SZÉRUMBAN TALÁLHATÓ KISMOLEKULÁK ENDOPLAZMATIKUS RETIKULUM STRESSZT INDUKÁLNAK SPECIFIKUSAN RÁKSEJTEKBEN

DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

Scheffer Dalma

Témavezetők: Dr. Czömpöly Tamás és Dr. Rékási Zoltán

Doktori Iskola vezetője: Prof. Dr. Szekeres Júlia
Programvezető: Prof. Dr. Reglődi Dóra

Anatómia Intézet
Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar

2020

1. Összefoglaló

Ph.D. értekezés fő célja volt, hogy egy aminosavakból, monoszaccharidokból, nukleobázisokból és egyéb molekulákból álló keverék apoptózis kiváltásában játszott szerepét megismerjük.

Kimutattuk, hogy egy meghatározott összetételű, kismolekulákból álló keverék (aktív keverék, AK) szelektíven képes ráksejtekben endoplazmatikus retikulum stresszt indukálni és aktiválja az úgynevezett rosszul feltekeredett fehérjeválaszt (unfolded protein response, UPR), ami végül pro-apoptotikus folyamatokat indít el.

Leírtunk egy új miRNS által mediált negatív visszacsatolási mechanizmust, mely szerepet játszik az UPR jelút bizonyos komponenseinek felülszabályozásában.

Ezen felül, sikerült azonosítanunk további, szérumban található molekulákat, melyek képesek voltak az AK hatását növelni és keverékük jelentős mértékben gátolta a ráksejtek növekedését.

2. Bevezetés

Korábbi munkánk során kimutattuk, hogy a szérumban jelenlévő kismolekulák kisérelti úton kiválasztott keveréke (AK) számos daganatsejt vonalon szelektív toxicitással rendelkezik *in vitro* és *in vivo*, míg normál sejtekre nem volt hatással. Az AK összetevői bizonyos esszenciális aminosavak, vitaminok, nukleobázisok és metabolikus köztitermékek: L-arginin, L-hisztidin, L-metionin, L-fenilalanin, L-triptofán, L-tirozin, L-aszkorbinsav, D-biotin, piridoxin, (−)-riboflavin, adenin, 2-deoxi-D-ribóz, hippursav, L-(−)-malát, D-(+)-mannóz, és orotsav. Megelőző kísérleteink során kimutattuk, hogy az AK apoptózist indukál szelektíven ráksejtekben *in vitro*. Továbbá, bizonyítottuk az AK kezelés jelentős daganatellenes hatással rendelkezik *in vivo*. Eredményeink mellett, Bonfili és munkatársai leírták, hogy esszenciális aminosavak keveréke apoptózist indukál specifikusan ráksejtekben, melyben fontos szerepet játszik a proteoszóma gátlása és az autofágia indukciója. Korábbi mechanizmus vizsgálataink során igazoltuk, hogy az AK mitokondriális útvonalon keresztül aktiválja az apoptózist, fokozza az apoptózisban és sejtciklus blokkolásában részt vevő gének expresszióját, de az apoptózis megindításához szükséges jelátviteli események nem voltak tisztázottak.

2.1. Endoplazmatikus retikulum stressz és rosszul feltekeredett fehérjeválasz

Az endoplazmatikus reticulumban (ER) történik a szekretált és membránfehérjék megfelelő módosítása, térszerkezetének kialakítása (folding) és összeszerelődése a Golgi apparátusba szállításukat megelőzően. Az ER lumen oxidatív környezete lehetővé teszi a diszulfid hidak kialakítását, továbbá a sejten belül itt a legmagasabb a kalcium koncentráció, ami nélkülözhetetlen a fehérjék megfelelő foldingjához és a dajkafehérjék (chaperonok) funkcióihoz.

Legkülönböző stimulusok, mint a redox homeosztázis zavara, ER-ben található kalcium depléciója, posztranszlációs módosítások zavara vagy vírusfertőzés, csökkentik az ER fehérje folding kapacitását, ami végül nem megfelelően feltekert, unfolded fehérjék felhalmozódásához, aggregációjához vezet, ER-stresszt okozva.

A sejtek ER stresszre adott válaszaként egy túlélési útvonalat aktivál, az úgynevezett rosszul feltekeredett fehérje választ (unfolded protein response, UPR), ami csökkenti az unfolded fehérjék felhalmozódását. Az UPR attenuálja az mRNS-ek transzlációját csökkentve a fehérjék mennyiségét, indukálja a fehérje foldingban és degradációban részt vevő gének expresszióját, és aktiválja a fehérjék lebontásában szerepet játszó úgynevezett ER-asszociált fehérje degradáció (ERAD) folyamatát.

Az UPR elsősorban egy túlélési válasz, azonban ha az ER stressz súlyos vagy tartósan fenn áll, úgy apoptotikus sejthalált indukálhat. ER stressz indukálta apoptózis számos betegség patogenezisében játszik szerepet, mint a cukorbetegség, a rák, a neurodegeneratív és szív-és érrendszeri betegségekben.

2.2. UPR jelátviteli útvonalak

Három fő UPR jelátviteli utat különböztethetünk meg, melyek ER membránjában található receptorokon keresztül aktiválódnak: aktiváló transzkripciós factor-6 (ATF6), inozitol-függő enzim 1 (IRE1) és a protein kináz R (PKR)-szerű ER kináz (PERK).

A sejt normál - nem-stresszelt állapotában, a GRP78 (78 kDa-os glükózregulált fehérje) dajkafehérje, más néven BiP (kötőfehérje) hozzákötődik mindhárom ER stressz receptorhoz és inaktív állapotban tartja őket. Az rosszul feltekeredett fehérjék akkumulációja következtében a GRP78 disszociál a receptorokról, és aktiválódik az UPR három jelátviteli útja.

2.2.1. ATF6 útvonal

ATF6 egy bázikus leucin cipzár (bZIP) transzkripciós faktor és II-es típusú ER transzmembrán fehérje, melynek C-terminális doménje az ER lumenben helyezkedik el, míg az N-terminális DNS-kötő doménje citoplazma felé néz. Emlősökben, két homológ fehérje, az ATF6α és ATF6β expresszálódik. Stressz hatására, a GRP78 disszociál az ATF6 fehérjéről, aminek következtében az ATF6 transzlokálódik az ER-ből a Golgi apparátusba, ahol proteázok által hasítódik. A hasított, bZIP-et tartalmazó domén a sejtmagba transzlokálódik és különböző ER chaperonok (GRP78, GRP79) és X-box-kötő fehérje 1 (XBP1) átírását aktiválja.

2.2.2. IRE1 útvonal

IRE1 egy I-es típusú transzmembrán fehérje, mely szerin-treonin kináz doménnal és endoribonukleáz doménnal is rendelkezik. Két homológ, emlős IRE1 fehérjét azonosítottak, IRE1α és IRE1β. Az IRE1α mindenütt, míg az IRE1β a gyomor-bél traktus hámsejtjeiben expresszálódik. GRP78 disszociációja oligomerizációt és a kináz domén autofoszforilációját váltja ki, ami az RNáz domén aktivációjához vezet. Az aktivációt követően, az IRE1 endoribonukláz aktivitása kivág egy 26-nukleotidból álló intron szakaszt az XBP1 mRNS-ből, így egy stabil, bZIP családba tartozó transzkripciós faktor, spliced XBP1 (sXBP1) keletkezik. sXBP1 számos különböző UPR gént aktivál a homeosztázis helyreállítása érdekében, például ER chaperonok (GRP78, ERDj4, HEDJ, és PDI-P5), ERAD komponensek (EDEM, $p58^{IPK}$).

Továbbá, az IRE1α RNáz aktivitásának köszönhetően, képes szelektíven lebontani mRNS-ket illetve mikroRNS-ket (regulated IRE1α-dependent decay, RIDD). Ez a folyamat szerepet játszhat mind a túlélésben, mind az apoptózisban, az ER stressz időtartamától és mértékétől függően.

2.2.3. PERK útvonal

PERK egy szerin-treonin kináz és a GRP78 disszociációja következtében dimerizálódik és autofoszforilálódik. Az aktivált PERK foszforilálja az eukarióta iniciációs factor 2α-t (eIF2α), ezzel attenuálja a globális fehérjeszintézist és csökkenti a fehérjék mennyiségét az ER-ben. Azonban, bizonyos upstream nyitott leolvasási kerettel rendelkező mRNS-ek, mint az aktiváló transzkripciós faktor 4 (ATF4) és a DNS-károsodás-indukálta transzkripció 3 (DDIT3), kikerülhetik eIF2α-függő transzlációs blokkot, és átíródhatnak.

ATF4 egy bZIP transzkripciós faktor, amely számos, a sejt sorsát meghatározó gént aktivál. ATF4 szabályozza az ER chaperon fehérjek (GRP78 és GRP79), aminosavak bioszintézisében,

redox reakciókban, fehérje szekrécióban, autofágiában és apoptózisban szerepet játszó gének expresszióját. ATF4 aktiválja a DDIT3 transzkripciós faktort, másnéven C/EBP homológ fehérje (CHOP). DDIT3 overexpressziója sejtciklus leállást és/vagy sejthalált okoz. ATF4 és DDIT3 fehérjékről leírták, hogy kölcsönhatásba lépnek és számos UPR gént aktiválnak, mint az aktiváló transzkripciós faktor 3 (ATF3), tribbles pszeudokináz 3 (TRIB3). Továbbá, az ATF4 és ATF3 indukálja a glutation specifikus gamma-glutamilciklotranszferáz 1-t (CHAC1), melyről leírták, hogy az UPR kaszkád része és pro-apoptotikus aktivitással rendelkezik, mivel lebontja a glutationt.

eIF2α foszforilációja történhet ER stressz független útvonalokon is. Aminosav hiány esetén a GCN2 kináz (general control nonderepressible-2, másnéven EIF2AK4), vírusfertőzés következtében a PKR kináz (protein kináz R, másnéven EIF2AK2) és hem hiány esetén a HRI kináz (hem-regulált inhibitor kináz, másnéven EIF2AK1) foszforilálja az eIF2α fehérjét. Így, az eIF2α foszforilációját és annak downstream eseményeit integrált stresszválasznak (ISR) nevezzük.

3. Célkitűzések

- Vizsgálni kívántuk transzkripciós és transzlációs szinten az AK16 kezelés hatását különböző ráksejteken illetve normál HRE (primer humán vese epitéliális sejtek) sejteken.
- Meg kívántuk határozni, hogy az ER stressz milyen mértékben járul hozzá az AK16 rákellenes hatásához.
- Vizsgálni kívántuk az AK16 egyes komponenseinek relatív hozzájárulását az ER stressz kiváltásához.
- Vizsgálni kívántuk, hogy az ATF3 és GDF15 (növekedési differenciálódási faktor 15) knockdown kezelések befolyásolják-e az AK16 sejtnövekedés gátló hatását, továbbá, hogy a mIR-3189-3p, GDF15 lókuszán található intronikus miRNS, hozzájárul-e az AK16 rákellenes hatásához, illetve milyen szerepet játszik az ATF3 és a DDIT3 regulációjában.
- Apoptózis, autofágia, ferroptózis és nekroptózis szerepének meghatározása az AK16 hatásmechanizmusában.
- Vizsgálni kívántuk, hogy az apoptózis mediátorok, BBC3 és PMAIP1, hogyan befolyásolják az AK16 hatását.
- További, az aktív keverék ráksejt növekedés gátló hatásást fokozó, komponensek azonosítása.

4. Anyagok és módszerek

4.1. Sejtvonalak

HeLa (humán cervix adenokarcinóma), MCF-7 (humán emlő adenokarcinóma), PC-3 (humán prosztata adenokarcinóma), Caco-2 (humán colorectális adenokarcinóma), A549 (humán tüdő adenokarcinóma), HT-29 (humán colorectalis adenokarcinóma), HepG2 (humán hepatocelluláris karcinóma) és 4T1 (egér emlőkarcinóma) sejteket Minimum Essential Medium Eagle (MEM) (Sigma Aldrich) médiumban tenyésztettük 10% (v/v) fötális borjú szérum (FCS), 100 U/ml penicillin és 0.1 mg/ml sztreptomicin jelenlétében. HRE sejteket cells Renal Epithelial Cell Basal Medium (REBM) médiumban tenyésztettük humán epidermiális növekedési factor (hEGF), hidrokortizon, epinefrin, inzulin, trijódtironin, transzferrin, GA-1000, és 0.5% fötális marha szérum (FBS) jelenlétében. A sejteket 37°C-os hőmérsékletre beállított és 5% CO_2-ot tartalmazó párásított atmoszférájú termosztátban tartottuk.

4.2. Aktív keverék

Az aktív keverék hatásmechanizmus vizsgálataink során egy tizenhat komponensből álló aktív keveréket (AK16) használtunk. Az AK16 összetétele a következő volt: 0.2 mM adenin, 0.5 mM L-triptofán, 0.5 mM piridoxin hidroklorid, 0.75 mM L-metionin, 0.5 mM biotin, 1 mM orotsav monohidrát, 2.5 mM 2-deoxi-D-ribóz, 2 mM L-tirozin dinátrium-só hidrát, 2.5 mM L-hisztidin, 2.5 mM L-fenilalanin, 2.5 mM L-arginin, 5 mM L-(−)-malát, 5 mM hippursav nátriumsó hidrát, 5 mM D-(+)-mannóz, 0.0025 mM (−)-riboflavin, 0.15 mM L-aszkorbinsav, és 8.95 mM nátrium-bikarbonát. Néhány kísérletben az AK16 komponenseit alcsoportokra osztottuk (AK1, AK2, AK3 és AK10). Az AK1 összetétele a következő volt: 0.5 mM L-triptofán, 0.75 mM L-metionin, 2 mM L-tirozin dinátrium-só hidrát, 2.5 mM L-hisztidin, 2.5 mM L-fenilalanin, 2.5 mM L-arginin, és a pH 7.4-re lett beállítva 1N-os hidrogén-kloriddal.
Az AK2 összetétele a következő volt: 0.2 mM adenin, 1 mM orotsav monohidrát, 2.5 mM 2-deoxi-D-ribóz, 5 mM L-(−)-malát, 5 mM hippursav nátriumsó hidrát, 5 mM D-(+)-mannóz, és 10.8 mM nátrium-bikarbonát. Az AK3 összetétele a következő volt: 0.5 mM piridoxin hidroklorid, 0.5 mM biotin, 0.0025 mM (−)-riboflavin, 0.15 mM L-aszkorbinsav, és 0.65 mM nátrium-bikarbonát. Az AK10 összetétele a következő volt: 0.5 mM L-triptofán, 0.75 mM L-metionin, 2 mM L-tirozin dinátrium-só hidrát, 2.5 mM L-hisztidin, 2.5 mM L-fenilalanin, 2.5 mM L-arginin, 0.2 mM adenin, 5 mM L-(−)-malát, 5 mM hippursav nátriumsó hidrát, 5 mM D-(+)-mannóz, és 7.3 mM nátrium-bikarbonát.

Az új komponensek kiválasztásakor használt 100%-os AK összetétele a következő volt: 4 mM L-metionin, 0.75 mM L-triptofán, 0.08 mM L-tirozin dinátrium-só, 5 mM L-fenilalanin, 5 mM L-arginin, 4 mM L-hisztidin, 5 mM N-benzoilglicin, 2 mM D-biotin, 1 mM piridoxin hidroklorid, 0.006 mM riboflavin-5-foszfát nátriumsó, 0.3 mM L-aszkorbinsav, 1 mM liponsav, 0.16 mM orotsav, 1 mM adenin hidroklorid, 7.5 mM 2-deoxi-D-ribóz, 5 mM D-mannóz, 0.5 mM D-glukózamin hidroklorid, 7.5 mM malát, 5 mM oxálecetsav, 0.05 mM adenozin trifoszfát dinátrium só, és 23.46 mM nátrium-bikarbonát. A felhasznált vegyszereket a Sigma Aldrich-tól vásároltuk.

4.3. Kontroll keverék

A kontroll keveréknek (KK) összetétele a következő volt: 0.2 mM hipoxantin, 0.5 mM L-prolin, 0.5 mM niacin, 0.75 mM glicin, 0.5 mM tiamin hidroklorid, 1 mM uracil, 2.5 mM D-(−)-ribóz, 2 mM L-alanin, 2.5 mM L-szerin, 2.5 mM L-valin, 2.5 mM L-aszparagin, 5 mM dinátrium szukcinát hexahidrát, 5 mM betain, 5 mM D-(+)-glükóz, 0.0025 mM D-pantoténsav hemikalcium só, 0.15 mM folsav. A felhasznált vegyszereket a Sigma Aldrich-tól vásároltuk.

4.4. Új keverék

A 100%-os új keverék (UK) összetétele a következő volt: 2 mM D-fenilalanin, 1 mM D-triptofán, 1 mM D-arginin, 0.5 mM 5-hidroxi-L-triptofán, 0.05 mM melatonin, 5 mM mandulasav, 2.5 mM 3,4-dihidroxi-mandulasav, 0.8 mM p-kumársav, 0.8 mM transz-fahéjsav, 1 mM indol-3-ecetsav, 1 mM fenilecetsav, 0.1 mM 3,4-dihidroxi-fenilecetsav, 0.25 mM indol-3-piroszőlősav, 2.5 mM fenilpiroszőlősav nátrium só, 1 mM 4-hidroxi-fenilpiroszőlősav, 1 mM 3-feniltejsav, 2.5 mM D-glicerinsav kalcium só, 0.25 mM gliceraldehid, 3 mM 3-metil-2-oxovajsav nátrium só, 5 mM 4-guanidino-vajsav, 2.5 mM 3-metil-2-oxovaleriánsav nátrium só, 3 mM 4-metil-2-oxovaleriánsav nátrium só, 5 mM 3-hidroxi-3-metil-glutársav, 1 mM gentizinsav nátrium só, 5 mM urokánsav, 2.5 mM homovanillinsav, 2.5 mM xanturénsav, 5 mM levulinsav kalcium só, 5 mM 4-hidroxi-benzoesav, 5 mM pirrol-2-karbonsav, 0.25 mM adenozin, 0.1 mM agmatin-szulfát, 0.5 mM ciszteamin, 5 mM kreatinin, 38.45 mM nátrium-bikarbonát. A felhasznált vegyszereket a Sigma Aldrich-tól vásároltuk.

4.5. Microarray analízis

A HeLa sejteket 3h, 6h és 24h időtartamon át kezeltük AK16-tal, triplikátumokban. A totál RNS izolálás az RNeasy Plus mini kit (QIAGEN) felhasználásával történt, az RNS minőségét agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük. A microarray hibridizációt és a kezdeti adatfeldolgozást a Personmed Kft. (Turku, Finnország) végezte. Röviden, az egyes időpontokból származó mintákból biotinnal jelölt cRNS-t szintetizáltunk, és standard protokollok alkalmazásával humán HT-12 v.4 Expression BeadChip -hez (Illumina) hibridizáltuk. Az átlag próba intenzitásokat a Genome Studio (Illumina) segítségével számoltuk ki, és a következő Bioconductor csomagokkal analizáltuk: affy, limma, gplots, beadarray, lattice, amap, simpleaffy, xtable, scatterplot3d, ade4 and made4. Majd az adatok kvantilis normalizációja történt és az eltérő expressziót mutató géneket kétoldalas t-teszttel és a fold change értékek alapján azonosítottuk. Azokat a géneket, melyek >1.3 fold change és $p < 0.05$ értékkel rendelkeztek, eltérő expressziót mutató géneknek tekintettük.

4.6. Géncsoport dúsulás vizsgálata

A géncsoport dúsulás vizsgálata (Gene set enrichment analysis (GSEA)) a java GSEA Desktop Application 2.2.3 verzióval történt. A gene ontology biological process gene set collection (GO BP) 5.2 verziót használtuk a dúsulás vizsgálathoz. Az upregulált útvonalak a normál dúsulási érték (normalized enrichment score, NES) > 3, míg a downregulált útvonalak esetében a NES < -3. Egy adott útvonal dúsulását a hamis találti arány (false discovery rate, FDR) $p < 0.25$ értékekkel tekintettük szignifikánsnak.

4.7. Kvantitatív RT-PCR (qRT-PCR)

A totál RNS izolálást PureLink RNA Mini Kit-el (ThermoFisher Scientific) végeztük, majd DNase I (Sigma Aldrich) emésztést végeztünk. cDNS szintézis High Capacity RNA-to-cDNA Kit (ThermoFisher Scientific) segítségével történt. A *B2M, GAPDH, HPRT1, RPL32* és *PPIA* háztartási gének amplifikációját korábban leírt primerekkel végeztük. Az *APAF1, BAX, BCL2L1, BIRC2, BIRC3, CASP3, CDKN1A, CDKN2A, IKBKG, NFKBIA, NFKB1* génekhez már korábban leírt primereket használtunk. A totál XBP1, spliced XBP1 és unspliced XBP1 transzkriptek meghatározásához szintén már leírt primereket használtunk. Az összes többi PCR primert a Primer Express Software segítségével terveztük. A *BBC3, PMAIP1, RLP32* expressziós szintjét TaqMan Gén Expressziós Assay-ek segítségével határoztuk meg. *RPL32* háztartási gént használtunk normalizására. miRNS-ek izolálásához a miRVana miRNA izoláló

kitet (ThermoFisher Scientific) használtuk. A miR-3189-3p és az U6 snRNS expressziója TaqMan microRNA assay (ThermoFisher Scientific) segítségével történt a gyártó utasításait követve. U6 snRNS-t használtuk a normalizációhoz. A PCR reakciókat PowerUp SYBR Green Master Mix (ThermoFisher Scientific) vagy Taqman gene expression master mix II, no UNG (ThermoFisher Scientific) felhasználásával, ABI StepOne Real Time PCR készüléken triplikátumokban végeztük. A háztartási ének expressziós szintjének stabilitás-vizsgálata után a RPL32-t választottuk célgének expressziójának normalizálására. A fold change értékeket a kezelt mintákban mért normalizált célgén expressziós értékek kezeletlen mintákban mért hasonló értékeivel történt osztásával számoltuk ki.

4.8. Western blot

$1.6x10^6$ sejtet ültettünk ki 150 mm-es Petri-csészékre, és $1.7x10^5$/lyuk sejtet ültettünk ki 6-lyukú sejttenyésztő lemezekre. Kezeléseket követően a sejteket hideg, proteáz és foszfatáz gátló koktélt (Abcam) tartalmazó, 1X RIPA pufferel (Abcam) lizáltuk. A minták fehérje koncentrációjának meghatározása DC protein assay-el (Bio-Rad) történt. 30-100 µg fehérjét választottunk el SDS-poliakrilamid gélen, majd nitrocellulóz membránra transzferáltuk őket. A membránokat 5% tejpor (Sigma Aldrich) vagy 5% marhaszérum albumin (BSA) (Sigma Aldrich) tartalmú TBS-T (150mM NaCl, 20mM Tris-base pH 7.6, 0.1% Tween 20) pufferben szobahőmérsékleten, 1 órán át blokkoltuk. Az elsődleges antitesteket 5% tejpor/TBS-T-ben vagy 5% BSA/TBS-T-ben hígítottuk és a membránokat a megfelelő antitestekkel inkubáltuk egy éjszakán át, 4°C-on. A HRP-konjugált anti-nyúl másodlagos antitesteket 5% tejpor/TBS-T pufferben hígítottuk és szobahőmérsékleten, 1 órán át inkubáltuk a membránokon. A membránokat LumiGlo kemilumineszcens szubszráttal (Cell Signaling Technology) hívtuk elő, majd röntgen filmre exponáltuk.

4.9. Reverz transzfekció

2.5×10^3 vagy 1.7×10^5 /lyuk HeLa sejtet ültettünk ki 96-lyukú, illetve 6-lyukú lemezekre és reverz traszfektáltuk a sejteket DharmaFect 1 (Dharmacon) segítségével a gyártó utasításai alapján. ON-TARGETplus Human GDF15 (9518) SMARTpool siRNS-t (Dharmacon), ON-TARGETplus Human ATF3 (467) SMARTpool siRNS-t (Dharmacon) és ON-TARGETplus Non-targeting Pool (Dharmacon) siRNS-t 50 vagy 100 nM végkoncentrációban alkalmaztuk. A miRIDIAN microRNS hsa-miR-3189-3p Hairpin Inhibitor (Dharmacon) és miRIDIAN microRNA Hairpin Inhibitor Negative Control (Dharmacon) miRNS-ket 50 nM vagy 200 nM

végkoncentrációban transzfektáltuk. A miRIDIAN microRNA hsa-miR-3189-3p Mimic (Dharmacon) és miRIDIAN microRNA Mimic Negative Control (Dharmacon) miRNS-ek végkoncentrációja 10 nM. A BBC3 és PMAIP1 silencer select (ThermoFisher Scientific) siRNS-ek transzfekciójához használt végkoncentráció 10 nM volt. 24 órával a transzfekciót követően a transzfekciós médiumot eltávolítottuk és a kezeltük a sejteket. 48 órával a transzfekció után, a sejteket fixáltuk és a sejtszámoláshoz jelöltük, vagy felszedtük őket qRT-PCR-al történő analízishez.

4.10. Sejszámolás és immuncitokémia

2.5×10^3/ well HeLa sejtet ültettünk ki 96-lyukú fekete, üvegaljú lemezekre. A sejteket kezelést követően, 10 percig fixáltuk 4% PBS-pufferelt paraformaldehiddel, majd 10 percig permeabilizáltunk Triton X-100-al, amit egy 5% kecske szérumos blokkolás követett, szobahőmérsékleten 1 órán át. ATF4 elleni antitesteket 1% BSA-t és 0.05% Triton X-100-t tartalmazó PBS-ben hígítottuk, és a sejteken egy éjszakán át, 4 °C-on inkubáltunk. 3x5 perc PBS mosást követően, a sejteket Alexa Fluor 555 anti-nyúl IgG-vel inkubáltuk, sötétben, szobahőmérsékleten 1 órán keresztül. 1x5 perc PBS mosás után, a sejtmagokat DAPI-val festettük 5 percig. Csak a sejtszámolást érintő kisérleteknél, a sejteket közvetlenül a fixálás után DAPI-val festettük. A sejteket egy automata, high-content screening (HCS) mikroszkóppal vizualizáltuk és számoltuk.

4.11. Élő/halott sejtfestés, EdU és TUNEL jelölés

2.5×10^3 HeLa sejtet ültettünk ki 96-lyukú lemezekre, majd kezeltük őket. Az élő/halott sejtfestéshez Apoptózis/Nekrózis detekciós kit (Abcam) cytocalcein violet 450 és 7-aminoactinomycin D (7-AAD) festését alkalmaztunk a gyártó utasításai alapján. EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine) jelölés esetében, a kezelés kezdetekor 10 μM végkoncentrációban adtuk a sejtekhez az EdU-t. Az inkorporált EdU mennyiségét Click-iT Plus EdU Alexa Fluor 555 imaging kit-el (ThermoFisher Scientific) detektáltuk a gyártó utasítási alapján. TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-dUTP nick end labeling) assay esetében Click-iT TUNEL Alexa Fluor 594 imaging kit-et (ThermoFisher Scientific) használtuk. A sejtmagokat Hoechst 33342 (5 μg/ml) festékkel jelöltük EdU és TUNEL assay esetében. A sejteket egy automata, high-content screening (HCS) mikroszkóppal vizualizáltuk.

4.12. Kombinációs indexek meghatározása

A sejteket 96-lyukú lemezekre ültettük ki és a gátlószerek három pontos, kétszeres hígítási sorozatával, AK16 hígítási sorozatával (40–100%), vagy a gátlószerek két magasabb koncentrációját 60 %, 80 %, 100 % -os AK16-tal kombinálva kezeltük a sejteket 24 órán át. Sejteket a sejtszámolásnál leírt módon számoltuk, majd a kombinációs indexeket Compusyn software segítségével kaptuk meg. A következő gátlószereket alkalmaztuk (zárójelben a hígítások kezdő koncentrációi): deferoxamin (Abcam) (100 μM), ferrosztatin-1 (Sigma Aldrich) (20 μM), trolox (Sigma Aldrich) (300 μM), 2-mercaptoetanol (Sigma Aldrich) (20 μM), U0126 (Sigma Aldrich) (20 μM), nekrosztatin-1 (Abcam) (10 μM), nekroszulfonamid (Abcam) (5 μM), Z-VAD(OMe)-FMK (Abcam) (80 μM), E64d (Abcam) (50 μM), ALLN (Abcam) (500 nM), ciklosporin A (Abcam) (10 μM), 3-metiladenin (Abcam) (4 mM), bafilomicin A1 (Abcam) (1 μM), klorokvin difoszfát (Abcam) (50 μM). A sejteket 2.5–10 μM erasztinnal kezeltük. A nekroptózis indukciója 20 ng/ml rekombináns humán TNF-α (Abcam) + 20 μM z-VAD-fmk + 500 nM BV6 (Smac mimetic) (Sigma Aldrich) kombinációval történt.

4.13. Statisztikai analízis

Statisztikai analízis IBM SPSS Statistics 22 segítségével végeztük. Normál eloszlás vizsgálatához Shapiro-Wilk tesztet alkalmaztuk. A varienciák homogenitását Levene-teszttel vizsgáltuk. Normál eloszlás, egyenlő variancia esetén a p értékek számításához egyutas-varienciaanalízist (ANOVA) alkalmaztunk, melyet Bonferroni post hoc teszt követett. Normál eloszlás, nem egyenlő variancia esetén a p értékek számításához Welch tesztet alkalmaztunk, melyet Games-Howell teszt követett. Statisztikailag szignifikánsnak a $p<0.05$ értékeket tekintettük.

5. Eredmények

5.1. Génexpressziós változások AK16-tal kezelt ráksejtekben

Microarray analízis jelentős génexpressziós változásokat mutatott HeLa sejtekben 3 óra, 6 óra és 24 óra AK16 kezelést követően. Az upregulált transzkriptek GSEA elemzése kimutatta a RNS splicing és transzláció iniciációhoz kötődő gének dúsulását 3 óránál, ER stressz indukálta apoptózisban és sejtciklus szabályozásában résztvevő gének dúsulását 6 óránál, illetve apoptózisban és TGF-β jelátvitelben szerepet játszót gének dúsulását 24 óránál. A génkészletek között, melyek dúsulást mutattak mindhárom időpontban az "ER stresszre adott válasz" rendelkezett legnagyobb NES értékkel.

A kapott eredmények alapján kiválasztottunk 100 gént, amiket qRT-PCR segítségével validáltunk. Kontroll keverékkel (KK) is kezeltük a sejteket, amelynek ozmolalitása megegyezett az AK16-tal, és hatástalan kis molekulákat tartalmaz, amelyek kémiai vagy fiziológiai szempontból hasonló tulajdonságokkal rendelkeznek, mint az AK16 komponensei. HeLa és HRE normál sejteket kezeltünk AK16-tal és KK-val 24 órán keresztül. Az UPR útvonalhoz köthető (*CHAC1, GDF15, TRIB3, ATF3, DDIT3, PPP1R15A, ATF4, XPB1*), illetve az autofágiában (*SESN2, ULK1*) és apoptoptózisban (*BIRC3, GADD45A, PMAIP1, BBC3*) szerepet játszó gének expressziós szintje emelkedett AK16-tal történő kezelést követően kizárólag HeLa sejtekben, KK-nak nem volt hatása.

Azokat a géneket, amelyek specifikus és szignifikáns génexpressziós különbségeket mutattak az AK16-tal kezelt HeLa-sejtekben tovább vizsgáltuk MCF-7, PC-3 és Caco-2 sejtekben.

ATF3, DDIT3, PPP1R15A, PMAIP1 és *GDF15* expressziós szintje specifikusan emelkedett mind a négy sejtvonal esetében AK16 kezelést követően, míg a *CHAC1* expressziós szintje csak a HeLa és PC-3 esetében emelkedett.

Eredményeink azt mutatják, hogy az AK16 kezelés ER stresszre jellemző génexpressziós változásokat indukál specifikusan ráksejtekben.

5.2. ISR-ben részt vevő fehérjék kimutatása AK16-tal kezelt ráksejtekben

Az integrált stresszválasz attenuálja a globális fehérjeszintézist, miközben lehetővé teszi néhány, upstream nyitott leolvasási kerettel rendelkező mRNS transzlációját, például: *ATF4, DDIT3*. Így, megvizsgáltuk az ATF4, ATF3, DDIT3, CHAC1 és GDF15 fehérjék expresszióját AK16-tal és KK-val kezelt HeLa, PC-3, Caco-2, MCF-7 és HRE sejtekben western-blottal. Az ATF4, ATF3, DDIT3, CHAC1 és GDF15 fehérjék időfüggő indukciója volt megfigyelhető

AK16-tal kezelt HeLa sejtekben. Továbbá, az ATF4, ATF3 és GDF15 emelkedése kimutatható volt AK16-tal kezelt PC-3, Caco-2 és MCF-7 sejtek esetében. Az AK16-tal kezelt HRE sejtekben CHAC1 és GDF15 fehérjék minimális indukciója volt megfigyelhető. A KK nem befolyásolta a vizsgált fehérjék expresszióját. Ezen felül, megvizsgáltuk az ATF4 szub-celluláris lokalizációját immuncitokémiával, és azt találtuk, hogy az ATF4 felhalmozódik a HeLa sejtek sejtmagjaiban 24 órás AK16 kezelést követően. Ezek az eredmények megerősítik ISR útvonal aktivációját.

Következő lépésben megvizsgáltuk az eIF2α foszforilációját, az ISR legfontosabb eseményét, ami felel globális transzláció gátlásáért, és a bizonyos mRNS-ek preferenciális expressziójáért. Az AK16-tal kezelt HeLa sejtekben az eIF2α időfüggő foszforilációja volt megfigyelhető. Ezután az ER stressz során aktiválódó PERK kináz, illetve két ER stressztől független kináz, a GCN2 és PKR, foszforilációját vizsgáltuk. PERK idő függvényében foszforilálódott, míg GCN2 és a PKR foszforilációja nem volt kimutatható AK16-tal kezelt HeLa sejtekben.

Mivel a kezelés hatására a PERK aktiválódott, így a másik két ER stressz szenzorra (IRE1α és ATF6) is kíváncsiak voltunk, illetve vizsgáltuk a BiP dajkafehérje akkumulációját is. Az AK16 kezelés az IRE1α időfüggő foszforilációját és az ATF6 és BiP mennyiségének időfüggő növekedését eredményezte HeLa sejtekben. Az ATF6 aktiválódását a hasított formájának (50kDa) detektálásával, míg az IRE1α aktivációját az emelkedett spliced *XBP1* kimutatásával igazoltuk.

Összeségében ezek az eredmények azt mutatják, hogy az AK16 kezelés hatására bekövetkező eIF2α foszforilációért a PERK kináz aktivációja felelős, illetve, hogy az AK16 mindhárom UPR útvonalat aktiválja.

5.3. ER stressz gátlók hatása az AK16-tal kezelt ráksejtekben

Számos ER stressz gátlót alkalmaztunk annak meghatározására, hogy az ER stressz milyen mértékben járul hozzá az AK16 rákellenes hatásához. Az AK16-tal kezelt sejtekben vizsgáltuk a hatását az ISR gátlásért felelős ISRIB-nek (rezisztensé teszi a sejteket eIF2α foszforilációjának hatásával szemben), a szalubrinálnak (gátolja az eIF2α defoszforilációját és az ER stressz indukált apoptózist), és a 4-fenilbutirátnak (4-PBA) (dajkafehérje, ami képes csökkenteni az rosszul feltekeredett fehérjéket az ER-ben). Az ISRIB teljes mértékben gátolta *ATF4*, *CHAC1*, *DDIT3* és *GDF15* mRNS-ek expresszióját HeLa sejtekben 6 órás AK16 kezelésnél, viszont az *ATF3* indukcióját csak csökkentette, továbbá képes volt enyhíteni az

AK16 sejtnövekedést gátló hatását. Szalubrinál és a 4-PBA nem befolyásolta az AK16 sejtnövekedést gátló hatását. Teszteltünk további két IRE1α gátlószert, GSK2850163 és STF-083010, de egyik sem befolyásolta az AK16 hatását.

Összefoglalva, ezek az eredmények azt mutatják, hogy az UPR jelentős szerepet játszik az AK16 sejtnövekedését gátló hatásában, és arra enged következtetni, hogy az AK16 által aktivált UPR fő ága az eIF2α foszforilációja.

5.4. AK16 egyes komponenseinek relatív hozzájárulása az ER stressz indukciójához

Kíváncsiak voltunk, hogy mind a tizenhat molekula szükséges-e az ER stressz kiváltásához, így első lépésként három csoportra bontottuk az AK16-ot, és teszteltük a hatásukat önmagukban vagy kombinációban HeLa sejteken. AK1 az aminosavakat, az AK2 az adenint, L-(-)-malátot, 2-deoxi-D-ribózt, orotsavat, D-(+)-mannózt és a hippursavat, míg az AK3 a vitaminokat tartalmazta.

AK1 és AK2 kombinációja szignifikánsan csökkentette a sejtszámot és indukálta az *ATF3, ATF4, CHAC1, DDIT3, GDF15* expresszióját HeLa sejtekben, míg önmagukban vagy más kombinációban nem volt hatásuk. Fontos megjegyezni, hogy az AK16 sejtnövekedés gátló hatása még mindig szignifikánsan nagyobb volt, mint az AK1 és AK2 kombinációjának.

Ezt követően, kombináltuk a random párosított AK1 komponenseit az AK2-vel, illetve fordítva és mértük az *ATF3, ATF4, CHAC1, DDIT3, GDF15* expresszióját. Sikerült azonosítani az AK16 komponensei közül tizet (aminosavak, adenin, L-(-)-malát, D-(+)-mannóz és hippursav), melyek képesek voltak hasonló mértékben indukálni az ER stressz gének indukcióját, mint az AK1+AK2. Tovább vizsgálva a tíz komponensű keverék (AK10) hatását HeLa sejtekben kimutattuk, hogy az AK10 hasonló mértékben indukálta az ER stressz géneket, mint az AK16 és az ISRIB teljes mértékben gátolta az *ATF4, CHAC1, DDIT3* traszkriptek indukcióját 24 óra AK10 vagy AK16 kezelés esetén, de az *ATF3* és *GDF15* expresszióját nem volt képes teljes mértékben gátolni. Továbbá az ISRIB enyhítette, de nem gátolta teljesen az AK10 sejtnövekedés gátló hatásást. Az AK10 sejtnövekedés gátló és ER stressz gének indukáló hatását PC-3, MCF-7 és Caco-2 sejtekben is igazoltuk.

Összefoglalva, az AK10 komponensei elegendőek az ER stressz kiváltásához, míg a másik hat komponens fokozza a sejtnövekedés gátló hatást.

5.5. ATF3, GDF15 és mIR-3189-3p szerepe az AK16 hatásában

Mivel az ISRIB nem volt képes teljes mértékben gátolni az *ATF3* és *GDF15* expresszióját AK16 kezelés során, így vizsgáltuk az *ATF3* és *GDF15* specifikus knockdown kezelések, illetve azok ISRIB-el való kombinációja milyen hatással lesznek az AK16 sejtnövekedés gátlására. *ATF3* és *GDF15* knockdown kezelések nem befolyásolták az AK16 sejtszámra gyakorolt hatását, még ISRIB jelenléte mellett sem.

Következő lépésként, *GDF15* lókuszán található intronikus miRNS-sel, a mIR-3189-3p, kezdtünk el foglalkozni. miR-3189-3p együtt expresszálódik a *GDF15*-tel és kimutatták, hogy pro-apoptotikus aktivitással rendelkezik. miR-3189-3p expressziós szintje 3-szorosára nőtt 24 órás AK16 kezelést követően HeLa sejtekben, míg a KK-nak nem volt hatása. Tunikamicin, egy ismert ER stressz indukáló, 4-szeres emelkedését okozott a miR-3189-3p expressziójában.

Ahhoz, hogy kimutassuk a miR-3189-3p szerepet játszik-e az AK16 sejtnövekedés gátló hatásásban, miRNS gátlót alkalmaztunk. Annak ellenére, hogy a miRNS expresszióját sikerült gátolni, az AK16 sejtszám csökkentését nem tudtuk kivédeni.

Tovább vizsgálva a miR-3189-3p szerepét megfigyeltük, hogy a miR-3189-3p mimik szignifikánsan növelte *ATF3*, *DDIT3*, and *GDF15* transzkriptek expresszióját, amit gátolni tudtunk gátló miR-3189-3p-vel, negatív kontroll miRNS gátlóval viszont nem.

Jun dimerizációs fehérje 2 (JDP2) transzkripciós faktor csökkenti az *ATF3* és *DDIT3* transzkripcióját és számos hiszton deacetiláz családba (HDAC) tartozó fehérje kapcsolódik a JDP2 fehérjéhez az *ATF3* és *DDIT3* promoter régióinál. Így megmértük a *HDAC1-6*, *JDP2*, és két további JPD2 célgén (*GSG1* és *PCDH7*) mRNS szintjét miR-3189-3p mimik transzfekcióját követően. *HDAC1*, *HDAC3*, *JDP2* mRNS szintje csökkent, míg a GSG1 és a PCDH7 mRNS szintje szignifikánsan nőtt. *GSG1* és *PCDH7* expressziós szintjének emelkedése is igazolja a *JDP2* szintjének csökkenését.

Az eredményeink azt mutatják, hogy az ATF3 és GDF15 nem nélkülözhetetlen az AK16 növekedés gátló hatásában, míg az AK16 hatására megnövekedett miR-3189-3p valószínűleg növeli az *ATF3* és *DDIT3* expresszioját azzal, hogy gátolja a *JDP2*, *HDAC1*, *HDAC3* expresszióját.

5.6. AK16 hatása a sejt "sorsának" kimenetelére – sejtciklus leállítás és sejthalál

Mivel az AK16 hatását nem tudtuk teljesen gátolni, így tovább vizsgáltuk, hogy az AK16 hatása főként citotoxikus, növekedést leállító vagy apoptózis indukáló aktivitásának tudható-e be. Citokalcein és 7-AAD festéssel kimutattuk, hogy a nekrotikus/ késői apoptotikus sejtek

száma nőtt AK16 kezelés hatására HeLa sejtekben. Továbbá HeLa sejtekben AK16 kezelés következtében EdU beépülésével mért proliferáció gátlás volt megfigyelhető, illetve szignifikánsan megnőtt az apoptotikus sejtek száma, amit TUNEL assay segítségével mutattunk ki.

Ezután, megvizsgáltuk az apoptózis, autofágia, ferroptózis és nekroptózis hozzájárulását az AK16 hatásához, ezen sejthalál útvonalak gátlószereinek használatával. AK16-ot önmagában vagy a gátlószerekkel kombinálva használtuk, és meghatároztuk a kombinációs indexeket (CI) sejtszámolás segítségével. A CI az inhibitorok és az AK16 közötti kölcsönhatás kvantitatív mértéke (CI> 1.1 antagonizmust jelez, CI <0.9 szinergizmust jelez).

A ferroptózis vizsgálatához először kiválasztottuk a megfelelő sejtvonalt. Erasztint, a ferroptózis ismert indukátorát HeLa, MCF-7, PC-3, Caco-2, HT-29 és A549 sejteken teszteltük, kombinálva a ferroptózis gátlószereivel: vas kelátor deferoxamine, és a lipidperoxidáció gátló ferrosztatin-1. Erasztin hatása egyedül A549 sejtekben gátlódott, így továbbiakban HeLa és A549 sejteken vizsgáltuk a többi ferroptózis gátlószer (deferoxamin, ferrosztatin-1, Trolox, 2-merkaptoetanol, U0126) hatását. Kimutattuk a HeLa és A549 sejtek dózisfüggő sejtszám csökkenését az AK16 kezelés következtében, azonban a ferroptózis gátlói nem tudták megakadályozni az AK16 hatását HeLa és A549 sejtekben.

Annak meghatározására, hogy az AK16 kezelés okoz-e nekroptózist, megvizsgáltuk a nekrosztatin-1 és az nekroszulfonamin gátlószerek hatását HT-29 sejteken, mivel a HeLa, PC-3, MCF-7 és Caco-2 sejtekből hiányoznak egyes nekroptózis jelátviteli út komponensek, és így nem reagálnak a TNF-α + z-VAD-fmk + Smac mimetic nekroptózist indukáló stimulusra. A nekroptózis gátló szerei nem tudták megakadályozni az AK16 dózisfüggő sejtszám csökkentő hatását HT-29 sejtekben.

Következő lépésben, megvizsgáltuk a kaszpáz, a katepszin vagy kalpain proteázok (z-VAD-fmk, E64d, ALLN), a ciklofilin D (ciklosporin A) és az autofágia/lizoszomális funkció (bafalomicin A1, 3-metiladenin és a klorokvin) gátlószerek hatását HeLa, A549 és HT-29 sejtekben. Megállapítottuk, hogy a z-VAD-fmk részlegesen antagonizálta az AK16 hatását A549 és HT-29 sejtekben (CI: 1.14-1.42), míg az E64d, ALLN és a ciklosporin A részlegesen antagonizálta az AK16 hatását mindhárom sejtvonal esetében (CI: 1.2-1.67).

Az autofágia gátlók, bafalomicin A1 és 3-metiladenin fokozta az AK16 hatását mindhárom sejtvonal esetében (CI: 0.32-0.86).

Az eredmények azt mutatják, hogy a ferroptózis és a nekroptózis nem vesz részt az AK16 indukálta sejthalálban, de az apoptózis fontos szerepet játszik benne.

5.7. BBC3 és PMAIP1 szerepe az AK16 hatásában

Az AK16 hatását továbbra sem tudtuk teljesen gátolni, így az AK16 által kiváltott apoptózis további mediátorait kerestük. Az apoptotikus mediátorok, *BBC3* és *PMAIP1* transzkripciós szintje emelkedett HeLa, MCF-7, PC-3 és Caco-2 sejtekben AK16 kezelés következtében. Érdekes módon a *BBC3* és *PMAIP1* együttes csendesítése (knockdown) kombinálva az ISRIB kezeléssel teljesen blokkolta az AK16 hatását.

5.8. További vegyületek azonosítása, melyek képesek fokozni az AK sejtnövekedés gátló hatását

Következő célunk volt azonosítani további szérumban található molekulákat, amik képesek fokozni az aktív keverék korábban azonosított komponenseinek hatását. 130 új vegyületet vizsgáltunk önmagában nem toxikus koncentrációban az AK-val kombinálva, ezek közül 34-et azonosítottunk, amelyek képesek fokozni az AK hatását. A 34 újonnan azonosított vegyület a következő: D-fenilalanin, D-triptofán, D-arginin, 5-hidroxi-L-triptofán, melatonin, mandulasav, 3,4-dihidroxi-mandulasav, p-kumársav, transz-fahéjsav, indol-3-ecetsav, fenilecetsav, 3,4-dihidroxi-fenilecetsav, indol-3-piroszőlősav, fenilpiroszőlősav, 4-hidroxi-fenilpiroszőlősav, 3-feniltejsav, D-glicerinsav, gliceraldehid, 3-metil-2-oxovajsav, 4-guanidino-vajsav, 3-metil-2-oxovaleriánsav, 4-metil-2-oxovaleriánsav, 3-hidroxi-3-metil-glutársav, gentizinsav, urokánsav, homovanillinsav, xanturénsav, levulinsav, 4-hidroxi-benzoesav, pirrol-2-karbonsav, adenozin, agmatin-szulfát, ciszteamin, kreatinin.

5.9. Új keverék ráksejtekre kifejtett hatása

Ezután, az új, 34 vegyületből álló keverék (UK) hatását vizsgáltuk AK-hoz viszonyítva HeLa, PC-3, MCF-7, Caco-2, HepG-2, 4T1 és HRE sejteken. Az UK-nak szignifikánsan nagyobb sejtnövekedés gátló hatását figyeltük meg a különböző ráksejteken az AK-hoz viszonyítva. A kombinált AK és UK kezelés jelentősebb sejtnövekedés gátlást eredményezett, mint önmagukban. HRE sejtek proliferációja nem csökkent egyik kezelés hatására sem.

Az UK hatásának további vizsgálata céljából megmértük bizonyos pro- és anti-apoptotikus, valamint a sejtciklus szabályozó gének expresszióját qRT-PCR-ral. HeLa sejteket kezeltünk 30% AK-val, 20% UK-val vagy kombinációjukkal (AK + UK). A kombinált kezelés (AK+UK) szignifikánsan növelte a pro-apoptotikus fehérjéket kódoló *BIM, BBC3 PMAIP1, DR4* (*TNFRSF10A*) és *DR5* (*TNFRSF10B*) és az anti-apoptotikus fehérjét kódoló *BCL-2, cIAP* és *cIAP2* gének expresszióját a kezeletlen kontrollhoz képest. A sejtciklus gátló, *CDKN1A*

expressziós szintje jelentősen emelkedett. 20% UK kezelés szintén okozott génexpressziós változásokat a pro- és antiapoptotikus gének esetében, de kisebb mértékben, mint az AK + UK.

30% AK-val végzett kezelés enyhén vagy nem okozott változásokat a vizsgált gének expressziójában a kontrollhoz képest.

Ezek az eredmények együttesen azt mutatják, hogy az UK nagyobb gátló hatást gyakorol a rákos sejtekre, mint az AK, és az AK és UK kombinációja indukálja az apoptózisban és a sejtciklus szabályozásban szerepet játszó gének expresszióját.

6. Megbeszélés

Jelen munkánk során, sikerült kimutatni, hogy a szérumban található aminosavak, vitaminok és egyéb kismolekulák meghatározott keveréke endoplazmatikus retikulum stresszt indukál és aktiválja a rosszul feltekeredett fehérje választ szelektíven ráksejtekben. Az AK kezelés elsőként az ER stresszben szerepet játszó géneket indukálja (*ATF3, ATF4, DDIT3, XBP1*), majd az apoptózisban és a sejtciklus szabályozásában részt vevő géneket (*BBC3, PMAIP1, TNFRSF10B, CDKN1A).* Ezek az eredmények, együtt az ATF4, ATF3 és DDIT3 fehérjék indukciójával, arra utalnak, hogy az AK ER stressz által kiváltott apoptózist indukál.

További vizsgálataink kimutatták, hogy az AK aktiválja UPR jelátviteli útvonal mindhárom ágát (PERK, ATF6, IRE1α), azonban a gátló kísérleteink eredményei azt sugallják, hogy a PERK aktivációja és eIF2α foszforilációja, és az azt követő upstream nyitott leolvasási keretet tartalmazó *ATF4* mRNS transzlációja a domináns útvonal az AK által kiváltott ER stresszben.

Az ATF4 fehérjét tekintik az UPR fő transzkripciós faktorának, amely heterodimereket képezhet különböző leucin cipzár transzkripciós faktorokkal, beleértve a DDIT3-mat. DDIT3 megjelenését az ATF4 indukciója előzte meg, illetve a *DDIT3* expressziója csökkent az ATF4 ISRIB általi gátlását követően, ezek az eredmények arra utalnak, hogy az ATF4 közvetíti az AK általi DDIT3 indukcióját.

ATF4 és DDIT3 heterodimert képezve további UPR gént aktivál, mint *ATF3* és *TRIB3*. Ez összhangban van az eredményeinkkel, melyek szintén mutatják e gének indukcióját AK kezelés hatására.

ATF4 és az ATF3 együttesen képes indukálni a *CHAC1*-et, amelyről kimutatták, hogy részt vesz az UPR folyamatokban és pro-apoptotikus aktivitással rendelkezik, mely a glutation lebontó képességének köszönhető. Eredményeink is azt mutatják, hogy az AK kezelés ATF4-függő módon aktiválja a CHAC1-et, és így felvetődik annak esélye, hogy a CHAC1 fontos szerepet játszik AK által kiváltott apoptózisban.

GDF15 a TGF-β szupercsalád tagja, változatos és ellentmondásos szerepet játszik a rák kialakulásában és progressziójában. Eredményeink azt mutatják, hogy a GDF15 minden vizsgált ráksejtvonalban indukálódott AK kezelés hatására.

GDF15 lókusza egy intronikus miRNS-t (mIR-3189) tartalmaz, melynek 3p terméke (mIR-3189-3p) transzkripciósan együtt szabályozódik a *GDF15*-tel, és kimutatták *in vitro* pro-apoptotikus és *in vivo* tumorellenes aktivitását vastagbél ráksejtekben. Ezen kívül, leírták a mIR-3189-3p tumornövekedés gátló hatását glioblasztóma xenografokban, továbbá downregulációját klinikai glioblasztóma mintákban. Általunk kapott eredmények, mi szerint az AK és a tunikamicin, az ismert ER stressz indukáló, növeli a mIR-3189-3p mennyiségét, arra utalnak, hogy szerepet játszhat az UPR indukciójában és az azt követő apoptózisban. Továbbá azt találtuk, hogy a mIR-3189-3p specifikusan növeli *ATF3, DDIT3*, és *GDF15* transzkriptek mennyiségét.

JDP2 transzkripciós faktorról leírták, hogy csökkenti az *ATF3* és *DDIT3* expresszióját, és kimutatták, hogy különböző HDAC család tagjai kapcsolódnak a JDP2 fehérjéhez az *ATF3* és *DDIT3* promóter régiónál. Eredményeink azt mutatják, hogy a mIR-3189-3p specifikusan csökkenti a *JDP2, HDAC1* és *HDAC3* expresszióját, ami arra utalhat, hogy ezek az mRNS-ek a mIR-3189-3p célpontjai. *JPD2* alulszabályozását továbbá megerősítette, hogy a *GSG1* és *PCDH7* expressziója viszont megnőtt, melyek ismert célpontjai a represszor JDP2-nek. Ezek alapján, azt feltételezzük, hogy a mIR-3189-3p fokozza az *ATF3* és *DDIT3* expresszióját valószínűleg a *JDP2, HDAC1*, és *HDAC3* csökkentésével, megszüntetve az *ATF3* és *DDIT3* promóter régióknál a repressziót. Ennek következtében megnövekedett ATF3 és DDIT3 stimulálhatja a *GDF15* transzkripciót vagy stabilizálhatja a *GDF15* transzkriptet, ezáltal egy visszacsatolást biztosítva a mIR-3189-3p-nek. Azonban, az a tény, hogy az *ATF3, GDF15* vagy mIR-3189-3p gátlása nem befolyásolta az AK sejtszám csökkentő hatását, azt mutatja, hogy ezek a komponensek nem nélkülözhetetlenek az AK rákellenes aktivitásához.

Munkánk során, arra is kerestük a választ, hogy az AK egyes komponensei hogyan járulnak hozzá az UPR aktivációjához. Eredményeink azt mutatják, hogy az aminosavakat (L-arginin, L-tirozin, L-hisztidin, L-triptofán, L-metionin, és L-fenilalanin) együtt alkalmazva adeninnel, L-(-)-maláttal, D-(+)-mannózzal és hippursavval nélkülözhetetlen és elegendő az ER stressz kiváltásához. Eddigi tudásunk szerint, egyik komponensről sem írták még le, hogy szerepet játszana az UPR aktiválásában kivétel az L-arginin és a D-(+)-mannóz.

Vizsgálataink kimutatták, hogy a sejtproliferáció gátlás és az apoptózis indukció az AK két fő mechanizmusa. Továbbá, eredményeink összekapcsolják a sejtproliferáció gátlást és a BBC3

és PMAIP1 közvetített apoptózist az AK indukált ER stresszel, ami összehangban van az ER stressz szerepével a sejt sorsának szabályozásában.

Ezen kívül, azonosítottunk 34 új vegyületet, melyek szignifikánsan fokozták az AK hatását különböző ráksejteken, ha önmagukban nem toxikus koncentrációban alkalmaztuk. Ezek a vegyületek főleg L-aminosav metabolitok, fenolsavak, D-aminosavak és ketonsavak. Az UK-val történő kezelés vagy az AK-val kombinációban, nem okozott toxikus hatást az HRE normál sejtekre. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy kiválasztott anyagok keveréke specifikus gátló hatással van a ráksejtekre. AK és UK kombinációjával történő kezelés növelte a *BBC3*, *PMAIP1* és *CDKN1* expresszióját, ami az apoptózis indukciójára és a sejtciklus leállására utal, mely összhangban van az eddigi eredményeinkkel.

7. Saját közlemények

A dolgozat alapjául szolgáló közlemények:

Scheffer D, Kulcsár G, Czömpöly T. Identification of Further Components of an Anticancer Defense System Composed of Small Molecules Present in the Serum. Cancer Biother Radiopharm. 2019 Apr; 34(3):160-170. **Impact factor: 1.894**

Scheffer D, Kulcsár G, Nagyéri G, Kiss-Merki M, Rékási Z, Maloy M, Czömpöly T. Active mixture of serum-circulating small molecules selectively inhibits proliferation and triggers apoptosis in cancer cells via induction of ER stress. Cell Signal. 2020 Jan; 65:109426. **Impact factor: 3.388**

Dolgozathoz kapcsolódó poszterek:

Dalma Scheffer, Tamás Czömpöly, Gyula Kulcsár. Effects of a mixture of amino acids and other small molecules on gene expression profile in human cervical cancer cells (HeLa). 45. Membrane Transport Congress, Sümeg, Hungary, 2015.

Dalma Scheffer, Tamás Czömpöly, Gyula Kulcsár. A mixture of amino acids and other small molecules induces endoplasmic reticulum stress in different cancer cell lines. 46. Membrane Transport Congress, Sümeg, Hungary, 2016.

Egyéb poszterek:

Viktor Sándor, **Dalma Scheffer**, Ágnes Dörnyei, Anikó Kilár, Béla Kocsis, Ferenc Kilár. Electrophoretic and mass spectrometric analysis of the lipid A part of bacterial lipopolysaccharides. 8th International Interdisciplinary Meeting on Bioanalysis. Brno, Czech Republic, 2011.

Árpád Czéh, Tamás Czömpöly, Gyula Kulcsár, Erika Lantos, György Nagyéri, Viktória Németh, **Dalma Scheffer**, Marianna Merki, György Lustyik. A novel approach for in vitro

characterization of anticancer effects of experimentally selected mixtures of amino acids and other small molecules. CYTO Congress, Glasgow, Scotland, 2015.

8. Köszönetnyilvánítás

Hálával tartozom témavezetőmnek, Dr. Czömpöly Tamásnak, aki munkám során végig támogatott és szakmai segítséget nyújtott.

Külön köszönettel tartozom Dr. Kulcsár Gyulának, aki lehetőséget adott arra, hogy ezen a témán dolgozhassak, szakmai segítséget nyújtott és bíztató szavakkal támogatott.

Szeretném megköszönni Dr. Rékási Zoltánnak az évek során nyújtott támogatását és hasznos tanácsait.

Nagyon hálás vagyok Heitmanné Lendvai Anikónak, aki az évek alatt sok technikai segítséget nyújtott és bíztató szavakkal támogatott.

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Nagyéri Györgynek a mikroszkópos képek elkészítésében nyújtott segítségéért.