

Szegedi Tudományegyetem
Szent-Györgyi Albert Doktori Iskola
Multidiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola

**TARG1 hatása az EGFR szignalizációs útvonalra RNS metabolizmus szabályozásán
keresztül**

PhD Értekezés

Mérey Mihály

Témavezető(k): Dr. Timinszky Gyula

Szeged,
2025

PUBLIKÁCIÓK

1. A tézishez kapcsolódó publikációk

- I. **Mérey, Mihály**; Fajka-Boja, Roberta; Imre, Gergely; Gudmann, Péter; Török, Zsolt; Mátés, Lajos; Czibula, Ágnes; Timinszky, Gyula. TARG1 affects EGFR signaling through the regulation of RNA metabolism SCIENTIFIC REPORTS 15 : 1 Paper: 23651 (2025)

2. A tézishez közvetlen nem kapcsolódó publikációk

- I. Mamar, Hasan; Fajka-Boja, Roberta*; Mórocz, Mónika; Pinto Jurado, Eva; Zentout, Siham; Mihut, Alexandra; Kopasz, Anna Georgina; **Mérey, Mihály**; Smith, Rebecca; Abhishek, Bharadwaj Sharma et al. The loss of DNA polymerase epsilon accessory subunits POLE3-POLE4 leads to BRCA1-independent PARP inhibitor sensitivity NUCLEIC ACIDS RESEARCH 52 : 12 pp. 6994-7011. , 18 p. (2024)

SZÓSZEDET

ARHs	ADP-ribosylhydrolases
cDNA	complementary DNA
c-Fos	Fos Proto-Oncogene, AP-1 Transcription Factor Subunit
CRISPR	clustered regularly interspaced short palindromic repeats
DDR	DNA damage response
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DraG	dinitrogenase reductase activating glycohydrolase
DNA	deoxyribonucleic acid
DRB	Dichlorobenzimidazole 1- β -D-ribofuranoside
EGFR	epidermal growth factor receptor
ErbB 2,3,4	Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 2,3,4
FBS	Fetal Bovine Serum
GAPDH	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase
HER 2,3,4	Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 2,3,4
KO	Knock out
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MAR	mono ADP ribose
MEK 1/2	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 1/2
mRNA	messenger RNA
mTORC1	Mechanistic Target of Rapamycin Kinase
MYC	MYC Proto-Oncogene, BHLH Transcription Factor
PARPs	Poly(ADP-ribose) Polymerases
PI3K	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase

qPCR	quantitative polymerase chain reaction
qRT-PCR	quantitative reverse transcription polymerase chain reaction
rRNA	ribosomal RNA
RAF	RAF Proto-Oncogene Serine/Threonine-Protein Kinase
RAS	RAS Proto-Oncogene, GTPase
RT	szobahőmérséklet
RTKs	Receptor Tyrosine Kinases
WT	vad típus

BEVEZETÉS

Az ADP-riboziláció egy általánosan előforduló biomolekula-módosító folyamat, amely nukleinsavakat és különböző fehérje oldalláncokat érint, és az élővilág valamennyi szintjén megtalálható. Az ADP-ribóz monomerek és polimerek képződése számos sejtes folyamatban játszik szerepet, többek között a DNS-károsodás válaszában, a kromatin szerkezetének szabályozásában, a transzkripcióban és az RNS-feldolgozásban. Mivel reverzibilis módosításról van szó, az ADP-riboziláció szigorúan szabályozott három enzimes család által: ezek a DraG-szerű ADP-ribozil-hidroláz család (ARHs), a makrodomént tartalmazó enzimek családja, valamint a „nukleozid-difoszfát, változó oldallánccal” (Nudix) család. A makrodomént tartalmazó enzimek az élővilág minden szintjein jelen vannak, és egy erősen konzervált ADP-ribóz-kötő doménnel (makrodoménnel) rendelkeznek. Három emberi makrodomént hordozó fehérje képes mono-ADP-ribozilált szubsztrátokat hidrolizálni: MacroD1, MacroD2 és TARG1. Ezek az enzimek képesek eltávolítani az egyetlen ADP-ribóz egységet a fehérjékről, de nem a polimer (PAR) láncot. A TARG1 ezen felül képes hasítani a glutamáthoz kapcsolódó PAR észterkötést is. Fontos, hogy a MacroD1, MacroD2 és TARG1 képesek az ADP-ribóz egység hasítására kettős szálú DNS vagy egyszálú RNS 5' vagy 3' végéről, így reverzálva a nukleinsavak módosítását. Korábbi vizsgálatok során a TARG1 interakciójának feltérképezése kimutatta, hogy a riboszomális fehérjék, valamint az rRNS-anyagcserével és RNS-kötéssel összefüggő fehérjék jelentették a fő kölcsönható partnereket. A TARG1 egyik mutációját olyan pácienseknél azonosították, akik súlyos neurodegeneratív tüneteket mutattak, bár a pontos molekuláris mechanizmus egyelőre tisztázatlan. A túlexpresszált TARG1 a sejtmagvacskákban (nukleólusz) és a magplazmában is megtalálható, és ezek között a kompartmentek között folyamatosan ingázik. Megfigyelések szerint a TARG1 a transzkripcióban aktív nukleóluszból akkumulálódik, és szerepet játszhat a riboszóma-bioszintézis minőségellenőrzésében. A TARG1 csökkent expressziója a 293T sejtek proliferációjának visszaesését, míg a U2-OS sejtek esetében (osteosarcoma eredetű sejtvonal) szeneszcencia növekedését idézte elő. Ezek a megfigyelések arra utalnak, hogy a TARG1 által érintett sejtes folyamatokat nagyrészt a PI3K/Akt és MAPK jelátviteli utak szabályozzák, amelyek kulcsszerepet játszanak a sejtek proliferációjában, differenciálódásában, migrációjában és apoptózisában. Ezen útvonalak fölött helyezkedik el az EGFR, egy membránhoz kötött glikoprotein, amely az ErbB receptor tirozin-kináz család tagja. Az EGFR extracelluláris szignálokat érzékel, majd aktivációja során intracelluláris jelátvitelt indít el. Az EGFR számos humán daganatban gyakran mutálódik, vagy túlzottan

expresszálódik, amit génamplifikáció, pontmutációk vagy in-frame deléciók okozhatnak. Korábbi tanulmányok összefüggést mutattak ki az EGFR és az ADP-riboziláció között, különösen a DNS-károsodás válasz (DDR) kontextusában. EGFR-t túltermelő sejtek érzékenyeknek bizonyultak PARP-gátlószerekkel szemben. Az ADP-riboziláció nemcsak a DNS-javítást, hanem az EGFR-jelátvitelhez kapcsolódó ERK1/2 aktivitását is befolyásolja, amely szerepet játszik a sejtnövekedés, migráció és túlélés szabályozásában. Továbbá a PARP1 gátlása vagy kiütése csökkentette az EGFR expresszióját és foszforilációját is.

A KUTATÁS CÉLJA

Az EGFR jól ismert és kiemelt terápiás célpont a daganatos megbetegedések kezelésében, mivel kulcsszerepet játszik a sejtnövekedés, a migráció, a túlélés, valamint a DNS-károsodás válasz (DDR) szabályozásában. Az EGFR-t a gátló szerek elleni szerzett rezisztencia, illetve maga a jelátviteli út komplexitása, amelyet pozitív és negatív visszacsatolási hurkok, valamint a különböző receptorok közötti kereszt jelátvitel (cross-talk) jellemez, folyamatosan a daganatos megbetegedésekkel kapcsolatos kutatások fókuszában tartja. Számos tanulmány igazolta, hogy a PARP- és EGFR-gátlók kombinált alkalmazása ígéretes terápiás stratégia lehet azon daganatos sejtek esetében, amelyek egyetlen kemoterápiás szerrel szemben rezisztenciát alakítottak ki. Ezzel szemben az ADP-ribóz-hidroláz enzimek (amelyek a PAR/MAR író enzimek által létrehozott módosításokat képesek visszafordítani) szerepét ebben az összefüggésben eddig kevésbé vizsgálták. Jelen kutatás célja az volt, hogy feltérképezzük a TARG1 lehetséges szerepét az EGFR expressziójának, aktivitásának vagy kapcsolódó jelátviteli útvonalainak szabályozásában. A makrodomént tartalmazó hidrolázok közül a TARG1 volt az ideális célpont, mivel ez az egyetlen olyan enzim a három közül (MacroD1, MacroD2, TARG1), amely mind mono-, mind poli-ADP-ribozil módosításokat képes eltávolítani. Emellett a MacroD1 aktivitása főként mitokondriumban zajlik, míg a MacroD2 főként idegrendszeri szövetekben expresszálódik. További célunk volt annak meghatározása, hogy létezik-e szignifikáns összefüggés az EGFR és a TARG1 expressziója és működése között, és amennyiben igen, ez milyen jelentőséggel bírhat a daganatellenes terápiás kutatások szempontjából.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

1. Sejttenyészet

A U2-OS vad típusú és TARG1 knockout (CRISPR/Cas) sejt vonalakat korábban írták le, és DMEM táptalajban (LM-D1109 Dulbecco's Modified Eagle Medium magas glükóz tartalommal, L-glutaminnal, nátrium-piruvát nélkül, Biosera Cholet, Franciaország), 10% FBS-sel (FB-1090/500 magzati borjú szérum (Dél-Amerika), Biosera Cholet, Franciaország), 1x NEAA-val (E1154 MEM, Biosera Cholet, Franciaország) és Penicillin/Streptomycin készítménnyel (A4118, Biosera Cholet, Franciaország) 37 °C-on, 5% CO₂ mellett, nedvesített inkubátorban tenyésztették. A sejt vonalakat rendszeresen ellenőriztük mikoplazma fertőzés szempontjából qPCR alapú módszerrel (MQ-50 MycoQuant Mycoplasma Quantification Kit AVIDIN, Szeged, Magyarország). A TARG1 expresszió csökkentésére stabil U2-OS sejt vonalat használtunk, amely folyamatosan expresszál egy TARG1 elleni miRNS-t. A stabil TARG1 knockdown U2-OS sejt vonalat egy transzposzon-alapú vektor, a pNeo-miR genomba integrálásával hoztuk létre, amely constitutívan expresszál egy amiR-t, amely a TARG1 mRNS GCCCACTGTATCAGTGAGGATT szekvenciáját célozza. Ezt a megközelítést korábbi módszerekhez igazítottuk. Röviden, az amiR elemeket a miR-E gerincstruktúrája alapján terveztük meg, a vezető szekvenciákat pedig a cél specifikitásuk alapján választottuk ki. Az amiR szekvenciákat az AgeI/XbaI helyeken klónoztuk be a pNeo-miR vektorba. Ez a vektor tartalmazza a Sleeping Beauty (SB) transzposzon elemeket a stabil genomintegrációhoz, valamint egy neomicin rezisztencia egységet. A genomintegrált klónok szelekciójához 800 µg/ml G418-at (HY-17561, MedChemExpress, Monmouth Junction, NJ, USA) használtunk három héten át. Az átmeneti siRNS transzfekciókhoz ON-TARGETplus, SMARTpool Human OARD1 siRNS-t (Horizon Discovery; Dharmacon™ Reagents; Katalógus szám: L-015886-02-0005) használtunk a TARG1 célzására, Ambion™ Silencer™Select Human C20orf133 (s44382, s4480 Ambion, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) MacroD2 célzására, és ON-TARGETplus nem célzó kontroll siRNS-t #1 (Horizon Discovery; Dharmacon™ Reagents; Katalógus szám: D-001810-01-20) kontrollként.

A sejteket Screenfect siRNS transzfekciós reagenssel (ScreenFect; Cat#S-4001) transzfektáltuk a gyártó utasításai szerint, majd a transzfekciót követő 72 órával a lizátumokat összegyűjtöttük elemzés céljából.

2. Western blot

A sejteket úgy ültettük le, hogy a kezelés idejére 70–80%-os konfluenciát érjenek el. Az alapállapotú (basal) mintákhoz a sejteket közvetlenül a konfluencia elérése után gyűjtöttük be. A foszfo-EGFR jel detektálásához 4 órára eltávolítottuk a FBS-t, majd 100 ng/ml humán EGF-et (h-EGF; E9644 Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA) tartalmazó tenyésztőközeggel egészítettük ki a sejteket a mintavételi időpontokig. A sejt-lizátumokat 4%-os SDS lízis pufferben (4% SDS, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 50 mM HEPES pH 7,4) gyűjtöttük össze. A lizátumokat 13 000 rpm-en centrifugáltuk 25 percig, majd a felülúszó fehérjetartalmát NanoDrop 2000™ spektrofotométerrel (Thermo Fisher Scientific Inc.) határoztuk meg. Azonos fehérjemennyiséget tartalmazó mintákat 9%-os TRIS/Glicin SDS-PAGE gélen választottuk szét, majd nitrocellulóz (GE10600004 Amersham Protran Premium 0.2 NC, Cytiva, Boston, MA, USA) vagy PVDF membránra (GE10600021 Amersham™ Hybond® P, Cytiva, Boston, MA, USA) transzferáltuk 10%-os metanoltartalmú transzfer puffert használva. A transzfer hatékonyságát Ponceau S festéssel ellenőriztük. A membránokat blokkoltuk 4% gelatin (G7765, Sigma Aldrich) vagy foszfo-blotok esetén 5% BSA-val (A7906 Sigma Aldrich) 1 órán át PBST-ben (1x PBS, 0,05% Tween-20). A blokkolást követően a membránokat elsődleges antitestekkel inkubáltuk egy éjszakán át 4 °C-on: anti-EGFR [EP38Y] (ab52894, Abcam, Cambridge, UK, 1:1000), anti-pEGFR [foszfo Y1068] (ab32430, Abcam, Cambridge, UK, 1:8000), anti-GAPDH (PA1-16777, Thermo Fisher Scientific Inc., 1:3000) és anti-TARG1 (25249-1-AP, ChromoTek GmbH, Planegg-Martinsried, Németország, 1:2000). A mosás után a másodlagos antitestet (G-21234, Goat anti-Rabbit IgG (H+L), HRP, Thermo Fisher Scientific Inc., 1:10 000) adtuk hozzá blokkoló pufferben 1 órára szobahőmérsékleten. A fehérjecsíkokat fokozott kémilumineszcencia (ECL) technikával detektáltuk (SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate, 34580 Thermo Fisher Scientific Inc.), az Alliance Q9 Advanced képalkotó rendszerrel (Uvitec, Cambridge, UK). A jelsűrűséget ImageJ programmal (ImageJ, NIH, Bethesda, MD, USA) mértük, és a betöltési kontrollhoz normalizáltuk.

3. Sejt migráció (wound healing)

A kísérletet megelőző napon a sejteket Ibidi mikroinert rendszerrel ellátott lemezekre vetettük (3×10^5 sejt/ml, 70 µl térfogat). Az inert eltávolítása után a sejteket 37 °C-os, FBS-mentes DMEM-mel mostuk át, majd a következő körülmények között inkubáltuk: szérumentes közeg, 10% FBS-t tartalmazó teljes közeg, illetve 100 ng/ml h-EGF-et

tartalmazó szérumbmentes közeg. A sejtmozgást Zeiss Cell Discoverer 7 fluoreszcens mikroszkóppal monitoroztuk (5% CO₂, 37 °C), és 30 percenként képeket készítettünk 24 órán keresztül ugyanarról a területről. A sebzárodási rátát a következő képlettel számítottuk:

$$\text{sebzárodás (\%)} = [(0h - 24h) / 0h] \times 100,$$

ahol „0h” a kiindulási sebszélesség, „24h” pedig az ugyanazon helyen mért végső érték. Az analízist ImageJ szoftverrel végeztük.

4. EGFR internalization assay (immunfestés)

A sejteket fedőlemezekre vetettük és konfluenciáig neveltük. Ezután a tenyésztőközeget 4 órára szérumbmentes DMEM-re cseréltük, majd 30 percig 100 ng/ml humán EGF-vel (h-EGF) kezeltük. A kezelés után a sejteket PBS-sel mostuk, majd 4% paraformaldehiddel 10 percig szobahőmérsékleten fixáltuk. A permeabilizáláshoz PBS 0,2% Triton X-100-t tartalmazó oldatban inkubáltuk 10 percig. A blokkolást PBS 0,1% Triton X-100 és 5% FBS tartalmú oldatban végeztük 1 órán át szobahőmérsékleten. Ezután az anti-EGFR [EP38Y] antitesttel (ab52894, Abcam, Cambridge, UK) a blokkoló oldatban, 1:1000-es hígításban inkubáltuk a sejteket egy éjszakán át 4 °C-on. A mosások után háromszor 5 percig PBS 0,1% Triton X-100-szal mostuk, majd 1 órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk a Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Cross-Adsorbed másodlagos antitesttel, Alexa Fluor™ 488 (A11008, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc.) 1:500-as hígításban. További mosások után a sejtmagnakot Hoechst 33342-vel (H3570, Thermo Fisher Scientific Inc.) 1:10 000-es hígításban festettük. A fedőlemezeket ProLong™ Glass Antifade Mountant-tal (P36982, Thermo Fisher Scientific Inc.) rögzítettük. A képeket Zeiss LSM 800 konfokális mikroszkóppal készítettük, Plan-Apochromat 40x/0,95 NA és 20x/0,8 NA levegős objektívekkel, GaAsP PMT detektorral, a Zen 2.6 szoftverrel vezérelve.

5. qRT-PCR

A sejtek növekedésének korlátozásához a sejteket 24 órán keresztül szérumbmegvonásos körülmények között tenyésztettük, vagy 24 órás szérumbmegvonást követően további 5 órán keresztül 10%-os FBS-t tartalmazó DMEM tápoldatban inkubáltuk őket az RNS izolálása előtt. A transzkripció és transzláció gátlásának vizsgálatához a sejteket 75 μM DRB-vel (D1916, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) és/vagy 40 μg/ml cikloheximiddel (CHX, C7698, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) kezeltük 12 órán keresztül. A teljes RNS-t a NucleoSpin RNA Kit (740955, Macherey-Nagel) használatával izoláltuk a gyártó utasításai szerint. Az RNS koncentrációját NanoDrop 2000 spektrofotométerrel (Thermo Fisher

Scientific) mértük. Az első szálú cDNS szintézisét 1 µg teljes RNS-ből végeztük RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit segítségével (K1622, Thermo Fisher Scientific Inc.).

Minden qPCR reakció 400 nM koncentrációban tartalmazta az adott génhez tartozó forward és reverse primereket, 20-szor hígított cDNS-t, valamint 1x SYBR Select Master Mix-et (CFX készülékhez, 4472953, Thermo Fisher Scientific Inc.). A használt primerek a következők voltak:

EGFR: fwd: 5'- GACTGCTGCCACAACCAGT -3'
rev: 5'- CGTGGCTTCGTCTCGGAAT -3'

MYC: fwd: 5'- AGCGACTCTGAGGAGGAACAA-3
rev: 5'- C TTCAGACCAATTCTCCTCCGG-3'

CCND1: fwd: 5'- CCTGTCCTACTACCGCCTCA
rev: 5'- CAGTCCGGGTCACACTTGA

RPL27: fwd: 5'- CGCAAAGCTGTCATCGTG - 3'
rev: 5'- GTCAC TTTGCGGGGGTAG - 3'

A qPCR-t 95 °C-on 2 percig történő denaturálással indítottuk, majd 40 cikluson keresztül 95 °C-on 5 másodperces denaturálás, valamint 60 °C-on 20 másodperces anneálás és elongáció követte. A reakciókat Rotor-Gene Q 2Plex készüléken (Qiagen, Hilden, Németország) futtattuk. A Ct-értékeket a Rotor-Gene Q Series 2.3.1 szoftverrel számítottuk. A relatív génexpresszió szintjét a következő képlet alapján határoztuk meg:

dCt = Ct(RPL27) – Ct(célgén). Az átlagértékeket és a hibásávokat három független biológiai ismételten alapján számítottuk ki Microsoft Excel segítségével.

6. Teljes RNA festés

A sejteket fedőlemezekre vetettük. A következő naptól kezdve a sejteket 24 órán át szérumhiányos közegben tartottuk, majd 10%-os szérumot tartalmazó DMEM-mel rekonstituáltuk 5 órán keresztül, vagy 24 órás minták esetén szérummentes DMEM-ben hagytuk. Az össz-RNS-t a Cell Navigator Live Cell RNA Imaging Kit (AAT Bioquest, Pleasanton, CA, USA) használatával vizualizáltuk a gyártó utasításainak megfelelően. A készletben alkalmazott StrandBrite™ RNA Green kiváló RNS-szelektivitással rendelkezik. A

DNS-t Hoechst 33342-vel (H3570, Thermo Fisher Scientific Inc.) festettük, amelyet PBS-ben 1:10 000 arányban hígítottunk. A képeket Zeiss LSM 800 konfokális mikroszkóppal készítettük, Plan-Apochromat 40X/0,95 NA és 20X/0,8 NA levegős objektívvel, valamint GaAsP (gallium-arzén) PMT detektorral, a Zen 2.6 szoftver használatával. A nukleocitoplazmatikus RNS-intenzitás arányt a nyílt forráskódú sejtkep-analízis szoftverrel, a CellProfiler-rel mértük egy egyedi elemzési folyamat (pipeline) segítségével. Röviden, a mag területét a Hoechst csatorna alapján szegmentáltuk. Ezután a sejtek kontúrait az RNS csatornából kiinduló propagációval definiáltuk, kezdve a szegmentált magoktól. A citoplazmák a propagált citoplazmatikus területek voltak, melyekből kivontuk a mag területét. A nukleocitoplazmatikus RNS-intenzitás arány kiszámításához az RNS csatorna átlagintenzitását mértük a citoplazmatikus és magterületeken, majd a citoplazmatikus RNS átlagintenzitást elosztottuk az adott mag átlagos RNS-intenzitásával minden szegmentált mag esetében. Az adatokat ábráztuk, és a statisztikai elemzéseket a GraphPad Prism (GraphPad Software, Boston, Massachusetts, USA, www.graphpad.com) programmal végeztük.

7. SunSET assay (teljes fehérje szintézis kimutatása)

Az U2-OS vad típusú, TARG1 knockout és stabil TARG1 knockdown sejtek normál tenyésztő közegben vagy 24 órás szérummegvonásos körülmények között kerültek tenyésztésre, majd az adott mintákat további 5 órán át szérummal stimulálták. A fehérjeszintézist a SunSET assay segítségével detektáltuk. Röviden, 1 μ M puromicin (sc-108071C, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) került hozzáadásra a sejt kultúrákhoz, majd 30 percig inkubáltuk. Negatív kontrollként a mintákat 10 percen át 100 μ g/ml cikloheximiddel (C7698, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) kezeltük a puromicin hozzáadása előtt. A puromicin kezelés után a sejteket PBS-sel mostuk, majd 4%-os SDS lizáló pufferrel lyzáltuk, és a fehérje koncentrációját NanoDrop 2000™ spektrofotométerrel (Thermo Fisher Scientific Inc.) határoztuk meg. Az egyenlő mennyiségű fehérjét 10%-os SDS-PAGE gélen választottuk szét, majd nitrocellulóz membránra transzferáltuk. A membránokat 3%-os gelatin PBST-ben blokkoltuk, majd anti-puromicin egér monoklonális ellenanyaggal (MABE343, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA, 1:20 000) inkubáltuk, ezt követően HRP-konjugált kecske anti-egér IgG (H+L) ellenanyaggal (31432, Invitrogen Thermo Fisher Scientific Inc., 1:10 000) kezeltük. A fehérje sávokat ECL oldattal (SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate, 34580 Thermo Fisher Scientific Inc.) vizualizáltuk az Alliance Q9 Advanced képalkotó rendszerrel (Uvitec, Cambridge, UK). A GAPDH fehérjét töltési kontrollként alkalmaztuk.

8. Sejt ploriferáció (resazurin assay)

A sejtosztódási vizsgálatokhoz a sejtvonalakat Rapamicinnal (37094 Vetranal analytic standard, Merck KGaA, Darmstadt, Németország) és U0126-tal (9903, Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA, USA) kezeltük. Minden egyes 96-lyukú tenyésztőlap egy-egy jólébe 1000 sejtet ültettünk, majd másnap 100 ng/ml Rapamicint, 25 μ M U0126-ot vagy ezek kombinációját adtuk hozzá 10%-os FBS-t tartalmazó DMEM közeghez. 72 óra elteltével a tenyésztőközeget frissre cseréltük további 72 órára. A gyógyszerek koncentrációja a teljes 6 napos kísérlet alatt változatlan maradt. A 6. napon a tenyésztőközeget Gibco™ Leibovitz's L-15 Mediumra (fenolvöröset nem tartalmazó, 11540556, Thermo Fisher Scientific Inc.) cseréltük, amely 25 μ g/ml Resazurint (199303, Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA) tartalmazott, majd 30 percig inkubáltuk CO₂ termosztátban. A fluoreszkáló anyagcsere-terméket Bio-Tek Synergy H1 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) mikroplate olvasóval mértük, 530/590 nm-es szűrőkészlettel. Minden minta életképességét a megfelelő genotípusú, kezeletlen kontrollmintákhoz normalizáltuk.

9. Statisztikai kiértékelés

Az eredményeket az egyes vizsgálatokban legalább három biológiai ismételés átlaga $\pm$ SEM értékeként adtuk meg. A statisztikai szignifikanciát a ábrák alatti magyarázatokban leírt módon határoztuk meg ($p=0,05$ -öt tekintettünk szignifikáns különbségnek minden elemzésben).

EREDMÉNYEK

10. A sejt migráció gyengült a TARG1 kiütött mutánsokban

Annak vizsgálatára, hogy a TARG1-hiány jelentős hatással van-e a sejtek migrációjára, sebfeltöltő (wound healing) vizsgálatot végeztünk TARG1 KO és kontroll, vad típusú (WT) sejtvonalakon. A sejteket Ibidi betétekkel ellátott tenyésztőedényekben tenyésztettük konfluenciáig, mely betétek eltávolítása után egységes karcot hoznak létre a sejtrétegben. A sejteket szérumban inkubáltuk a proliferációs hatások minimalizálása érdekében, és humán EGF-vel (h-EGF) stimuláltuk, hogy elősegítsük a sejtek migrációját a létrejött résbe. A sebzárást 24 órával a h-EGF hozzáadása után mértük. Kvantitatív elemzés kimutatta, hogy a h-EGF-vel stimulált TARG1 KO sejtek jelentősen csökkent migrációt mutattak a WT sejtekhez képest, lassabb sebzárási sebességgel. A 10%-os FBS-t tartalmazó közeggel stimulált sejtek pozitív kontrollként szolgáltak, míg a szérumban tartott sejtek negatív kontrollként voltak jelen. A pozitív kontroll eredményei mindkét sejtvonalon hasonlóak voltak a h-EGF stimulációval kapott eredményekhez, míg a negatív kontrollban nem mutatkozott szignifikáns különbség a TARG1 KO és WT között, ami arra utal, hogy az észlelt eltérések valóban a migrációnak, és nem a sejtvonalak eltérő proliferációs kapacitásának köszönhetők. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy a TARG1 szükséges a hatékony EGF-által stimulált sejt migrációhoz.

11. Az EGFR vezikuláris transzportjában nem volt megfigyelhető szignifikáns különbség a vad típusú és TARG1 kiütött mutáns sejtek között

A következő lépésben receptor internalizációs vizsgálatot végeztünk, hogy megfigyeljük, mutat-e eltérést a TARG1 mutáns sejt vonal az internalizáció sebességében vagy az EGFR receptor vezikuláris trafficking dinamikájában (a jel specifikus sejtsekreáció körüli akkumulációja, a jelintenzitás változása időben). A sejteket szérumban tartás után 30 percig humán EGF-vel stimuláltuk, majd a mintákat fixáltuk, és immunfestést végeztünk az EGFR intracelluláris doménjének epitóp-specifikus antitestével mind a szérumban tartott, mind a 30 perces stimulációs mintákon. A vad típusú és TARG1 mutáns sejtek nem mutattak eltérést az internalizáció dinamikájában a kísérlet során, kivéve, hogy a TARG1 knock out sejt vonal alacsonyabb jelintenzitást mutatott. Ez az adat arra engedett következtetni, hogy az EGFR aktivációja és internalizációja során a receptor vezikuláris trafficking nem mutatott akkumulált visszatartást vagy gyorsított degradációt, valamint nem volt megfigyelhető változás a trafficking útvonalában sem a sejtsekreáció felé a vad típusú és a TARG1 knock out mutáns között.

12. A TARG1 kiütött és csendesített sejtek lecsökkent EGFR fehérje szintet mutattak

Mivel az immunfestéses (IF) kísérletek során az egyetlen különbség az alacsonyabb jelintenzitás volt, a következő lépésként a receptor kifejeződési szintjét és aktivitási állapotát western blot vizsgálattal ellenőriztük. Mind az összes, mind a foszforilált EGFR fehérjeszintet kvantifikáltuk a vad típusú (WT) és TARG1 KO sejtek teljes sejtlízátumaiból. Az eredmények csökkent összes EGFR fehérjeszintet és a receptor foszforilációjának mérséklődését mutatták a TARG1 KO sejtekben. Azonban, amikor a foszfo-EGFR szinteket az összes EGFR-hez normalizáltuk, nem észleltünk szignifikáns különbséget a vad típusú és a TARG1 KO sejtek között. A TARG1 EGFR-szintekre gyakorolt hatásának megerősítésére további kísérleteket végeztünk stabil miRNS-expressziós (TARG1 KD) és tranziens siRNS transzfekciós módszerekkel, amelyekkel a vad típusú sejtekben elnémítottuk a TARG1 kifejeződését. Mind a stabil miRNS-expressziós TARG1 KD sejtvonalt, mind a siRNS-es TARG1 némítás csökkentette az EGFR fehérjeszintjét, bár kisebb mértékben, mint a TARG1 KO esetén. Ezek az eredmények alátámasztják a korábbi migrációs vizsgálat eredményeit, mivel a TARG1 knock out sejtvonalt csökkentett receptor szintje miatt kevesebb jel érkezik a sejt extracelluláris teréből, ezáltal csökken a jelintenzitás, amely aktiválja azokat az útvonalakat, amelyek szabályozzák a sejtek migrációs képességét.

13. Fokozott RNS forgalom volt megfigyelhető a TARG1 kiütött sejtekben

Annak vizsgálatára, hogy a TARG1 KO sejtekben megfigyelt EGFR fehérjeszint csökkenése kísérő változásokat eredményez-e az mRNS szinten is, megmértük az EGFR mRNS expresszióját vad típusú (WT) és TARG1 KO sejtekben. A sejteket 24 órán át szérummegvonás kezelésnek vetettük alá, majd 5 órás regenerálódási időszak következett, amely alatt a tenyésztőközeg 10%-os FBS-t tartalmazott. Kvantitatív RT-PCR (qRT-PCR) elemzés kimutatta, hogy mindkét körülményben az EGFR mRNS szintje jelentősen alacsonyabb volt a TARG1 KO sejtekben a WT-hez képest. Érdekes módon, míg a WT sejtek EGFR mRNS szintje a 5 órás regenerálódás alatt nem változott jelentősen, a TARG1 KO sejtekben ebben az időszakban szignifikáns növekedés volt megfigyelhető, habár a szérum indukálta génexpressziós változások nem csökkentették az EGFR mRNS alacsonyabb szintjét a TARG1 KO sejtekben.

Az EGFR jelátvitelt a génexpresszió szintjén vizsgálva megmértük két EGFR-célgén, a MYC és a ciklin D1 (CCND1) mRNS szintjének változását szérum stimuláció hatására. A MYC transzkripcióját az EGFR a MAPK útvonalon keresztül szabályozza. A CCND1 expresszióját

több, az EGFR jelátviteli útvonal alsóbb szintű effektorainak tekinthető transzkripciós faktor szabályozza, többek között a MYC proto-onkogén és az AP-1 transzkripciós faktor komplex, amely Jun és c-Fos fehérjékből áll. A MYC mRNS szintje jelentősen megnőtt mind WT, mind TARG1 KO sejtekben szérumszorongás hatására. Ezzel szemben a CCND1 mRNS szintje jelentősen emelkedett a vad típusú sejtekben, míg a TARG1 KO sejtekben ez az emelkedés nem volt szignifikáns. Érdekes azonban megjegyezni, hogy szérumszorongás után a CCND1 mRNS szintje nagyon hasonló volt WT és TARG1 KO sejtekben, és a különbség inkább a szérumszorongásos állapotban mutatkozott meg, ahol a TARG1 KO sejtek CCND1 mRNS szintje nem csökkent a WT-ben megfigyelthez hasonlóan. Összességében ezek az eredmények arra utalnak, hogy az EGFR jelátvitel nem sérül a génexpresszió szintjén TARG1 hiányában, függetlenül az EGFR fehérje szint csökkenésétől. Az EGFR mRNS csökkenése a TARG1 KO sejtekben ösztönzött minket arra, hogy tovább vizsgáljuk az mRNS stabilitását, valamint a transzkripció és a transzláció esetleges szerepét a szabályozásban. Ehhez Dichlorobenzimidazole 1- β -D-ribofuranoside-t (DRB) alkalmaztunk az RNS-polimeráz II általi transzkripció gátlására, valamint cikloheximidet (CHX) a transzláció elongációjának blokkolására, és megmértük ezek egyéni és kombinált hatását az EGFR, MYC és CCND1 mRNS szintjeire. Normál tenyésztőközegben az EGFR mRNS szintje szignifikánsan alacsonyabb volt TARG1 KO sejtekben a WT-hez képest. Ezt alátámasztották az EGFR mRNS mérések siRNS transzfekcióval TARG1 némított sejtekben. A transzkripció 12 órási gátlása mind a vad típusú, mind a TARG1 KO sejtekben csökkentette az EGFR mRNS szintjét, azonban az EGFR mRNS csökkenése nagyobb volt TARG1 KO sejtekben. Míg a CCND1 mRNS szintje csak a TARG1 KO sejtekben csökkent. A MYC mRNS szintek enyhén, de nem szignifikánsan emelkedtek mindkét sejtvonalban transzkripció gátlás esetén, ami az mRNS lebomlás és a transzkripció közötti bonyolult visszacsatolásra utal. A transzláció gátlása CHX-szel mind WT, mind TARG1 KO sejtekben megnövelte a MYC mRNS szintjét. Érdekes módon, az EGFR mRNS szintek közötti különbség a WT és TARG1 KO között megszűnt, amikor a transzláció gátolt volt, ami arra utalhat, hogy a TARG1 transzlációs szabályozáson keresztül hat. Ugyanakkor, amikor a transzkripciót és transzlációt egyszerre blokkoltuk, mindhárom vizsgált gén mRNS szintje szignifikánsan nagyobb mértékben csökkent TARG1 KO sejtekben, mint WT-hez képest a csak CHX-vel kezelt állapotokhoz képest. Összességében ezek az eredmények arra utalnak, hogy a TARG1 hiánya csökkenti az mRNS-ek stabilitását és fokozza az mRNS lebomlást.

14. TARG1 függő szabályozása az RNS eloszlásnak és translációnak

Annak a hipotézisnek a tesztelésére, miszerint a TARG1 részt vesz az RNS-anyagcserében, ahelyett, hogy csak néhány specifikus, ugyanazon úton szabályozott gén mRNS szintjét vizsgáltuk volna, teljes RNS festést végeztünk a sejtvonalakon, amely lehetővé tette a teljes RNS szintek esetleges változásainak gyors és egyszerű megfigyelését. Az általunk használt festék kifejezetten RNS-re szelektív volt, miközben alacsony háttérfestést okozott a DNS-en (a DNS-t Hoechst festékkel előfestettük, hogy relevánsabb eredményeket kapjunk).

Kísérleteinkben ugyanazt a beállítást alkalmaztuk, mint a qRT-PCR méréseknél, azaz a sejteket 24 órán át szérummegvonásos kezelésnek vetettük alá, majd 5 órán át 10%-os szérummal stimuláltuk őket. Megfigyeltük, hogy a TARG1 mutáns sejtvonalakban a teljes RNS szint szignifikánsan magasabb volt a magban 24 órás szérummegvonás után, és ugyanilyen tendencia figyelhető meg az 5 órás szérum stimuláció után is. A citoplazmatikus területen 24 óra után nem mutatkoztak jelentős különbségek a sejtvonalak között, de az 5 órás szérum stimulációt követően a vad típusú sejtekben a teljes RNS szint jelentősen magasabb volt, mint a TARG1 mutáns sejtvonalakban. Annak érdekében, hogy pontosabb képet kapjunk a teljes RNS eloszlásáról a mag és a citoplazma között a különböző kezelések során, kvantifikáltuk az RNS citoplazmatikus és magi eloszlását, ahol a citoplazmatikus RNS intenzitást elosztottuk a magi RNS intenzitással. A vad típusú sejtekben a szérum stimuláció szignifikánsan növelte a citoplazmatikus/magi RNS arányt, ami az RNS újraeloszlását jelzi a magból a citoplazmába, ami a transláció újraindulásával járhat. TARG1 KO sejtekben a szérummegvonás után nem szignifikáns csökkenést figyeltünk meg a citoplazmatikus/magi RNS arányban a WT sejtekhez képest, amely csak enyhén emelkedett az 5 órás szérum stimuláció során. A miRNS-indukált TARG1 KD azonban jelentősen csökkentette az RNS újraeloszlását a magból a citoplazmába a szérum stimulációt követően a WT sejtekhez viszonyítva, továbbá a szérum stimuláció alatt mért citoplazmatikus/magi arány szignifikánsan alacsonyabb volt a WT-hez képest. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a TARG1 expressziós szintje szerepet játszhat az RNS érésében, stabilitásában és exportjában. Annak megállapítására, hogy az RNS eloszlásában bekövetkezett változások összefüggésben állnak-e a transláció változásaival, elvégeztük a SUNSET tesztet, amely újonnan szintetizált fehérjéket mutat ki rövid puromicin impulzus bejuttatásával, amit anti-puromicin antitesttel detektálnak. Kontrollként a WT és TARG1 KO sejteket vagy csak puromicinnel kezeltük, vagy előkezeltük a translációs gátló cikloheximiddel (CHX), majd a puromicin beépülést Western blot segítségével elemeztük. A puromicin hatékonyan jelöli az újonnan szintetizált

fehérjéket, míg a transláció gátlása megakadályozza a puomicin beépülését. Érdekes módon a puomicin jelölés fokozott translációt mutatott a TARG1 KO sejtekben a WT-hez képest. Ezután megvizsgáltuk, hogy a szérummegvonás, majd szérum stimuláció milyen hatással van a translációra WT, TARG1 KO és TARG1 KD sejtvonalakban. Normál tenyésztési körülmények között mind a TARG1 KO, mind a KD sejtvonalakban fokozott puomicin jelölést figyeltünk meg a WT-hez képest. A 24 órás szérummegvonás alig befolyásolta a WT sejtek translációját, míg a TARG1 KO és KD sejtek translációja a WT szintjére csökkent. Az 5 órás szérum stimuláció hatására a WT és TARG1 KO sejtekben megnőtt a transláció, amit a fokozott puomicin jelölés mutatott, de ez a fokozódás nem volt megfigyelhető a TARG1 KD sejtekben. Ezek az eredmények a WT-hez képest emelkedett translációs szintet mutatnak TARG1 KO és KD sejtekben, ami további bizonyíték arra, hogy a TARG1 szerepet játszik a transláció szabályozásában.

15. TARG1 mutáns sejtvonalak nagyobb érzékenységet mutattak a vad típusnál MEK1/2 gátlószerezrel szemben

A translációt és a transzkripciót két fő jelátviteli útvonal szabályozza, a PI3K/mTOR és a Ras/Raf/MEK/ERK utak. Célunk annak vizsgálata volt, hogy a sejtosztódásra milyen hatással van a TARG1 expresszió megváltozása specifikus útvonalgátlókkal történő kezelés után. A sejteket rapamicinnel, az mTOR gátlóval, valamint U0126-tal, a MEK1/2 gátlóval kezeltük önmagukban, illetve kombinációban. A rapamicinnel történő kezelés önmagában nem eredményezett szignifikáns különbséget a WT és a TARG1 KO sejtek életképességében. Ugyanakkor az U0126 mind a TARG1 KD, mind a KO sejtekben nagyobb mértékben csökkentette az életképességet, mint a vad típusú sejtekben. Érdekesség, hogy az U0126 és a rapamicin együttes alkalmazása csak a WT sejtek érzékenységét növelte, így megszüntette a WT és a TARG1 KO sejtek közötti különbséget a MEK1/2 gátlásra adott válaszban. A TARG1 KD sejtek MEK1/2 és mTOR gátlásra adott érzékenysége gyakorlatilag megegyezett a TARG1 KO sejtekével.

Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a TARG1 hatással lehet egy olyan szabályozó célpontra, amely a PI3K/mTOR és a Ras/MEK/ERK útvonalak közötti keresztbeszédben vesz részt, potenciálisan az mTOR aktivitás modulálásán keresztül.

ÖSSZEFOGLALÓ

A poszttranszlációs módosítások kulcsfontosságú szabályozó elemei különböző enzimatisz aktivitásoknak és más biomolekulák stabilitásának, dinamikájának, valamint interakcióinak a sejtekben. Az elmúlt években kimutatták, hogy az ADP-ribosiláció, mint poszttranszlációs módosítás, nemcsak a fehérjék különböző aminosav-csoportjait módosítja, hanem nukleinsavakat is, ami még összetettebbé tette a PARP enzimesalád kutatásának területét, szélesebbkörű szerepét reprezentálva a már jól ismert DNS hibajavításban betöltött szerepén kívül. A család polimeráz aktivitású enzimeit mellett az ADP-ribóz módosításokat eltávolító hidrolázok is rendkívül fontosak, mivel képesek visszafordítani a polimerázok által végzett módosításokat, ezzel megszüntetve az adott jelet (aktiváló vagy deaktiváló), vagy segítve egy ciklikus, folyamatos jel újraírását egy célmolekulán. A közelmúltban végzett kutatásaink során a TARG1 nevű ADP-ribóz-hidroláz enzim szerepét vizsgáltuk egy ismert, proto-onkogén fehérje, az EGFR expressziós profiljának szabályozásában U2-OS oszteoszarkóma sejtvonalban. “Wound healing” kísérlettel kimutattuk, hogy a TARG1 gén kiütött sejteknek gyengébb volt a sejt migrációs képessége. Western blot és RT-qPCR kísérleteink bizonyították, hogy a TARG1 mutánsokban az EGFR expressziója alacsonyabb volt, mind a fehérje, mind az mRNA szinten, valamint immunfestéssel kimutattuk, hogy a receptor endocitózisa és endoszomális eloszlása aktivált állapotában nem különbözött a vad típusú sejtektől. Továbbá, annak ellenére, hogy a ligand általi aktiválásakor a foszforilált (aktív) receptor mennyisége alacsonyabb volt (amely lineáris összefüggést mutatott a receptor fehérje mennyiségének expressziójával a sejtvonalakban), a TARG1 mutánsok nem mutatták a receptor célgénnek nagy mértékű deficiens transzkripciósz szabályozását (CCND1, MYC). Másrészt, specifikus inhibitorokkal végzett transzkripciósz és/vagy transzlációsz gátlás során instabilabb mRNA szinteket mértünk az idő függvényében a TARG1 KO-ban. Ez az eredmény megerősítette eddigi következtetéseinket, amelyet RNS-specifikus jelölővel végzett festéssel, ahol az RNS forgalom citoplazma és mag közötti aránya, valamint puromycin specifikus western blottal (amely a globális transzlációsz profilt vizsgálta) támasztottunk alá, szignifikáns különbségeket mutatott a sejtvonalak között. Ezekből a kísérletekből arra a következtetésre jutottunk, hogy a TARG1 szabályozó szerepet játszik RNS biogenezisben mind poszt-transzkripcionális, mind transzlációsz szinten. Továbbá, a TARG1 mutánsok sejt proliferációsz vizsgálatai érzékenységet mutattak MEK inhibitorral való kezelésre, de nem mutattak mTORC1 inhibitor esetében (RNS biogenezis fő enzimatisz szabályozó útvonalai), ami arra utal, hogy a TARG1 szerepet játszhat a RAS-RAF-MEK-ERK/AKT-mTOR közös szabályozási útvonalon. Összességében adataink

erősen arra utalnak, hogy a TARG1 szabályozó szerepet játszik az RNS biogenezisben, és ezzel együtt az EGFR szintjének szabályozásában az U2-OS sejtvonalakban.

KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném kifejezni mély hálámat témavezetőmnek, **Dr. Timinszky Gyulának**, amiért doktori tanulmányaim kezdetén lehetőséget adott, hogy bekapcsolódhassak kutatócsoportjának tudományos munkájába, így bővíthettem ismereteimet a magas színvonalú kutatás területén. Hálás vagyok iránymutatásáért, tanácsaiért és építő kritikájáért, melyek végigkísérték kutatásomat. Emberi hozzáállásával, magas szintű szakmai tudásával és széles látókörével nemcsak példát mutat számunkra, hanem igazán inspiráló légkört teremtett, amely mindannyiunk fejlődését ösztönzi. Köszönettel tartozom továbbá kutatócsoportunk minden tagjának: **Dr. Czibula Ágnesnek, Dr. Fajka-Boja Robertának, Dr. Henn Lászlónak, Hasan Mamar-nak, Kopasz Georgina Annának, Mihut Alexandra Catalinának, Pék Ramónának.**

Külön köszönettel tartozom **Koszó Adriánnak** laboratóriumi technikusként nyújtott támogatásáért, valamint a laboratóriumi munka kezdeti szakaszában nyújtott segítségéért és iránymutatásáért.

Hálás vagyok a Genetikai Tanszék valamennyi munkatársának a támogatásukért és azért, hogy tanulmányaim során kellemes munkakörnyezetet biztosítottak.