

A TSC MUTÁCIÓVAL ÖSSZEFÜGGŐ MITOKONDRIÁLIS ÉS JELÁTVITELI MECHANIZMUSOK JELLEMZÉSE ANGIOMIOLIPÓMA MODELLRENDSZERBEN

PhD értekezés tézisei



Bóvári-Biri Judit

Pécsi Tudományegyetem

Gyógyszerészi Biotechnológia Intézet

Interdiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola

Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar

Témavezető: Prof. Dr. Pongrácz Judit E.

Pécs, 2024

Bevezetés

A lassan növekedő tumoros elváltozásokként ismert neoplazmák, pl: a lymphangioliomyomatosis (LAM) és az angiomiolipóma (AML) mellett, számos rosszindulatú daganat háttérében a Tuberous Sclerosis Complex (TSC) gének mutációja áll. A TSC gént érintő genetikai eltérések a TSC1 vagy a TSC2 gének által kódolt fehérje funkcióvesztését eredményezik. A TSC1/TSC2 fehérjéknek központi szerep jut a Rheb/mTOR/p70S6K (Ras homolog enriched in brain/ mammalian target of rapamycin/ Ribosomal protein S6 kinase beta-1) jelátviteli út szabályozásában, mely képes befolyásolni a sejtek fehérje szintézisét és ebből következően a sejtek osztódását. Ennek köszönhetően az mTOR jelátviteli út gátlása fontos terápiás célpont a LAM, az AML és a rák kemoterápiájában. Ezt a jelátviteli útvonalat célzó gyógyszer a Sirolimus, azaz rapamycin, amely gátolja az mTOR-on keresztül jutó jeleket, ezért amennyiben lehetséges, a rapamycint beépítik a kezelési tervbe. A rapamycin az mTOR complex leszálló ágán, azon belül is az S6K1 gátlásán keresztül hat, ami csökkent fehérjeszintézisben, lassabb sejtosztódásban, és így a betegség lassabb előrehaladásában nyilvánul meg. Sajnos azonban a betegek nagy része súlyos mellékhatásokkal küzd a kezelés során, többek között ödémával, hasmenéssel, nefrotoxicitással, nem megfelelő sebgyógyulással, trombocitopéniával, sztomatitiszel vagy hiperkoleszterinémiával. Ha a beteg nem tudja tolerálni a rapamycin terápiát a fellépő mellékhatások miatt, akkor az egyetlen alternatív kezelési lehetőség AML esetében a vese eltávolítása vagy angioembolizációja, míg a LAM esetében a tüdő transzplantáció. Egy kohort tanulmány szerint az alacsonyabb súlyoskoncentrációban alkalmazott rapamycin csökkentette a kialakuló mellékhatások súlyosságát, miközben lassította a betegség előrehaladását. Ez arra enged következtetni, hogy az ajánlott terápiás dózis csökkentése, illetve ebben a csökkentett dózisban más hatóanyaggal való kombinálása eredményesen csökkenthetné a későbbi invazív beavatkozások szükségességét.

A kombinációban alkalmazott hatóanyagok kiválasztása a TSC mutáns AML sejtek eltérő mitokondriális metabolizmusán alapult. A sejtek megváltozott metabolikus aktivitását számos betegség esetében megfigyelték és leírták korábban. A hibás mitokondriális működés és a túlaktivált mTOR jelátviteli út következménye a megemelkedő mitokondriális légzés, a glikolízis és a kontrollálatlan sejtosztódás. Egészséges sejtekben a sejtosztódás, a sejtvándorlás, a sejt méretének szabályozása, a sejtszerkezet megőrzése, illetve az autofágia szabályozása mind energiaigényes folyamat, melyek szigorú szabályozás alá esnek. A daganatos sejtek megnövekedett osztódási potenciálját a háttérben zajló folyamatok magas ATP igénye jellemzi. A daganatos sejtek esetében az ATP molekulák jelentős része az oxidatív foszforiláció során (OxPhos) keletkezik. Daganatos sejtekben megfigyelték, hogy képesek az ATP termelésre fokozott, oxigénellátottságtól független glikolízis révén (Warburg-effektus). A daganatos sejtek esetében a metabolikus működési zavarok, azon belül is a mitokondriális diszfunkciók a betegség kialakulását jellemző folyamatok. Ennek megfelelően számos daganat terápiájához kísérletileg alkalmaztak mitokondriális működésre ható hatóanyagokat. Több tanulmány is összefüggést figyelt meg a kemoterápiára kialakuló rezisztencia és a metabolikus aktivitás felborulása között, továbbá a metasztázis képzés és a metabolizmusban bekövetkező változások, illetve a megnövekedett aerob glikolízis között. A gyomor daganatok esetében leírták, hogy a cisplatin kemoterápiás szerre kialakuló rezisztencia összefügg az mTOR

jelátviteli úthoz kapcsolódó szabályozási folyamatokkal. A megnövekedett aerob glikolízis következtében az elektrontranszportláncok túltelítődnek, és szuperoxid gyökök halmozódnak fel. A szuperoxid megkötésére használt hatóanyagok a terápiában alkalmazva képesek lehetnek csökkenteni az elektrontranszportláncok túltelítődését, ezáltal csökkentik a daganatsejtek migrációs- és metasztázis képző képességét.

A TSC (-/-) mutáns S102 angiomiolipóma sejtek proliferációs képességének, mitokondriális jelátviteli folyamatainak és antioxidáns rendszereinek a vizsgálatát követően felmerültek olyan lehetséges terápiás célpontok, amelyeket eddig nem alkalmaztak a TSC mutációval összefüggő betegségek terápiájában. Az általunk vizsgált három hatóanyag mindegyike a sejtek antioxidáns rendszerét célozza meg. A proxison, egy szintetikus flavonoid, amely egy engedélyezés előtt álló gyógyszerjelölt molekula. Hatékonyan képes a szabad reaktív oxigén gyököket semlegesíteni egy elektron transzferén/ H-atom donációján keresztül. A másik kombinált kezelésben vizsgált hatóanyag molekula az FDA által akut myeloid leukémia kezelésére engedélyezett retinsav (RA). Az RA a lipofil tulajdonságú A-vitamin (retinol) metabolitja, amelyet növényi (karotinoidok) vagy állati forrásokból (retinil-észterek) nyernek. A harmadik hatóanyag, melynek hatását vizsgáltuk az auranofin, egy aranytartalmú redox enzim inhibitor, amely képes gátolni a thioredoxin reduktáz (TrxR) enzimet és egyes tumorsejtenyészetekben sejthalált indukál, melynek következtében olyan klinikai eseteken is kipróbálták, ahol a gyorsan-növő daganat nem reagált az alkalmazott kezelésre.

Célkitűzések

Dolgozatomban célul tűztem ki az AML, egy krónikus proliferatív megbetegedés molekuláris hátterének mélyebb megismerését és feltérképezését, illetve a megismert molekuláris háttér folyamatokra építve lehetséges új terápiás célpontok beazonosítását.

A főbb vizsgálati célok a következők voltak:

- 1- A TSC mutációval összefüggő mitokondriális érintettség vizsgálata a TSC (+/+) vad típusú, S103 kontroll és TSC (-/-) mutáns S102 AML sejtvonalak alkalmazásával.
- 2- A TSC mutáció által módosított molekuláris mechanizmusok:
 - a. A p53 tumor szuppresszor gén
 - b. Az A-vitamin receptorok és az A-vitamint metabolizáló enzimek
 - c. A TrxR redox enzim
- 3- A feltárt molekuláris háttérmechanizmusokra építve új, a TSC mutáció által indukált betegségek terápiájában potenciálisan alkalmazható hatóanyagok (retinsav, proxison, auranofin) in-vitro vizsgálata TSC (+/+) vad típusú S103 kontroll és TSC (-/-) mutáns S102 AML sejtvonalakon.

Anyagok és módszerek

1. AZ AML SEJTEK SAJÁTOSÁGAI, SEJTNYÉSZETEI

A kísérleteink során a TSC gén mindkét alléljának mutációját hordozó 621-S103 és a 621-S102 AML sejteket használtunk.

2. HATÓANYAGKEZELÉSEK

A sejteket a kiültetést követően, de még a tervezett kezelések megkezdése előtt 24 órán keresztül hagytuk kitapadni. A hatóanyagkezelések inkubációs ideje 3, 24 és 48 h volt.

A kísérleteinkben felhasznált TSC (+/+) vad típusú S103 és a TSC (-/-) mutáns S102 sejtek kezelését vagy kizárólag rapamycinnel, auranofinnal, proxizonnal és retinsavval vagy az utóbbiak rapamycinnel alkotott kombinációjával (rapamycin+proxisonnal, rapamycin+retinsavval és rapamycin+auranofinnal) végeztük.

3. ELEKTRONMIKROSKÓPIA

A TSC (+/+) vad típusú S103 és a TSC (-/-) mutáns S102 sejtek mitokondriumainak morfológiai vizsgálatához Jeol 1400 és Jeol 1200 transmissziós elektron mikroszkópot használtunk.

4. SEJTÉLETKÉPESSÉG MÉRÉSE

1.4.1. CELL TITER GLO LUMINOMETRIÁS ASSAY

A CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay Kitet használtuk a kezelések utáni sejtéletképesség meghatározásához.

1.4.2. CRYSTAL VIOLET KOLORIMETRIÁS ASSAY

Az auranofin kísérleteinkben alkalmazható dózisének meghatározásához crystal violet sejtviabilitási assay-t használtunk.

5. SEJT PROLIFERÁCIÓS ASSAY

A 621-103 (TSC2 +/+) AML és a 621-102 (TSC2-/-) AML sejtek hatóanyag kezeléseit követően Click-IT EdU Cell Proliferation Kitet használtunk (a gyártó előírásait követve), hogy meghatározzuk az újonnan szintetizálódó DNS mennyiségét. A képeket Olympus IX 81 fluoreszcens mikroszkóppal készítettük.

6. MITOKONDRIUMOK FUNKCIONÁLIS FESTÉSE

A hatóanyagokkal kezelt sejteket MitoBright Green mitokondriális vitális festék jelenlétében inkubáltuk. A felvételeket Zeiss LSM 710 konfokális mikroszkóppal készítettük.

7. IMMUNFLUORESZCENS FESTÉSEK

A TSC (+/+) vad típusú S103 és a TSC (-/-) mutáns S102 sejtek konvencionális festési eljárását követően a képeket Olympus IX-81 (Olympus Corporation, Tokyo, Japán) fény- és fluoreszcens mikroszkóppal készítettük.

8. WESTERN BLOT

A kezelés lejtárát követően a sejteket a western blot protokollnak megfelelően gyűjtöttük össze. A konvencionális protokollt követően az immunreakció detektálására kemilumineszcens HRP szubsztrátot használtunk, a felvételeket ImageQuant LAS-4000 imager segítségével készítettük. A fehérje expresszió intenzitásának meghatározásához ImageJ szoftvert használtunk.

9. PROTEIN ARRAY

A sejtek hatóanyagokkal történő inkubálását követően a Proteome Profiler Array, Human Cell Stress Array Kitet használtuk a fehérjeexpressziós mintázatok detektálására. A protein assay-eket a gyártó által mellékelt protokoll alapján végeztük. A lumineszcens jelet ImageQuant LAS-4000 imager rendszerrel detektáltuk. A fehérje expresszió intenzitásának meghatározásához ImageJ szoftvert használtunk, a kapott értékeket a referencia pontokra normalizáltuk.

10. PRDX5 FEHÉRJEKONCENTRÁCIÓ MEGHATÁROZÁSA ELISA MÓDSZERREL

A sejtkelések lejtárát követően a Human Peroxiredoxin 5 ELISA Kit-et használtuk a Prdx5 fehérje koncentrációjának meghatározására. Az abszorbancia detektálására Perkin Elmer EnSpire Multiplate Reader használtunk.

11. ALDH ÉS ADH ENZIMAKTIVITÁSI VIZSGÁLAT

ALDH Activity Assay Kit és Alcohol Dehydrogenase Assay Kit segítségével vizsgáltuk a TSC (-/-) mutáns S102 sejtek ALDH és ADH aktivitását a kezelések előtti és utáni kontrollokhoz képest. Az enzimaktivitás hatására bekövetkező színváltozásokat Perkin Elmer EnSpire Multimode Plate Reader segítségével mértük le, OD450 nm-en.

12. METABOLIKUS ENZIM RT2 ARRAY

A cDNS szintézist követően a Human Drug Metabolism: Phase I Enzymes array-t használtuk fel a metabolikus enzimek mRNS expressziós szintjeinek vizsgálatára. Az array Quantstudio 12k flex készüléken futtattuk le.

13. RNS IZOLÁLÁS

A sejtekből történő totál RNS kivonásához a MN NucleoSpin RNA isolation kitet használtuk, a gyártói protokollnak mindenben megfelelően. A cDNS szintézisthez High capacity RNA to cDNA kitet használtunk. A reverz transzkripcióhoz random hexamer primert használtunk.

14. TAQMAN ASSAY

A Taqman assay-ek futtatásához Quantstudio 12K Flex Real-Time PCR rendszert használtunk. A génextpressziót a GAPDH housekeeping génre normalizáltuk. Az adatok kiértékelése összehasonlító ddCt módszerrel történt.

15. INTRACELLULÁRIS ROS TERMELÉS MÉRÉSE

A Reactive oxygen species szintjének meghatározásához green Fluorometric Intracellular Ros Kitet használtunk, a gyártói utasítás szerint. A sejtek ROS termelését a kezeléseket követően Perkin Elmer EnSpire Multimode Plate Reader segítségével határoztuk meg.

16. TrxR ENZIMAKTIVITÁS MÉRÉS

A TrxR enzim aktivitásának mérésére sejt homogenizátumot használtunk fel, melyet a thioredoxin reductase assay kit leírásában szereplően készítettünk el. A TrxR enzim aktivitását a kitben foglalt leírásnak megfelelően végeztük el.

17. ÁRAMLÁSI CITOMETRIA

Az Annexin V-tel és 7-AAD-vel festett sejtek detektálásához BD FACSCanto™ II (három lézer: kék 488-nm, vörös 633-nm, és violet 405-nm) készüléket és a BD FACS DIVA szoftver V6 verzióját, az adatok elemzéséhez az FCS Express V3 szoftvert használtuk.

18. INGENUITY PATHWAY ANALYSIS

Az Ingenuity Pathway Analysis szoftvert a molekuláris útvonalelemzés során használtam. A rendelkezésre álló adatokon interakciós hálózat elemzést és MAP (Molecule Activity Predictor) analízis szűrőt alkalmaztunk

19. STATISZTIKAI ANALÍZIS

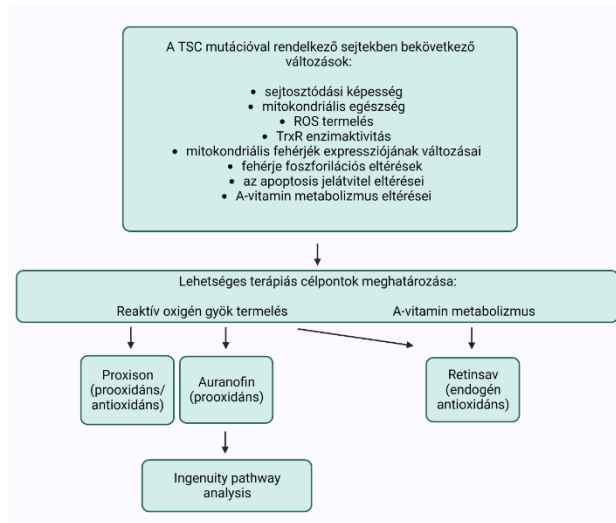
Az eredmények statisztikai kiértékeléséhez SPSS version 20 és Graphpad Prism 8 version szoftvert használtunk. Az ábrázolt adatok a mérések átlagát és a három ismétlésből eredő SEM-et ábrázolják. A statisztikai analízishez két-utas ANOVA- ill. kétmintás t-próbát használtunk, az eredményeket $p < 0,05$ érték alatt jelöltük szignifikánsként (*). A további jelölések: $p < 0,0021$ (**), $p < 0,0002$ (***) és $p < 0,0001$ (****).

Eredmények megbeszélése és következtetések

1. AZ AML SEJTEK KARAKTERIZÁLÁSA

A TSC (-/-) mutáns S102 sejtek mérete sok esetben kisebb, mint az egészséges sejteké, emelkedett proliferációs képességgel jellemezhetőek, mitokondriumaik kisebbek, sötétebbek és annyira elektrodenzek, hogy a belső membrán alkotta kriszták nem felismerhetőek. A TSC mutáns sejtek esetében a mitokondriumok membránpotenciálja csökkent értéket mutatott, a mitokondriális membránpotenciált befolyásoló VDAC fehérje expressziója megemelkedett, míg a mitokondriumok integritásának megőrzésében központi szerepet játszó prohibitin fehérje szintje csökkent az egészséges kontrollhoz viszonyítva. A TSC mutáns sejtekben bekövetkező változások a sejtek apoptózisát szabályozó jelátviteli folyamatokat is érinti. Annak ellenére, hogy az eredményeink alapján a p53 fehérje foszforilációja három fontos szerin foszforilációs helyen volt kimutatható (S15, S392 és S46), a TSC (-/-) sejtek proliferációja gyorsabb, mint a TSC (+/+) vad típusú kontroll sejtek esetében. Hogy többet tudjunk meg a pro-és az anti-apoptotikus jelátviteli utakat jellemző bonyolult szabályozási folyamatokról, megvizsgáltuk a sejtekben keletkező ROS mennyiségét. Az egészséges sejtek metabolikus folyamataira is jellemző a ROS keletkezése. A mitokondriumok károsodásának következtében azonban a sejtekben felhalmozódó nagy mennyiségű ROS a sejtek pusztulásához vezethet. A keletkező reaktív gyökökkel szemben a sejtek antioxidáns enzimrendszerei nyújtanak védelmet, melyek közé soroljuk a TrxR és a glutathione reduktáz enzimeket. TSC (-/-) mutáns sejtekben megfigyelhető volt a TrxR enzim aktivitásának TSC (+/+) vad típusú sejtekhez viszonyított emelkedése, a ROS koncentrációja ugyanakkor lecsökkent. Az A-vitamin a sejtek endogén, nem-enzimikus antioxidáns molekulái közé sorolható, hatását a RAR β receptorokhoz kapcsolódva fejti ki. Vizsgálatunk igazolta, hogy a TSC mutáns sejtek A-vitamin metabolizmusa és RAR β expressziója is eltérést mutat a TSC vad típusú sejtekhez viszonyítva. Az alkohol-dehidrogenáz enzimcsaládból négy enzim (ADH1A, ADH1B, ADH1C és ADH6) szintje szignifikánsan megnőtt, egy enzim szintje csökkent (ADH4) a mutáns sejtvonalban. Az aldehid-dehidrogenáz családban három enzim (ALDH1A2, ALDH1A3 és ALDH3A1) szintje emelkedett, míg öt enzim mutatott csökkent expressziót (ALDH1A1, ALDH3B1, ALDH3B2, ALDH4A1 és ALDH5A1).

2. A FELTÁRT MOLEKULÁRIS MECHANIZMUSOKON ALAPULÓ ALTERNATÍV TERÁPIÁS LEHETŐSÉGEK



3. A CSÖKKENTETT KONCENTRÁCIÓBAN ALKALMAZOTT, RETINSAVVAL KOMBINÁLT RAPAMYCIN KEZELÉS HATÁSA A SEJTEKRE

Mivel az AML-ben szenvedő betegek rapamycin kezelést kapnak, amiről jól ismert, hogy lecsökkenti a RAR β szintjét, kísérleteinkben megmértük a RAR β fehérje expressziós szintjét TSC (-/-) mutáns S102 angiomiolipóma sejtvonalban 10 nM rapamycin kezelés után, illetve a rapamycin kezelést kiegészítettük 2 μ M RA-val. Míg a 10 nM rapamycin monokezelés nem volt hatással a RAR β szintre, a 2 μ M RA még rapamycinnel kombinálva is növelte a RAR β expressziót a TSC2-/- sejtvonalakban. Annak tesztelésére, hogy az enzimszintek és az A-vitamin-anyagcsere aktivitásának normalizálása, valamint az mTOR-aktivitás gátlása hatással van-e a sejtek proliferációjára és migrációjára, BrdU (EdU) Assay-t végeztünk 2 μ M RA és 10 nM rapamycin mono- és kombinációs kezelést követően. A TSC mutáns (-/-) sejtvonalak rapamycinnel (10 nM) és RA-val (2 μ M) történő kombinált kezelése jelentősen csökkentette a BrdU vizsgálatban kimutatott proliferációs kapacitást a rapamycin mono kezeléshez képest.

4. A CSÖKKENTETT KONCENTRÁCIÓBAN ALKALMAZOTT, PROXISONNAL KOMBINÁLT RAPAMYCIN KEZELÉS HATÁSA A SEJTEKRE

Vizsgáltuk annak lehetőségét, hogy az apoptózis folyamatának szabályozása helyreállítható-e. Ehhez kombinált kezeléseket végeztünk az FDA által engedélyezett rapamycinnel és a gyógyszerjelölt proxisonnal, egy flavonoid alapú gyógyszerjelölt molekulával, mely a korábbi kísérleteink során helyreállította a mitokondriumok morfológiáját és funkcióját. Erre alapozva megvizsgáltuk a 3 μ M proxison és/vagy a

standard (20 nM) vagy csökkentett (10 nM) koncentrációban alkalmazott rapamycin TSC (-/-) S102 mutáns és TSC (+/+) vad típusú S103 kontroll sejtvonalakra gyakorolt hatását. A sejtek fluoreszcens festése a p53 (S15) fehérje megnövekedett sejtmagi jelenlétét mutatta 3 μ M proxison illetve 10 nM rapamycin és 3 μ M proxison kombinált kezelését követően. Hogy meghatározzuk a proxison mono- és kombinált kezeléseinek a sejtek életképességére gyakorolt hatását ATP szint mérést, ROS koncentráció mérést és AnnexinV festést végeztünk TSC (-/-) mutáns S102 és TSC (+/+) S103 kontroll sejteken. Míg a 20 nM rapamycin szignifikánsan megnövelte a TSC (-/-) mutáns sejtek ROS termelését, addig a 10 nM rapamycinnel kezelt minta esetében a ROS szintje nem különbözött a kontrolltól. A rapamycin 10 nM és a 3 μ M proxison kombinációja hasonló eredményt mutatott, mint az önmagában alkalmazott proxison kezelés. Mindkettő jelentősen megnövelte a ROS termelést, csökkentette az ATP szintet és hasonlóan emelkedett AnnexinV pozitivitást eredményezett.

5. A CSÖKKENTETT KONCENTRÁCIÓBAN ALKALMAZOTT, AURANOFINNAL KOMBINÁLT RAPAMYCIN KEZELÉS HATÁSA A SEJTEKRE

A citosztatikus rapamycin és a redox enzim inhibitor auranofin kombinációban alkalmazva szignifikánsan csökkentette a TSC (-/-) sejtek proliferációs képességét, javította azok mitokondriális működését, csökkentette a TrxR enzim aktivitását, valamint a Prdx5 enzimfehérje szintjét a sejtekben. Ezeknek az antioxidáns enzimeknek a szintje szoros összefüggést mutat az érintett sejtek ROS termelésével, ami pedig összefüggésben áll az ER stresszel. A Prdx5 és az ER stressz-jelátvitel közötti kapcsolatot keresve a HSP70 expresszió emelkedett szintjét mutattuk ki rapamycin (10 nM) és auranofin (0,75 μ M) kombinált kezelést követően mind a TSC (-/-) mutáns S102, mind a TSC (+/+) vad típusú S103 sejtvonalakban. A HSP70 jól ismert szerepe, hogy megakadályozza a fehérje aggregátumok képződését fokozott intracelluláris stressz esetén. A megfelelően hajtogatott fehérjék belépnek a Golgi komplexbe, míg a hibásan hajtogatott fehérjék az ER-ben halmozódnak fel, HSP70 chaperon molekulához kapcsolva. A nem-hajtogatott vagy hibásan hajtogatott fehérje és a HSP70 molekula komplexe beindítja az UPR által közvetített sejthalál folyamatát. A Prdx5 megvédi a sejteket az ilyen halálózástól, ami azt jelzi, hogy a Prdx5-nek kettős szerepe van ezekben a komplex biokémiai mechanizmusokban.

Korábbi vizsgálatok és eredményeink azt támasztják alá, hogy a TSC mutáció egyensúlyzavart okoz a rákos sejtek antioxidáns rendszerében, a TrxR és Prdx5 enzimek fokozott aktivitása pedig kompenzálja a megnövekedett ROS termelést és fenntartja a megnövekedett proliferációs kapacitást, megvédve a sejteket az ER stressz okozta haláltól. Az auranofin gátolni tudja ezt a megóvott antioxidáns státuszt, így a rákos sejteket védtelenné teszi a megnövekedett intracelluláris ROS-szinttel és ennek következtében a sejthalállal szemben.

Diszkusszió

Kísérleteink során olyan TSC mutációhoz kapcsolódó molekuláris mechanizmusokat tártunk fel, amelyek segítenek megérteni ezen mutációval járó betegségek patomechanizmusát és közelebb jutni a betegség kezelésében alkalmazható célzott terápiákhoz.

Számos daganattípus esetében magának a RAR β receptornak az aktivitása gátolt a különféle jelátviteli utakon keresztül, amely gátlás az mTOR aktiválásához vezet. A dolgozatomban eredményei megerősítik, hogy a RAR β downregulációja a TSC mutációval rendelkező S102 angiomiolipóma sejtekben is jelen van. Vizsgálatunk alapján a TSC-hiányos sejtekben a retinol metabolizáló képessége súlyosan károsodott, számos enzim szintje (aldehid- és alkohol-dehidrogenázok), eltér a vad típusú kontrollban mért eredményektől. Az aldehid-dehidrogenázok jellemző funkciója az aldehidek oxidációja, amelyek egyébként minimalizálják a ROS-termelést és részt vesznek a jelátviteli útvonalakban, illetve az RA jelátviteli kaszkádjában. Az alkohol-dehidrogenázok szintjének eltérései hatással vannak a retinsav bioszintézisére a májban. Különösen fontos kiemelni, hogy az A-vitamin metabolikus enzimeinek koexpressziója és a közöttük kialakuló fizikai kölcsönhatások szigorúan szabályozottak, és fontos szerepet játszanak a sejtek differenciálódásának, proliferációjának és migrációjának szabályozásában. Kísérleteink rávilágítottak arra, hogy a betegek számára előnyös lehet az RA és a rutinszerűen alkalmazott rapamycin kezelés kombinációja a TSC-mutáció által érintett betegségekben. Az ilyen kezelés során a rapamycin dózisának csökkentése és az A-vitamin metabolizmus normalizált enzimaktivitás értékei kedvező életteni hatásokhoz vezethetnek, beleértve a csökkent sejtproliferációt és sejtmigrációt.

Eredményeink alapján elmondható, hogy nemcsak a retinsav rapamycinnel kombinált kezelése nyújtott biztató eredményeket, hanem a másik két kombinációban alkalmazott hatóanyag eredményei is további vizsgálatok tárgyát képezhetik a közeljövőben. Az apoptotikus folyamatok jelátvitelét vizsgálva a p53 fehérje szignifikánsan emelkedett szintjét találtuk TSC (-/-) mutáns S102 sejtekben, ami a pro- és anti-apoptotikus folyamatok szabályozásában bekövetkezett egyensúly megbomlására világít rá. A TSC mutáns sejtekben a sejthalált beindító mechanizmusok gátoltak, az apoptózis indukció a p53 aktivációja ellenére sem következik be, aminek oka nagyrészt az mTOR és a p53 fehérje közötti szabályozás hibás működésében keresendő. Az AKT-AMPK-mTOR-P70S6K jelátviteli út központi szerepet játszik a p53 fehérje aktivitásának szabályozásában. A p53-mal összefüggő gátló folyamatok a hibásan működő AMPK-TSC útvonalon keresztül jutnak el az mTOR-hoz, amely megszakítja a visszacsatolási kört, ha a TSC génnek mutációja fennáll. Azt is feltártuk, hogy a TSC mutáció esetén az anti-ROS redukív mechanizmusok magasabb aktivitást mutatnak, ami nem teszi lehetővé a mitofágia és az autofágia megindulását. A p53-hoz kapcsolódó ismereteink alapján a fehérje felhalmozódása és fokozott foszforilációja a szerin 15, 20 és/vagy 46 helyeken elősegíti a pro-apoptotikus célgén transzaktivációját. Önmagában a p53 foszforilációja nem elegendő az apoptózis kiváltásához szükséges jelátviteli utak bármelyikének indukálásához. Ugyanakkor a deregulált foszforilációs kaszkádok, a mitokondriális funkció vagy a metabolikus enzimszintek megcélzása lehetséges módjai lehetnek a sejthalál mechanizmusainak normalizálására.

A TSC (-/-) mutáns S102 sejtek a p53 fehérje eltérésein túl, fokozott proliferációs képességet, csökkent mitokondriális membránpotenciált, fokozott TrxR aktivitást és rendellenes mitokondriális biogenezist mutatnak. Az mTOR szabályozza a mitokondriumok aktivitását, és központi szerepet játszik annak az érzékeny, relatív egyensúlynak a beállításában, amely meghatározza, hogy az ATP előállítás a mitokondriális vagy nem mitokondriális forrásból történik. Számos esetben a rákos sejtek anaerob fermentációval termelnek ATP-t, magasabb glikolízisszinttel, még oxigén jelenlétében is (Warburg-effektus). A Warburg-hatást a TSC-hiányos sejtvonalak mellett a TSC-mutáció által vezérelt neopláziákban is kimutatták, például a LAM -ban és az AML-ben. A „Warburg-effektus” a légzés során nagyobb mennyiségű ROS termelődéséhez és az érintett sejtek antioxidatív kapacitásának csökkenéséhez vezet, ami mitokondriális károsodást eredményez. A megnövekedett ROS termelés állapotában lévő sejt a NADPH oxidáción és a TrxR enzim aktiválásán keresztül igyekszik növelni a ROS közömbösítő kapacitását. A redox homeosztázis, amely szabályozza a ROS túlsúlyt, a sejtek túlélésének kritikus eleme. Számos antioxidáns molekula és kaszkád vesz részt a folyamatban, beleértve a Prdx fehérjéket is. A Prdx enzimes család tiol-függő peroxidáz enzimekből áll, amelyek központi szerepet játszanak a sejtek redox reakcióiban. A Prdx5 egy tioredoxin-peroxidáz enzim, amely nem igényel kofaktorokat, megtalálható a mitokondriumokban, peroxiszómákban, citoszolban és a sejtmagban. Fő funkciója, hogy citoprotektív antioxidánsként működjön. Mivel a ROS által kiváltott citotoxicitás a kemo- és sugárterápiák központi eleme, az antioxidáns enzimek – köztük a Prdx5 – megnövekedett szintje és aktivitása fontos szerepet játszik a rákos sejtek kemo- és radiorezisztenciájának kialakulásában. Míg a sejtválasz a sejt antioxidáns állapotától függ, a Prdx5 antioxidáns molekula kimerülése érzékennyé teheti a sejteket a kemoterápiával szemben. A korábbi tanulmányok azt mutatják, hogy a Prdx5 alacsony expressziójával rendelkező sejtek érzékenyebbek az oxidatív károsodásra és az apoptózisra. Korábbi tanulmányok szerint a csökkent Prdx5 szint a lassú tumornövekedéssel, valamint a csökkent infiltrációs és metasztázis képességgel is összefüggést mutat. Az agresszív és gyorsan növekvő daganattípusokkal, például a tüdő adenokarcinómával ellentétben egy korábbi tanulmány azt találta, hogy a Prdx5 mRNS-szintek eltérései jól használhatóak lehetnek a tüdőrák prognosztikai tényezőiként, ahol a Prdx5 alacsony szintje rossz általános túlélést jelez. A szakirodalmi adatok alátámasztják, hogy a Prdx5 eltérő szintje, más daganatspecifikus molekuláris eseményekkel összefüggésben, ideértve a különféle drivermutációkat és metabolikus változásokat, meghatározza a sejtek kezelésre adott válaszát és a daganatsejtek túlélését.

A Prdx5 szabályozása összetett, és a TSC (-/-) mutáns S102 sejtekben jelentősen emelkedett a szintje. A megemelkedett Prdx5 szintek a rapamycin és auranofin kombinációs kezeléssel csökkenthetők, megközelítve a TSC (+/+) vad típusú sejtekben detektált szintet. A Prdx5 mind a rapamycin, mind az auranofin célpontja. Mivel a Prdx5 egy fehérje, amely kommunikációt biztosít a mitokondriumok és az ER között, a HSP70 ER stresszfehérje jelentős felszabályozása az auranofin és rapamycin kombinációs kezelést követően arra utal, hogy az ER és az UPR fontos szerepet játszik a ROS által kiváltott sejthalálban. A HSP70 jól ismert szerepe, hogy megakadályozza a fehérje aggregátumok képződését fokozott intracelluláris stressz esetén. A megfelelően hajtogatott fehérjék belépnek a Golgi komplexbe, míg a hibásan

hajtogatott fehérjék az ER-ben halmozódnak fel, HSP70 chaperon molekulához kapcsolva. A nem-hajtogatott vagy hibásan hajtogatott fehérje és a HSP70 molekula komplexe beindítja az UPR által közvetített sejthalál folyamatát. A Prxd5 megvédeheti a sejteket az ilyen halálózástól, ami azt jelzi, hogy a Prdx5-nek kettős szerepe van ezekben a komplex biokémiai mechanizmusokban.

A harmadik vizsgált molekulaként, kombinációs kezelésben is alkalmazott proxison szintén csökkenti a TrxR aktivitást, fokozza a ROS termelést és csökkenti a sejtek életképességét. Az eredmények alapján a proxison hatásmechanizmusa az auranofinhoz hasonlóan a sejt antioxidáns egyensúlyának kibillentésén alapul, amely így megnövekedett oxidatív terheléshez és sejthalálhoz vezet a TSC (-/-) mutáns S102 sejtekben.

Összefoglalva, kísérleteink azt sugallják, hogy egyes TSC-mutáció által szabályozott neopláziákban érintett betegek számára előnyös lehet az auranofin és rapamycin vagy a proxison és rapamycin kombinációs terápia, amelyek potenciálisan meghosszabbíthatják a remissziót vagy lelassíthatják a betegség progresszióját, javítva a betegek életminőségét.

Az új eredmények rövid összefoglalása

1. Kísérleteink eredményei alapján karakterizálni tudtuk a TSC mutációval rendelkező AML sejtek morfológiai eltéréseit és megnövekedett proliferációs képességét. A vizsgálatok megmutatták, hogy a TSC mutációval rendelkező sejtek mitokondriumai kisebbek az egészséges kontrollnál, krisztái nem felismerhetőek, valamint a mitokondriális funkciók is sérültek. Utóbbit a mitokondriális membránpotenciál szintjének csökkenésével, valamint a prohibitin és VDAC mitokondriális fehérjék szintjében bekövetkező változások bemutatásával bizonyítottuk.
2. Számos TSC mutációval összefüggő molekuláris mechanizmust azonosítottunk, melyek az ismertetett eredmények alapján új, potenciális terápiás célpontként szolgálhatnak a TSC mutációval rendelkező betegségekben. A munkánk során jellemeztük a TSC mutációval rendelkező sejtek apoptózisban szerepet játszó fehérjéinek expressziós és foszforilációs változásait (p53 tumorsuppresszor fehérje), az A-vitamin anyagcseréjük eltéréseit (RAR β , ADH és ALDH enzimek), illetve az antioxidáns rendszerük (TrxR) érintettségét.

Irodalmi adatok alapján a rapamycin terápiás dózisének csökkentése mindenképpen kívánatos lenne az AML-ben és LAM-ban szenvedő betegek esetében. Ennek egyik oka, az általa okozott súlyos mellékhatások, melyek jelentősen rontják a betegek életminőségét, valamint azok a kedvezőtlen változások, amelyeket pl. az A-vitamin metabolizmusban vagy a sejtek antioxidáns kapacitásában figyelhetünk meg a rapamycin mono kezelést követően. Az A-vitamin metabolizmusát retinsav alkalmazásával lehet kedvezően befolyásolni, míg az antioxidáns kapacitás a TrxR enzim gátlásán keresztül szabályozható hatékonyan.

3. Eredményeink bizonyítják, hogy az A-vitamin metabolizmusának számos enzime és a nukleáris receptor RAR β is potenciális terápiás célponttá válhat TSC mutáns daganatokban. Kísérleteinkben a rapamycin szintjének csökkentésével a rapamycin ALDH-ra gyakorolt gátló hatása visszaszorítható volt, ami kiegyensúlyozottabb A-vitamin metabolizmust és RAR β aktivitás tesz lehetővé. A RAR β fokozott expressziója és aktivitása a sejtek migrációjának és proliferációjának gátlásához vezethet, ami együtt jár a beteg állapotának javulásával.
4. Eredményeink alapján az antioxidáns egyensúly kibillentése a TrxR enzim gátlásán keresztül egy lehetséges útnak bizonyult, a p53-asszociált jelátviteli útvonalak megfelelő irányba történő modulálásához. Jelenleg a TSC-mutációval rendelkező sejtek erős anti-apoptotikus mikrokörnyezetét az FDA által jóváhagyott gyógyszer, a rapamycin nem tudja teljesen leküzdeni. Vizsgálatunk azt mutatja, hogy a rapamycin alacsonyabb dózisa (10 nM) a Proxison gyógyszerjelölttel (3 μ M) kombinálva sejthalált eredményezhet. Bár további vizsgálatokra van szükség, az mTOR útvonal és a TrxR együttes gátlása potenciálisan hatékonyabb terápiát eredményezhet.
5. A kísérleteinkben mono -és kombinált kezelésben vizsgált, az FDA által jóváhagyott auranofin szintén a sejtek antioxidáns rendszerét célozza meg, azon belül is a TrxR és Prdx5 enzimeket. Az auranofin önmagában alkalmazva kevésbé tolerálható, súlyos mellékhatásokat okozó, erős citotoxikus hatást mutató gyógyszer. Kísérleteinkben

igazoltuk, hogy az auranofin rapamycinnel kombinálva szignifikánsan csökkenti a TSC mutációval rendelkező sejtek proliferációs aktivitását, és jobb tolerálhatóságot biztosít a mutációval nem rendelkező, egészséges sejtek számára. kombinációs terápiában történő újrahasonosítása a TSC-mutációkkal rendelkező daganatok kezelésére további vizsgálatokat igényel. Mivel mindkét gyógyszer immunszuppresszív hatással is rendelkezik, fokozott figyelmet igényelhet egyes rákos betegek esetében az ilyen kombinált terápia időzítése, hogy elkerüljék az egyébként alkalmazott immunterápiákkal való interferenciát.

Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni a támogatást és a türelmet mindazoknak, akik segítségével nélkül PhD dolgozatom nem készülhetett volna el. Köszönettel tartozom az iránymutatásért témavezetőmnek Prof. Dr. Pongrácz Juditnak, aki a kezdetektől fogva támogatót, kiemelkedő szakmai tudásával, tapasztalatával és hasznos javaslataival hozzásegített munkám elkészüléséhez. Köszönöm, hogy mindig fordulhattam hozzá, bárhol akadtam el és bármilyen kérdés merült fel a munka során.

Köszönöm Dr. Elhousseiny Mohamed Mahmoud Abdelwahab segítségét, aki számtalan sejtes vizsgálati módszert ismeretett meg velem. Hálás vagyok a közösen végzett munka során mutatott türelméért és javaslataitaiért, amelyek alapvetően hozzájárultak a dolgozatom, illetve a tudományos közlemények megszületéséhez. Külön köszönöm a western-blot vizsgálatok során nyújtott támogatását.

Szeretném megköszönni a támogatást Dr. Kvell Krisztiánnak és Dr Csöngői Veronikának, akik javaslataikkal és észrevételeikkel sokat segítettek a munkám során.

Kiemelt köszönettel tartozom Dr. Garai Kittinek és Dr. Bánfai Krisztinának a labormunkák és az „együttgondolkodás” során nyújtott segítségéért és inspirációért. Köszönöm a biztatást, amit tőlük kaptam. Hálás vagyok a Gyógyszerészi Biotechnológia Intézet minden munkatársának a segítségért, amelyet a mindennapi munkám során nyújtanak.

Végül, de nem utolsósorban köszönöm szüleimnek, hogy lehetővé tették, hogy tanuljak. Nagyon köszönöm Férjemnek és a gyermekeimnek a szeretetüket, és a türelmüket, amellyel a laborban töltött órákat, a cikk- és a dolgozatírás nehézségeit viselték.

Közlemények jegyzéke

A PhD DOLGOZAT ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK

- **Bovari-Biri, J;** Abdelwahab, EMM; Garai, K; Pongracz, JE: **Prdx5 in the regulation of Tuberous Sclerosis Complex mutation-induced signaling mechanisms.**

2023. Cells, Jun 24;12(13):1713. doi: 10.3390/cells12131713 (IF: 6.0) Q1

- **Bovari-Biri, J.;** Garai, K. ; Banfai, K. ; Csongei, V. ; Pongracz, J.E. **miRNAs as Predictors of Barrier Integrity**

2023. Biosensors, 13 : 4 Paper: 422 , 21 p., <https://doi.org/10.3390/bios13040422> (IF: 5,743) Q1

- Abdelwahab, EMM; **Bovari-Biri, J;** Smuk, G; Harko, T; Fillinger, J; Moldvay, J; Krymskaya, VP; Pongracz, JE: **Normalization of enzyme expression and activity regulating vitamin A metabolism increases RAR-beta expression and reduces cellular migration and proliferation in diseases caused by tuberous sclerosis gene mutations.**

2021. Frontiers in Oncology, Cell metabolism, 11:644592. doi: 10.3389/fonc.2021.644592 (IF: 5.738) Q1, D1

- Abdelwahab, EMM; **Bovari, J;** Smuk, G; Harko, T; Fillinger, J; Moldvay, J; Sarosi, V, McPhail, D; Krymskaya, VP; Pongracz, JE: **Activated p53 in the anti-apoptotic milieu of tuberous sclerosis gene mutation induced diseases leads to cell death if thioredoxin reductase is inhibited.**

2021. Apoptosis, Published online 16 Apr, doi:10.1007/s10495-021-01670-4 (IF: 5.561) Q1, D1

A dolgozat alapjául szolgáló közlemények összesített impakt faktora: 23,042.

Más közlemények:

Kardos Kinga, Told Roland, Pentek Attila, Sahai Nitin, Banfai Krisztina, Vizi Andras, Koltai Arnold, Szabo Peter, Gurdan Zsuzsanna, Bovari-Biri Judit, Pongracz Judit E., Telek Elek, Lukacs Andras, Maroti Peter
Surface disinfection change the mechanical, structural and biological properties of flexible materials used for additive manufacturing of medical devices
MATERIALS AND DESIGN 237 Paper: 112616 , 17 p. (2024) (IF: 8,4)

Vörös-Horváth B, Živković P, Bánfai K, **Bovári-Biri J**, Pongrácz JE, Bálint G, Pál Sz, Széchenyi A
Preparation and Characterization of ACE2 Receptor Inhibitor-Loaded Chitosan Hydrogels for Nasal Formulation to Reduce the Risk of COVID-19 Viral Infection
ACS omega, 2022 (IF: 4,1)

Told, Roland; Ujfalusi, Zoltan; Pentek, Attila; Kerényi, Monika; Banfai, Krisztina; Vizi, Andras; Szabo, Peter; Melegh, Szilvia; **Bovari-Biri**, Judit; Pongracz, Judit E.
A state-of-the-art guide to the sterilization of thermoplastic polymers and resin materials used in the additive manufacturing of medical devices
MATERIALS AND DESIGN 223 Paper: 111119, 17 p., 2022 (IF: 8,4)

Pénzes Á, Mahmud Abdelwahab EM, Rapp J, Péteri ZA, **Bovári-Biri J**, Fekete C, Miskei G, Kvell K, Pongrácz JE
Toxicology studies of primycin-sulphate using a three-dimensional (3D) in vitro human liver aggregate model
Toxicol Lett. 2017 Sep 12. pii: S0378-4274(17)31337-1. doi: 10.1016/j.toxlet.2017.09.005. (IF: 3,858)

Czömpöly T., Olasz K., Nyárády Z., Simon D., **Bovári J.**, Németh P.
Detailed analyses of antibodies recognizing mitochondrial antigens suggest similar or identical mechanism for production of natural antibodies and natural autoantibodies
Autoimmunity Reviews 2008, (IF: 5,591)

Kvell K, Cooper EL, Engelmann P, **Bovari J.**, Nemeth P
Blurring borders – Innate immunity with adaptive features
Clinical and Developmental Immunology, Article ID 83671, pp 1-10, 2007 (IF: 1,4)

Bovari J., Czömpöly T., Olasz K., Arnold H. H., Balogh P.
Complex oranzational defects of fibroblast architecture in spleen with Nkx2.3 homeodomain deficiency
Pathology Oncology Research, 13(3):227-35, 2007

Más közlemények impakt faktora: 31,749

Cumulative impakt faktor: 54,791

Könyvfejezetek:

Abdelwahab EMM, **Bovari-Biri J**, Smuk G, Harko T, Fillinger J, Moldvay J, Krymskaya PV, Pongracz JE

NORMALIZATION OF ENZYME EXPRESSION AND ACTIVITY REGULATING VITAMIN A METABOLISM INCREASES RAR-BETA EXPRESSION AND REDUCES CELLULAR MIGRATION AND PROLIFERATION IN DISEASES CAUSED BY TUBEROUS SCLEROSIS GENE MUTATIONS

Metabolism meets function: The multifaceted role of metabolism in cancer (Eds: Morandi A, Galluzzi L, Martini M, Montopoli M, *Frontiers in Oncology*, pp 199-210, Lausanne: Frontiers Media SA. doi: 10.3389/978-2-88976-243-9)2022

Engelmann P., Talaber G., **Bovari J.**, Czömpöly T., Kvell K., Berki T., Nemeth P. FADING FRONTIERS: THE WAY INNATE IMMUNE CELLS AND MOLECULAR COMPONENTS AFFECT ADAPTIVE IMMUNE RESPONSES *New Research on Innate Immunity*, (Eds.: M. Durand and C.V. Morel, Nova Science Publishers, pp 89-118) 2008.