

# **A SerpinB2 és a SerpinB10 szerepe a DNS hibajavításban és a tumoros folyamatokban**

**Majoros Hajnalka**

**Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei**

Témavezetők:

Prof. Dr. Boros Imre Miklós  
egyetemi tanár

Dr. habil. Pankotai Tibor  
adjunktus

Biológia Doktori Iskola  
Szegedi Tudományegyetem

Szegedi Tudományegyetem  
Természettudományi és Informatikai Kar  
Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszék

Szeged  
2019

## **Bevezetés**

Sejtjeinket életünk során külső és belső forrásból származó károsító hatások érik. A külső források közül a bőrsejtekre leginkább destruktív hatás a Napból a Földre érkező ultraibolya (UV) sugárzás. Az UV sugárzásnak a szervezetünkben számos káros fiziológiai és biológia következménye van, ilyen például a sejtöregedés, immunszupresszió, gyulladáshoz vezető folyamatok kiváltása, DNS károsodás, vagy akár apoptotikus folyamatok inicializációja.

Egy emlős sejtben naponta mintegy  $10^4$ - $10^6$  DNS hiba keletkezik. Ezeket a DNS károsodásokat rövid idő alatt, precízen javítani kell. A szervezet a DNS sérülés mentes megőrzésére számos DNS hibajavító útvonalat fejlesztett ki. A DNS hibajavító útvonalak közül a nukleotid kivágó javító mechanizmus (NER- nucleotide excision repair) egy kivételes típus, hiszen a többitől eltérően, számos strukturálisan különböző DNS lézió javítására alkalmas, többek között az UV indukálta ciklobután pirimidin dimer (CPD), 6-4 pirimidin-pirimidon fototermék (6-4 PP) eltávolítására.

Mivel az emberi bőr az elsődleges védelmi vonal a károsító hatások elleni védekezésben, így ezen szervünk van a leginkább kitéve az UV sugárzás okozta destruktív hatásoknak. A bőr eredetű tumorok közé sorolható minden olyan tumortípus, mely

a bőr egy meghatározott típusú sejtjéből indul ki. A rosszindulatú bőrtumorok két nagy csoportra bonthatók: melanoma és nem-melanoma típusú tumorokra. A melanoma a bőr pigmentsejtjeiből kialakuló rosszindulatú daganat.

A nem-melanoma típusú tumorok (NMSC- non-melanoma skin cancer), melyek a bőrtumorok előfordulásának 95%-át teszik ki, a humán rosszindulatú daganatok leggyakoribb típusai. Az NMSC tumorok kialakulásának legfőbb oka a gyakori, vagy hosszú idejű UV sugárzásnak való kitettség.

Az NMSC tumorok közül a két legjelentősebb és leggyakoribb a bazális sejtes karcinóma (BCC- basal cell carcinoma), valamint az elszarusodó laphámrák (SCC-squamous cell carcinoma). Az SCC egy invazív tumortípus, mely általában a környező szöveteket is roncsolja. Gyakran alakul ki metasztázis, azonban, ha korai stádiumban diagnosztizálják, a páciensek túlélési esélyei javulnak. BCC tumorokra jellemző, hogy lassan növekednek, és igen ritkán halálos kimenetelűek. Késői diagnózis esetében képesek a környező szöveteket és csontokat is roncsolni, azonban távoli metasztázis igen ritkán alakul ki ennél a tumortípusnál. A bőrtumorok közül a BCC a legnagyobb esetszámmal rendelkező tumortípus a világon. Az NMSC tumorok, így a BCC-k esetében is bizonyították az UV sugárzás igen erős iniciáló hatását.

A Serpinek az egyik legnagyobb és funkcionálisan legdiverzebb fehérjecsalád. A Serpinek nevét Carrell és Travis alkotta meg a serine protease inhibitor szavak kezdőbetűiből, annak okán, hogy a család akkor ismert számos tagjának funkcióját takarta ez a név. Mára a Serpinek körülbelül 1500 tagot számláló, doménszerkezetükben hasonló fehérjecsaládot alkotnak. A Serpinek szerepét leírták már számos folyamatban, mint például a tumorgenezis, véralvadás, hormon transzport, immunrendszerben végbemenő változások, vagy akár a gyulladási folyamatok során is. A DNS szekvenciájuk és filogenetikai rokonságuk alapján a Serpineket 16 csoportba, úgynevezett kládokba osztották (A-P).

A SerpinB2 (SPB2) fehérjét először 1970-ben Uemura és munkatársai izolálták humán placentából. A fehérjét sokáig PAI-2 (Plasminogen activator inhibitor 2) néven jegyezték, mely azon extracelluláris funkciójára utalt, hogy plazminogén aktivátorokat képes gátolni, nevezetesen az uPA (urokinase plasminogen activator) és tPA (tissue plasminogen activator) enzimeket. Kezdetben az SPB2 fehérjét csak a terhesség alatt megjelenő inhibitornak vélték. Azóta számos sejttípusban kimutatták az SPB2 mRNS és/ vagy fehérje szintjének növekedését intracellulárisan különböző körülmények hatására. Ezzel összhangban az SPB2 számos folyamatban részt vesz, például a szignál transzdukcióban, apoptózis gátlásában,

makrofágok túlélését elősegítő folyamatokban, monocita és keratinocita sejtek differenciációjában, gyulladásszerű és immunfolyamatok szabályozásában. Az irodalmi adatok alapján feltételezhető, hogy az SPB2 fehérjének szerepe lehet különböző tumorok kialakulásában. Plazminogén inhibitor funkcióját említik emésztőrendszeri-, emlő-, vagy tüdőrákok esetében.

Mindezen eredmények arra utalhatnak, hogy az SPB2 számos fehérje mellett egy olyan protein, mely a szervezet homeosztázisának szabályozásában játszhat szerepet különböző sérülések, hibák és stresszhatások esetében.

A SerpinB10 (SPB10), vagy másnéven Bomapin a Serpinek B kládjába tartozó redox-szenzitív hematopoetikus és mieloid leukémia specifikus sejtmagi fehérje. A protein a mieloid leukémia sejtek proliferációját vagy apoptózisát indukálja a növekedési faktorok meglététől függően. Továbbá a szakirodalom szerint, az *SPB10* mRNS expressziója emelkedik tüdőrákos páciensekben, míg mellrákos pácienseknél csökken. Az eddig leírt irodalom alapján látható, hogy a SerpinB klád igen diverz család, mely tagjainak funkciói igen sokrétűek. Feltételezhető, hogy az SPB klád tagjainak számos funkciója még ismeretlen, továbbá valószínűsíthető, hogy a már jellemzett funkciójú fehérjék egyéb, még nem leírt folyamatokban is részt vehetnek.

## **Célkitűzések**

*A kutatási irányvonalunk fő célpontja az UV károsodás indukciója után a két legerősebb génexpresszió változást mutató SerpinB2 (SPB2) és SerpinB10 (SPB10) génekről termelődő fehérjék funkciójának jellemzése. A vizsgálatok során az alábbi kérdésekre kerestük a válaszokat:*

### **SPB2:**

- Microarray kísérletben tapasztalt SPB2 transzkripciós aktivitás emelkedése UV sugárzás hatására igazolható-e qPCR módszerével?
- Az UV sugárzás hatására megemelkedő SPB2 mRNS expresszió szint változás sejtvonal- vagy szövet specificitást mutat-e?
- Az UV sugárzás befolyásolja-e az SPB2 fehérje szintjét?
- Az SPB2 szubcelluláris lokalizációja változik-e UV kezelés hatására?
- UV sugárzás következtében megfigyelhető-e, hogy az SPB2 a sérült DNS régiókhoz kötődik?
- Az UV sugárzás mellett egyéb DNS károsító ágensek is kiválthatják-e ezt a hatást?

- Megfigyelhető-e az SPB2 a hibajavítási fókuszokban, ahol a NER komplex tagjai összeszerelődnek?
- Az SPB2 kapcsolata a NER komplex-szel ubiquitiláció által közvetített poszt-transzlációs módosításokkal kapcsolt folyamat-e?
- Lehet-e kapcsolat az SPB2 fehérje és a bazális sejtes karcinóma (BCC) között? Van-e különbség az SPB2 fehérje mennyiségében, vagy lokalizációjában az ép és tumoros szövetekben?

### **SPB10:**

- Az előzetes microarray kísérletben tapasztalt *SPB10* mRNS szint emelkedése UV sugárzás hatására igazolható-e qPCR technika segítségével? A tapasztalt UV sugárzásra adott válasz sejtípus specifikus-e?
- Az SPB10 csendesítése befolyásolja-e a sejtek túlélését UV kezelés hatására?
- Az SPB10 fehérje szerepet játszik-e az UV károsodás indukálta sejtválasz folyamatokban?
- Az SPB10 feltételezett szerepe a DNS hibajavításban egy köztes fehérjén keresztül valósul meg, vagy az SPB10 közvetlenül a DNS-hez kötődik UV kezelést követően?

## Alkalmazott módszerek

- Tripán kék és kristályibolya festéssel vizsgáltuk az UV sugárzás és a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> humán sejtekre gyakorolt toxicitását
- Microarray technikával azonosítottuk a Hker E6SFM sejtek UV sugárzásra adott génexpresszió változásait.
- Kvantitatív real time PCR (qPCR) technika segítségével vizsgáltuk az *SPB2* és *SPB10* UV sugárzás hatására bekövetkező expresszió változásait.
- Western blot technika segítségével vizsgáltuk az *SPB2* fehérje szintjét és szubcelluláris lokalizációját UV sugárzás hatására.
- CSK-immunhisztokémia segítségével vizsgáltuk a kromatin kötött *SPB2* fehérje szintjét különböző DNS hibákat kiváltó stresszhatások következtében.
- CSK-Immunistokémia segítségével vizsgáltuk az *SPB2* és a *NER* hibajavító fehérjék ko-lokalizációját.
- Ko-immunprecipitációval vizsgáltuk, hogy az *SPB2* kölcsönhat-e az *XPB*, valamint az elongáló Polimeráz II (*S2P RPB1*) fehérjékkel, továbbá tanulmányoztuk az *SPB10* és a *H3* fehérje kapcsolatát.
- „LacO-tethering” módszer segítségével vizsgáltuk, hogy az *SPB2* megjelenik-e a hibajavító fókuszokban, ahol a



nukleotid kivágó javítófolyamat pre-incíziós komplexének tagjai szerelődnek össze.

- Immunhisztokémiai eljárással vizsgáltuk az SPB2 mennyiségét, valamint előfordulását bazális sejtes karcinóma tumorokból származó szövetmintákon.
- Az SPB10-et csendesítő siRNS-sel vizsgáltuk, hogy a SPB10 befolyásolja-e a sejtek UV kezelést követő túlélését.
- Comet-esszé segítségével vizsgáltuk, hogy az SPB10-nek szerepe van-e az UV sugárzás következtében kialakult DNS hibák javításának folyamatában.

## Eredmények

Kutatócsoportunkkal nemrégiben közöltünk egy tanulmányt, melyben egy immortalizált keratinocita sejtvonal, a Hker E6SFM UV sugárzásra adott génexpresszió változásait vizsgáltuk. Az UV kezelés hatására megemelkedett transzkripciós aktivitású gének közül kimutattuk a Serpin fehérjecsalád több tagját is, melyek szerepét korábban még nem vizsgálták a DNS károsodás hatására indukálódó sejtválaszban. Disszertációm fő célja az UV károsodás indukciója után a két legerősebb génexpresszió változást mutató SerpinB2 (SPB2) és SerpinB10 (SPB10) génekről termelődő fehérjék funkciójának jellemzése volt.

Ph.D. munkám során sikerült kimutatnom, hogy UV kezelés hatására az *SPB2* mRNS és fehérje szintje is megemelkedik számos bőr eredetű sejtvonalban. U2OS oszteosarkóma sejtvonalban szintén igazoltuk az *SPB2* mRNS szint emelkedését UV kezelés hatására. Arra a következtetésre jutottunk, hogy az *SPB2* expresszió emelkedés UV sugárzás hatására egy általános, evolúciósan konzervált folyamat, mely sejtválasz azonban a bőrsejtekben sokkal intenzívebb hatású. Továbbá azt is megfigyeltük, hogy az *SPB2* fehérje UV sugárzás hatására a citoplazmából a sejtmagba transzportálódik

és ott fókuszokat alakít ki, mely utalhat a fehérje hibajavító lókuszokban történő megjelenésére. Kimutattuk azt is, hogy ezt a folyamatot nem csak az UV károsodás aktiválja, hanem megfigyelhető  $H_2O_2$  kezelés hatására is. Mindezen eredményekből arra következtettünk, hogy az SPB2 fehérje aktivációja olyan stresszhatások következménye lehet, melyekből a nukleotidokat érintő és gyors javítást igénylő DNS hibák származnak.

Kísérleteinkben megfigyeltük, hogy UV kezelést követően az SPB2 fehérje ko-lokalizálódik a NER útvonal középső szakaszában aktív XPB fehérjével. „LacO-tethering” módszert alkalmazva az XPB kihorgonyzását követően megfigyelhettük az SPB2 fehérje NER pre-incíziós komplexszel való ko-lokalizációját kezeletlen és UV kezelt sejtekben is. Valamint sikerült kapcsolatot kimutatnunk az SPB2 és az UV kezelés hatására kialakuló ubiquitiláció-függő útvonal között, amely alapján feltételeztük, hogy az SPB2 fehérjének szerepe lehet a NER ubiquitiláció általi finomszabályozásában.

Továbbá vizsgáltuk az SPB2 jelenlétét és szintjét bazális sejtes bőrtumorokból származó humán szövetmintákon. Az SPB2 fehérje mennyiségében nem, de sejten belüli eloszlásában különbséget találtunk a normál és a tumoros szövetrészek között. Ép szövetrészekben az SPB2 a sejtmagban és a citoplazmában helyezkedik el, míg a minták tumoros

szövetrészeiben az SPB2 csak a citoplazmában lokalizálódott. Mindezen eredményekből arra a következtetésre jutottunk, hogy az SPB2 egy potenciálisan új szabályzó faktor az UV sugárzás indukálta javító mechanizmusban.

Korábbi microarray eredményeink arra utaltak, hogy Hker E6SFM sejtekben az SPB2 mellett az SPB10 is szerepet játszhat az UV sugárzás kiváltotta sejtválaszban. Annak érdekében, hogy tanulmányozzuk az SPB10 szerepét, első lépésként qPCR módszert alkalmaztunk és azt tapasztaltuk, hogy UV sugárzás hatására az *SPB10* mRNS szintje megemelkedett Hker E6SFM, HaCaT és A375 melanoma sejtekben.

Comet-esszét alkalmazva kimutattuk, hogy SPB10 csendesített S-fázisú sejtekben UV kezelés hatására sokkal gyorsabb a DNS hibák javítása, mint a nem csendesített sejtekben. Valószínűsítjük, hogy az SPB10 a DNS hibajavítást lassítja, így elősegítheti a precízebb, ám több időt igénylő javítás folyamatát replikálódó sejtekben, ezzel csökkentve a mutációk előfordulásának gyakoriságát. Végül igazoltuk, hogy az SPB10 kölcsönhat a H3 fehérjével és az interakció a két fehérje között UV kezelés hatására erősödik.

Összefoglalásként elmondható, hogy a SerpinB fehérjecsalád több tagja is szerepet játszik az UV kiváltotta sejtválaszban. Dolgozatomban két fehérje, az SPB2 és az SPB10 vizsgálatával

foglalkoztam. Eredményeink alapján elmondható róluk, hogy UV sugárzást követően megemelkedik az expressziójuk, és a kromatin kötött frakcióban dúsulnak fel. Arra következtetünk, hogy az SPB2 és SPB10 az UV sugárzás hatására bekövetkező DNS hibajavítás finomszabályzásában vesznek részt. Feltételezéseink szerint az SPB2 fehérjének a NER útvonalban, az XPB aktivitását követő folyamatok regulációjában lehet szerepe, míg az SPB10 az UV kiváltotta replikációs stressz feloldásában működhet közre.

## **Publikációs lista**

**MTMT azonosító: 10048472**

### **A dolgozat alapjául szolgáló közlemény:**

SerpinB2 is involved in cellular response upon UV irradiation, **Hajnalka Majoros**, Zsuzsanna Ujfaludi, Barbara Nikolett Borsos, Viktória Vivien Hudacsek, Zita Nagy, Frederic Coin, Krisztina Buzas, Ilona Kovács, Tamás Bíró, Imre Miklós Boros, Tibor Pankotai; Sci.Rep. 2019 Feb 26; 9 (1): 2753. doi: 10.1038/s41598-019-39073-w

**SCIENTIFIC REPORTS 9: 2753. (2019)**

**IF: 4,525**

Coordinated activation of a cluster of MMP genes in response to UVB radiation, Zsuzsanna Ujfaludi, Agota Tuzesi, **Hajnalka Majoros**, Balint Rothler, Tibor Pankotai, Imre Miklós Boros; Sci.Rep. 2018 Feb 8; 8(1):2660. doi: 10.1038/s41598-018-20999-6

**SCIENTIFIC REPORTS 8: 2660. (2018)**

**IF: 4,525**

### **Egyéb közlemények:**

Quantification of DNA damage induced repair focus formation via super-resolution dSTORM localization microscopy, Dániel Varga\*, **Hajnalka Majoros\***, Zsuzsanna Ujfaludi, Miklós Erdélyi, Tibor Pankotai; Nanoscale 2019 doi: 10.1039/C9NR03696B

**NANOSCALE**: 2019.06.30.

**IF**: 7,233

Human p53 interacts with the elongating RNAPII complex and is required for the release of actinomycin D induced transcription blockage, Barbara Nikolett Borsos, Ildiko Huliák, **Hajnalka Majoros**, Zsuzsanna Ujfaludi, Péter Pukler, Imre Miklos Boros, Tibor Pankotai; Sci.Rep. 2017 Jan 19; 7:40960. doi:10.1038/srep40960.

**SCIENTIFIC REPORTS 7**: p. 40960. (2017)

**IF**: 5,228

Detection of invasive fungal pathogens by real-time PCR and high-resolution melting analysis, Ferenc Somogyvari, Adam Horvath, Julianna Serly, **Hajnalka Majoros**, Csaba Vagvolgyi, Zoltan Peto; In Vivo 2012 Nov-Dec; 26(6):979-83

**IN VIVO 26**: 979-984 (2012)

**IF**: 1,219

**Összesített impakt faktor: 22,73**

**Ismeretterjesztő közlemények:**

DNS-hibák és ami mögöttük van. Borsos B, Majoros H, Újfaludi Zs, Páhi Z, Pankotai T; ÉLET ÉS TUDOMÁNY LXXI:(6) pp. 180-182. (2016)

***ÉLET ÉS TUDOMÁNY LXXI:(6) pp. 180-182. (2016)***