizsgálataink alapján a CHAC1-túltermelő sejtekben a POLE4 fehérje expressziója szignifikánsan lecsökkent, míg a POLE3-é növekedett. A POLE4 fehérje csökkenését feltehetőleg az instabilitása okozza, mivel nem tud heterodimert alkotni a POLE3-mal ugyanis a megnövekedett CHAC1 fehérjemennyiség több POLE3-at igényel a CHAC1 remodelling komplex kialakításához. Ez az eredményünk erősíti azt a feltevést, amit az előző kísérleteink alapján megfogalmaztunk, hogy a POLE4 és a CHAC1 versengenek a POLE3-ért.

Munkacsoportunk egy korábbi kísérletben meghatározta a POLE4 fehérje hiányának hatását a sejtek ATR gátlószerekkel szembeni érzékenységére. Megállapítottuk, hogy a POLE4 hiánya érzékenyíti a HeLa, méhnyak karcinóma sejteket az ATR gátlószerekre (13. ábra). Mivel a CHAC1-túltermelő sejteknél lecsökken a POLE4 fehérje szintje kíváncsiak voltunk, hogy a POLE4 KO sejtek esetén tapasztalt ATR inhibitor érzékenység itt is jelentkezik-e. A túlélési kísérletek eredményei azt mutatják, hogy a U2OS CHAC1-túltermelő sejtek hasonlóan fokozott érzékenységet mutatnak az ATR inhibitorokkal szemben, mint a POLE4 KO sejtek. Ennek hátterében a POLE4 fehérje egyik nélkülözhetetlen funkciójának elvesztése állhat, mely feltehetőleg a replikációs folyamatok szabályozásában játszik fontos szerepet.

Az ATR és PARP inhibitorok kombinált alkalmazása ígéretes terápiás eljárás, mely jelenleg klinikai tesztek alatt áll. Az ATR kináz gátlása jelentősen növeli a PARP inhibitorok citotoxicitását azáltal, hogy lehetővé teszi a sejtek korai mitózisba lépését, ami replikációs katasztrófához és a mitózis defekthez vezet. A kombinált terápia egyik hátránya, hogy erősebb mellékhatásokat okoz. A mellékhatások csökkenthetők olyan genetikai változatok azonosításával, melyek egyes tumorfajtákra fogékonyabbá és szelektívebbé teszik a kezelést.[22] A munkacsoportunk korábbi kísérletei során tesztelte az ATR-PARP inhibitorok kombinált kezelésének hatékonyságát POLE4 KO sejtek esetén, a kombinált kezelés jóval hatékonyabbnak bizonyult, mint a gátlószerek különálló alkalmazása [18]. A jövőben a

CHRA1 túltermelő U2OS sejteken a PARP és ATR kombinált gátlásának hatását kívánjuk tanulmányozni.

Eredményeink alátámasztják, hogy a CHRA1-túltermelő tumorok esetén az ATR inhibitorral történő kezelés ígéretes terápiás támadáspont lehet. A CHRA1 magas expressziója biomarkerként szolgálhat olyan, petefészek-, tüdő- és mellrák tumorfajták azonosításához, melyeknél az ATR inhibitorral történő kezelés alkalmazható. Mivel a CHRA1 túltermelés bizonyos ráktípusokban viszonylag gyakori, például a petefészekrákos esetek 1/3-ára jellemző, érdemes további kutatásokat végezni ebbe az irányba.

9. Köszönetnyilvánítás

Köszönetet mondok témavezetőmnek, **Dr. Czibula Ágnesnek**, hogy nagy lelkesedéssel és kitartással vezette a témámat, megtanított számos technika elsajátítására és segítséget nyújtott a dolgozatom elkészítésében.

Köszönöm **Dr. Timinszky Gyulának**, hogy lehetővé tette, hogy csoportjában írhassem a Diplomamunka dolgozatomat.

Köszönöm **Dr. Henn Lászlónak** a sok technikai segítséget, különösen a slic eljárással kapcsolatban.

Köszönöm **Dr. Fajka-Boja Robertának**, hogy megosztotta velem korábbi kísérleteinek eredményeit.

Köszönöm **Kopasz Annának**, hogy segítséget nyújtott a Western blot eljárás elsajátításában és ezzel kapcsolatos vizsgálatok kivitelezésében.

Köszönöm szaktársamnak, **Pék Ramónának**, hogy összekötött a mostani témavezetőmmel.

10. Irodalomjegyzék

- [1] Stadler J, Richly H. Regulation of DNA Repair Mechanisms: How the Chromatin Environment Regulates the DNA Damage Response. *Int J Mol Sci.* 2017 Aug 5;18(8):1715.
- [2] Zhang C, Lu J, Zhang P. The Roles of Chromatin Remodeling Proteins in Cancer. *Curr Protein Pept Sci.* 2016;17(5):446-54.
- [3] Aydin ÖZ, Vermeulen W, Lans H. ISWI chromatin remodeling complexes in the DNA damage response. *Cell Cycle.* 2014;13(19):3016-25.
- [4] Li S, Wang L, Shi J, Chen Y, Xiao A, Huo B, Tian W, Zhang S, Yang G, Gong W, Zhang H. Chromatin accessibility complex subunit 1 enhances tumor growth by regulating the oncogenic transcription of YAP in breast and cervical cancer. *PeerJ.* 2024 Jan 10;12:e16752.
- [5] Mahmood SF, Gruel N, Chapeaublanc E, Lescure A, Jones T, Reyat F, Vincent-Salomon A, Raynal V, Pierron G, Perez F, Camonis J, Del Nery E, Delattre O, Radvanyi F, Bernard-Pierrot I. A siRNA screen identifies RAD21, EIF3H, CHRAC1 and TANC2 as driver genes within the 8q23, 8q24.3 and 17q23 amplicons in breast cancer with effects on cell growth, survival and transformation. *Carcinogenesis.* 2014 Mar;35(3):670-82.
- [6] Wang M, Li S, Guo W, Wang L, Huang J, Zhuo J, Lai B, Liao C, Ge T, Nie Y, Jin S, Wang M, Zhang Y, Liu Y, Li X, Zhang H. CHRAC1 promotes human lung cancer growth through regulating YAP transcriptional activity. *Carcinogenesis.* 2022 Apr 25;43(3):264-276.
- [7] CBioPortal.https://www.cbioportal.org/results/cancerTypesSummary?case_set_id=all&gene_list=CHRAC1&cancer_study_list=5c8a7d55e4b046111fee2296
- [8] Mao X, Wu J, Zhang Q, Zhang S, Chen X, Liu X, Wei M, Wan X, Qiu L, Zeng M, Lei X, Liu C, Han J. Requirement of WDR70 for POLE3-mediated DNA double-strand breaks repair. *Sci Adv.* 2023 Sep 8;9(36):eadh2358.
- [9] Kukimoto I, Elderkin S, Grimaldi M, Oelgeschläger T, Varga-Weisz PD. The histone-fold protein complex CHRAC-15/17 enhances nucleosome sliding and assembly mediated by ACF. *Mol Cell.* 2004 Jan 30;13(2):265-77.
- [10] Varga-Weisz PD, Wilm M, Bonte E, Dumas K, Mann M, Becker PB. Chromatin-remodelling factor CHRAC contains the ATPases ISWI and topoisomerase II. *Nature.* 1997 Aug 7;388(6642):598-602.
- [11] Lan L, Ui A, Nakajima S, Hatakeyama K, Hoshi M, Watanabe R, Janicki SM, Ogiwara H, Kohno T, Kanno S, Yasui A. The ACF1 complex is required for DNA double-strand break repair in human cells. *Mol Cell.* 2010 Dec 22;40(6):976-87.
- [12] Collins, N., Poot, R., Kukimoto, I. et al. An ACF1–ISWI chromatin-remodeling complex is required for DNA replication through heterochromatin. *Nat Genet* 32, 627–632 (2002).
- [13] Hartlepp KF, Fernández-Tornero C, Eberharder A, Grüne T, Müller CW, Becker PB. The histone fold subunits of *Drosophila* CHRAC facilitate nucleosome sliding through dynamic DNA interactions. *Mol Cell Biol.* 2005 Nov;25(22):9886-96.

- [14] Poot Poot RA, Dellaire G, Hülsmann BB, Grimaldi MA, Corona DF, Becker PB, Bickmore WA, Varga-Weisz PD. HuCHRAC, a human ISWI chromatin remodelling complex contains hACF1 and two novel histone-fold proteins. *EMBO J.* 2000 Jul 3;19(13):3377-87.
- [15] Bellelli R, Belan O, Pye VE, Clement C, Maslen SL, Skehel JM, Cherepanov P, Almouzni G, Boulton SJ. POLE3-POLE4 Is a Histone H3-H4 Chaperone that Maintains Chromatin Integrity during DNA Replication. *Mol Cell.* 2018 Oct 4;72(1):112-126.e5.
- [16] Iida T, Araki H. Noncompetitive counteractions of DNA polymerase epsilon and ISW2/yCHRAC for epigenetic inheritance of telomere position effect in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 2004 Jan;24(1):217-27. doi: 10.1128/MCB.24.1.217-227.2004.
- [17] Casari E, Gobbini E, Gnugnoli M, Mangiagalli M, Clerici M, Longhese MP. Dpb4 promotes resection of DNA double-strand breaks and checkpoint activation by acting in two different protein complexes. *Nat Commun.* 2021 Aug 6;12(1):4750.
- [18] Hasan Mamar, Roberta Fajka-Boja. The loss of DNA polymerase epsilon accessory subunits POLE3-POLE4 leads to BRCA1-independent PARP inhibitor sensitivity. *bioRxiv* 2023.09.21.558850; doi: <https://doi.org/10.1101/2023.09.21.558850>
- [19] Gnesutta N, Nardini M, Mantovani R. The H2A/H2B-like histone-fold domain proteins at the crossroad between chromatin and different DNA metabolisms. *Transcription.* 2013 May-Jun;4(3):114-9.
- [20] Murai J. Targeting DNA repair and replication stress in the treatment of ovarian cancer. *Int J Clin Oncol.* 2017 Aug;22(4):619-628.
- [21] Hustedt N, Álvarez-Quilón A, McEwan A, Yuan JY, Cho T, Koob L, Hart T, Durocher D. A consensus set of genetic vulnerabilities to ATR inhibition. *Open Biol.* 2019 Sep 27;9(9):190156.
- [22] Yano K, Shiotani B. Emerging strategies for cancer therapy by ATR inhibitors. *Cancer Sci.* 2023 Jul;114(7):2709-2721.
- [23] Karnitz LM, Zou L. Molecular Pathways: Targeting ATR in Cancer Therapy. *Clin Cancer Res.* 2015 Nov 1;21(21):4780-5.
- [24] Boudny M, Trbusek M. ATR-Chk1 pathway as a therapeutic target for acute and chronic leukemias. *Cancer Treat Rev.* 2020 Aug;88:102026.
- [25] Livak, K. J., and T. D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta C_T$) Method. *Methods* (San Diego, Calif.) 25, no. 4 (December): 402-408. doi:10.1006/meth.2001.1262.
- [26] Duma L, Ahel I. The function and regulation of ADP-ribosylation in the DNA damage response. *Biochem Soc Trans.* 2023 Jun 28;51(3):995-1008.