

36. OTDK Biológia szekció

A redoxrendszerek hatása a sugárérzékenységre emberi sejtvonalban vizsgálva

OTDK-dolgozat

készítette:

Paller Éva

biológia alapszak, 3. évfolyam

küldő intézmény: Eötvös Loránd Tudományegyetem

kutatói intézmény: Országos Onkológiai Intézet

témavezetők:

Dr. Kocsis Zsuzsa PhD

klinikai sugárbiológus

Dr. Jurányi Zsolt MD PhD

osztályvezető főorvos

EÖTVÖS LORÁND TUDOMÁNYEGYETEM

TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR

BIOLÓGIAI INTÉZET



Budapest, 2022.

Tartalomjegyzék

Rövidítésjegyzék	3
1. Bevezetés.....	6
1.1. Sugárterápia	6
1.2. ROS és sugárrezisztencia.....	8
1.3. Sugárérzékenység kutatása	10
1.4. A ROS-t ellensúlyozó antioxidánsrendszerek és -fehérjék	12
2. Célkitűzések	17
3. Anyagok és módszerek.....	18
3.1. Sejtvonal és tenyésztési körülmények	18
3.2. Sugárrezisztens emlőkarcinóma vonal létrehozása	18
3.4. Glutation kit.....	19
3.4. Superoxid-dizmutáz kit.....	19
3.5. Flow citométeres sejtciklus fázis meghatározás (FACS)	20
3.6. Statisztika.....	20
4. Eredmények.....	21
4.1. Korábbi eredmények: klonogenitási assay és SRB	21
4.1.1. Klonogenitási assay	21
4.1.2 Szulforodamin B kolorimetriás assay	22
4.2. Glutation assay	23
4.3. Szuperoxid-dizmutáz assay	24
4.4 Flow citométeres sejtciklus fázis meghatározás	25
5. Diskusszió.....	28
6. Összefoglaló	30
7. Summary	31
8. Köszönetnyilvánítás	32
9. Szerzői hozzájárulás	33
10. Irodalomjegyzék.....	34

Rövidítésjegyzék

60Gy- HCC1954 emlőkarcinóma sugárrezisztens alvonala

AF- auranofin

BSO- butionin-szulfoximin

Ca²⁺-ionok- kalcium-ionok

CAT- kataláz / catalase

CBS- a cisztation-béta-szintáz kódoló gén

CBS- cisztation-béta-szintáz / cystathione-beta-synthase

CSE- a cisztation-gamma-liáz kódoló gén

CSE- cisztation-gamma-liáz / cystathione-gamma-lyase

DEM- dietilmalát

DMF- dimetilfumarát

DNS- deoxiribonukleinsav

ED₅₀- effektív dózis

eNOS/NOS3- endoteliális nitrogén-monoxid szintáz / endothelial nitrogen-monoxide synthase

Ex/Em- excitációs/emissziós maximumok

FACS- flow (áramlási) citométer/ fluorescence-activated cell sorting

FBS- szarvasmarha magzati vészérum / foetal bovine serum

G6DP- glükóz-6-foszfát dehidrogenáz / glucose-6-phosphate dehydrogenase

GLRX3- glutaredoxin-3 /glutharedoxin-3

Glrx3- glutaredoxin-3-at kódoló gén

GSH- glutation / glutathione

GSR- glutation-reduktáz /glutathione reductase

GSS- glutation szintetáz / glutathione synthetase

GSSG- glutation-diszulfid / glutathione disulfide

GST- glutation-S-transzferázok /glutathione-S-transferases

GSTA4- glutation-S-transzferáz A 4 / glutathione-S-transferase A 4

Gy- gray

H₂O₂- hidrogén-peroxid

H₂S- hidrogénszulfid

HepG2- hepatokarcinóma sejtvonal

HIF1- hipoxia indukálta faktor-1

HO⁻- hidroxilgyök

K562- eritroid leukémia sejtvonal

KEAP1- Kelch-szerű ECH-val asszociált fehérje / Kelch Like ECH Associated Protein 1

KEAP1- Kelch-szerű ECH-val asszociált fehérjét kódoló gén

KO- knockout

L-Glu- L-glutamin /L-glutamine

mRNS- hírvivő RNS / messenger RNA

NADPH- nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát / nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

NaHS- nátrium-hidrogénszulfid

NF-KB- nukleáris faktor-kappa B / nuclear factor-kappa B

NF-KB1- nukleáris faktor-kappa B1 / nuclear factor-kappa B1

NF-KB1- nukleáris faktor-kappa B1-et kódoló gén

no IR- besugárzás nélküli kontroll / no ionizing radiation control

NO- nitrogén-monoxid

NOS- nitrogén-monoxid szintázok / nitrogen-monoxide synthases

Nrf2- eritroid 2-vel kapcsolatos nukleáris faktor / nuclear factor-erythroid factor 2-related factor 2

Nrf2- eritroid 2-vel kapcsolatos nukleáris faktort kódoló gén

O₂⁻- szuperoxid anion

OPA- o-ftálaldehid / o-phthalaldehyde

PBS- foszfáttal pufferolt sóoldattal / phosphate buffered saline

PCA- perklórsav / perchloric acid

PDI- protein diszulfid izomeráz / protein disulfide isomerase

PDIA3/4- protein diszulfid izomeráz A3/4 / protein disulfide isomerase A3/4

PenStrep- penicillin-sztreptomycin oldat

PI- propídium-jodid / propidium-iodide

PL- piperlongumin

Prx1/2/4/6- peroxiredoxin1/2/4/6

QSOX- quiescin Q6 szulfhidril-oxidáz /quiescin Q6 sulfhydryl oxidase

QSOX1- quiescin Q6 szulfhidril-oxidáz 1 /quiescin Q6 sulfhydryl oxidase 1

Qsox1- quiescin Q6 szulfhidril-oxidáz 1-et kódoló gén

RNS- ribonukleinsav

ROS- reaktív oxigéngyök / reactive oxygen species

RPM- fordulat per perc / rotation per minute

RPMI-1640- sejtenyésztéshez használt médium

siRNS- rövid interferáló RNS / short interfering RNA

Sod1/2/3- szuperoxid-dizmutáz1/2/3-at kódoló gén

SOD1/2/3- szuperoxid-dizmutáz1/2/3 / superoxide-dismutase1/2/3

SRB- szulforodamin B assay / sulforhodamine B assay

TrR1/2/3- tioredoxin reduktáz1/2/3 / thioredoxin-reductase1/2/3

Trx1/2- tioredoxin 1/2 / thioredoxin 1/2

1. Bevezetés

1.1. Sugárterápia

A sugárterápia egy olyan terápiás eljárás, mely során meghatározott területekre ionizáló sugárzást bocsátanak. Leggyakrabban rosszindulatú daganatok esetében alkalmazzák abból a célból, hogy a ráksejteket megölje, illetve, hogy a daganat zsugorodjon. A sugárterápiát lehet definitív –azaz egyedüli– kezelésként alkalmazni egy jól lokalizálható tumor esetén, illetve adjuváns, –azaz kiegészítő– kezelésként hormonterápia, kemoterápia vagy a daganat műtéti úton való eltávolítása mellett. Az eltérő alkalmazási formák használata a daganat szövettanától, szervi kiterjedtségétől, stádiumától és a beteg általános egészségi állapotától függ. A sugárterápiát lehet továbbá kuratív –azaz gyógyító– vagy palliatív –azaz tüneteket enyhítő– céllal használni. A kuratív kezelés célja a daganatmentes állapot elérése és a teljes gyógyulás. Ezzel a céllal általában jó prognózisú betegek kapnak kezelést, akikre általánosan jellemző a jobb szövettani profil, alacsonyabb életkor és egy kisebb, jobban szervre határolt, korai stádiumú daganat, aminek kevés közeli áttéte van vagy teljesen áttétmentes. A palliatív kezelés célja az élethossz lehetőségek szerinti növelése, a tünetek és fájdalmak enyhítése, amikor a daganatmentes állapot elérése már nem reális célkitűzés. Ilyen kezelést általában a rosszabb szövettani profilú betegek kapnak, akiknek nagyobb és nehezebben behatárolható végstádiumú daganatuk és általában egy vagy több távoli áttétjük is van.

A sugárterápiát a sugárzás típusa szerint három csoportra oszthatjuk. Teleterápia esetén a beteg szervre lokalizált külső besugárzást kap, míg brachyterápia esetén a sugárzást belülről kapja meg, ilyenkor a sugárforrást a szövetek közé szúrva vagy testüregebe vezetik. A harmadik esetben a sugárforrást folyékony halmazállapotban, orálisan, injekcióként vagy infúzióként kapja a beteg, ezt radioizotóp vagy radiofarmakon terápiának hívják. Teleterápia során a beteg több irányból kapja meg a besugárzást, hátránya, hogy a sugár útjába kerülő egészséges szövetek is károsodnak, beleértve a bőrt is. Brachyterápia során a sugárzó izotópot közvetlenül a tumorba, vagy az ahhoz közeli testüregbe helyezik, így nem kell a sugárzásnak sok egészséges szöveten áthatolnia mielőtt elérje a tumort,

viszont nem alkalmazható minden lokalizációnál (pl. tüdő tumornál nem, de légcső tumornál lehet).

Radiofarmakon terápia során a daganatos szervre célzott izotópot (pl. pajzsmirigy és radiojód), illetve izotópot a célszervre specifikus molekulával vagy antigénnel kombinálva szisztémikusan kap a beteg, amit a célszerv sokkal intenzívebben –akár ezerszeres mennyiségben– vesz fel.

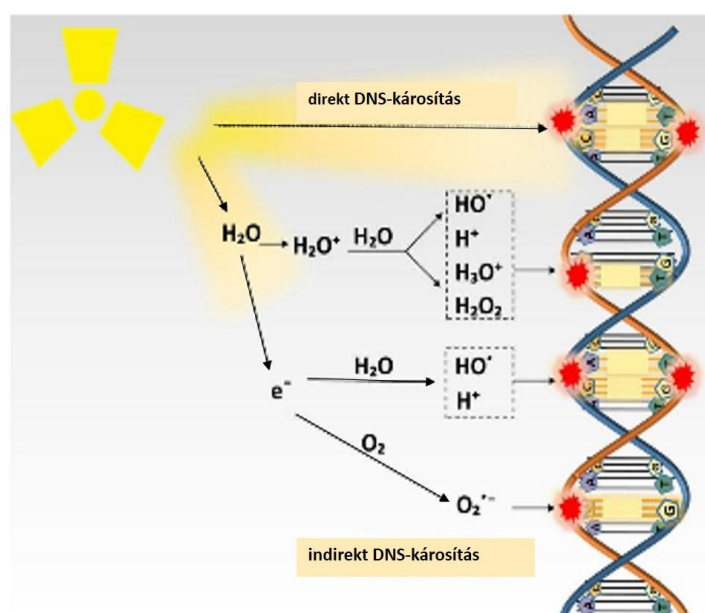
A sugárzás mennyiségét gray-ben (Gy) fejezzük ki, ami egy joule felvett energia egy kilogrammra vonatkoztatva. A leadott dózis függ a daganat stádiumától és szövettani profiljától, teleterápia esetén a dózis általában 20 Gy és 80 Gy között van, amit a beteg általában 1,5-2,5 Gy-es frakciókban kap meg. Az előbb említett ok miatt egy teljes teleterápiás kezelés akár 6-11 hétig is eltarthat napi rendszerességű kezeléssel, bár már alkalmaznak úgynevezett hipofrakcionált kezeléseket is, akár napi 12Gy-el, így a teljes kezelési idő akár 8 nap is lehet. Ezzel szemben a brachyterápiás és radiofarmakon terápiás kezeléseknél a sugárforrás bejuttatására elegendő lehet akár egy alkalom is.

A sugárterápia hatásmechanizmusa a besugárzás sejteket károsító hatásán alapszik. Amint egy sejtet sugárzás ér, annak örökítőanyaga különböző módon károsodik. Ezek közül a legfontosabb fellépő hibák a szimpla- és a duplaszálú DNS-törések. Mivel ezeket a töréseket ki kell javítani, mielőtt a sejt osztódhatna, a sejt megreked ciklusának G2-es szakaszában és stacioner növekedési fázisba lép.

A ráksejtek természetüknél fogva differenciáltságtól függően multi- vagy akár pluripotensek is lehetnek (a jól differenciált ráksejtek jobban hasonlítanak normál szöveti sejtekhez, míg a rosszul differenciáltak pluripotencia felé tendálnak). A multi- és pluripotens sejtekre jellemző a gyors osztódás és a csökkent hibajavító képesség, így egy duplaszálú DNS-törés azonnali sejthalált vagy mitotikus katasztrófát eredményezhet. Szimpla szálú DNS-törés esetében a sejt tovább osztódhat, de a genetikai hibák hamar felgyülemlelnek a gyorsan osztódó daganatsejtekben, ezért rövid időn belül ez is sejthalált vagy lassú osztódási sebességet eredményezhet. Az egészséges szöveti sejtek sokkal jobban differenciáltak, mint a ráksejtek, ezért bár lassabban osztódnak, a fejlettebb hibajavító mechanizmusuk segítségével eredményesebben képesek felépülni a káros sugárhatásokból.

Két fő sugárfajtát különböztetünk meg, a töltött részecske (ion, proton és elektron) sugárzást és a ftonsugárzást, amik a DNS-t különböző módon károsítják. A töltött részecskék relatív nagy tömegűek, a szövetben kevésbé szóródnak, és közvetlenül képesek duplaszálú DNS-törést

létrehozni. Ez a jelenség a direkt DNS-károsítás. A fotonsugárzás a sejtekben található vízből reaktív szabadgyököket –főképp reaktív oxigéngyököket (ROS)– hoz létre, amik megtámadják a DNS-t és töréseket hoznak létre benne. Mivel ehhez szükségesek a reaktív szabadgyökök, ezt indirekt DNS-károsításnak hívják. Az 1. ábrán megfigyelhető a direkt és indirekt DNS roncsolás folyamata. Azonban mivel a daganat gyakran túlnövi a vérrellátását, így oxigénhiányos – hipoxiás – környezet alakul ki. Az oxigén hiánya miatt pedig kevés ROS keletkezik, ezért az indirekt DNS-károsítás csökken. Mivel oxigénhiányos állapotban sokkal kisebb lesz a DNS-károsodás, ezért a ROS rendszer kutatása igen fontos lehet akár ennek ellensúlyozására is.



1. ábra: A direkt és indirekt DNS-károsítás hatása. A direkt DNS-károsítás képes a közvetlen DNS-törés létrehozására, míg az indirekt DNS-károsítás a vízből képzett ionok és szabadgyökök segítségével károsítja a DNS-t. Az ábra Wang H., et al, 2019 cikkéből lett átemelve.

1.2. ROS és sugárrezisztencia

A ROS a sejtkben alapesetben is megtalálható, agresszív oxigénszármazékok gyűjtőneve. Két fő csoportja van, a szabadgyökök, amiknek vannak párosítatlan vegyértékelektronjai –például szuperoxid anion ($O_2^{\cdot-}$) és hidroxilgyök ($HO^\cdot$)–, és olyan molekulák, amelyek szabadgyök képzésre képesek, például hidrogén-peroxid (H_2O_2).

A ROS egészséges sejtben az oxigén metabolizmusa során keletkezett melléktermék, illetve a terminális oxidáció során a mitokondrium termeli, és kettős szerepet lát el a szintjétől függően. A ROS alacsony, állandó szinten megtalálható normál sejtekben, ahol homeosztázis-fenntartó és másodlagos jelátviteli funkciót tölt be, továbbá elősegíti a sejtosztódást és differenciálódást, emellett az oxidatív stresszhez való alkalmazkodást. Ezzel ellentétben magas szintje indukálhat autofágiát vagy visszafordíthatatlan oxidatív stresszt, és ezáltal fehérje-, lipid- és nukleinsavkárosodást okozhat. Mivel a magas ROS-szint oxidatív károkat okoz a DNS-ben is –ezzel elősegítve a mutációt–, aktiválhat onkogéneket, genomikus instabilitást okozhat, amivel közvetlenül indukálhat karcinogenezist. Magas ROS-szintek a ROS-keletkezés növekedésével vagy a ROS-eltávolítás csökkenésével is kialakulhatnak. A ROS-keletkezés oka lehet endogén vagy exogén, például stresszfaktorokra adott válaszreakció vagy ionizáló sugárzás. A ROS eltávolításáért pedig az antioxidáns védekező rendszer felel, így ennek hibája is ROS-szint emelkedést okozhat.

Daganatsejtekre is igaz, hogy alacsony szinten a ROS sejt szaporodást okoz, hiszen vannak olyan növekedési faktor receptorok és sejtnövekedést szabályzó szignalizációs útvonalak, amelyeket reaktív oxigéngyökök aktiválnak. A nagyon magas ROS-szint a daganatsejtekben is sejthalált vagy oxidatív stresszt eredményez, de egy közepesen magas szint a fent említett módon segíti az onkogenezist. Mivel a daganatsejtekre a gyors osztódásuk miatt jellemző a gyors metabolizmus és a ROS egy metabolikus melléktermék, a ráksejtek általában magasabb ROS-stressznek vannak kitéve.

Mivel a sugárzás DNS-károsító hatásának nagyjából kétharmadát okozza ROS, a sejtek ROS-eltávolító képessége nagyban meghatározza egy tumor sugárérzékenységét. A daganatsejtek a ROS-szint kiegyensúlyozását többféle módon érhetik el: metabolikus adaptációval, antioxidánsrendszer enzimexpresszióinak és -aktivitásainak diszregulációjával és hipoxiás válaszreakcióval. A hipoxiás mikrokörnyezet jellemző a szolid tumorok esetén, ahol a nem megfelelő vérellátás intratumorális oxigén- és tápanyaghiányhoz vezet. Mivel a ROS oxigénszármazék, hipoxiás környezetben csökkent mennyiségben fordul elő, így a DNS-károsodás és az apoptózis mértéke csökken. A daganatra irányított besugárzás károsíthatja a tumort körülvevő ereket, így növelheti a hipoxiás környezet kialakulásának esélyét. A hipoxiás válaszreakció során működésbe lép a hipoxia indukálta faktor-1 (HIF1), ami felelős a tumorokra jellemző abnormális angiogeneziséért, a glikolitikus metabolizmusra való áttéréseért és az antioxidáns fehérjék emelkedett expressziójáért, amik mind a ROS alacsony szinten tartásában játszanak kulcsfontosságú szerepet (1). Mivel a ROS alacsony szinten hátráltatja az

indirekt sugárzás okozta DNS károsítást, ezt a jelenséget hipoxiás sugárrezisztenciának nevezzük.

Mivel az antioxidánsrendszer diszregulációja közvetlenül köthető a ROS alacsony szinten tartásához és ezzel a hipoxiás sugárrezisztenciához, ezért az antioxidáns fehérjék gátlása felboríthatja ezt az egyensúlyt, ezzel lehetséges megoldást jelentve a hipoxiás sugárrezisztencia által felvetett problémára. Erre a célra többfajta sugárérzékenyítő szert is kifejlesztettek. Egy ilyen szer a butionin-szulfoximin (BSO), ami a glutation-szintézist akadályozza, ami késlelteti az oxidációs folyamatokat, hiszen a glutation képes lebontani a H_2O_2 -t. A dimetilfumarát (DMF) és dietilmalát (DEM) a glutationnal kovalensen köt, így a hipoxiás környezetben emelkedett mennyiségű glutationt a kontroll értékek 10%-ára csökkentheti. Mind a BSO, DMF és DEM szinergisztikus oxigén-mimetikus sugárérzékenyítő szerekkel. A piperlongumin (PL) a glutation S-transzferáz és a tioredoxin reduktáz, míg az auranofin (AF) a tioredoxin reduktáz gátlásával borítja fel a ROS homeosztázist (2).

1.3. Sugárérzékenység kutatása

A tumor sugárérzékenységének nevezzük a besugárzásra adott válaszreakcióját, amit a regresszió mértékével és gyorsaságával, valamint az esetleges kiújulásig eltelt időtartammal lehet számszerűsíteni. A sugárérzékenységet in vivo genetikailag módosított egereken, ex vivo biopsziával nyert szövetmintákon, in vitro pedig genetikailag módosított sejtvonalakon lehet modellezni.

Az in vivo modelleknél előnyt és hátrányt is jelent, hogy a daganat tulajdonságait egy összetett rendszerben vizsgálják. Előnyeik, hogy komplex multicelluláris és élettani választ lehet rajtuk megfigyelni, így a sugárérzékenyítő szereknek nem csak a hatékonyságát, hanem a toxicitását is lehet vizsgálni. Hátrányaik, hogy az élő rendszer befolyásolhatja a daganat viselkedését, így például az immunrendszer hatása nem elkülöníthető a sugárérzékenységből adódó hatásoktól, emellett a daganatot ért pontos dózis nehezebben meghatározható. Az in vivo kísérletek etikai problémákat vetnek fel, így használatukat nemzetközileg is próbálják limitálni, továbbá felettébb anyag- és időigényesek és képzett szakemberek szükségesek a kísérlet véghezviteléhez és a modellállatok gondozásához. A genetikailag módosított állatokban jól modellezhetők az emberi betegségek, de az emberre adaptálhatóság így sem problémamentes:

a sugárérzékenyítő szerek felszívódása, eloszlása, metabolizmusa és ürülése emberben és különböző modelleken nagyban eltérhet.

Az ex vivo modellek (ebben az esetben tumor biopsziás mintavétel) előnye, hogy összetett multicelluláris választ képesek adni, továbbá jól meghatározható a daganatot ért pontos dózis, a módszer anyaghatékony és jobban modellezi az in vivo körülményeket. Hátránya, hogy általában egyszer történik mintavétel, így a tumor viselkedését idő és kezelés függvényében nem lehet feltérképezni, továbbá nagy a munkaigényük és a minta megszerzéséhez nagyon precíz és gyakorlott szakembert kell alkalmazni. A biopszia előnye, hogy a másik két módszerhez képest relatív gyorsan lehet szövetszövetmintához jutni, de hátránya, hogy egy jobban differenciált, heterogén daganatból vett minta nem reprezentatív jellegű az egész tumorra tekintve. Emellett az eredményeket itt is befolyásolhatja a betegek különbözősége, ebből fakadóan problémás lehet a mintákat egymással összehasonlítani.

Az in vitro modellek mindkét előbb említett modellnél kisebb komplexitásúak. Ez hátrányt és előnyt is jelent, hiszen például élettani hatásokat nem lehet rajtuk vizsgálni, de éppen amiatt, hogy a szervezet szerv- és immunrendszere nincs rá kihatással, a sejtekben történő változások tükrözik a besugárzás hatását. Emellett a választott sejtvonalat igény szerint lehet tárolni és sokszorozítani, hiszen az in vitro modellek fagyaszthatók, a daganatsejteknek megfelelő körülmények között végtelen az élettartamuk és viszonylag egyszerűen szaporíthatók. A sejteket ért pontos dózis könnyen meghatározható, a módszer költség- és anyaghatékonyabb mind az in vivo, mind az ex vivo modellrendszereknél, viszont az emberre adaptálhatóság kevésbé egyértelmű. Két fő sugárrezisztens sejtvonal létrehozási módszer létezik. Az egyik során a sejtet vagy az átírt antioxidánsfehérjéinek expresszióját célzottan genetikailag módosítjuk. A géntechnológiával előállított sejtvonal előnye, hogy tudjuk a génhiba pontos helyét. Ennek többféle technikája létezik: KO, knock-in valamint a knockdown. A knockout során a vizsgált organizmusokban egy gént kiütünk – ez lényegében célzott delécia – és ezután a KO-egyedek fenotípusos változását vizsgálhatjuk, ezzel szemben a knock-in esetében a vizsgált organizmus genetikai állományába egy kisebb génszekvenciát illesztünk – ez lényegében célzott inzercia –. Knockdown egyedek esetében egy vagy több gént csendesítünk, azaz azok expressziójának mértékét csökkentjük, ezt rövid interferáló RNS-sel (siRNS) végezzük, ami egy rövid duplaszálú RNS. A másik módszer a sejtvonal indukált mutációja, ami úgy készül, hogy a sejteket besugarazzák, majd a túlélő sejteket hagyják szaporodni a következő besugárzásig (kb. 30 ciklus). Munkánk során mi is ezt a módszert alkalmaztuk. Ennek előnye, hogy sokkal jobban visszaadja a természetes módon kialakuló sugárrezisztencia tulajdonságait,

viszont hátránya, hogy ezzel a módszerrel egy véletlenszerű mutáns sejtvonalat hoznak létre, ami akár minden ugyanolyan módon végzett és ugyanolyan kiindulási törzsből előállított rezisztens sejtvonallétrehozásánál különböző eredménnyel járhat.

1.4. A ROS-t ellensúlyozó antioxidánsrendszerek és -fehérjék

Mivel a ROS eltávolításáért és alacsony szinten tartásáért az antioxidáns enzimrendszerek és ezek fehérjéi felelnek, ezek gátlása ROS-szint emelkedést és ezzel sejthalált okozhat ráksejtekben (2). Ezért különösen fontos ezen rendszerek útvonalainak és fehérjéinek megismerése a hipoxiás válaszreakció ellenében is ható terápiás szerek kifejlesztéséhez.

A továbbiakban bemutatom a redoxirendszer jelentős fehérjéit, amelyek a ROS homeosztázisáért és a sugárérzékenyséért felelősek. Laborunk projektje, aminek munkám is része, ezek köré a fehérjék köré szerveződik.

A cisztation-gamma-liáz (CSE) és cisztation-béta-szintáz (CBS) az a két fő enzim, ami képes endogén hidrogén-szulfid (H_2S) szintetizálására (3). A H_2S egy gáztranszmitter, ami alacsony koncentrációban mitokondriális elektrondonor – ezáltal serkenti a mitokondrium működését és növeli a ROS-szintézist –, magas koncentrációban viszont gátolja az apoptózist és a ROS-képzést és serkenti a sejtosztódást és a metasztázisképzést, ezzel jelentős szerepet játszva a tumor túlélésében és növekedésében (4). Ennek megfelelően azt találták, hogy a CSE emelkedett mennyiségben található metasztatikus prosztata- (2) és emlőrákban (5), a CBS pedig magas szinten van jelen emlő- (6), prosztata- (7), petefészek- (8) és vastagbélrákban (9). Továbbá a CSE/CBS knockdown hepatokarcinóma (HepG2) sejtvonalon csökkent inváziós képesség és emelkedett sugárérzékenység volt megfigyelhető (10). Ezentúl Chang máj eredetű sejtvonalon kimutatták, hogy a H_2S /CSE útvonal fontos szerepet játszik a káros sugárhatás elleni védelemben és a DNS-károsodás megelőzésében. CSE gátolt sejtekben besugárzás után jelentősen alacsonyabb volt a túlélés és nagyobb volt a DNS-károsodás mértéke, mint a kezetlen kontrollban, valamint NaHS – H_2S donor – hozzáadásával tovább csökkent a DNS-károsodás mértéke és nőtt a sejtek túlélése (11).

Az endotheliális nitrogén-monoxid szintáz (eNOS vagy NOS3) a nitrogén-monoxid szintázok (NOS) közé tartozik, ami egy olyan enzimsalád, aminek a fő feladata a nitrogén-monoxid (NO) képzése. A NOS3 homeosztatikus körülmények között inaktív állapotban található a

sejtben, de Ca^{2+} -ionok beáramlásának hatására –amit többek között besugárzás is okozhat (12)– aktiválódhat (13). Például laphámrákos egérmodellben megfigyelhető volt, hogy a besugárzás után –az eNOS aktiválásán keresztül– megnőtt a tumor NO szintje, ami a hipoxia csökkenést és sugárérzékenységet okozott. Következésképpen az eNOS fontos szerepet játszik a hipoxiás környezet reoxigenációjában és az első besugárzás után szuszeptibilisebbé teszi a tumort a következő frakciók által okozott károokra (14).

A tioredoxin antioxidánsrendszer három fő komponensből áll: tioredoxinok (Trx), tioredoxin reduktázok (TrxR) és a nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát (NADPH) (15). A rendszer általános működése a következőképpen írható le: A Trx célfehérjét vagy ROS-t redukál, majd a Trx ezúton oxidált aktív helyét a TrxR fogja a NADPH által szállított protonokkal újra redukálni (16). A Trx-nek elhelyezkedése alapján két altípusa van, a főképp citoszolikus (Trx1) és a mitokondriális tioredoxin (Trx2) és egy herére specifikus (TrxR3). A Trx1 közvetlenül szabályozza különböző antioxidánsfehérjék aktivitását, emellett szerepet játszik a ROS redukciójában és a pro-apoptotikus fehérjék gátlásában. Magas endogén NO jelenlétében a sejtmagba migrál, ahol segíti a nitrozatív stressz ellenében való túlélést (15), illetve növeli a DNS transzkripció faktorok kapacitását. A Trx2 szintén pro-apoptotikus fehérjéket gátol, emellett gátolja a mitokondriális ROS-képzést és elősegíti a véréreképződést (17).

Emberi melanóma sejtvonalban a TrxR-ek gátlása elősegítette az apoptózist sugárhatás után, illetve mivel csökkentette a TrxR-ek besugárzás utáni aktivitását, megoldást nyújthat a besugárzás indukálta sugárrezisztenciára (18). Továbbá egérmodellek tüdő- és májrákjában megfigyelték, hogy a TrxR-ek gátlása ROS-dependens apoptózist indukált (19).

A peroxiredoxinok (Prx) egy olyan antioxidánsfehérje-család tagjai, ami a Trx/TrxR/NADPH rendszer segítségével H_2O_2 -t redukál, ezzel csökkentve a ROS-stresszt. A magas Prx szint megfigyelhető volt és rossz prognózissal járt tüdő-, emlő-, prosztatá-, gyomor- (20), valamint fejnyakrák esetén (21). Egér tüdő-tumor modellekben az emelkedett Prx-1-szint szintén csökkentette a teljes túlélést és rosszabb klinikai eredményekkel járt, valamint a sugárterápia alatt indukált Prx-1 a sugárzás után még 24 órával is emelkedett koncentrációban volt jelen a tumorban, így feltételezhető, hogy a radiorezisztencia egyik okozója lehet (22). Emberi fejnyakrák vonalban a Prx-2 túlexpresszió védte a sejtvonalat a sugárzás sejtkárosító hatásaitól. Ugyanebben a sejtvonalban a Prx-2 gátlása apoptózist stimulált és sugárérzékenyítőként viselkedett (21). A Prx-4 nagy mennyiségben volt megfigyelhető egy tüdőrák sejtvonalban, ahol ráksejtszaporodást, tumornövekedést és metasztatikus hajlamot eredményezett. A Prx-6 szintén nagy mennyiségben található tüdőrák sejtvonalban, ahol sejtciklus-szabályozó fehérjék

expresszióját növeli, valamint közvetetten elősegíti a tumorsejtek növekedését és viabilitását (22).

A nukleáris faktor-kappa B (NF-KB) egy öt fehérjéből álló fehérjedimer-család. Ezek a dimerek nyugalomban lévő sejtekben nem aktívak, de különféle környezeti stresszfaktorok, mint például a szabadgyökök vagy a besugárzás aktiválhatja őket. Az aktív NF-KB indukálhat génexpressziót, ami kemo- és sugárrezisztenciában, valamint fokozott sejtszaporodásban, inváziós és metasztatikus viselkedésben és anti-apoptotikus tulajdonságokban nyilvánul meg (23). Ennek megfelelően orrgarat-daganat esetében megfigyelhető volt a NF-KB útvonal aktiválódása és rosszabb prognózishoz vezetett, míg NF-KB knockdown sejtvonalakban sugárérzékenységet állapítottak meg (24). Továbbá, egy nukleáris faktor-kappa B1 (NF-KB1) mutáns sejtvonalban besugárzás után csökkent tumorszuppresszív funkciók és sugárrezisztencia volt megfigyelhető. Emellett *NF-KB1* knockdown sejtvonalban besugárzás előtt gyorsabb sejtosztódás, kolóniaképzés és sejtmigráció lépett fel, míg a *NF-KB1* túlexpresszált vonalban a felsoroltak ellentétét lehetett megfigyelni (25). Bár emberi daganatokban ritka a NF-KB1 mutáció, a NF-KB1 alacsonyabb expressziója mellett jelentősen magasabb a tumorkialakulás kockázata, ami azt mutatja, hogy a NF-KB1 expressziója haploelégtelen jellegű (26).

Az eritroid 2-vel kapcsolatos nukleáris faktor (Nrf2) és a Kelch-szerű ECH-val asszociált fehérje (KEAP1) – a Nrf2 represszorfehérjéje – együtt alkotja a Nrf2/KEAP1 komplexet. A KEAP1 egy homodimer fehérje, ami a Nrf2 negatív regulátora, azaz a faktor kötésében és ubiquitinálásában játszik szerepet. A Nrf2 egy antioxidáns transzkripció faktor, ami számos sejtvédő gén aktiválásáért felelős. Oxidatív stressz hatására a Nrf2 konformációs változáson megy keresztül, leválik a KEAP1-ről és a sejtmagba transzlokálódik, ahol megkezdődik a sejtvédő gének aktiválása, ezáltal szabályozva a sejtben jelen lévő antioxidáns- és detoxifikáló enzimek mennyiségét. Így homeosztatikus körülmények között az Nrf2 véd a karcinogén vegyületek hatásaitól és megelőzi a karcino- és mutagenezist (27). *KEAP1* vagy *Nrf2* mutáció esetén a Nrf2/KEAP1 rendszer nem képes szabályozni az Nrf2-t, ami ez által felgyülemlik a ráksejtben, ezáltal védve azt a sugár- és kemoterápia sejtkárosító oxidatív hatásai ellen (28). Onkogén mutációk miatt fellépő emelkedett Nrf2-transzkripció sejtszaporodást és tumorigenezist eredményezett in vivo egérmodellekben és emberi hasnyálmirigyrákban is (29), emellett a magas Nrf2-szint hozzájárulhat a hipoxiás mikrokörnyezet kialakulásához és indukálhat angienezist (30).

A szuperoxid dizmutázok (SOD) a O_2^- saját magával történő reakcióját katalizálják, ami O_2^- -ből H_2O_2 -t és O_2 -t eredményez. A O_2^- nem erős oxidálószer, de közvetetten nagyobb károsodást

és toxicitást tud okozni, mint a H_2O_2 . Kompartmentalizációjuk alapján emlősejtekben három SOD-típus van: a sejtplazmában SOD1, a mitokondriális mátrixban SOD2 és az extracelluláris térben SOD3. K562 (erythroid leukémia) sejtvonalban a SOD-dal inkubált tenyészet hamarabb felépült besugárzás után valamint már a sugárzás utáni első órában szignifikánsan emelkedett a kataláz, glutation-peroxidáz és SOD koncentrációja, ezzel védve az azonnali káros sugárhatás ellen (31). *Sod1* KO egérben komoly oxidatív károsodásokat és rövid élettartamot figyeltek meg, a *Sod2* KO pedig letális. *Sod3* KO egérben a tüdő és véredények károsodása volt megfigyelhető magasabb oxigénnyomás alatt (32). Továbbá emberi emlőadenokarcinóma sejtvonalakban vizsgálva megfigyelték, hogy a SOD2 steady-state szintje magasabb sugárrezisztens sejtekben, mint a sugárérzékeny vonalakban (33). Emellett nyelőcsőrákos betegekből vett mintákban a SOD2 a kemorezisztanciát is befolyásolta, és a SOD2 siRNS transzfekciójával ciszplatin-érzékenység volt megfigyelhető (34).

A kataláz (CAT) egy olyan endogén antioxidáns enzim, ami a H_2O_2 vízzé és oxigénné alakulását katalizálja, ezzel védve a szöveteket az oxidatív stresszel szemben. Egérmodellben hozzáadott exogén CAT gátolta a sugárzás indukálta apoptózist és megvédte a sejtvonal telepképzési képességét. Emellett gátolta a sugárhatásra bekövetkező ROS-képzést és védte a sejtvonalakat a kettős szálú DNS-töréssel szemben (35). Továbbá, mitokondriálisan célzott CAT knock-in egerek esetében a CAT megvédte az egerek tüdejét a káros sugárhatásoktól (36).

A glutation (GSH) az egyik legfontosabb antioxidánsfehérje; két fő formája van: a redukált forma (GSH) és az oxidált forma (GSSG). Ezeknek a homeosztázisa azért fontos, mert a redukált forma magas szinten sejtgyógyulást, kemo- és sugárrezisztenciát okoz, ezzel ellentétben az alacsony GSH-szintű rák sejtvonalak sokkal érzékenyebbek voltak besugárzásra (37). Ezt az egyensúlyt többek között a glutation-reduktáz (GSR), a glutation szintetáz (GSS) és a glutation-S-transzferázok (GSTk) tartják fent (38). Ennek megfelelően egy GSS génkészlet-dúsított *E. coli* törzsben nagyobb rezisztencia volt megfigyelhető a letális sugárhatásokkal szemben, mint a vad törzsben (39). Továbbá, melanómás egérmodellekben a GSR gátlása gyengébb metasztatikus, migrációs és inváziós tulajdonságokat eredményezett (40). A glutation-S-transzferáz A 4 (GSTA4) szintén közrejátszik az előbb említett tulajdonságokban, emellett serkentette a sejtgyógyulás mértékét orrgarat-, emlő- és májrák esetében (41). A glutaredoxin-3 (GLRX3) főleg az oxidatív stresszre válaszoló szignalizációs útvonalak felé továbbítja ROS stressz-jeleket. Túlexpressziója megfigyelhető volt többek között hepatocelluláris karcinómában, tüdő- és emlőrákban, míg *Glrx3* knockdown emberi

emlőráksejtekben csökkent NF-KB aktivitás volt megfigyelhető, ezzel lassítva a sejtszaporodást, inváziót és a rákos sejtek túlélését (42).

A quiescin Q6 szulfhidril-oxidáz (QSOX) egy olyan enzimesalád, ami fehérje folding közben O_2 -t redukál H_2O_2 -dá (43) és ezekben a fehérjékben diszulfid-kötéseket generál. Mivel a tumornak kedvező mikrokörnyezet kialakulásához szükségesek az extracelluláris mátrixban található diszulfid-kötések, a QSOX fontos szerepet tölthet be a tumorigenezisben (44). A QSOX1 emelkedett mennyiségben található meg orrgarat- (45), emlő-, hasnyálmirigy- és prosztatatarákban (43). QSOX1 gátlása mellett egér xenograftokban a tumornövekedés, a metasztázisképzés és az invázió mind csökkent mértékben fordult elő (44). Ezzel szemben orrgaratrákban a magas QSOX1-szint sugárérzékenységet eredményezett, míg csendesített *Qsox1* mellett nőtt a sugárrezisztencia mértéke. Ez feltehetőleg a fehérjefolding közben termelt H_2O_2 hatása, ami a tumor mikrokörnyezetét oxidatívvá teszi, így a tumort nagy ROS-stressznek teszi ki (45).

A protein diszulfid izomerázok (PDI) elsődlegesen az endoplazmatikus retikulumban találhatók és az oxidatív fehérjefolding a fő funkciójuk. Mindemellett egyre több bizonyíték van arra, hogy több betegség - többek közt a rák - kialakulásában és progressziójában is részt vesznek. A PDI magas expresszióban volt megtalálható többféle tumorban, így például a központi idegrendszer, limfóma, vese-, emlő-, gyomor-, petefészek- és prosztatatarákban és az utolsóban szignifikánsan korrelált a súlyosságával. A PDI-knek szintén szerepük van a kemorezisztencia kialakulásában, az alacsony PDI szint glioblasztóma és emlőrákban is jobb prognózist eredményezett (46). A PDI fehérjecsalád egyik tagja, a PDIA4 prosztatatarákban az apoptózis negatív regulátora és kemorezisztenciát alakít ki (47), emellett emlőrákban ROS-szintézist indukál és szabályozza a GSH-szintet (48). A család egy másik tagja, a PDIA3 akut mieloid leukémiában magas szinten sejtszaporodást, migrációt és inváziót eredményezett (49).

A glükóz-6-foszfát dehidrogenáz (G6DP) egy sejten belüli anabolikus folyamatokat és redox homeosztázist befolyásoló enzim. Túlexpresszióját megfigyelték melanóma, leukémia, vastagbél- (50), nyelőcső- (51) és tüdőrák esetében is (52), ahol progressziót, inváziót és migrációt eredményezett. Ennek megfelelően nyugalmi állapotban lévő fejnyci laphámráksejtekben megfigyelték, hogy a G6DP gátlása vagy expressziójának csökkentése sugárérzékenyítő hatással volt a sejtvonalra (53).

2. Célkitűzések

Kutatásunk célja különböző antioxidánsfehérjék mérése és összehasonlítása vad (WT) és sugárrezisztens (60Gy) sejtvonalban, e dolgozat keretein belül a GSH és SOD fehérjék vizsgálatára kerül sor. Célunk volt továbbá a sejtek besugárzás utáni sejtciklus-fázisbeli elhelyezkedésének vizsgálata flow citométerrel (FACS).

A glutation vizsgálata során a teljes GSH szintet fogjuk összehasonlítani a besugárzás utáni 1., 2., 4., 6. és 8. órában, célunk, hogy vizsgáljuk, észlelhető-e különbség a WT és 60Gy sejtvonal GSH-szintje között.

A SOD vizsgálata során célunk a O_2^- ROS szintek összehasonlítása vad és sugárrezisztens sejtvonalban a besugárzástól eltelt idő függvényében, valamint annak meghatározása, hogy a SOD fehérjék játszanak-e szerepet a sugárrezisztencia kialakulásában.

A FACS analízis során célunk, hogy meghatározzuk a WT és 60Gy vonalban besugárzás után a sejtek a sejtciklus-stádiumának százalékos arányát, és ez alapján következtetéseket vonhassunk le a sejtvonalak oxidatív stressz alatt megfigyelhető sejtciklus ellenőrző pont aktivitásáról és DNS hibajavító képességeiről.

3. Anyagok és módszerek

3.1. Sejtvonal és tenyésztési körülmények

A kísérletekhez emberi emlőkarcinóma (HCC1954) sejtvonalat és sugárrezisztens alvonalát használtunk, amit komplettált RPMI-1640 Medium (Gibco) tenyésztőmediumban növesztettünk. A komplettálás során a végtérfogat 10%-ával megegyező mennyiségű szarvasmarha magzati vészérumot (FBS, Gibco), majd század térfogatnyi 10000 egység/mL penicillin és 10000 µg/mL sztreptomycin keverékét (PenStrep, Gibco) és ugyanennyi 200 mM-os L-Glutamint (L-Glu) adtunk a törzsoldathoz. A sejteket Thermo Fisher Scientific Nunclon flaskákban növesztettük, amiket 37°C-os, 95% párasított levegő és 5% CO₂ tartalommal rendelkező termosztátban tároltunk.

Mivel ennek a sejtvonalnak a kétszereződési ideje ~45 óra, 2-3 naponta passzálni kellett őket, hogy a sejtkultúra növekedése ne lépjen stacioner fázisba. A passzálás menete során a sejteken lévő komplettált tápot leszívjuk, majd átmoszuk vele a flaskát, hogy a halott sejteket eltávolítsuk. Ezután még egy mosási lépés jön, ahol foszfáttal pufferolt sóoldattal (PBS) mossuk át a flaskát háromszor, majd a sejteket tripszines emésztés segítségével visszük szuszpenzióba. Tápban szuszpendáljuk a sejteket, majd lecentrifugáljuk és a felülúszó leszívása és a sejtek tápban való szuszpendálása után új flaskába tesszük ki őket és kiegészítjük komplettált táppal.

3.2. Sugárrezisztens emlőkarcinóma vonal létrehozása

A fent említett sugárrezisztens emlőkarcinóma vonalat (60Gy) a kutatócsoportunk már korábban létrehozta a vad típusú szülői vonalból. A tenyésztésre összesen 60 Gy sugárzást adtak le, 2 Gy frakciódózissal. A sugárzás alatt a sejtek PBS-sel feltöltött flaskában 60%-os konfluenciaszinten voltak, a frakciódózist 6 MV gyorsítóenergia és 500 monitorunit/perc (a dózisteljesítmény beállítható mértékegysége, kb. 5Gy/perc) beállítás mellett adták le. Ezután a sejteken tápcsere történt, majd miután 90%-os konfluenciaszintre növekedetek, a sejteket passzálták és új flaskákba helyezték, majd miután elérték a 60%-os konfluenciaszintet, megint besugarazták. Ezt a folyamatot 30-szor ismételték meg.

3.4. Glutation kit

A mérésekhez BioVision Glutathione Fluorometric Assay Kit-et használtunk.

A mérés előtt a kontrollok kivételével a mintákat a fent leírt beállítások mellett 2 Gy-vel besugarazzuk. A sejtenyésző flakából eltávolítjuk a tápoldatot, majd 7 mL PBS-sel mossuk. Ezután eltávolítjuk az összes folyadékot, majd 300 uL PBS-t pipetázunk bele és sejtkaparóval lekaparjuk a sejteket, majd Eppendorf csőben azonnal jégre tesszük. A sejteket Countess 3 (Invitrogen Countess 3 FL Automated Cell Counter) sejtszámolóval számoljuk meg, majd $3 \cdot 10^6$ db sejtet kimérünk és 5 percig 4°C-on 1000 forgás per percen (RPM) lecentrifugáljuk. A felülszót leszívjuk, majd a pelletre 100 uL assay puffert mérünk, majd szuszpendáljuk. Ezután Bransen 250 Sonifier szonikátorral szonikáljuk az oldatot, amiből majd 60 uL-t mérünk egy 20 uL perklórsavat (PCA) tartalmazó Eppendorfba, amit ezután 2 percig 4°C-on 13000 RPM-en centrifugálunk. A felülszót leszívjuk, feliratozott Eppendorfba tesszük és -80°C-on tároljuk.

A fluorimetriás méréshez a mintákból 10 uL-t (előzetes mérések alapján) egy fekete 96-lyukú plate-be oltunk, ezután assay pufferrel kiegészítjük 90 uL-re, majd 10 uL redukáló ágenszt mérünk rá és szuszpendáljuk. 10 percet inkubálni hagyjuk, majd 10 uL o-ftálaldehid (OPA) probe oldatot mérünk rá és 40 percig inkubáljuk. Egy fluoreszcens plate olvasóval (Tecan 20M) Ex/Em=340/420-as beállítással lemérjük a fluoreszcencia értékeket.

3.4. Superoxid-dizmutáz kit

A mérésekhez Enzo ROS-ID® Superoxide Detection Kit-et használtunk.

A sejteket passzáljuk, és ennek során a sejtek számát a szuszpenzióba vitelük után meghatározzuk. A sejteket Countess 3 (Invitrogen Countess 3 FL Automated Cell Counter) sejtszámolóval számoljuk meg, majd a vad típusból (WT) 6650, a 60Gy alvonalból pedig 6832 darabot mérünk ki három fekete és egy fehér 96-lyukú plate-re a mérés előtti napon és 100 uL tápot mérünk rá. A mérés napján ~70%-os konfluenciaszinten kell mindkét vonalnak lennie, ezután a fent leírt beállítások mellett a kontrollok kivételével a mintákat 2 Gy-vel besugarazzuk.

A felülúszót eltávolítjuk, ezután a kitben található pufferrel óvatosan mosást hajtunk végre, majd 100 uL szuperoxid detektáló oldatot mérünk a sejtekre. A sejteket ezután 60 percig 37 °C fokon, sötétben inkubáljuk. A negatív kontroll mintákra a mérés előtt 30 perccel ROS gátlót, a pozitív kontroll mintákra a mérés előtt ROS indukátort mérünk. Egy fluoreszcens plate olvasóval Ex/Em=488/520-as és Ex/Em=550/610-es beállítással lemérjük a plate-eket.

3.5. Flow citométeres sejtciklus fázis meghatározás (FACS)

A mérés előtt a kontrollok kivételével a mintákat a fent leírt beállítások mellett 2 Gy-vel besugarazzuk. A sejttenyésztő flaskából eltávolítjuk a tápoldatot, majd 3 mL PBS-sel mossuk. A sejteket tripszines emésztés segítségével visszük szuszpenzióba, sejttenyésztő flaskánként 1,5 uL tripszint használunk és 6 percig hagyjuk állni. Ezután 3 mL tápot mérünk rá, majd 1000 RPM-en 5 percig centrifugáljuk. A felülúszó eltávolítása után 3 mL PBS-ben szuszpendáljuk, majd 1000 RPM-en ismét 5 percig centrifugáljuk. Ezután a felülúszót megint eltávolítjuk, majd a mintákra 3 mL 75%-os etanolt mérünk és -20°C-on tároljuk.

A méréshez a mintákat lecentrifugáljuk 1500 RPM-en 5 percig, majd 1 mL festéket mérünk rájuk. A festéket mintánként 1 mL PBS-ből, 40 uL propium-jodidból (PI) (SigmaAldrich) és 1 uL RNáz A-ból (Qiagen) keverjük ki. A mintákat szűrős kupakos FACS csövön szűrjük át, majd flow citométeren mintánként 10000 eseménnyel lemérjük.

3.6. Statisztika

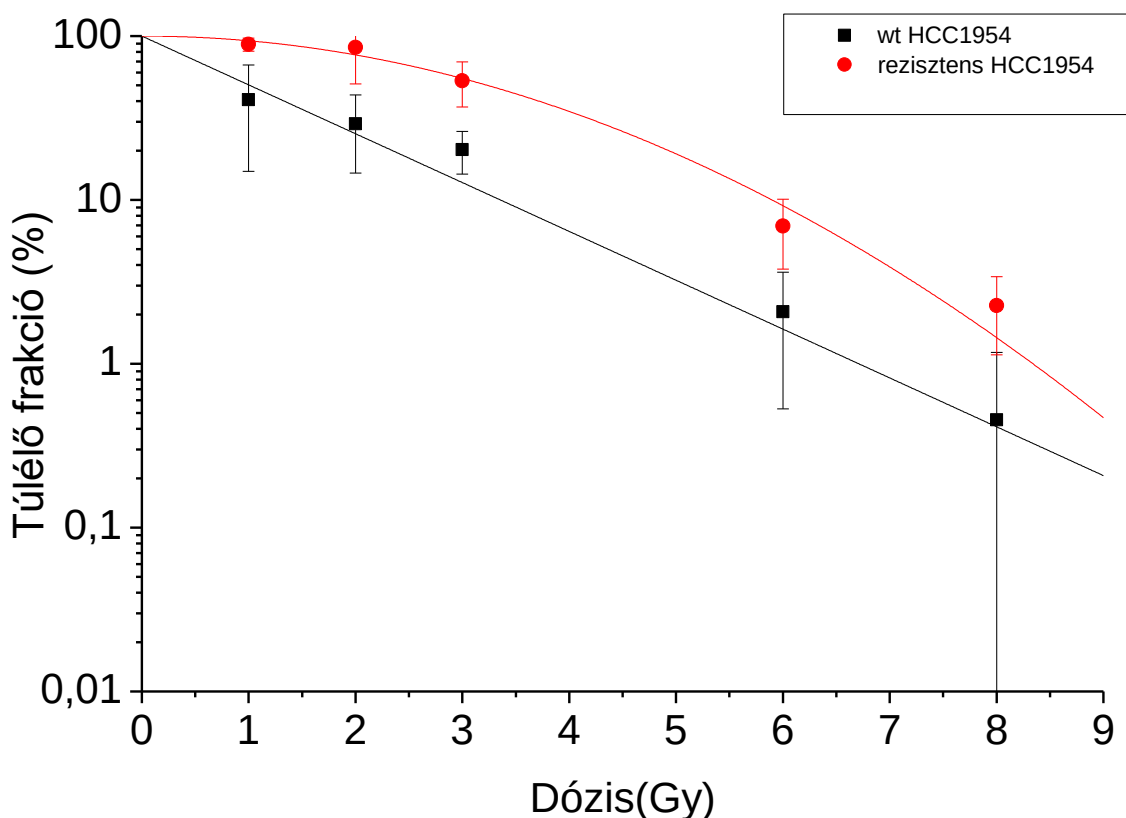
Méréseinkben a kontrollcsoport és a vizsgált csoport összehasonlítására Mann-Whitney non-parametrikus t-tesztet használtunk, mert nem volt feltételezhető normális eloszlás. A p szignifikancia érték minden esetben 0.05. A klonogenitási és az SRB tesztekben 3 párhuzamos mérést átlagoltunk, az ábrákon SD-t tüntettünk fel. A SOD és a GSH esetén egy mérésen belüli három párhuzamos van átlagolva, az oszlopdiagrammokon SD-t tüntettünk fel. A felhasznált programok: Origin Pro 8.5, GraphPad Prism 8, Microsoft Excel.

4. Eredmények

4.1. Korábbi eredmények: klonogenitási assay és SRB

4.1.1. Klonogenitási assay

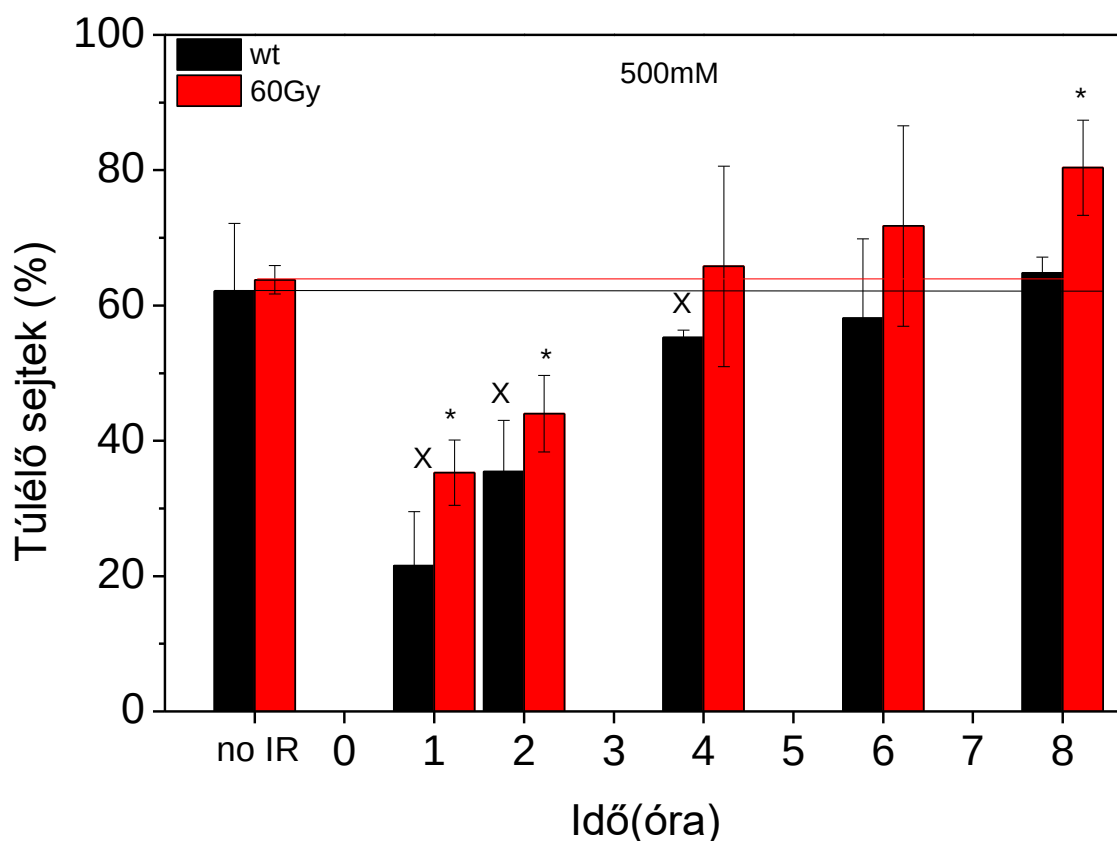
A kutatócsoportunk egy sugárrezisztens emlőkarcinóma alvonal létrehozását kísérte meg ismételt besugárzással és a túlélő sejtek tenyésztésével. Ezen az alvonalon klonogenitási assay-val bebizonyították, hogy a sugárzás indukálta mutáció hatására valóban sugárrezisztens lett (2. ábra). A medián effektív dózis (ED_{50}) a két vonalban jelentősen eltért: a WT vonalban 1,6 Gy sugárzás elég volt a sejtek felének elpusztulásához, a 60Gy vonalban azonban ugyanehhez a hatáshoz 3,7 Gy volt szükséges. Az továbbá megfigyeltük, hogy 1 Gy sugárzás hatására a WT sejtek 59,2%-a ($\pm 25,8$) elpusztult, míg a 60Gy esetében csupán a 11,1%-a ($\pm 8,2$), tehát szignifikánsan kevesebb sejt halálát okozta ugyanaz a dózis.



2. ábra: A klonogenitási assay eredményei. Az x tengelyen a leadott sugárdózis látható Gy-ben, az y tengelyen pedig az összes sejt túlélő frakciója százalékban mérve. A vörös szín a 60Gy, a fekete pedig a WT sejtvonalat jelöli. Az ábrán megfigyelhető, hogy a 60Gy vonalban nagyobb mértékben található életképes sejt, mint a WT vonalban.

4.1.2 Szulforodamin B kolorimetriás assay

Következő lépésként szulforodamin B (SRB) kolorimetriás assay használatával az oxidatív stresszre adott választ vizsgálták, mely során besugárzás után 500 mM H₂O₂ hozzáadásával érték el oxidációs stresszt. A mérés során megállapították, hogy a 60Gy sejtvonal a sugárzástól eltelt 4. órában már ugyanolyan oxidációs stressztűrő-képességgel rendelkezik, mint besugárzás nélküli (no IR) kontroll, ezzel ellentétben a WT sejtvonalnak az oxidációs stressztűrő-képesség helyreállításához ennél több időre, 6-8 órára van szüksége (3. ábra).



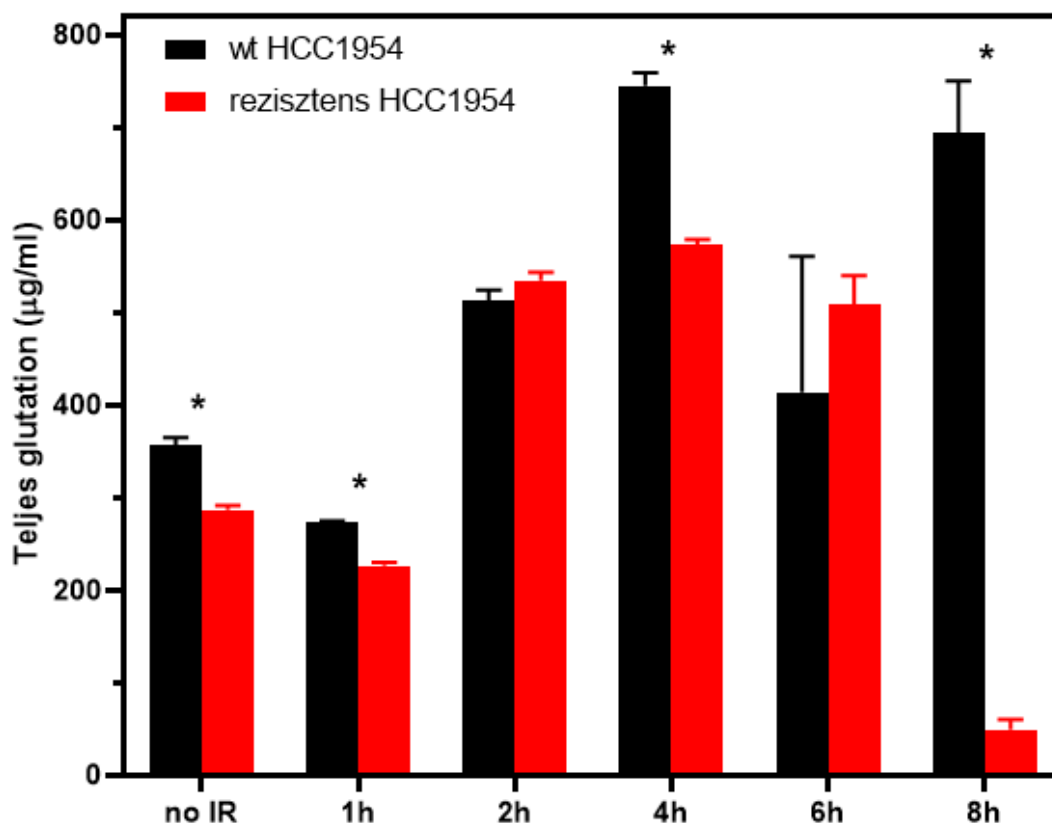
3. ábra: A SRB assay eredménye (az error bar-ok a SD-t jelölik, az X-ek a WT esetén a szignifikáns különbséget jelölik a besugározatlan kontrollhoz képest, a csillagok ugyanezt a 60GY vonal esetében). Eredményeink alapján elmondható, hogy a 60Gy vonalnak a sugárzástól eltelt 4. órában már nem figyelhető meg szignifikáns különbség a túlélésben (oxidációs stressz tűrésben) a be nem sugározott kontrollhoz képest, míg a WT vonalban a különbség később, a 6–8. órában szűnik meg.

4.2. Glutation assay

A glutation mérésnél a sejtek teljes glutation mennyiségét (redukált és oxidált forma is, $\mu\text{g/ml}$) vizsgáltuk sugárzás után mindkét vonalban. Kontrollnak mindkét vonalból a sugárzást nem kapott mintákat használtuk. Ezt a mérést egyszer végeztük el, ezért további mérések szükségesek ebben a témában a pontos kép felmérése érdekében.

A mérési eredmények mutatják, hogy a besugárzás utáni 1. órában szignifikánsan alacsonyabb a teljes GSH szint mindkét vonalban, majd ezt követően kezd el nőni. A besugárzás után a 4. és a 8. órában mutatkozik szignifikáns különbség a 60Gy és a WT vonal GSH szintje között (4. ábra).

A 60Gy vonalban általánosan alacsonyabb a GSH szintje. Ebben a vonalban a besugárzás utáni 1. órában szignifikánsan alacsonyabb volt a teljes GSH szintje, de a 2. órától fogva jelentősen megnőtt és nagyjából konstans szintet mutatott a 8. óráig. A 4. órában észleltük a legjelentősebb különbséget a WT és a 60 GY GSH szintje között (úgy gondoljuk, hogy a 8 óránál mért 60GY-es érték mérési hiba). A WT vonal GSH-szintje szintén a fent említett tendenciát mutatja, de a sugárzás után eltelt 2. óra után a GSH szintje ingadozik, továbbá a WT vonalra általánosan jellemző a magasabb GSH-szint.

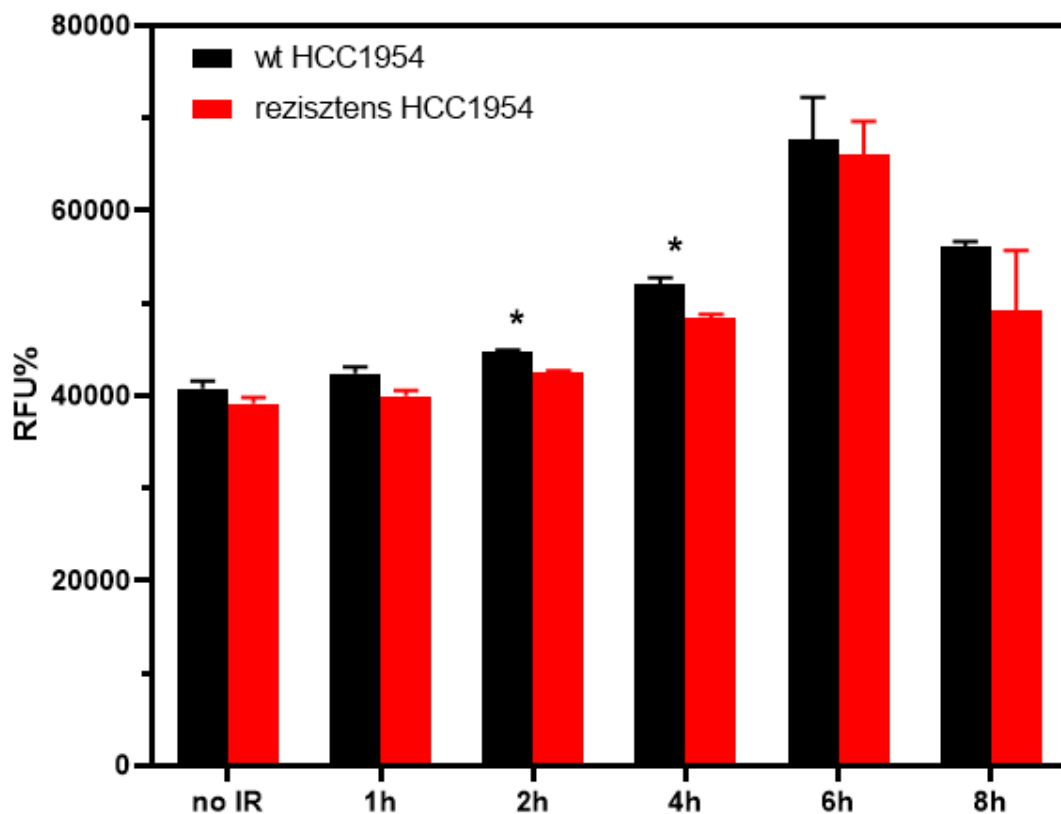


4. ábra: A GSH szintjének változása no IR kontroll és sugárzás utáni eltelt idő függvényében WT és 60GY sejtvonalak estében (az error bar-ok a SD-t jelölik). A sugárzás után eltelt 1. órában jelentősen csökkent a teljes GSH szint, majd ezt követően mindkét vonal GSH szintje nőni kezdett. A sugárzás utáni 4. órában észleltük a legnagyobb mértékű különbséget a WT és a 60Gy vonalak között.

4.3. Szuperoxid-dizmutáz assay

A mérés során a O_2^- ROS mennyiségét vizsgáltuk sugárzás után mindkét sejtvonalban.

A O_2^- ROS mennyisége sugárzás hatására megemelkedett, majd a SOD rendszer fehérjéinek hatása miatt csökkenni kezdett. Azonban a besugárzást követő nyolc óránál még nem tapasztaltuk a besugarazatlan sejtek szintjére való visszatérést. A vad törzsben nagyobb O_2^- mennyiséget figyeltünk meg az egész mérés alatt, mint a rezisztens törzsben, ez a különbség a sugárzás után eltelt 2. és 4. órában szignifikáns (5. ábra). Ennek oka valószínűsíthetően az, hogy a sugárrezisztens sejtvonalban hatékonyabbak a ROS-eltávolító mechanizmusok, és ezzel hozzájárulnak a sugárrezisztencia kialakulásához.



5. ábra: A relatív fluoreszcens egység (RFU) változása no IR kontroll és sugárzás utáni eltelt idő függvényében WT és 60GY sejtvonalak estében (az error bar-ok a SD-t jelölik). A szuperoxid species mennyiségét reprezentáló relatív fluoreszcencia a besugárzás után nő, majd a SOD enzimaktivitásnak köszönhetően csökkenésbe kezd.

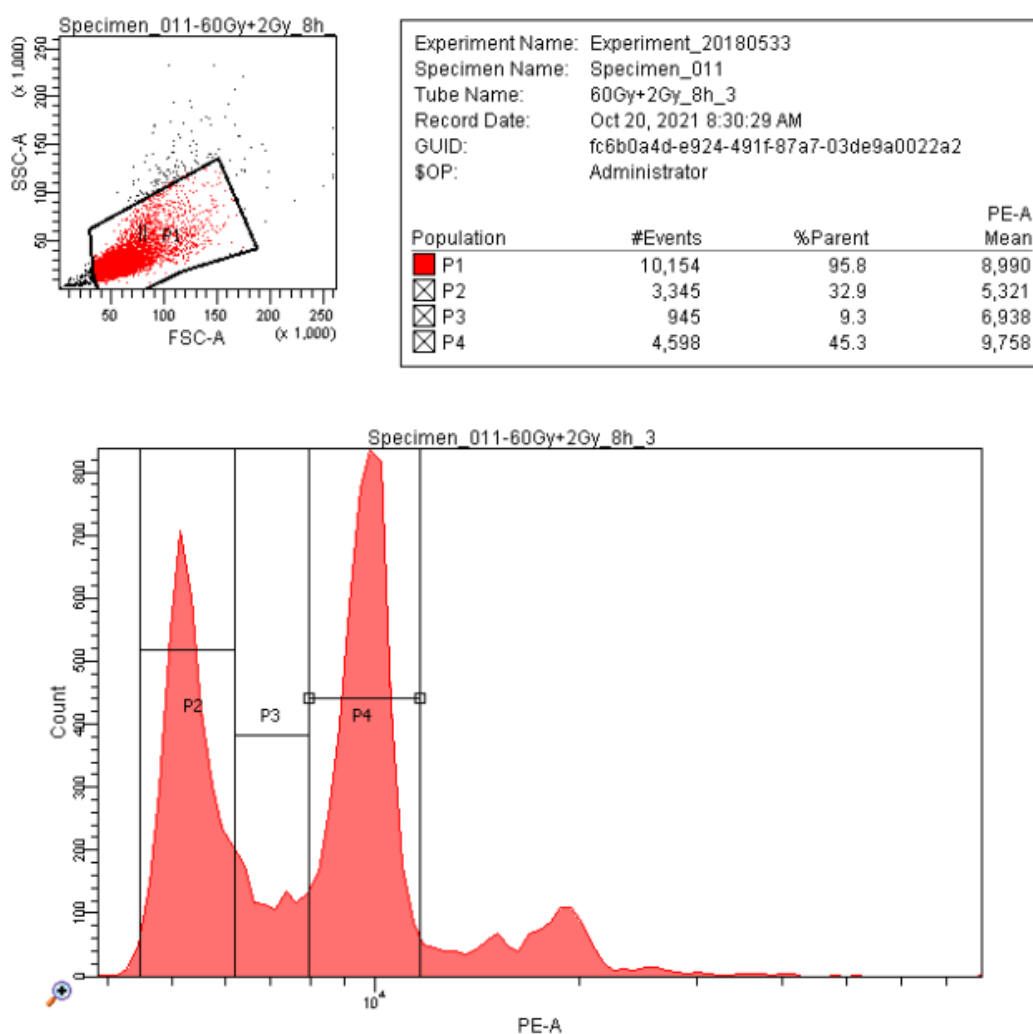
4.4 Flow citométeres sejtciklus fázis meghatározás

A FACS mérés során a WT és 60Gy vonalakban vizsgáltuk, hogy besugárzás után a sejtek a sejtciklus mely stádiumában helyezkednek el. Az eredményeket a diploid plusz tetraploid sejtek százalékaként is megadtuk (relatív %), mert ez a sejtvonal nagy százalékban poliploidizálódik. A méréseket egy passzálásból származó, de külön sejtenyészítő flaskákban tenyésztett sejtkultúrákon, 3-3 párhuzamos mérésben végeztük el.

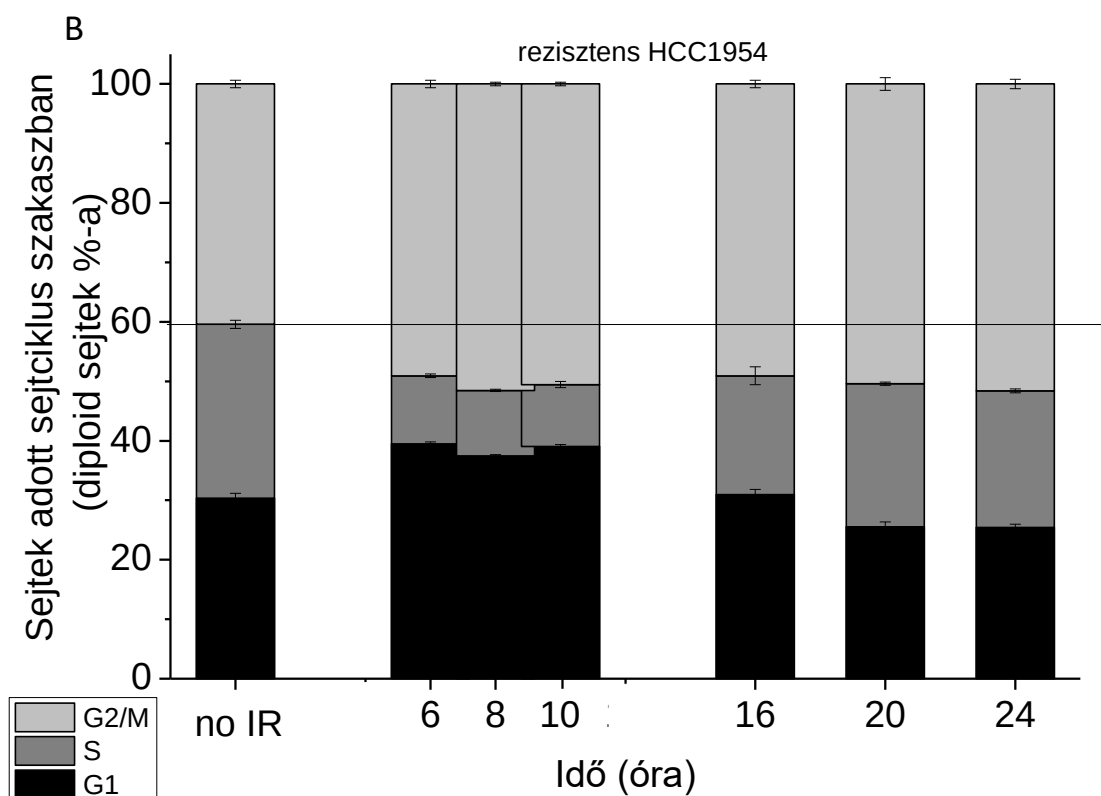
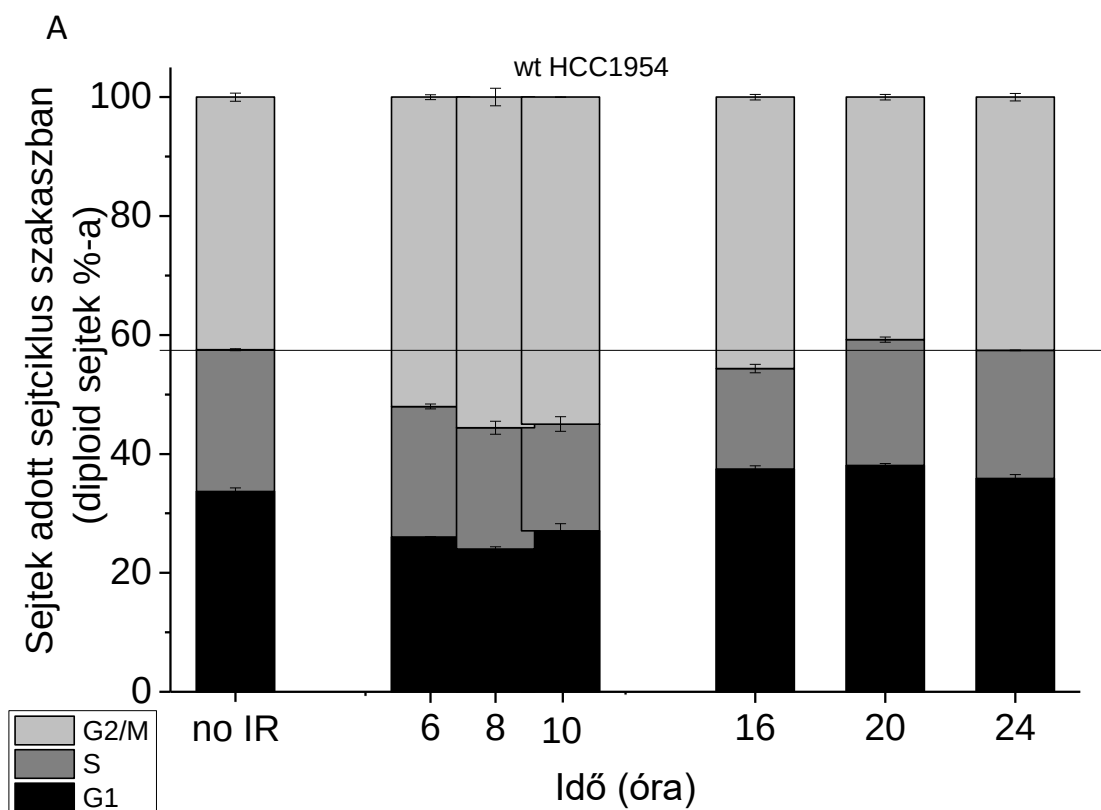
A sejtciklus 4 fő fázisból áll: G1, S, G2 és M. G1 során a sejt növekedik, DNS mennyiségét tekintve diploid. S-fázisban DNS-szintézis folyik, tehát a DNS mennyisége növekszik. G2-fázisban a sejt már tetraploid, a mitózisra készülve kijavítja a DNS-hibákat és az M-fázis során történik meg a sejtosztódás.

A besugarazatlan (no IR) kontrollban megfigyeltük, hogy a 60Gy vonalban kevesebb sejt található ciklusának G1 fázisában, (átlag: 25,03%, relatív átlag: 30,35%), mint a WT vonalban (átlag: 28,77%, relatív átlag: 33,70%), ami Welch-próbával szignifikáns eltérést mutatott ($p=0,05$, $t=-3,2591$). Megfigyeltük továbbá, hogy a 60Gy vonalban az S fázisban lévő sejtek mennyisége a sugárzás óta eltelt 6. és 10. óra között jelentősen lecsökkent (6. ábra). Szintén ebben a vonalban a sejtek G2-es fázisból jóval lassabban lépnek ki, mint a WT vonal sejtjei (7. ábra).

FACSDiva Version 6.1.3



6. ábra: A FACS mérés menete egy reprezentatív mintán a sejtciklus különböző fázisaiban lévő sejtek százalékos arányával. Az ábrán a P2 a G1, a P3 az S és a P4 a G2/M-es sejtfázist jelölik. Az ábrán egy 60Gy minta mérési eredménye látható, amin megfigyelhető az S fázisban lévő sejtek jelentősen alacsony szintje.



7. ábra: A sejtek mennyisége sejtciklusuk különböző szakaszaiban százalékosan megadva, idő függvényében ábrázolva (az error bar-ok a SD-t jelölik). A WT (A) vonalra jellemző volt, hogy több sejt található G1-es fázisban és hamarabb kilép a G2 fázisból, míg a 60Gy (B) vonalban megfigyeltük, hogy az S fázisban a sugárhatás utáni 6–10. órában csökkent a sejtek száma, valamint lassabban lép ki a G2 fázisból.

5. Diszkusszió

Az SRB assay eredményeit tekintve, a legnagyobb különbség a 60Gy és WT vonalak között a besugárzástól számított 4. óránál mérhető. Ez azt jelenti, hogy az oxidációs stressz elhárítása a sugárrezisztens sejtvonalban még ez előtt az időpont előtt történik meg. Tudomásunk szerint ezt az eredményt mi írtuk le először, így nincs irodalmi adat, amihez eredményeinket hasonlítani tudnánk.

A GSH assay során az SRB-hez hasonlóan szintén a besugárzás utáni 4. órában észleltük a legnagyobb különbséget a két vonal között. Megfigyeltük, hogy a GSH szint besugárzás után nő, ami korrelál az irodalmi adatokkal (54). Méréseink során a WT vonalban magasabb GSH szint mutatkozott, mint a 60Gy alvonalon, aminek több indoka is lehet. Elsősorban a ráksejtek összetett antioxidánsrendszerei közül a GSH csak az egyik, ami azt jelenti, hogy ennek a vonalnak a sugárrezisztenciájáért nem biztos, hogy ez az útvonal felelős. Emellett megfigyelték, hogy alacsony GSH szintű vonalakban az eritroid 2-vel kapcsolatos nukleáris faktor (Nrf2) upregulálja a befolyása alatt álló antioxidáns géneket (37), ez a helyzet ebben a vonalban is fennállhat. Egy másik lehetséges magyarázat az, hogy a kiindulási fehérjemennyiség nem az egyetlen sugárrezisztenciát befolyásoló tényező a GSH rendszerben, hanem lehetséges a rezisztens sejten a sugárhatás után egy gyorsabb válaszreakció, például a GSH rendszer működésének gyorsabb volta (pl. oxidált formák gyorsabb visszaalakulása itt vagy kapcsolódó rendszerekben). Lehetséges sugárrezisztencia mechanizmus a DNS károsodás tűrése is. Ebben az irányban csoportunk további vizsgálatokat tervez.

A SOD mérés során az eredményeink részben ütköztek az irodalmi adatokkal. A SOD koncentráció a sugárzás után eltelt 2. órában ugrott csak meg, míg az egyetlen irodalomban található adat szerint ez már az 1. órában megtörténik, de ez a különbség lehet a különböző sejtvonalak vizsgálatának eredménye. Szintén megfigyeltük, hogy a 60Gy vonalban kevesebb a O_2^- ROS mennyisége, ami magasabb SOD aktivitásra utal, ez egybeesik az irodalmi adatokkal (33).

A FACS mérés során megfigyeltük, hogy a 60Gy vonalban kevesebb G1 fázisban található sejt található. Ez azt jelentheti, hogy a sugárrezisztencia és az agresszív terjedés egymással kapcsolatban van, ezt irodalmi adatok is alátámasztják (55). Emellett megfigyeltük, hogy a G2-es megtorpanás a 60Gy sejtvonalban hosszabb ideig tart. Ezt okozhatja az, hogy az indukált

mutáció a sejtvonallal hibajavító képességére is hatással volt, így a DNS-hibajavítás tovább tart, mint a WT vonalban.

Összefoglalóan megállapíthatjuk, hogy a rezisztenciához hozzájáruló oxidációs stressztűrő kapacitás a 60GY vonal esetében már a besugárzást követő negyedik órában teljes (a besugárzás előtti) azonban ekkor még sem a szuperoxid szpeciesz, sem a glutation fehérje mennyiség nem állt vissza kiindulási állapotra. A sugárrezisztencia kialakulásában bár valószínűleg a glutation mennyiségének növekedése nem (hiszen gyakran a vad típusban több), de lehetséges, hogy a SOD fehérjék aktivitásának növekedése szerepet játszhat ebben a sejtvonallal. Szintén lehetséges, hogy a sejtciklus ellenőrző pontok is szerepet játszanak sejtvonallunk rezisztenciájában, de az időfüggő mérésekből megállapítható volt, hogy a sejt folyamatok egy későbbi fázisában lehet ennek jelentősége.

6. Összefoglaló

A sugárterápia az egyik leggyakrabban alkalmazott onkológiai kezelés, de a tumorsejtek rezisztenssé válhatnak rá. A terápia DNS-károsításán keresztül hat, aminek körülbelül kétharmadáért a reaktív oxigéngyökök (ROS) felelősek.

A kutatás célja az, hogy feltérképezzük a ROS eltávolításáért felelős redox útvonalakat és ezek fehérjéit sugárrezisztens sejtvonalban.

Ehhez egy frakcionáltan besugárzott sejtvonalat (60Gy) használtunk fel, és ennek tulajdonságait klonogenitási vizsgálatokkal, szulforodamin módszerrel (SRB) és flow citométer segítségével térképeztük fel.

A vizsgálatok megerősítették, hogy a sejtvonal sugárrezisztenssé vált. Megállapítottuk, hogy a 60Gy vonal a besugárzás után már 4 órával helyreállt oxidatív stressztűrés szempontjából a vad sejtvonallal ellentétben, ami ekkor még nem épült fel a besugárzás okozta ROS-stresszből. Továbbá a 60Gy vonal nagyobb százalékban volt a sejtciklusának G2/M fázisában besugárzás után.

A kutatás eredményei azt mutatják, hogy a besugárzás után 4 óráig érvényesül legjobban redox útvonalak közvetlen hatása (pl. stressztűrés), és a vad és 60Gy vonal között is ebben az időintervallumban figyelhető meg a legnagyobb különbség.

7. Summary

Radiation therapy is one of the most commonly used oncological treatments, but cancer cells can develop resistance to it. The therapy acts through damaging the DNA, around two thirds of which are attributable to reactive oxygen species (ROS).

The aim of this research is to explore the redox pathways and their proteins responsible for removing ROS in radiation resistant cell lines.

For this, we used a cell line that had received fractionated irradiation (60Gy) and examined its traits with clonogenic and sulforhodamine (SRB) assays and flow cytometry.

Our findings confirmed that the cell line has developed radiation resistance. We established that the 60Gy cell line has recovered in terms of oxidative stress capacity after 4 hours, unlike the wild type cell line, which had been yet to recover from the ROS-stress caused by irradiation. Furthermore, the cells of the 60Gy line were in the G2/M phase of their cell cycle in higher percentage than the wild type.

Our results show that the immediate effects of redox pathways (such as stress capacity) prevail the most up until the 4th hour after irradiation, and the most prevalent difference between the wild type and the 60Gy line was observable in this time interval as well.

8. Köszönetnyilvánítás

Elsősorban szeretném megköszönni **Dr. Polgár Csabának** a lehetőséget, hogy az Országos Onkológiai Intézetben dolgozhattam.

Szeretném megköszönni témavezetőimnek, **Dr. Kocsis Zsuzsának és Dr. Jurányi Zsoltnak**, hogy ezen az érdekes témán dolgozhattam és készséges segítségüket a kísérletek kivitelezése és a dolgozat megírása alatt.

Emellett szeretném megköszönni **Dr. Sándor Gyöngyvérnek** a dolgozat megírásában és a konferenciára való felkészülésben nyújtott készséges segítségét.

Továbbá köszönettel tartozom a kísérletes munkám segítségéért a laboratóriumi asszisztenseknek, **Kiss Krisztinának és Vass Nagyesdának**.

Végül szeretném megköszönni a sok segítséget és a jó hangulatú közös munkát az **Országos Onkológiai Intézet Klinikai Sugárbiológiai és Onkocytogenetikai Osztály összes munkatársának**.

9. Szerzői hozzájárulás

Alulírott Paller Éva a dolgozatban végzett munkafolyamatok közül az alábbiakat végeztem el.

- A sejtek tenyésztését és passzálását.
- A GSH-assayt, mely során a sugárzás után eltelt 1. órában jelentősen csökkent a teljes GSH szint, majd ezt követően mindkét vonal GSH szintje nőni kezdett.
- A SOD-assayt, mely a során relatív fluoreszcencia a besugárzás után nő, majd a SOD enzimaktivitásnak köszönhetően csökkenésbe kezd.
- Valamint a flow citométeres sejtciklus fázis meghatározást a hozzátartozó Welch-próbával, mely szignifikáns különbséget mutatott ki a két vonal kontroll G1 fázisban lévő sejteinek százalékos aránya között.



Paller Éva

10. Irodalomjegyzék

1. Kim, W., Lee, S., Seo, D., Kim, D., Kim, K., Kim, E., Kang, J., Seong, K. M., Youn, H., and Youn, B. (2019) Cellular Stress Responses in Radiotherapy. *Cells* **8**
2. Wang, H., Jiang, H., Van De Gucht, M., and De Ridder, M. (2019) Hypoxic Radioresistance: Can ROS Be the Key to Overcome It? *Cancers (Basel)* **11**
3. Wang, Y. H., Huang, J. T., Chen, W. L., Wang, R. H., Kao, M. C., Pan, Y. R., Chan, S. H., Tsai, K. W., Kung, H. J., Lin, K. T., and Wang, L. H. (2019) Dysregulation of cystathionine gamma-lyase promotes prostate cancer progression and metastasis. *EMBO Rep* **20**, e45986
4. Zhu, H., Blake, S., Chan, K. T., Pearson, R. B., and Kang, J. (2018) Cystathionine beta-Synthase in Physiology and Cancer. *Biomed Res Int* **2018**, 3205125
5. Wang, L., Shi, H., Liu, Y., Zhang, W., Duan, X., Li, M., Shi, X., and Wang, T. (2019) Cystathionine gamma-lyase promotes the metastasis of breast cancer via the VEGF signaling pathway. *Int J Oncol* **55**, 473-487
6. Sen, S., Kawahara, B., Gupta, D., Tsai, R., Khachatryan, M., Roy-Chowdhuri, S., Bose, S., Yoon, A., Faull, K., Farias-Eisner, R., and Chaudhuri, G. (2015) Role of cystathionine beta-synthase in human breast Cancer. *Free Radic Biol Med* **86**, 228-238
7. Guo, H., Gai, J. W., Wang, Y., Jin, H. F., Du, J. B., and Jin, J. (2012) Characterization of hydrogen sulfide and its synthases, cystathionine beta-synthase and cystathionine gamma-lyase, in human prostatic tissue and cells. *Urology* **79**, 483 e481-485
8. Bhattacharyya, S., Saha, S., Giri, K., Lanza, I. R., Nair, K. S., Jennings, N. B., Rodriguez-Aguayo, C., Lopez-Berestein, G., Basal, E., Weaver, A. L., Visscher, D. W., Cliby, W., Sood, A. K., Bhattacharya, R., and Mukherjee, P. (2013) Cystathionine beta-synthase (CBS) contributes to advanced ovarian cancer progression and drug resistance. *PLoS One* **8**, e79167
9. Phillips, C. M., Zatarain, J. R., Nicholls, M. E., Porter, C., Widen, S. G., Thanki, K., Johnson, P., Jawad, M. U., Moyer, M. P., Randall, J. W., Hellmich, J. L., Maskey, M., Qiu, S., Wood, T. G., Druzhyna, N., Szczesny, B., Modis, K., Szabo, C., Chao, C., and Hellmich, M. R. (2017) Upregulation of Cystathionine-beta-Synthase in Colonic Epithelia Reprograms Metabolism and Promotes Carcinogenesis. *Cancer Res* **77**, 5741-5754
10. Pan, Y., Zhou, C., Yuan, D., Zhang, J., and Shao, C. (2016) Radiation Exposure Promotes Hepatocarcinoma Cell Invasion through Epithelial Mesenchymal Transition Mediated by H₂S/CSE Pathway. *Radiat Res* **185**, 96-105
11. Pan, Y., Ye, S., Yuan, D., Zhang, J., Bai, Y., and Shao, C. (2012) Radioprotective role of H₂S/CSE pathway in Chang liver cells. *Mutat Res* **738-739**, 12-18

12. Nagane, M., Yasui, H., Sakai, Y., Yamamori, T., Niwa, K., Hattori, Y., Kondo, T., and Inanami, O. (2015) Activation of eNOS in endothelial cells exposed to ionizing radiation involves components of the DNA damage response pathway. *Biochem Biophys Res Commun* **456**, 541-546
13. Zou, D., Li, Z., Lv, F., Yang, Y., Yang, C., Song, J., Chen, Y., Jin, Z., Zhou, J., Jiang, Y., Ma, Y., Jing, Z., Tang, Y., and Zhang, Y. (2021) Pan-Cancer Analysis of NOS3 Identifies Its Expression and Clinical Relevance in Gastric Cancer. *Front Oncol* **11**, 592761
14. Nagane, M., Yasui, H., Yamamori, T., Zhao, S., Kuge, Y., Tamaki, N., Kameya, H., Nakamura, H., Fujii, H., and Inanami, O. (2013) Radiation-induced nitric oxide mitigates tumor hypoxia and radioresistance in a murine SCCVII tumor model. *Biochem Biophys Res Commun* **437**, 420-425
15. Monteiro, H. P., Ogata, F. T., and Stern, A. (2017) Thioredoxin promotes survival signaling events under nitrosative/oxidative stress associated with cancer development. *Biomed J* **40**, 189-199
16. Arner, E. S., and Holmgren, A. (2006) The thioredoxin system in cancer. *Semin Cancer Biol* **16**, 420-426
17. Chen, C., Li, L., Zhou, H. J., and Min, W. (2017) The Role of NOX4 and TRX2 in Angiogenesis and Their Potential Cross-Talk. *Antioxidants (Basel)* **6**
18. Liang, Y. W., Zheng, J., Li, X., Zheng, W., and Chen, T. (2014) Selenadiazole derivatives as potent thioredoxin reductase inhibitors that enhance the radiosensitivity of cancer cells. *Eur J Med Chem* **84**, 335-342
19. Lei, H., Wang, G., Zhang, J., and Han, Q. (2018) Inhibiting TrxR suppresses liver cancer by inducing apoptosis and eliciting potent antitumor immunity. *Oncol Rep* **40**, 3447-3457
20. Kim, Y., and Jang, H. H. (2019) The Role of Peroxiredoxin Family in Cancer Signaling. *J Cancer Prev* **24**, 65-71
21. Park, S. H., Chung, Y. M., Lee, Y. S., Kim, H. J., Kim, J. S., Chae, H. Z., and Yoo, Y. D. (2000) Antisense of human peroxiredoxin II enhances radiation-induced cell death. *Clin Cancer Res* **6**, 4915-4920
22. Yu, X., Li, Z., Zhang, Y., Xu, M., Che, Y., Tian, X., Wang, R., Zou, K., and Zou, L. (2019) beta-elemene inhibits radiation and hypoxia-induced macrophages infiltration via Prx-1/NF-kappaB/HIF-1alpha signaling pathway. *Onco Targets Ther* **12**, 4203-4211
23. Deorukhkar, A., and Krishnan, S. (2010) Targeting inflammatory pathways for tumor radiosensitization. *Biochem Pharmacol* **80**, 1904-1914
24. Huang, T., Yin, L., Wu, J., Gu, J. J., Wu, J. Z., Chen, D., Yu, H. L., Ding, K., Zhang, N., Du, M. Y., Qian, L. X., Lu, Z. W., and He, X. (2016) MicroRNA-19b-3p regulates nasopharyngeal carcinoma radiosensitivity by targeting TNFAIP3/NF-kappaB axis. *J Exp Clin Cancer Res* **35**, 188

25. Yang, D., Zhang, W., Liang, J., Ma, K., Chen, P., Lu, D., and Hao, W. (2018) Single cell whole genome sequencing reveals that NFKB1 mutation affects radiotherapy sensitivity in cervical cancer. *Oncotarget* **9**, 7332-7340
26. Voce, D. J., Schmitt, A. M., Uppal, A., McNerney, M. E., Bernal, G. M., Cahill, K. E., Wahlstrom, J. S., Nassiri, A., Yu, X., Crawley, C. D., White, K. P., Onel, K., Weichselbaum, R. R., and Yamini, B. (2015) Nfkb1 is a haploinsufficient DNA damage-specific tumor suppressor. *Oncogene* **34**, 2807-2813
27. Deshmukh, P., Unni, S., Krishnappa, G., and Padmanabhan, B. (2017) The Keap1-Nrf2 pathway: promising therapeutic target to counteract ROS-mediated damage in cancers and neurodegenerative diseases. *Biophys Rev* **9**, 41-56
28. Taguchi, K., and Yamamoto, M. (2017) The KEAP1-NRF2 System in Cancer. *Front Oncol* **7**, 85
29. DeNicola, G. M., Karreth, F. A., Humpton, T. J., Gopinathan, A., Wei, C., Frese, K., Mangal, D., Yu, K. H., Yeo, C. J., Calhoun, E. S., Scrimieri, F., Winter, J. M., Hruban, R. H., Iacobuzio-Donahue, C., Kern, S. E., Blair, I. A., and Tuveson, D. A. (2011) Oncogene-induced Nrf2 transcription promotes ROS detoxification and tumorigenesis. *Nature* **475**, 106-109
30. Guo, Z., and Mo, Z. (2020) Keap1-Nrf2 signaling pathway in angiogenesis and vascular diseases. *J Tissue Eng Regen Med* **14**, 869-883
31. Bogdanovic, V., Spasic, S., Rutonjski, L., Djan, M., and Mrdjanovic, J. (2014) Dose-dependent survival of K562 cells subjected to irradiation, time course of endogenous enzyme activity and protective effect of applied superoxide dismutase. *J BUON* **19**, 554-561
32. Wang, Y., Branicky, R., Noe, A., and Hekimi, S. (2018) Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. *J Cell Biol* **217**, 1915-1928
33. Guo, G., Yan-Sanders, Y., Lyn-Cook, B. D., Wang, T., Tamae, D., Ogi, J., Khaletskiy, A., Li, Z., Weydert, C., Longmate, J. A., Huang, T. T., Spitz, D. R., Oberley, L. W., and Li, J. J. (2003) Manganese superoxide dismutase-mediated gene expression in radiation-induced adaptive responses. *Mol Cell Biol* **23**, 2362-2378
34. Zuo, J., Zhao, M., Liu, B., Han, X., Li, Y., Wang, W., Zhang, Q., Lv, P., Xing, L., Shen, H., and Zhang, X. (2019) TNF α mediated upregulation of SOD2 contributes to cell proliferation and cisplatin resistance in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* **42**, 1497-1506
35. Xiao, X., Luo, H., Vanek, K. N., LaRue, A. C., Schulte, B. A., and Wang, G. Y. (2015) Catalase inhibits ionizing radiation-induced apoptosis in hematopoietic stem and progenitor cells. *Stem Cells Dev* **24**, 1342-1351
36. Epperly, M. W., Melendez, J. A., Zhang, X., Nie, S., Pearce, L., Peterson, J., Franicola, D., Dixon, T., Greenberger, B. A., Komanduri, P., Wang, H., and Greenberger, J. S. (2009) Mitochondrial targeting of a catalase transgene product by plasmid liposomes increases radioresistance in vitro and in vivo. *Radiat Res* **171**, 588-595

37. Traverso, N., Ricciarelli, R., Nitti, M., Marengo, B., Furfaro, A. L., Pronzato, M. A., Marinari, U. M., and Domenicotti, C. (2013) Role of glutathione in cancer progression and chemoresistance. *Oxid Med Cell Longev* **2013**, 972913
38. Umar, M., Qian, W., Liu, Q., Xing, S., Li, X., Yang, X., Fan, Y., Ma, D., Jiang, P., and Li, M. (2020) Study on the pharmacological character of an insulin-mimetic small molecular compound of vanadyl trehalose. *Physiol Res* **69**, 481-490
39. Moore, W. R., Anderson, M. E., Meister, A., Murata, K., and Kimura, A. (1989) Increased capacity for glutathione synthesis enhances resistance to radiation in Escherichia coli: a possible model for mammalian cell protection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 1461-1464
40. Li, X., Wu, J., Zhang, X., and Chen, W. (2018) Glutathione reductase-mediated thiol oxidative stress suppresses metastasis of murine melanoma cells. *Free Radic Biol Med* **129**, 256-267
41. Liu, C. J., Yang, J. H., Huang, F. Z., Nie, W. P., Liu, C. P., Mao, X. H., Yin, X. M., Shen, X. B., Peng, C., Chen, M. F., Jiang, B., Liu, X. Y., and Wu, J. S. (2017) Glutathione-s-transferase A 4 (GSTA4) suppresses tumor growth and metastasis of human hepatocellular carcinoma by targeting AKT pathway. *Am J Transl Res* **9**, 301-315
42. He, F., Wei, L., Luo, W., Liao, Z., Li, B., Zhou, X., Xiao, X., You, J., Chen, Y., Zheng, S., Li, P., Murata, M., Huang, G., and Zhang, Z. (2016) Glutaredoxin 3 promotes nasopharyngeal carcinoma growth and metastasis via EGFR/Akt pathway and independent of ROS. *Oncotarget* **7**, 37000-37012
43. Lake, D. F., and Faigel, D. O. (2014) The emerging role of QSOX1 in cancer. *Antioxid Redox Signal* **21**, 485-496
44. Fifield, A. L., Hanavan, P. D., Faigel, D. O., Sergienko, E., Bobkov, A., Meurice, N., Petit, J. L., Polito, A., Caulfield, T. R., Castle, E. P., Copland, J. A., Mukhopadhyay, D., Pal, K., Dutta, S. K., Luo, H., Ho, T. H., and Lake, D. F. (2020) Molecular Inhibitor of QSOX1 Suppresses Tumor Growth In Vivo. *Mol Cancer Ther* **19**, 112-122
45. Zhou, L., Chen, H. M., Qu, S., Li, L., Zhao, W., Liang, Z. G., Yu, B. B., Chen, K. H., Lu, Q. T., Lin, G. X., and Zhu, X. D. (2018) Reduced QSOX1 enhances radioresistance in nasopharyngeal carcinoma. *Oncotarget* **9**, 3230-3241
46. Xu, S., Sankar, S., and Neamati, N. (2014) Protein disulfide isomerase: a promising target for cancer therapy. *Drug Discov Today* **19**, 222-240
47. Qian, S., Zhang, S., Wu, Y., Ding, Y., Shen, and Li, X. (2020) Protein Disulfide Isomerase 4 Drives Docetaxel Resistance in Prostate Cancer. *Chemotherapy* **65**, 125-133
48. Alhammad, R., Khunchai, S., Tongmuang, N., Limjindaporn, T., Yenchitsomanus, P. T., Mutti, L., Krstic-Demonacos, M., and Demonacos, C. (2020) Protein disulfide isomerase A1 regulates breast cancer cell immunorecognition in a manner dependent on redox state. *Oncol Rep* **44**, 2406-2418

49. Ye, Q., Fu, P., Dou, J., and Wang, N. (2018) Downregulation of PDIA3 inhibits proliferation and invasion of human acute myeloid leukemia cells. *Onco Targets Ther* **11**, 2925-2935
50. Chen, X., Xu, Z., Zhu, Z., Chen, A., Fu, G., Wang, Y., Pan, H., and Jin, B. (2018) Modulation of G6PD affects bladder cancer via ROS accumulation and the AKT pathway in vitro. *Int J Oncol* **53**, 1703-1712
51. Su, X., Gao, C., Feng, X., and Jiang, M. (2020) miR-613 suppresses migration and invasion in esophageal squamous cell carcinoma via the targeting of G6PD. *Exp Ther Med* **19**, 3081-3089
52. Rao, X., Duan, X., Mao, W., Li, X., Li, Z., Li, Q., Zheng, Z., Xu, H., Chen, M., Wang, P. G., Wang, Y., Shen, B., and Yi, W. (2015) O-GlcNAcylation of G6PD promotes the pentose phosphate pathway and tumor growth. *Nat Commun* **6**, 8468
53. Eckers, J. C., Kalen, A. L., Sarsour, E. H., Tompkins, V. S., Janz, S., Son, J. M., Doskey, C. M., Buettner, G. R., and Goswami, P. C. (2014) Forkhead box M1 regulates quiescence-associated radioresistance of human head and neck squamous carcinoma cells. *Radiat Res* **182**, 420-429
54. Navarro, J., Obrador, E., Pellicer, J. A., Aseni, M., Vina, J., and Estrela, J. M. (1997) Blood glutathione as an index of radiation-induced oxidative stress in mice and humans. *Free Radic Biol Med* **22**, 1203-1209
55. Aiello, N. M., and Kang, Y. (2019) Context-dependent EMT programs in cancer metastasis. *J Exp Med* **216**, 1016-1026