



BUDAPESTI MŰSZAKI ÉS GAZDASÁGTUDOMÁNYI EGYETEM

VEGYÉSZMÉRNÖKI ÉS BIOMÉRNÖKI KAR

**ALKALMAZOTT BIOTECHNOLÓGIAI ÉS ÉLELMISZERTUDOMÁNYI
TANSZÉK**

A HSF1 transzkripciós faktor és az ER-stressz kapcsolatának vizsgálata emlős sejtvonalakban

Témavezető:

Dr. Deák Veronika

Alkalmazott Biotechnológiai és Élelmiszertudományi Tanszék

Írta: Erdélyi Viktor

Budapest, 2023

Lezárva: 2024.06.05

TARTALOMJEGYZÉK

Bevezetés.....	4
1. Irodalmi áttekintés.....	5
1.1. ER stressz és az UPR válasz.....	5
1.2. A HSF1 transzkripciós faktor.....	9
1.2.1. HSF1 target génjei.....	10
1.2.2. HSF1 és az oxidatív stressz.....	11
1.2.3. Autofágia és a HSF1	11
1.2.4. A HSF1 klinikai jelentősége	12
1.2.5. HSF1 inhibíció	13
1.3. Humán sejt kultúrák	15
2. Célkitűzések.....	17
3. Anyagok és módszerek	18
3.1. Sejttenyésztési műveletek.....	18
3.1.1. Sejtek fenntartása, passzálása.....	18
3.1.2. Sejtek mikroszkopizálása	18
3.1.3. Sejtszámlálás	19
3.1.4. Sejtek kezelése	20
3.2. RNS izolálás	21
3.3. RNS tisztaság ellenőrzése, agaróz gélelektroforézis	21
3.4. cDNS szintézis.....	22
3.5. Kvantitatív mérések, real-time PCR.....	23
3.5.1. PCR primerek.....	25
3.6. Kísérleti elrendezések.....	26
3.6.1. Bevezetés és előkísérletek.....	26
3.6.2. Hőstressz hatásának vizsgálata	27
3.6.3. HEK-5 és HT-3 kísérlet	27
3.6.4. HEK-6 és HT-4 kísérlet	28
3.6.5. HEK-7 és HT-5 kísérlet	28
3.7. Kémiai stressz hatásának vizsgálata	29
3.7.1. HEK-8 és HT-6 kísérlet	29
3.7.2. HT-8 kísérlet	30
3.7.3. HT-9 kísérlet	30
3.7.4. HEK-10 és HT-10 kísérlet	31

4.	Eredmények és megvitatásuk.....	32
4.1.	A HSF1 és az UPR ^{ER} kapcsolatának vizsgálata hőstresszben.....	32
4.1.1.	Hőkezelések hatása HT-1080 sejtekben (a HT-3/4/5 kísérletek eredményei)	32
4.1.2.	Hőkezelések hatása HEK-293T sejtekben (a HEK-5/6/7 kísérletek eredményei). 34	
4.2.	A HSF1 és az UPR ^{ER} kapcsolatának vizsgálata tunikamicin-indukált stresszben	35
4.2.1.	Tunikamicin kezelés hatása HT-1080 sejtekben (a HT-6/7/8/10 kísérletek eredményei).....	35
4.2.2.	Tunikamicin kezelés hatása HEK-293T sejtekben (a HEK-6/10 kísérletek eredményei).....	37
4.3.	HSF-1 inhibíció hatása a sejtek túlélésére	38
5.	Összefoglalás.....	40
6.	Köszönetnyilvánítás	42
7.	Felhasznált irodalom	43
8.	Függelék.....	52

BEVEZETÉS

A sejtekben lejátszódó önvédelmi mechanizmusok napjainkban egyre szélesebb körben vizsgált folyamatok, mivel olyan általános, sok embert érintő problémák, betegségek lehetséges terápiájához, felismeréséhez vezethet ezeknek a mechanizmusoknak az alapos feltérképezése, amelyekre jelenleg vagy nem rendelkezünk hatékony gyógymóddal, vagy kívánatos lenne a jelenleg használt módszer kiváltása. A sejtekben lejátszódó folyamatok összetettsége alapvetően nehezíti meg a kutatók munkáját. Jelen munkánkban humán sejtek stresszhatásra adott válaszreakcióit igyekszünk alaposabban feltérképezni.

Megfigyelték, hogy különböző stresszhatásokra a sejtekben megnő a hibás térszerkezetű fehérjék mennyisége, mely akár a sejt elpusztulásához is vezethet. Ebben a folyamatban fontos szerephez jut a sejtek endoplazmás retikuluma, hiszen itt zajlik a fehérjék érése. Ezen kívül a sejt számos, a sejtplazmában és az organeliumokban található dajkafehérje segítségével igyekszik megszabadulni a káros fehérjeaggregátumoktól. A HSF1 (hősokk-faktor 1, *heat-stress factor 1*) napjaink egyik igen intenzíven kutatott transzkripciós mester-regulátora, mely részt vesz a sejtplazmából induló hősokk válaszban, azonban több eredmény is arra mutat, hogy ennél sokkal kiterjedtebb a szerepe, és kapcsolatban állhat az endoplazmás retikulumban zajló folyamatokkal is.

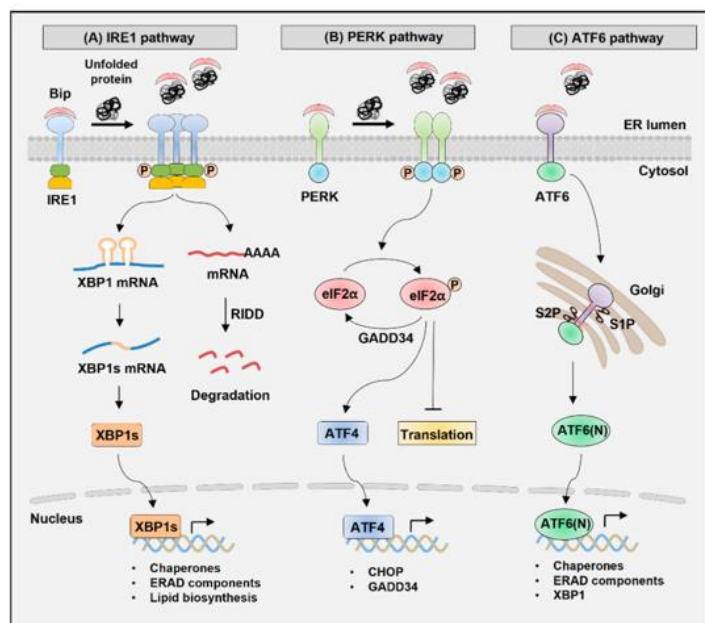
Témám ennek a kapcsolatnak az új szemszögből történő vizsgálatával foglalkozik. Szeretnénk felderíteni, hogy a HSF1 – jól ismert funkcióin túl – vajon szerepet játszik-e az endoplazmás retikulumból kiinduló UPR (*unfolded protein response*, hibás térszerkezetű fehérje válasz) szabályozásában. Kooperációs partnerünk kutatócsoportjában bizonyos UPR-komponensek aktivációjának HSF1-függését mutatták ki *Ceanorhabditis elegans* fonalféreg modellben (Dr. Barna János, ELTE Genetika Tanszék). Annak kiderítésére, hogy ez az új, a szakirodalomban eddig nem jegyzett molekuláris kapcsolat univerzálisnak tekinthető-e, célul tűztük ki a kérdés vizsgálatát humán eredetű sejttényeszetekben. Eredményeink hozzájárulhatnak a HSF1 regulátor-funkciójának jobb megértéséhez.

1. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

1.1. ER STRESSZ ÉS AZ UPR VÁLASZ

Az eukarióta sejtek endoplazmás retikulum (ER) lumenjében zajló fehérjeérési folyamatok során különböző tényezők hatására megnőhet a hibás térszerkezettel rendelkező fehérjék (unfolded protein) mennyisége, ami végső esetben a sejt hibás működéséhez és akár halálához is vezethet. Ennek elkerülése érdekében a sejtekben életbe lép egy evolúciósan jól konzervált önvédelmi mechanizmus, az úgynevezett hibás térszerkezetű fehérje stresszválasz (*unfolded protein response* - UPR), ami a protein homeosztázis (proteosztázis) helyreállítására hivatott. Az UPR rövid távon a sejtek önvédelmét szolgálja, azonban hosszabb távon fennálló UPR aktivitás sejthalál folyamatokat indít be apoptotikus útvonalakon. [1]

Az UPR komplex jelátviteli folyamatokon alapszik, melyek lehetővé teszik újabb dajkafehérjék (chaperonok) vagy degradációs faktorok expresszióját a hibás proteinek javításához vagy eltávolításához. Három transzmembrán ER stressz szenzor felelős az UPR szabályzásáért: az inozitol-requiring enzyme 1 (IRE1), a protein kinase RNA (PKR)-like ER kinase (PERK) és az activating transcription factor-6 (ATF6). [2]



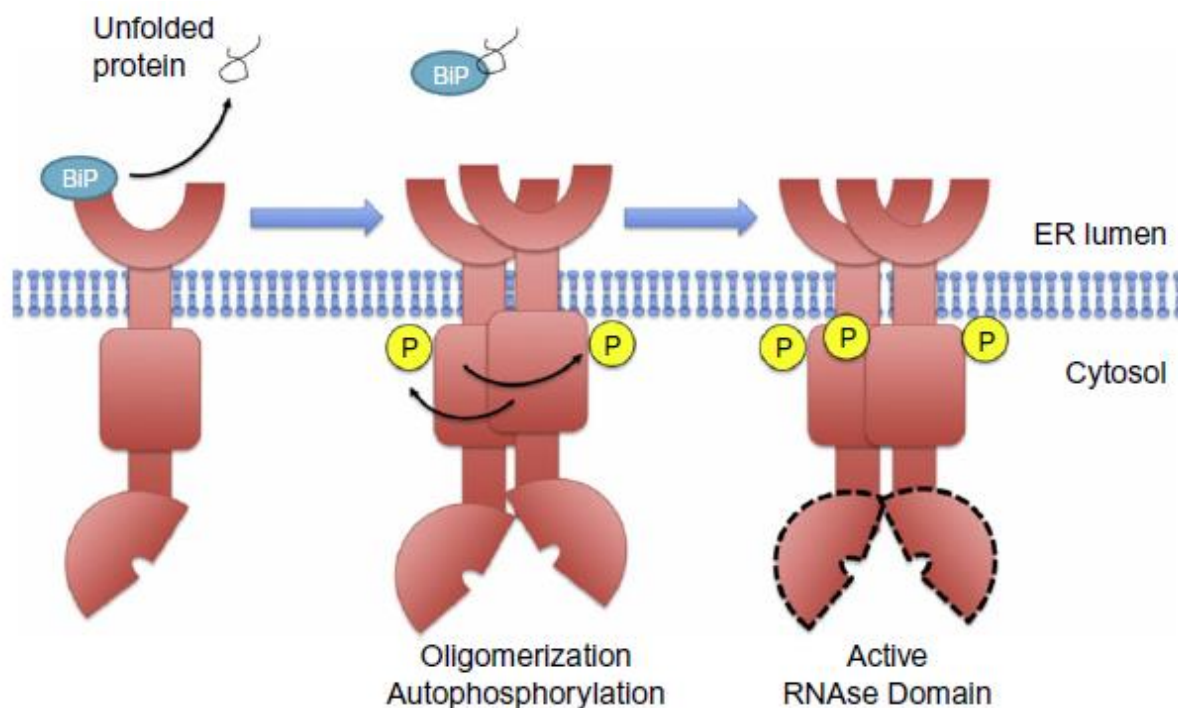
1. ábra: Az UPR aktivációs útvonalak sematikus ábrája. [76]

A binding immunoglobulin protein (BiP) egy HSP70-szerű (70 kDa nagyságrendű hősokk fehérje) chaperon az ER lumenjében. Elsődleges feladata a fehérjék helyes feltekeredésének segítése azáltal, hogy a frissen szintetizálódott fehérjelánchoz kötődik és további foldingra alkalmas állapotban tartja őket. [3] Ezen felül a BiP az ER stressz-szenzor transzmembrán fehérjékhez (IRE1, PERK, ATF6) is kötődik normál körülmények között, ezáltal inaktív állapotban tartva azokat. Stressz esetén a rosszul feltekeredett fehérjék száma drasztikusan megnő, melyek hozzákötődnek a BiP-hez. Ezen kompetitív kötődésnek az egyensúlya erősen a hibás proteinek felé van eltolódva, vagyis a BiP sokkal nagyobb affinitással kötődik a hibás fehérjékhez. Hibásan feltekert fehérjék megjelenésekor tehát a BiP disszociál a fent említett transzmembrán-fehérjékről, ezzel aktiválva ezt a három faktort. Ezek több, szekréciós folyamatokhoz kapcsolódó útvonalat szabályozó gén expresszióját befolyásolják, többek között a fehérjék bejutását az ER-be, a foldingot, az N-glikozilációt, a redox metabolizmust, a proteinek minőség ellenőrzését vagy az ER asszociált degradációt (ERAD). [4] A BiP disszociációja a szenzor fehérjékről reverzibilis, a proteosztázis helyreállásakor visszakötődik rájuk, ezzel leállítva az UPR-t. ER stressz esetén a BiP expressziója is megemelkedik. Az ER lumenben jelen lévő nagy mennyiségű BiP csökkenti a hibás térszerkezetű fehérjék mennyiségét. [5]

Az ATF6 egy membránhoz kötődő transzkripciós faktor, egy citoszol- és egy ER lumináris doménből áll. Aktivációja a BiP disszociációjához kötött: normál esetben a lumináris doménhez kötődik a BiP, azonban hibás fehérjék megjelenésekor leválik, amivel párhuzamosan az ATF6 is felszabadul, valamint kifejeződik rajta egy Golgi-lokalizációs szignál.[6] Az ATF6 α diszulfid kötése megváltoznak, lehetővé téve, hogy a Golgi apparátusba transzlokálódjon. Itt elhasítja a Site-1 és Site-2-proteáz. [7] A citoszol-domén ATF6c ezután a sejtmagba transzlokálódik és aktiválja bizonyos UPR gének transzkripcióját a DNS megfelelő ER-stressz szakaszához való közvetlen kötődéssel, vagy az általános sejtmagi transzkripciós faktor Y-nal együtt fejt ki a hatását. [8] Az ATF6 target génjei elsősorban ER stressz transzkripciós faktorokat (mint például az X-boksz kötő fehérje, XBP1) vagy ER chaperonokat (pl. BiP) kódolnak.

A PERK szintén egy transzmembrán szenzor fehérje, mely az ER lumenjébe nyúló stresszérzékelő, valamint a citoszolba nyúló kináz doménnel rendelkezik. A lumináris oldalon található BiP disszociációjakor a PERK citoszol felőli része autofoszforilálódik, majd ez foszforilálja az eukarióta transzlációs iniciációs faktor 2-t (eIF2 α), ami általánosan csendesíti a transzlációt a sejtben. [9] Ennek elsődleges szerepe az ER lumenbe kerülő fehérjék mennyiségének csökkentése, ezzel is csökkentve a hibajavító mechanizmusok terhelését. A PERK ezen kívül rendelkezik génregulációs funkcióval is: stressz hatására foszforilálja a sejtmagi transzkripciós faktor (erythroid-eredetű 2)-szerű faktor 2-t (eIF2 α), ami módosítja annak aktivitását. Ez a faktor elsősorban az oxidatív stressz elleni védekezésben játszik szerepet, valamint fokozza az ATF4 faktor transzlációját. [10] [11] Ezt a genomban az ATF4-et kódoló régió előtt elhelyezkedő inhibíciós mikroszekvencia áthidalásával éri el. [12] Génexpressziós vizsgálatok kimutatták, hogy azon gének, melyek olyan fehérjéket kódolnak, amik aminosav-bioszintézisben és transzport folyamatokban, antioxidáns stressz elleni válaszban vagy az apoptózisban vesznek részt (pl. BiP, CHOP) mind PERK, eIF2 α foszforiláció, illetve ebből következően ATF4 függők. [1] Ezen kívül az apoptózishoz vezető útvonal más résztvevőit is felfelé szabályozza hosszabb ER stressz esetén, de nem találtak egyértelmű határértéket vagy váltópontot, ami döntene a túlélés és a sejthalál között. [13]

Az IRE1 a legkonzerváltabb útvonal az összes közül. [4] Humán sejtekben két izoformáját azonosították: az IRE1 α mindenütt megtalálható, az IRE1 β csak a bélhámsejtekben fordul elő. Előbbi szerkezete három funkcionális doménből tevődik össze, egy luminális stressz érzékelő doménből, egy sejtplazmába nyúló kináz doménből és egy endoribonukleáz doménből. ER stressz hatására az IRE1 α lumináris domének dimerizálódnak az egymásra specifikus oldalaik mentén. Kimutatták, hogy ezek megváltozása esetén a dimerizálódás nem megy végbe, így nem tudja aktiválva az UPR-t. [14], [15] Az IRE1 α citoplazmába nyúló kináz doménjének transz-autofoszforilációja kritikus az endoribonukleáz domén aktivációjának szempontjából. (2. ábra) [16] Utóbbi domén endonukleáz aktivitása során elhasítja az *XBP1* mRNS-t és eltávolít belőle egy 26 nukleotid hosszúságú intront. Az így keletkező spliced *XBP1*-ről (*XBP1s*) átíródó XBP1 protein fontos transzkripciós faktora az UPR-nek, amely sok target gén, többek között a BiP expresszióját is befolyásolja. [17], [18]



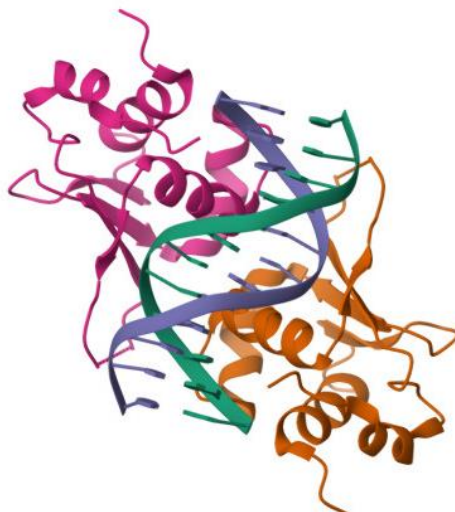
2. ábra: IRE1 α aktivációja emlőseken. Normál körülmények között a BiP hozzákötődik az IRE1 α -hoz. ER stressz hatására a BiP levál, az IRE1 α oligomerizálódik és autofoszforilálódik. [2]

Látható tehát, hogy az UPR-nek alapvetően három célja van: egyrészt általánosan csökkenti a protein transzlációt, hogy csökkentse a hibajavító mechanizmusok terhelését, másrészt elindít bizonyos degradációs folyamatokat, melyek segítenek megszabadulni a hibásan feltekeredett fehérjéktől, harmadrészt pedig elindít olyan jelátviteli útvonalakat, amik a dajkafehérjék expresszióját fokozzák, hogy azok elősegítsék a refoldingot. Ha ezekkel nem éri el a célját a sejt, vagyis a proteosztázis helyreállítását záros időintervallumon belül, akkor az UPR elindítja a sejtet az apoptózishoz vezető útvonalon.

1.2. A HSF1 TRANSZKRIPCÍÓS FAKTOR

A HSF1 (Heat Shock Factor 1) a *HSF1* gén által kódolt, eukariótákban evolúciósan jól konzervált transzkripciós faktor a sejtek citoplazmájában. Elsődlegesen a hőstressz miatt keletkező hibás térszerkezetű fehérjék okozta stresszre adott transzkripciós válaszban aktív, de ezen kívül megfigyelték a szerepét egyéb, nem stresszhez kapcsolódó sejtbiológiai folyamat szabályozásában is (pl. sejtfejlődés, metabolizmus). [19]

Normál körülmények között a HSF1 főleg inaktív monomer állapotban található meg a citoplazmában. Ehhez a monomerhez chaperonok (pl. HSP70, HSP90) kapcsolódnak, melyek így represszálják a HSF1 aktivációt. A proteosztázis megváltozásakor ezek a fehérjék részt vesznek a hibajavításban: hozzákötnek a rosszul feltekeredett fehérjékhez, miközben disszociál róluk a HSF1. A HSF1 molekulák ezt követően trimerizálódnak, foszforilálódnak és átkerülnek



3. ábra: *Hsf1* DNS kötő szerkezete (PDB: 5D5U, XRD)

a sejtmagba. Itt kötődnek hozzá specifikusan a hősokk-reszponzív DNS szakaszokhoz (Heat Shock-responsive DNA Elements, HSE), hogy a megfelelő hősokk-fehérjék átíródását fokozzák. A HSF1 homotrimer minden DNS-kötő doménje egy nGAAn pentamer szekvenciát ismer fel, mely a hélix-turn-hélix szerkezet miatt alternálva kell, hogy elhelyezkedjen (pl. 5'-nGAAnnTTCnnGAAn-3'). [20]–[23]

A HSF1 fehérje szerkezetileg több alegységből épül fel, melyek mind más-más funkcióval rendelkeznek. (4. ábra)

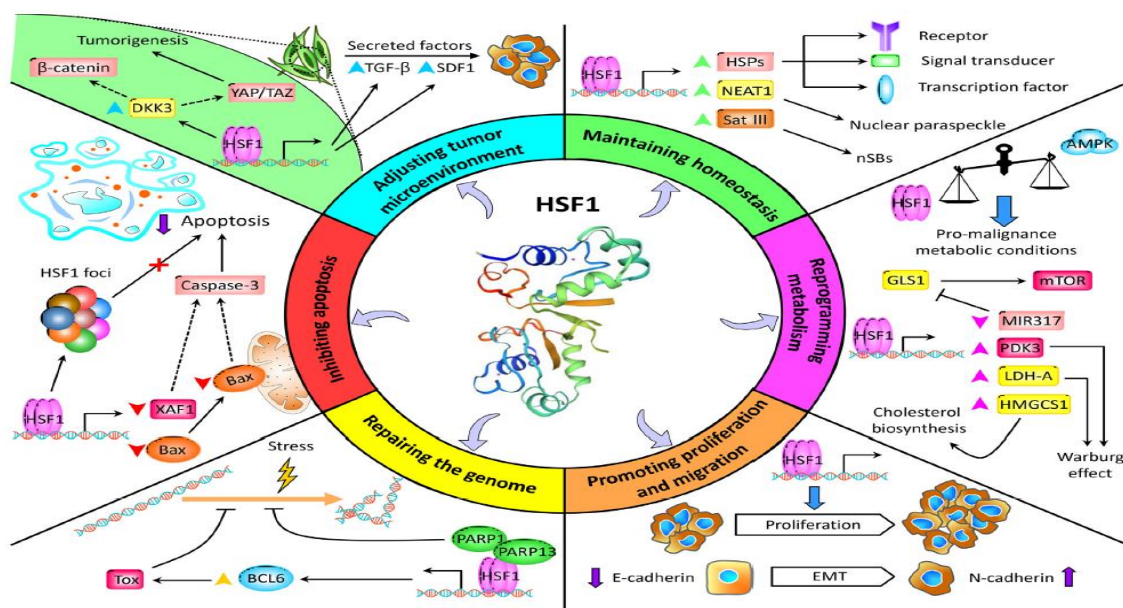


4. ábra: A HSF1 felépítése. DBD=DNS Binding Domain, LZ1-3 és 4=Leucine Zipper Domain, RD=Regulatory Domain, TAD=Trans-Activation Domain (PDB: 5D5U)

Az első a DNS-kötő domain (DBD), mely kb. 100 aminosavból álló egység az N-terminális közelében. Ez a rész kötődik a DNS HSE-hez. Ezt követik az oligomerizációs domének (Leucin Zipper Domain, LZ1-3 és 4), melyek a monomerek közötti kapcsolatért és a trimerizálódásért felelősek. Normál körülmények között az LZ1-3 interaktál az LZ4 alegységgel, megakadályozva az oligomerizációt. Az LZ1-3 és LZ4 közé beékelődve található a regulációs alegység (Regulatory Domain, RD), melynek funkciója és működése még nem egyértelműen tisztázott, mivel elsősorban rendezetlen aminosavak építik fel, melyeknek nehéz a vizsgálata. [24] Ugyanakkor kimutatták, hogy ennek az alegységnek a fő feladata a következő alegység szabályozása (negatív kontrollja, repressziója). Ez az alegység a transz-aktivációs rész (Trans Activation Domain, TAD), mely közvetlenül a C-terminális előtt található kb. 150 aminosav. Két részre osztható: TAD1 és TAD2. Előbbi közvetlenül interakcióba lép a DNS-sel és segíti a HSF1 kötődését, utóbbi pontos funkciója még tisztázatlan, azonban azt már kimutatták, hogy a HSP70 itt kötődik a HSF1-hez. [25]

1.2.1. HSF1 TARGET GÉNJEI

Az irodalom jelen állása szerint a HSF-1 számos target génjét azonosították *S. cerevisiae*, *C. elegans*, *D. melanogaster*, *M. musculus*, *R. norvegicus* és humán sejtvonalakban. Az irodalomban elérhető ma már az irodalmi adatokon alapuló kiterjedt adatbázis (HSF1base) a HSF-1 eddig leírt targetjeiről. Ezek a gének az alábbi folyamatokban játszanak szerepet: sejtciklus, apoptózis, cirkadián ciklus („napi biológiai óra”), immunválasz, öregedési folyamatok, rákos betegségek, neurodegeneratív betegségek. [26] Az alábbi ábra vázlatosan mutatja be a HSF-1 sokoldalúságát. (5. ábra) [27]



5. ábra: A HSF1 target géneinek vázlatos csoportosítása [27]

1.2.2. HSF1 ÉS AZ OXIDATÍV STRESSZ

Az oxidatív stresszre adott sejtválasz nagyban hasonlít a hősokk esetén tapasztalt jelenségekkel. Mint korábban már utaltunk rá, nem csak hősokk indíthatja be az UPR-t és HSR-t. Laboratóriumi körülmények között H_2O_2 hozzáadására is ugyanúgy bekövetkezett a HSF1 homotrimerizálódása. [28] Két cisztein oldalláncot is azonosítottak a HSF1 DNS-kötő doménjében (Cys35 és Cys105), melyek szerinné alakulása megakadályozza a homotrimerizációt és így a DNS-hez kötődést. A mutáns C35S és C105S HSF-1 fehérje a citoplazmában lokalizálódik és nem képes a sejtmagba transzlokálódni az oxidatív stresszt követően. Ez arra enged következtetni, hogy ezen Cys oldalláncokon keresztül a HSF1 képes érzékelni a környezete redoxi állapotát, ami a fehérjék szerkezetét is nagyban befolyásolja, hiszen az oxidatív stressz képes kicsapni a fehérjéket. [29], [30] Kimutatták, hogy az oxidatív stressz elsődleges szabályzójaként funkcionáló NRF2 (Nf E2-related factor 2) – ami a reaktív oxigéntartalmú anyagok elleni védekezéshez szükséges gének transzkripcióját szabályozza – és a HSF1 target génjei között számos közös pont található. Ilyen fehérjék például a HMOX1 (hemoxigenáz) és SQSTM1 (sequestosome)/p62, az ATF3 vagy a HSPA1A/B/L (HSP70). [31]–[36] Ez alapján úgy tűnik, hogy a két transzkripció faktor együtt tud működni a proteosztázis helyreállításában. Bizonyos kisméretű HSP-k (HSP25, HSPB5) – avagy sHSP-k – ismertén részt vesznek a sejtek redox potenciáljának fenntartásában, jelen esetben az oxidatív stressz okozta károk mérséklésében azáltal, hogy a megnövekedett koncentrációjuk miatt emelkedik az antioxidáns glutation (GSH) koncentrációja. Ez fokozott glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz (G6PD) aktivitást eredményez, ami a GSH szint helyreállításában fontos. Mind az NRF2 és a HSF1 pozitívan befolyásolja ezek átíródását. [37]

1.2.3. AUTOFÁGIA ÉS A HSF1

Az autofágia, más néven a sejt önmérsztése, egy szigorúan szabályozott ön-degradációs mechanizmus eukarióta sejtekben, melynek során a sejtplazma bizonyos részei lizoszómákba kerülnek és enzimek lebontják őket. Ez a folyamat nagyon fontos a sejt proteosztázisának fenntartása érdekében, mivel biztosítja a makromolekulák megújulását, a hibás és toxikus proteinek lebontását. A sejtet ért stresszt követően természetesen az autofágia is fokozódik. Kimutatták, hogy a Karboplatin tumorellenes szerrel kezelt rákos sejtekben fokozódott az autofágiához köthető proteinek mennyisége, mely nem történik meg a HSF1 hiányában. A karboplatin képes indukálni a HSF1-et, amely hozzáköt az *Atf7* autofágiáért felelős gén regulációs régiójához, így képes közvetlenül hatni az autofágiára felszabályozva bizonyos *Atg*

géneket. [38] A SQSMT1/p62, mely a szelektív autofágiában játszik szerepet bizonyos szubsztrátoknak az autofágia helyszínére történő szállításával, szintén HSF1 targetnek bizonyult. Ennek felszabályozásával elősegíti a protein aggregátumok kiürülését a sejtéből. A tanulmány szerint a HSF1 gátlása blokkolta az autofagoszómák képződését és így a hibás térszerkezetű, sérült fehérjék lebontását. [33]

1.2.4. A HSF1 KLINIKAI JELENTŐSÉGE

A HSF1 által hőshock hatására aktivált gének eltérést mutatnak egészséges és rákos sejtek esetében. Ez lehetővé teszi a rákos sejtekre jellemző génpanel felállítását, melynek segítségével kiszűrhetővé válik, az amúgy csak nagyon nehezen kimutatható, visszaesésre való hajlam. A vizsgálatok alapján a három leggyakoribb ráktípus esetében (mell-, vastagbél- és tüdőrák) összefüggés van a HSF1 által aktivált gének, vagyis a génpanel és a kiújulásra való hajlam és a súlyosabb végkimenetel között. Az, hogy a rákos sejtek egyedi módon használják a HSF1-et, lehetőséget teremt kimutatási és terápiás módszerek fejlesztésére. [39] Ezekben az esetekben a HSF1 csendesítése vagy gátlása negatívan érintheti a rákos sejteket.

Léteznek olyan betegségek, melyek esetében éppen ellenkezőleg az HSR indukciója lenne előnyös. Egy ilyen betegség a Huntington-kór, mely egy gyógyíthatatlan idegrendszeri betegség (többnyire örökletes) és bizonyos degenerált fehérjék sejtkárosító hatásán alapszik. A legújabb vizsgálatok kimutatták, hogy az ebben a betegségben szenvedők bizonyos sejteiben a hőshockválasz és a HSF1 szintje is alacsonyabb az egészséges szintnél, ami megmagyarázhatja miért nem tudnak a beteg sejtek jól reagálni különböző stresszekre, és miért sokkal súlyosabbak bizonyos betegségek hatásai rájuk. [40]

Tanulmányok kimutatták, hogy az HSR hosszabb ideig tartó fennállásának bizonyos prion betegségek esetében is szerepe van. A prionok olyan hibásan feltekeredett stabil fehérjék, amelyek át tudják adni a hibás feltekeredésüket más hasonló, de amúgy helyes szerkezetű fehérjéknek. Jelen tudásunk szerint ezek a prionok a felelősek a szivacsos agyvelőelfajulásért (köznyelven kergemarhakórként ismert tünetegyüttes). [41] Mivel ez a betegség hibás térszerkezetű fehérjék jelenlétén alapszik, felmerül az UPR válaszon keresztül történő beavatkozás lehetősége elsősorban a fertőzött sejtek célzott eliminációjával.

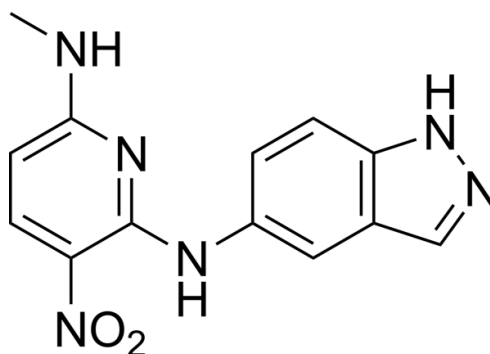
1.2.5. HSF1 INHIBÍCIÓ

A transzkripciós faktorok közvetlen gátlása kifejezetten nehéz feladat, mivel az irodalomban kevés vagy semennyi információ áll rendelkezésre specifikus természetes inhibitoraikról és így az erre specifikus dedikált kötőhelyekről. Az inhibíció megvalósítására genetikai és farmakológiai megközelítésekkel is próbálkoznak. [42]

A genetikai megközelítésben small hairpin RNS (*shRNS*) szekvenciát klónoznak expressziós vektorokba, melyek sikeresen veszik célba a *HSF1* mRNS-t és csendesítik azt különböző sejttípusokban. [42], [43] Az *shRNS*-t kódoló és nem-kódoló oligonukleotid láncok szekvenciáját általában adeno- vagy lentivirális vektor-rendszerrel transzfektálják expressziós sejtvonalakba. [44] A célsejt megfertőzése után azok elkezdik expresszálni az *shRNS*-t, ami hozzáköt a *HSF1* mRNS-hez, megakadályozza annak transzlációját és így csökkenti a sejt *HSF1* termelését. Ez a módszer sikeresen csökkentette humán rákos sejtvonalakban a *HSF1* szintjét. [45] Egy másik megközelítés szerint az adott sejttípusban a domináns-negatív *HSF1* mutánsokat felszaporítják, ami többnyire génmérnökség terméke, és ezek így „felhígítják” a *HSF1* transzkripciós potenciálját. Továbbá, a fehérjemérnökség eszközeivel lehetőség van olyan kötőhely(ek) kialakítására, mely(ek)hez egy adott ligandum kötődése segíti vagy gátolja a *HSF1* célgénnek átíródását. [46] Ugyanakkor komoly korlátai vannak ezeknek a módszereknek a felhasználhatóságukat illetően. A virális transzdukción alapuló eljárásokról ismert, hogy nem túl jó a hatékonyságuk, és cserébe sok nemkívánt mellékhatással járhatnak. Ezen kívül az FDA és a WHO sem támogatja a virális vektor alapú géntranszfer vagy csendesítés embereken történő alkalmazását. [47]

A farmakológiai megközelítések egyrészt a direkt kötődést, másrészt az indirekt hatás csökkentést igyekeznek elérni. Ezek közül számos jelölt már tesztelve lett különböző szöveteken vagy akár már a klinikai tesztelésben van. Az első, természetes eredetű inhibitor a kvercetin volt, mely számos biológiai aktivitása mellett alkalmasnak bizonyult a hőstressz általi HSP70 expresszió gátlására is. A hatásmechanizmusa a transzkripciós faktor hősokk szekvenciához (HSE) való kötődésének blokkolásán alapul. A felhasználhatóságát ugyanakkor nagyban csökkenti, hogy kifejezetten nagy koncentrációban (0,5 mM) kell alkalmazni a *HSF1* aktivitás csökkentése érdekében. [48] Egy másik, nagyon hasonló, ám hatásosabb jelölt a Streszenin B. [49] Az egyik legerősebb természetes eredetű *HSF1* inhibitor a triptolid, ami egy diterpén triepoxid, azonban a gyógyászatban való felhasználhatóságát csökkenti toxicitása és vízben való nehéz oldhatósága. [50], [51] Ezeken kívül az utóbbi években még számos más,

ígéretes jelöltet találtak. [52] A második nagy kategória a szintetikus inhibitorokat foglalja magában. Az első ezek közül a KNK437 volt, mely hatásosabb és kevésbé toxikus, mint a kvercetin és szintén a HSF1 és a HSE interakciójának gátlásán alapul. [53] A nagy áteresztőképességű screenelési módszerek fejlődésével lehetővé vált különböző kémiai és szintetikus könyvtárak vizsgálata. Így találtak rá az NZ28-ra, illetve annak nem toxikus variánsára, az emuninra. Ezek a hősokk fehérjék termelését gátolják. [54] Az első, közvetlenül a HSF1-hez kötődő inhibitor a KRIBB11 piridindiamin volt, melyet szintén screeneléssel találtak szintetikus könyvtárakban. (6. ábra) A KRIBB11 meggátolja, hogy a szabályozó DNS-szakaszhoz bekötődött HSF1 -hez hozzákapcsolódjon a transzkripció iniciációhoz szintén nélkülözhetetlen p-TEFb fehérje. A KRIBB11 azóta már elérhető a különböző gyártóknál. [55] Az ezt követő években sorban találtak újabb lehetséges inhibitorokat, azonban ezek többsége csak indirekt módon tudja gátolni a HSF1 aktivitását, máig csak a KRIBB11 és az IHSF115 nevű újabban létrehozott molekula tud közvetlenül kötödni a HSF1-hez. [56]



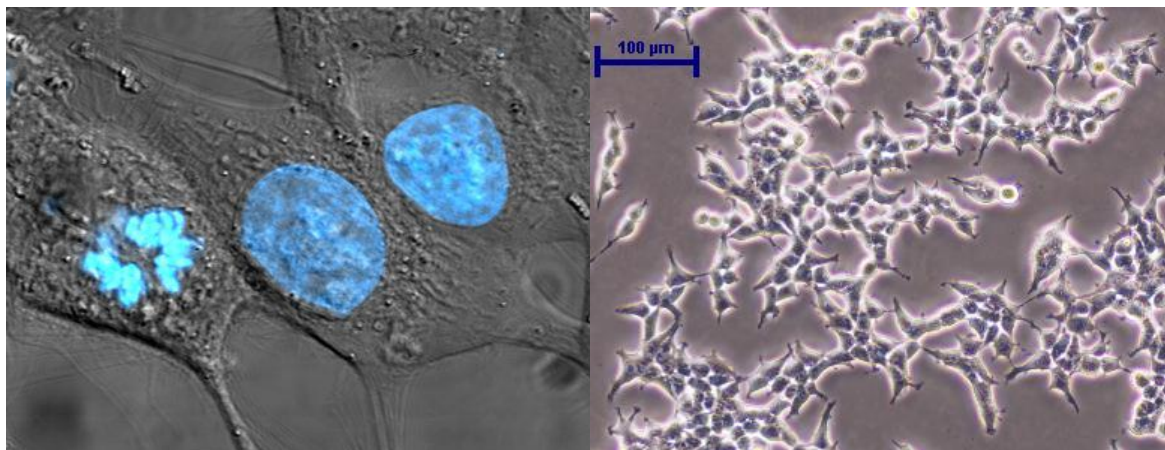
6. ábra: KRIBB11 szerkezete (CAS No.: 342639-96-7)

1.3. HUMÁN SEJTKULTÚRÁK

A sejtkultúrák a sejtbioológiai kutatásokban fontos, viszonylag könnyen kezelhető modellrendszerek. A sejteket *in vitro* növesztjük és fenntartjuk megadott, szigorúan szabályozott körülmények között. Ezzel a módszerrel egy sokkal egyszerűbb környezetben vizsgálhatjuk a sejtek adott folyamatait. Lehetőségünk van elsődleges (ún. primer) sejt- és szövetkultúrák létrehozására, illetve rendelkezésünkre állnak immortalizált sejtvonalak is. A primer sejtkultúrák esetében magából az élő állatból/emberből eltávolított szövet lesz az, amit elkezdünk fenntartani. Ennek előnye, hogy közvetlenül a kívánt sejteket/szövetet vizsgálhatjuk mind sejttypus, fiziológia és egyéb szempontokból. Ezen kívül a primer kultúrákból származó eredmények sokkal jobban extrapolálhatók a valós szöveti környezetre. Ugyanakkor ez a fajta sejtkultúra számos hátránnyal is rendelkezik. A primer kultúrák élettartama meglehetősen limitált, melyet nagyban befolyásol, hogy az élőlény milyen idős volt, amiből a sejtek származnak. Ezen kívül a leggondosabb mintavétel mellett is sokkal heterogénebb lesz a kapott sejtkultúránk, ami nehezíti a reprodukálható eredmények kinyerését. [57] Az immortalizált sejtvonalak ezzel szemben homogén, genetikailag azonos populációt alkotnak, ráadásul kiterjedt szakirodalommal rendelkeznek. Széles körben használják őket modellorganizmusként biokémiai, sejtbioológiai vagy emlőssejtes kísérletekben. [58] Legnagyobb előnyük az immortalitásuk, vagyis korlátlan ideig fenntarthatók megfelelő körülmények között. Ezen kívül alkalmasak adott funkcióval bíró klónok előállítására, gyógyszer- és fehérjemolekulák termelésére. Természetesen az immortalizált sejteknek is megvannak a maguk limitációi. A korlátlan fenntarthatóság elérése érdekében sok mutáción kell átesniük, ami megváltoztathatja a sejt biokémiai tulajdonságait, genetikai információit. [59]

Számos különböző eredetű immortalizált sejtvonallról tudunk napjainkban. Az egyik első ilyen a 3T3 egér embionális fibroblaszt volt, mely egy fenntartott egér embrió szövetben létrejött spontán mutáció eredménye. Egy robosztus, könnyen kezelhető sejt. [60] Az egyik legismertebb immortalizált, humán eredetű sejtvonala a HeLa egy Henrietta Lacks nevű páciens méhnyakrákjából lett izolálva. Ez a sejt azért különleges, mert szemben a legtöbb immortalizált törzsszel, ez szuszpenziós kultúrában is fenntartható, ugyanakkor körültekintést igényel, mert képes megfertőzni más sejtvonalatokat. [61] Stabil génexpressziót tesz lehetővé és kiváló különböző protein expressziós rendszerek létrehozására a CHO (Chinese Hamster Ovary) sejtvonala, mely hőrcsög méhsejtekből lett immortalizálva. Gyakran használják sejt-kommunikációs és rekombináns fehérjéket vizsgáló kísérletekben. [62] A HEK-293/HEK-293T egy spontán elvetélt humán embrió embrionális vese sejtjeiből lett kitenyésztve. Széles

körben használják expressziós rendszerként, mivel könnyű transzfektálni. Sejtkommunikáció és rekombináns fehérjetermelés vizsgálatára használják a legtöbbször. [63] A HT-1080 sejtvonalat egy rákos férfi fibroszarkómájának szövettani vizsgálata során izolálták és napjainkban gyakran használják orvosbiológiai kutatásokhoz. [64]



7. ábra: Balra HeLa sejtek (DNS Hoechst-tel megfestve) [WikiMedia], jobbra HEK293T sejtek. [saját kép]

Több különböző módszer is lehetséges immortalizált sejtvonalak előállítására. [65] Ezek közül a legelső, hogy egy spontán mutáció eredményeként természetesen létrejött sejtet izolálnak. Erre a legjobb példát a HeLa sejtek adják. Lehetőségünk van arra is, hogy egy virális gént juttatunk a sejtekbe, ami részlegesen félreszabályozza a sejtciklust. Ez a módszer vezetett a HEK-293 sejtek létrejöttéhez, ahol az adenovírus type-5 E1 gént juttatták a sejtbe. [66] Az immortalizálás elvégezhető bizonyos fehérjék mesterséges kifejezésével is: olyan telomeráz enzimeket kell expresszáltatnunk a sejtekben, amik megakadályozzák a kromoszómák telomer régióinak degradációját a replikáció során. [67] Végül pedig elvégezhető az immortalizálás hibridóma módszerrel is, vagyis egy antitest termelő B sejtet fuzionálnak egy myelóma sejttel (rákos B sejt). Ezt a módszert használják az immortalizált antitesttermelő B sejtek előállításához. [68]

2.CÉLKITŰZÉSEK

A HSF1 napjaink egyik igen intenzíven kutatott transzkripciós mester-regulátora, mely részt vesz a sejt plazmából induló hősokk válaszban, azonban számos szakirodalmi eredmény támasztja alá, hogy ennél sokkal kiterjedtebb a szerepe. Jelen kutatási témában arra keressük a választ, hogy a HSF1 – jól ismert funkcióin túl – vajon szerepet játszik-e az endoplazmás retikulumból kiinduló UPR (*unfolded protein response*, hibás térszerkezetű fehérje válasz) szabályozásában. Munkánk közvetlen előzménye, hogy bizonyos UPR-komponensek aktivációja HSF1-függést mutat *Ceanorhabditis elegans* fonalféreg modellben (Dr. Barna János, ELTE Genetika Tanszék, nem publikált eredmények). Annak kiderítésére, hogy ez az új, a szakirodalomban eddig nem jegyzett molekuláris kapcsolat univerzálisnak tekinthető-e, célul tűztük ki a kérdés vizsgálatát humán eredetű sejtenyészetekben.

Ennek részeként:

- Humán sejtvonalakat (HEK-293T, HT-1080) stresszhatásnak teszünk ki: hőstressz és kémiai (tunikamicin) stressz
- a sejtbioológiai folyamatok dinamikájának jobb megértése érdekében több eltérő idejű kezelést is kivitelezünk
- a sejteket feltárva totál-RNS-t izolálunk, qPCR-módszerrel meghatározzuk a legfontosabb UPR-marker gének transzkriptum szintjeit, melyből a génkifejeződés mértékére következtethetünk
- a kísérleteket HSF1 gátlószer (KRIBB11) alkalmazása mellett is elvégezzük
- vizsgáljuk a sejtek túlélését mikroszkópos és flow-citométeres technikákkal

Eredményeink hozzájárulhatnak a HSF1 regulátor-funkciójának jobb megértéséhez, új molekuláris kapcsolatok felderítéséhez, mely az alapkutatás és az orvostudomány számára is előrelépést jelenthet.

3.ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. SEJTTENYÉSZTÉSI MŰVELETEK

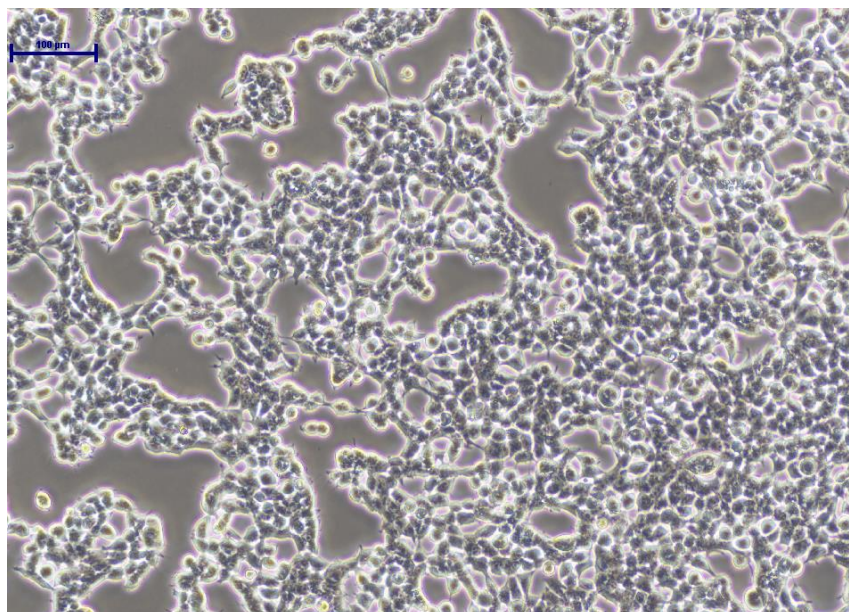
Kísérleteinkhez humán sejtvonalakat használtunk: HT-1080 és HEK-293T, melyeket mi tartottunk fent és kezeltünk a kísérleteink során. Az említett sejtvonalak és a fenntartásukhoz szükséges anyagok és eszközök, berendezések rendelkezésünkre álltak a laboratóriumban.

3.1.1. SEJTEK FENNTARTÁSA, PASSZÁLÁSA

Az általunk használt sejtvonalak mind humán eredetűek, így a velük való munka különös odafigyelést és steril körülményeket igényel. A sejtek fenntartásához magas glükóz tartalmú Dulbecco féle módosított Eagle médiumot (DMEM - high glucose) [69] használtunk 10% FBS (Fetal Bovine Serum) hozzáadásával. A sejteket 37 °C-ra temperált inkubátorban tartottuk 5% CO₂-ot tartalmazó atmoszférában. Mindkét vonal esetében a fenntartást T25-ös flakán végeztük, passzáláskor 500 ezer sejtet oszlattunk el 5 mL tápoldatban. A passzálásokat minden héten hétfőn és csütörtök délután vagy péntek reggel végeztük. Így jellemzően 4-7 millió sejt keletkezett egy T25-ös flakán. A kísérletekhez ennél több sejtre volt szükség, így ekkor péntekenként egy T75-ös flakára ültettünk le 1,5 millió sejtet 15 mL médiumban, majd az így képződött 8-14 millió sejtől passzáltunk a következő hétfőn 500 ezer sejtet fenntartásra és további 500 ezret az egyes kísérletekhez előkészített 60mm-es Petri csészékre. Passzáláskor 2x 1 mL PBS oldattal történő mosás után – adherens sejtekről lévén szó –, a T25-ös flaska esetén 500 µL, T75-ös flaska esetén 1 mL 0,25 %-os tripszin oldattal értük el, hogy a sejtek feljöjjenek a flaska aljáról. 5 perc termosztátban történő inkubálást követően 2x térfogatú DMEM+10%FBS médium hozzáadásával inaktiváltuk az enzimet és szuszpendáltuk a sejteket.

3.1.2. SEJTEK MIKROSZKOPIZÁLÁSA

A sejteket passzálás előtt és után, illetve a kezelések előtt és után mikroszkópon ellenőriztük, illetve egyes festési eljárások során is mikroszkópon vizsgáltuk a sejtek festődését. A laborban rendelkezésünkre állt egy Nikon® Eclipse Ts2R-FL készülék, hozzá tartozó Nikon® Elements gyári szoftverrel, EPI-fluoreszcenciás egységgel és DS-Qi2 kameramodullal. A benövés ellenőrzését 10x vagy 20x nagyításon végeztük (2,5x okulár, 4x vagy 8x objektív). (8. ábra)



8. ábra: HEK293T sejtek 20x nagyítású képe [saját kép]

3.1.3. SEJTSZÁMLÁLÁS

A flaskákban található sejtek számlálását egy Beckman Coulter® CytoFLEX Flow Cytometer és hozzá tartozó CytExpert Acquisition szoftver segítségével végeztük. A készülék két irányból vizsgálja a sejteket azok fényszórása alapján: előlről (előre szórás, FSC – forward scatter) és oldalról (oldalszórás, SSC – side scatter). Előbbi a sejtek méretével arányos, utóbbi pedig azok granularitásától függ. Az egészséges, élő sejtek meghatározott FSC-SSC értéktartományba esnek. A sejtörmelékek és a halott sejtek visszavert fény intenzitása pedig alacsonyabb és/vagy az egyik tengely felé hajlik. A visszavert fényintenzitások csúcsmagassága (H), vagy csúcs alatti területei (A) alapján is végezhetjük a szoftveres kiértékelést, mi a csúcsok alatti területeket tekintettük relevánsabbnak (SSC-A és FSC-A tengelyek). Az elemzést különböző hullámhosszokon is elvégezhetjük, ezáltal lehetőségünk van festési eljárások használatára és elemzésére. A számláláshoz 200 μL sejtszuszpenziót helyeztünk a készülékbe, ami 50 μL -t áramoltatott át a detektoron (a felesleg alkalmazására a holtter miatt van szükség). A mérés végeztével a készülék megadta az összes áthaladt sejt/sejtörmelék számát event/ μL egységben, illetve a beállított pont-diagram kapuk alapján külön az élő sejtek számát szintén event/ μL mértékegységben. Ez alapján visszaszámolható, hogy az eredeti szuszpenzióban mennyi élő sejt található. Általában a HT-1080 esetében 3200-3500 event/ μL , a HEK-293T esetében 4000-5000 event/ μL értékeket mértünk. (8. Függelék)

3.1.4. SEJTEK KEZELÉSE

A kísérletekhez különböző hő- és kémiai stresszeknek tettük ki a sejteket, illetve inhibitort is alkalmaztunk. A kísérleteket 60 mm-es petri-csészében vagy 6-zsebes tenyésztőedényben (6-well platen) végeztük, melyekre 3 mL médiumban 500 ezer sejtet ültettünk le a kísérletet megelőző napon. Ezt egy nap 37 °C-on 5% CO_2 -t tartalmazó atmoszférában inkubálás követte.

A hőstressz-kísérletekben egy kontroll (K) mintát és mellette 2-3 kísérleti mintát helyeztünk különböző hőmérsékletre termosztált inkubátorokba. A kontroll minta a kísérlet teljes időtartama alatt 37 °C-ra termosztált inkubátorba került 5% CO_2 atmoszférában, míg a hőstressznek kitett minták hasonló atmoszférában 42 °C-ra termosztált inkubátorba kerültek a kísérletnek megfelelő 1, 2 vagy 3 órára (1h, 2h, 3h).

A kémiai stresszt tunikamicin (TunM) (Sigma-Aldrich®, T7765-5MG, CAS No.: 11089-65-9) hozzáadásával értük el. A tunikamicin egy molekuláris biológiai kísérletekben széles körben használt kezelőszer az UPR indukálására, mivel gátolja az N-glikozilációt és megállítja a sejtciklust a G1 fázisban. Mivel így a fehérjék nem tudják befejezni az érési folyamatukat, az ER lumenjében maradnak, felhalmozódásuk kiváltja az UPR^{ER} -t. [11] Itt a korábbiakhoz hasonlóan egy kontroll (K) minta mellett több különböző ideig kezelt mintát vizsgáltunk. A TunM kezeléshez 500 µg/mL törzsoldatból 30 µL került mindegyik Petri csészére (végkoncentráció 5 µg/mL). Mivel a TunM DMSO-ban volt feloldva, így a K mintákhoz is hozzáadtunk 30 µL DMSO-t.

A HSF1 gátlását KRIBB11 inhibitor (Sigma-Aldrich®, 385570-10MG, CAS No.: 342639-96-7)) hozzáadásával értük el. Ehhez 10 mM-os törzsoldatot készítettünk, melyből 3 µL-t tettünk minden érintett Petri csészére (végkoncentráció 10 µM). Mivel az inhibitor is DMSO-ban volt feloldva, így a kontroll Petri csészékbe 3 µL DMSO oldatot tettünk. Ezt követően a Petri csészéket visszahelyeztük a 37 °C-os inkubátorba (5% CO_2) 1 órára, hogy az inhibitor kifejtsen a hatását. A hőstressz vagy a tunikamicin kezeléseket – az adott kísérleti elrendezés szerint – ezt követően kezdtük csak meg.

3.2. RNS IZOLÁLÁS

Ahhoz, hogy mérhetővé tegyük a számunkra releváns RNS-eket, a sejteket előbb fel kell tárnunk, majd a sejtlyázumból izolálnunk kell az összes RNS-t. A kísérletekben kezelt sejteket (Petri csészéket) megvizsgáltuk mikroszkóp alatt, hogy a sejtek élnek-e, nem jöttek-e fel. Ezután az RNS izolálást NucleoSpin® [70] gyári protokoll alapján végeztük gyári oldatok és kolonnák segítségével.

NucleoSpin® RNA Plus				
1	Homogenize sample and lyse sample			350 µL LBP
2	Remove gDNA and filtrate lysate			11,000 x g, 30 s
3	Adjust RNA binding conditions			100 µL BS Mix
4	Bind RNA			Load sample 11,000 x g, 15 s
5	Wash and dry silica membrane		1 st wash	200 µL WB1
			2 nd wash	600 µL WB2
			3 rd wash	250 µL WB2
			1 st and 2 nd	11,000 x g, 15 s
6	Elute RNA		3 rd	11,000 x g, 2 min
				30 µL RNase-free H ₂ O 11,000 x g, 1 min
				30 µL RNase-free H ₂ O 11,000 x g, 1 min

9. ábra: Macherey-Nagel® NucleoSpin RNS izolálás gyártói protokollja. A feltüntetett oldatok a gyári kit-ben található oldatok.

Az így nyert összes RNS koncentrációját Thermo Scientific™ NanoDrop One/OneC spektrofotométeren mértük, mely csupán 1µL mintaoldatból is képes abszorbanciákat mérni. Az RNS koncentráció jellemzően 100 és 2000 ng/µL között változott.

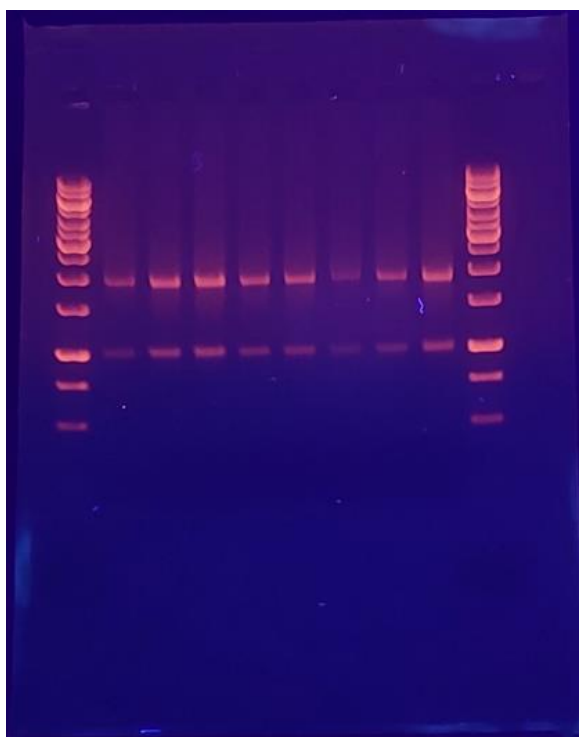
3.3. RNS TISZTASÁG ELLENŐRZÉSE, AGARÓZ GÉLELEKTROFORÉZIS

Az izolált RNS-ek tisztaságát, intaktságát agaróz gélelektroforézissel vizsgáltuk. Ehhez az RNS oldatokat 100 ng/ml etídium-bromid tartalmú, 1%-os agaróz-TBE gélben elektroforetizáltuk, majd a géleket UV-fényben vizsgáltuk. Az RNS-minták mellett méretbeli viszonyításhoz Invitrogen™ 1 Kbp DNA ladder-t is felvittünk a gélekre.

1. táblázat: Az agaróz géltre felvitelhez összeállított oldatok összetétele. Minden zsebbe 10 μL oldatot vittem fel.

Komponens	Térfogat (μL)
RNS oldat	3
10x loading dye	1
dH_2O	11
Σ	15

A gélelektroforézist 1 órán keresztül végeztük 60 V állandó feszültség mellett. Az RNS preparátum akkor tekinthető megfelelőnek, ha UV alatt a gélen 2 fő csíkot látunk a mintáknál: a riboszóma két abundáns RNS-féleségét (28S és 18S rRNS). Amennyiben a minta RNÁzzal szennyezett, ez a két csík nem különül el. A számunkra fontos mRNS-ek az elmosódott sávokban találhatók.



10. ábra: HT/8 kísérlet agaróz gélelektroforézis eredménye. [saját kép]

3.4. cDNS SZINTÉZIS

Kísérleteinkben az izolált RNS preparátumok bizonyos RNS-einek mennyiségi viszonyaira vagyunk kíváncsiak, melyekre specifikus PCR primerek állnak a rendelkezésünkre. Ezek viszont csak cDNS templát szolgál tudnak kapcsolódni, így előbb cDNS-t kell szintetizálnunk az RNS-ekről reverz transzkripcióval. Ehhez Thermo Scientific™ RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kitet használtunk. A kísérleteink során mindig közel azonos össz-RNS mennyiségből végeztük a cDNS-szintézist, így a mintákban a templát cDNS-ek mennyisége is közel azonos lett, ami hozzájárul korrekt qPCR-eredmények kinyeréséhez.

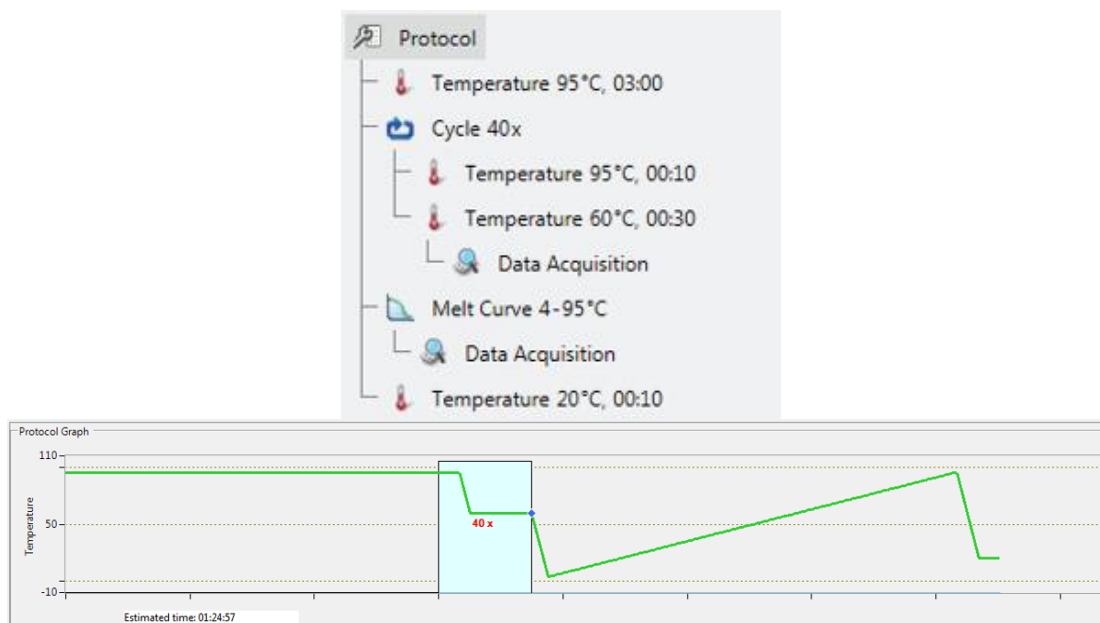
2. táblázat: cDNS szintézis elegy összetétele

Komponens	Térfogat (μL)
RNS oldat	2 μg (változó térfogatban)
dNTP MIX (10mM)	4
RT Reverse Transcriptase	1
oligo(dT) primer (100 μM)	2
5x puffer	8
dH_2O	kiegészíteni végtérfogatra
Σ	40

A cDNS szintézist 1 órán keresztül 42 °C-on végeztük, majd 10 percre 70 °C-ra emeltük a hőmérsékletet, hogy inaktiváljuk a reverz transzkriptázt. Az így elkészült mintákat -80 °C-on tároltuk felhasználásig.

3.5. KVANTITATÍV MÉRÉSEK, REAL-TIME PCR

A kísérleteinkben felhasznált sejtekben termelődött, általunk vizsgált RNS-ek relatív mennyiségére közvetett módon tudunk következtetni kvantitatív real-time PCR (qPCR) segítségével. A már említett módon átírt cDNS-ek, különböző génspecifikus primer párok, DNS-polimeráz, dNTP-k, valamint interkalálódó fluoreszcens festék (SYBRE GREEN) jelenlétében lejátszódó DNS-polimerizáció során minden ciklusban detektálni tudjuk az össz-DNS mennyiségét (az egyes reakcióelegyekben mérhető fluoreszcencia intenzitás alapján). Minden minta minden egyes target-cDNS-ét külön-külön reakciókban mértük (singleplex PCR). Így – bár az alkalmazott fluoreszcens interkaláló festék nem szekvencia-specifikus –, csak az adott génspecifikus primerpár által kijelölt templárról képződő DNS-termékek mennyiségi növekedését tudjuk nyomon követni. A mérés során a fluoreszcencia növekedése elér egy küszöbértéket (threshold), melyhez feljegyezzük az aktuális ciklusszámot (C_t). Az összehasonlítható minták C_t értékeinek különbségéből következtethetünk a mintában jelen lévő cDNS arányokra: az egyes körülmények esetében a ΔC_t értékeket az adott primer és a belső kontrollként alkalmazott GAPDH primer esetében mért ciklusszám különbségeként kaptuk. Ezt követően a kontroll körülmény és a kísérlet egyes körülményeinél számított ΔC_t értékek különbsége adta a $\Delta\Delta C_t$ értékeket (delta-delta C_t módszer). Ebből a $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -t kiszámítva megkapjuk, hogy a kontroll körülményhez viszonyítva hányszorosára változott az adott körülménynél az adott primerrel vizsgált RNS (cDNS) mennyisége. [71]

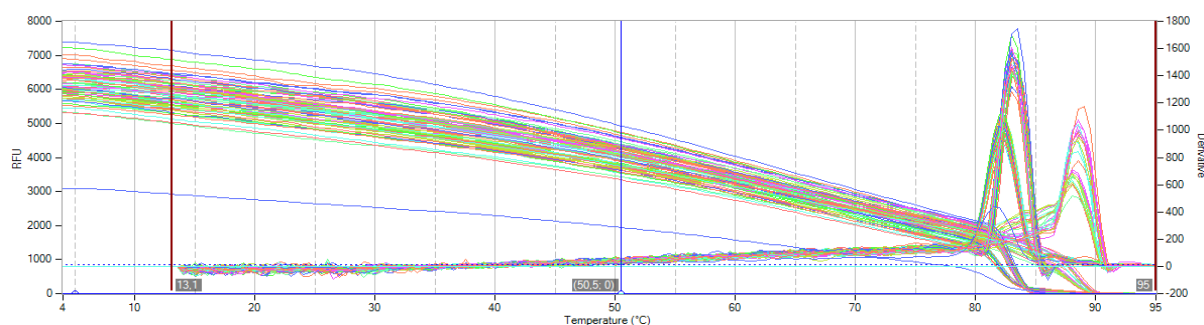


11. ábra: Az alkalmazott PCR protokoll. Az ampikonok felszorzása után felvesszük az olvadási görbéjüket.

3. táblázat: qPCR reakcióelegy összetétele a 96 well-platen egy wellben

Komponens	Térfogat (μL)
cDNS	1
forward primer (10 μM)	1
reverse primer (10 μM)	1
Applied Biosystems™ SYBR™ green master MIX (2x)	10
dH_2O	7
Σ	20

A PCR reakció lezajlása után a keletkezett ampikonok tisztaságának ellenőrzése érdekében megmértük az olvadási hőmérsékletüket (T_M). Az eredmények csakis abban az esetben elfogadhatóak, ha minden egyes reakcióban kizárólag az adott génspecifikus primerpár által kijelölt egy-féle termék keletkezett. Ez esetben az olvadásgörbe egycsúcsú, az olvadási hőmérséklet pedig az adott felszorzott DNS-fragmentre jellemző.



12. ábra: HEK/5 kísérlet PCR ampikonok olvadási görbéi és a dT/dt -k egy diagramon ábrázolva.

A mérések elvégzéséhez egy Thermo Fisher® PikoReal96 real-time PCR készüléket, hozzá való 96 well-platet, illetve a készülék gyári szoftverét használtunk. Az eredményekben a ciklusszámoknál három biológiai párhuzamos kísérlet átlagát vettük.

3.5.1. PCR PRIMEREK

A kísérletek kulcsfontosságú eleme, hogy a használt PCR primerek az adott génre specifikusak legyenek. A szakirodalomban talált információk alapján és a laborban korábbi kísérletekben használt saját tervezésű primereket a Sigma-Aldrich® gyártó készítette el számunkra.

- GAPDH: általánosan használt referencia, belső standardként használjuk
fw: 5'-TGCCCAGTTGAACCAGGCG
rev: 5'-CGCGGAGGGAGAGAACAGTGA
- HSP70:
fw: 5'-CCTCTACATTCATAAACTGCAACT
rev: 5'-CTGGCTGATGTCCTTCTTGTGT
- XBP1 spliced: úgy tervezve, hogy a kivágott intron melletti szekvenciákra illeszkedjen, így csak a hasított mRNS-t amplifikáljuk. [74]
fw: 5'-GCTGAGTCCGCAGCAGGT
rev: 5'-CTGGGTCCAAGTTGTCCAGAAT
- CHOP: [75]
fw: 5'-AGAACCAGGAAACGGAAACAGA
rev: 5'-TCTCCTTCATGCGCTGCTTT
- BiP: [75]
fw: 5'-TGTTCAACCAATTATCAGCAAACCTC
rev: 5'-TTCTGCTGTATCCTCTTCACCAGT

3.6. KÍSÉRLETI ELRENDEZÉSEK

3.6.1. BEVEZETÉS ÉS ELŐKÍSÉRLETEK

A kísérleti munka során két humán sejtvonalban, HEK293T-ben és HT1080-ban vizsgáltuk több kiválasztott marker mRNS szintjét, mely reményeink szerint visszajelzést ad adott gének expressziójáról és információval szolgál a vizsgált HSF1 és az UPR válasz közötti kapcsolatról.

Kísérleteink megkezdése előtt előkísérletekkel bizonyosodtunk meg az általunk használni kívánt sejtvonalak életképességéről, passzálhatóságáról, valamint a használni kívánt módszerek működőképességéről. Ennek részeként ellenőriztük, hogy a sejtek kellő ideig túlélnek-e a kijelölt hő- és kémiai sokk körülményeit, illetve a kontrollként alkalmazott kísérleti körülmények (például a kémiai sokk esetén a kezelőszer oldószere) valóban nem befolyásolják-e a sejtek túlélését. Ezeket a kísérleti elrendezéseket nem részletezzük jelen munkánkban.

Kísérleteinket HEK-n és HT-n kódnevek alatt futtattuk, ahol az n a kísérlet sorszáma, és a továbbiakban is ezen nomenklatura alapján hivatkozunk az egyes kísérletekre.

A kísérleteink általánosan az alábbi protokoll szerint zajlottak:

1. Hőstressz vizsgálata (HEK-5/6/7 és HT-3/4/5 kísérletek)
 - 1.1. Kísérleti elrendezés előkészítése (1. nap)
 - 1.2. Hőstressz alkalmazása és RNS izolálás (2. nap)
 - 1.3. cDNS szintézis és PCR (3. nap)
 - 1.4. Eredmények kiértékelése (4. nap)
2. Kémiai stressz (tunikamicin – TunM) vizsgálata (HT-6/7/8/10 kísérletek)
 - 2.1. Kísérleti elrendezés előkészítése (1. nap)
 - 2.2. Kémiai kezelés alkalmazása és RNS izolálás (2-3. nap)
 - 2.3. cDNS szintézis és PCR (3-4. nap)
 - 2.4. Eredmények kiértékelése (4-5. nap)

Ezen kívül további kísérletek elvégzésének szükségszerűségére is felfigyeltünk, melyeket későbbi munkának a részeként kívánunk elvégezni.

3.6.2. HŐSTRESSZ HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA

Először az irodalmi források alapján a hősokk hatására beinduló UPR választ vizsgáltuk. Ennek részeként különböző időtartamokra (1, 2, 3 és 4 óra) emelt hőmérsékletnek (42 °C) tettük ki a sejteket, majd feltárva őket megmértük a marker mRNS-ek relatív szintjeit. Ezen kívül vizsgáltuk, hogy hogyan változnak ezek a relatív expressziós szintek, amennyiben HSF1 inhibitor (KRIBB11) adunk a rendszerhez.

A méréseink előtt elvégzett előkísérletek alapján a HEK293 és HT1080 sejtek esetén is alkalmazhatunk 0-3 óra időtartamú 42 °C-os hőkezelést (HEK-0/1/2/3/4 és HT-0/1/2 előkísérletek). Ezek elrendezését külön nem részletezzük.

3.6.3. HEK-5 ÉS HT-3 KÍSÉRLET

Alkalmazott kísérleti elrendezés: 3 db 6-well plate, 500 ezer sejt / 3 mL médium / well

4. táblázat: A HEK-5/HT-3-ban alkalmazott kísérleti elrendezés vázlata. K=kontroll (37 °C, 3h), 2h=2 órás hősokk (42 °C, 2h), 2+1h= 2 órás hősokk majd 1 óra regeneráció (42 °C, 2h, 37 °C, 1h)

K			2h			2+1h		
HEK293	egyéb előkísérlet	HEK293 +inhibitor	HEK293	egyéb előkísérlet	HEK293 +inhibitor	HEK293	egyéb előkísérlet	HEK293 +inhibitor
HT1080	egyéb előkísérlet	HT1080 +inhibitor	HT1080	egyéb előkísérlet	HT1080 +inhibitor	HT1080	egyéb előkísérlet	HT1080 +inhibitor

Felhasznált sejtek:

- HEK-293T
- HT-1080

Inhibitor: 10 µM KRIBB11 + 1 óra inkubáció

Hősokk alkalmazása: kísérleti elrendezésnek megfelelően 37 és 42 °C inkubálás

RNS koncentrációk mérése: 3.2 fejezetben leírt protokoll szerint

cDNS szintézis: 3.4 fejezetben leírt protokoll szerint

PCR összeállítása: 3.5 fejezetben leírt protokoll szerint

└ vizsgált mRNS-ek: *GAPDH*, *Hsp70*, *Hsf1*, *Xbp1t/u/s*, *BiP*, *CHOP*

3.6.4. HEK-6 ÉS HT-4 KÍSÉRLET

Alkalmazott kísérleti elrendezés: 3 db 6-well plate, 500 ezer sejt / 3 mL médium / well

5. táblázat: A HEK-6/HT-4-ben alkalmazott kísérleti elrendezés vázlata. K=kontroll (37 °C, 3h), 2h=2 órás hő sokk (42 °C, 2h), 3h= 3 órás hő sokk (42 °C, 3h)

K			2h			3h		
HEK293	egyéb előkísérlet	HEK293 +inhibitor	HEK293	egyéb előkísérlet	HEK293 +inhibitor	HEK293	egyéb előkísérlet	HEK293 +inhibitor
HT1080	egyéb előkísérlet	HT1080 +inhibitor	HT1080	egyéb előkísérlet	HT1080 +inhibitor	HT1080	egyéb előkísérlet	HT1080 +inhibitor

Felhasznált sejtek:

- HEK-293T
- HT-1080

Inhibitor: 10 µM KRIBB11 + 1 óra inkubáció

Hő sokk alkalmazása: kísérleti elrendezésnek megfelelően 37 és 42 °C inkubálás

RNS koncentrációk mérése: 3.2 fejezetben leírt protokoll szerint

cDNS szintézis: 3.4 fejezetben leírt protokoll szerint

PCR összeállítása: 3.5 fejezetben leírt protokoll szerint

└ vizsgált mRNS-ek: *GAPDH*, *Hsp70*, *Hsf1*, *Xbp1t/u/s*, *BiP*, *CHOP*

3.6.5. HEK-7 ÉS HT-5 KÍSÉRLET

Alkalmazott kísérleti elrendezés: 3x4 db 60mm Petri, 500 ezer sejt / 3 mL médium / Petri

6. táblázat: A HEK-7/HT-5-ben alkalmazott kísérleti elrendezés vázlata. K=kontroll (37 °C, 4h), 2h=2 órás hő sokk (42 °C, 2h), 2+2h= 2 órás hő sokk, 2 órás regeneráció (42 °C, 2h, 37 °C, 2h)

K		2h		2+2h	
HEK293	HEK293 +inhibitor	HEK293	HEK293 +inhibitor	HEK293	HEK293 +inhibitor
HT1080	HT1080 +inhibitor	HT1080	HT1080 +inhibitor	HT1080	HT1080 +inhibitor

Felhasznált sejtek:

- HEK-293T
- HT-1080

Inhibitor: 10 µM KRIBB11 + 1 óra inkubáció

Hő sokk alkalmazása: kísérleti elrendezésnek megfelelően 37 és 42 °C inkubálás

RNS koncentrációk mérése: 3.2 fejezetben leírt protokoll szerint (. táblázat)

cDNS szintézis: 3.4 fejezetben leírt protokoll szerint

PCR összeállítása: 3.5 fejezetben leírt protokoll szerint

└ vizsgált mRNS-ek: *GAPDH*, *Hsp70*, *Xbp1s*, *BiP*, *CHOP*

3.7. KÉMIAI STRESSZ HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA

A HSF1 szerepének alaposabb felderítése érdekében más stressz hatásait is meg kívántuk vizsgálni az UPR válaszra. Ebben a fázisban tunikamicint (TunM) adtunk a tápközeghez, mint kémiai sokkot okozó anyagot, majd különböző időtartamokig inkubáltuk a sejteket. Ezt követően a korábbiakhoz hasonlóan feltártuk őket és megmértük a marker mRNS-ek relatív szintjeit. Ezen kívül itt is vizsgáltuk, hogy hogyan változnak ezek a relatív expressziós szintek, amennyiben HSF1 inhibitor (KRIBB11) is adunk a rendszerhez.

A méréseink előtt elvégzett előkísérletek alapján a HEK293 és HT1080 sejtek is kibírják az alkalmazandó anyagok oldószerét (DMSO) az alkalmazás koncentrációjában (HEK-7/8 és HT-5/6 előkísérletek). Ezek elrendezését külön nem részletezzük.

3.7.1. HEK-8 ÉS HT-6 KÍSÉRLET

Alkalmazott kísérleti elrendezés: 2x2 db 60mm Petri, 500 ezer sejt / 3 mL médium / Petri

7. táblázat: A HEK-8/HT-6-ban alkalmazott kísérleti elrendezés vázlata. K=kontroll (37 °C, 24h), 24h=24 órás TunM kezelés (37 °C, 24h)

K		24h	
HEK293	HT1080	HEK293	HT1080

Felhasznált sejtek:

- HEK-293T
- HT-1080

Inhibitor: 10 μ M KRIBB11 + 1 óra inkubáció

Kémiai kezelés: 5 μ g/mL TunM + inkubáció

RNS koncentrációk mérése: 3.2 fejezetben leírt protokoll szerint

cDNS szintézis: 3.4 fejezetben leírt protokoll szerint

PCR összeállítása: 3.5 fejezetben leírt protokoll szerint

└ vizsgált mRNS-ek: *GAPDH*, *Hsp70*, *Xbp1s*, *BiP*, *CHOP*

3.7.2. HT-8 KÍSÉRLET

Alkalmazott kísérleti elrendezés: 4x4 db 60mm Petri, 500 ezer sejt / 3 mL médium / Petri

8. táblázat: A HT-8-ban alkalmazott kísérleti elrendezés vázlata. K=kontroll (37 °C, 24h), 1h=1 órás TunM kezelés (37 °C, 1h), 2h=2 órás TunM kezelés (37 °C, 2h), 3h=3 órás TunM kezelés (37 °C, 3h)

K		1h		2h		3h	
HT1080	HT1080 +inhibitor	HT1080	HT1080 +inhibitor	HT1080	HT1080 +inhibitor	HT1080	HT1080 +inhibitor

Felhasznált sejtek:

– HT-1080

Inhibitor: 10 µM KRIBB11 + 1 óra inkubáció

Kémiai kezelés: 5 µg/mL TunM + inkubáció

RNS koncentrációk mérése: 3.2 fejezetben leírt protokoll szerint

cDNS szintézis: 3.4 fejezetben leírt protokoll szerint

PCR összeállítása: 3.5 fejezetben leírt protokoll szerint

└ vizsgált mRNS-ek: *GAPDH*, *Hsp70*, *Xbp1s*, *BiP*, *CHOP*

3.7.3. HT-9 KÍSÉRLET

Alkalmazott kísérleti elrendezés: 2x4 db 60mm Petri, 500 ezer sejt / 3 mL médium / Petri

9. táblázat: A HT-9-ben alkalmazott kísérleti elrendezés vázlata. K=kontroll (37 °C, 24h), 2h=2 órás TunM kezelés (37 °C, 2h), 3h=3 órás TunM kezelés (37 °C, 3h), 24h=24 órás TunM kezelés (37 °C, 24h)

K		2h		3h		24h	
HT1080	HT1080 +inhibitor	HT1080	HT1080 +inhibitor	HT1080	HT1080 +inhibitor	HT1080	HT1080 +inhibitor

Felhasznált sejtek:

– HT-1080

Inhibitor: 10 µM KRIBB11 + 1 óra inkubáció

Kémiai kezelés: 5 µg/mL TunM + inkubáció

RNS koncentrációk mérése: 3.2 fejezetben leírt protokoll szerint

cDNS szintézis: 3.4 fejezetben leírt protokoll szerint

PCR összeállítása: 3.5 fejezetben leírt protokoll szerint

└ vizsgált mRNS-ek: *GAPDH*, *Hsp70*, *Xbp1s*, *BiP*, *CHOP*

3.7.4. HEK-10 ÉS HT-10 KÍSÉRLET

Alkalmazott kísérleti elrendezés: 4x4 db 60mm Petri, 500 ezer sejt / 3 mL médium / Petri

10. táblázat: A HEK-10/HT-10-ben alkalmazott kísérleti elrendezés vázlata. K=kontroll (37 °C, 24h), 3h=3 órás TunM kezelés (37 °C, 3h), 6h=6 órás TunM kezelés (37 °C, 6h), 24h=24 órás TunM kezelés (37 °C, 24h)

K		3h		6h		24h	
HEK293	HEK293 +inhibitor	HEK293	HEK293 +inhibitor	HEK293	HEK293 +inhibitor	HEK293	HEK293 +inhibitor
HT1080	HT1080 +inhibitor	HT1080	HT1080 +inhibitor	HT1080	HT1080 +inhibitor	HT1080	HT1080 +inhibitor

Felhasznált sejtek:

- HEK-293T
- HT-1080

Inhibitor: 10 µM KRIBB11 + 1 óra inkubáció

Kémiai kezelés: 5 µg/mL TunM + inkubáció

RNS koncentrációk mérése: 3.2 fejezetben leírt protokoll szerint

cDNS szintézis: 3.4 fejezetben leírt protokoll szerint

PCR összeállítása: 3.5 fejezetben leírt protokoll szerint

└ vizsgált mRNS-ek: *GAPDH*, *Xbp1s*, *BiP*

4. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

4.1. A HSF1 ÉS AZ UPR^{ER} KAPCSOLATÁNAK VIZSGÁLATA HŐSTRESSZBEN

A szakirodalmi források alapján a hősokk komoly hatással van a sejtek proteosztázisára, közte az általunk vizsgált humán HEK-293T és HT-1080 sejtvonalakra is. A kísérleteink során először igazolni kívántuk, hogy a kísérleti elrendezésünkben valóban beindul az irodalomból jól ismert HSF1-függő hősokk válasz (HSR – *heat stress response*). Ennek egyik legismertebb markere a HSF1 transzkripciós faktor egyik célgénjéne, a *HSP70*, mely egy citoplazmás lokalizációjú dajkafehérjét kódol, s melynek expressziója HSR-során megemelkedik. [20]–[23]

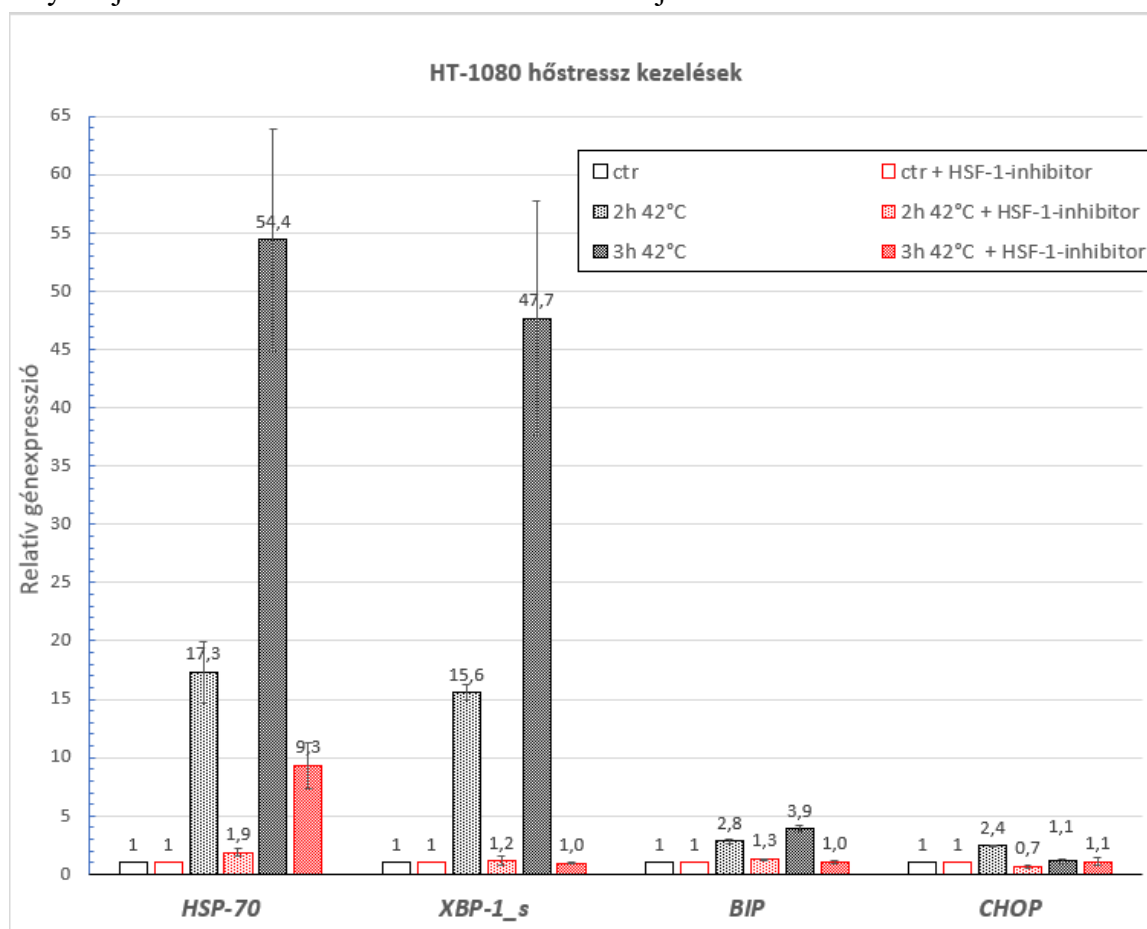
A *HSP70* mRNS mennyiségét különböző körülmények között vizsgáltuk, és azt tapasztaltuk, hogy a hősokk hatására időarányosan növekedik a szintje. (13. ábra és 14. ábra) A rövid (1 órás) hőstressz hatására még nem volt jelentős expresszió-változás (nem közölt eredmények), viszont a hosszabban fennálló hőstressz (2 és 3 óra) esetén 10-50-szeres *HSP70* mRNS-szinteket mértünk a kezeletlen sejtekhez képest mindkét sejtvonalba. Továbbá, a KRIBB11 elnevezésű HSF1-inhibitor jelenlétében – a várakozásoknak megfelelően – a *HSP70* indukció sokkal gyengébb volt. Ezzel megbizonyosodtunk arról, hogy a kísérleti elrendezésünkben a KRIBB11 hatékonyan blokkolja a HSF1 transzkripció-aktivátor funkcióját (legalábbis a *HSP70* esetében). Így ez a gátló hatás feltételezhetően más, a továbbiakban vizsgálni kívánt ER-stresszválasz útvonalban részt vevő potenciális HSF1 célgénen is érvényesülhet. Ily módon ezen HSF1 inhibitor alkalmazásával az ER-stressz HSF1 függése vizsgálhatóvá válik számunkra.

4.1.1. HŐKEZELÉSEK HATÁSA HT-1080 SEJTEKBEN (A HT-3/4/5 KÍSÉRLETEK EREDMÉNYEI)

Három marker gén aktivációját vizsgáltuk (*XBP1s*, *BiP*, *CHOP*). Az ER stressz esetén az *XBP1* mRNS-ben jelen lévő intron kihalásait az IRE1 fehérje katalizálja. [2] Az így létrejövő *XBP1s* mRNS-ről képződő transzkripciós faktor a sejtmagba jutva aktiválja az ER rezidens chaperonokat kódoló gének expresszióját. [76] Megfigyeltük, hogy hősokkot követően az *XBP1s* szintje a HT-1080 esetében jelentősen megnőtt, ami azt jelzi, hogy a HT-1080 sejtekben hőstressz hatására aktiválódik az UPR^{ER} IRE1 függő útvonala. Amikor azonban a KRIBB segítségével gátoltuk a HSF1 aktivitását, az *XBP1s* expresszió jelentősen csökkent, gyakorlatilag nem történt hasítás. Ez egy eddig a szakirodalomban nem publikált jelenség,

ugyanis ez arra utal, hogy az *XBP1* mRNS hasítása is HSF1 függő, vagyis kapcsolat áll fent az ER stressz válasz (UPR^{ER}) és a citoszolikus hősokk válasz mester regulátora, a HSF1 transzkripció faktor között.

Az ER rezidens dajkafehérjét kódoló *BiP* gén transzkripcióját ER stressz esetén az XBP1 aktiválja. [17], [18] Kimutattuk, hogy a HT-1080 esetében a *BiP* mRNS szintje kis mértékben megemelkedett. Elképzelhető, hogy az aktív XBP1 transzkripció faktor képződése hosszabb időt vesz igénybe, ezért érdemes lenne megvizsgálni a *BiP* mRNS szintjét a hősokkot követő későbbi időpontokban is. A HSF1 inhibitor jelenléte ugyanakkor a *BiP* mRNS szint kismértékű növekedését is megszüntette. Ez összhangban van korábbi megfigyelésünkkel, miszerint az *XBP1s* képződés HSF1 függő. Az irodalom szerint a *BiP* szintjét ER stressz esetén az ATF6 függő útvonal is szabályozza. Az a megfigyelésünk, hogy HSF1 gátlása esetén szupresszálódik a *BiP* transzkripciója arra utal, hogy hőstressz esetén a *BiP* szabályozásában az IRE1 útvonal játszik fontos szerepet. Elképzelhető ugyanakkor az is, hogy a HSF1 az ATF6 függő útvonal szabályozásában is szerepet játszik. A későbbiekben érdemes lenne megvizsgálni, hogy a HSF1 befolyásolja -e az UPR ATF6 útvonal általi indukcióját hősokkot követően.

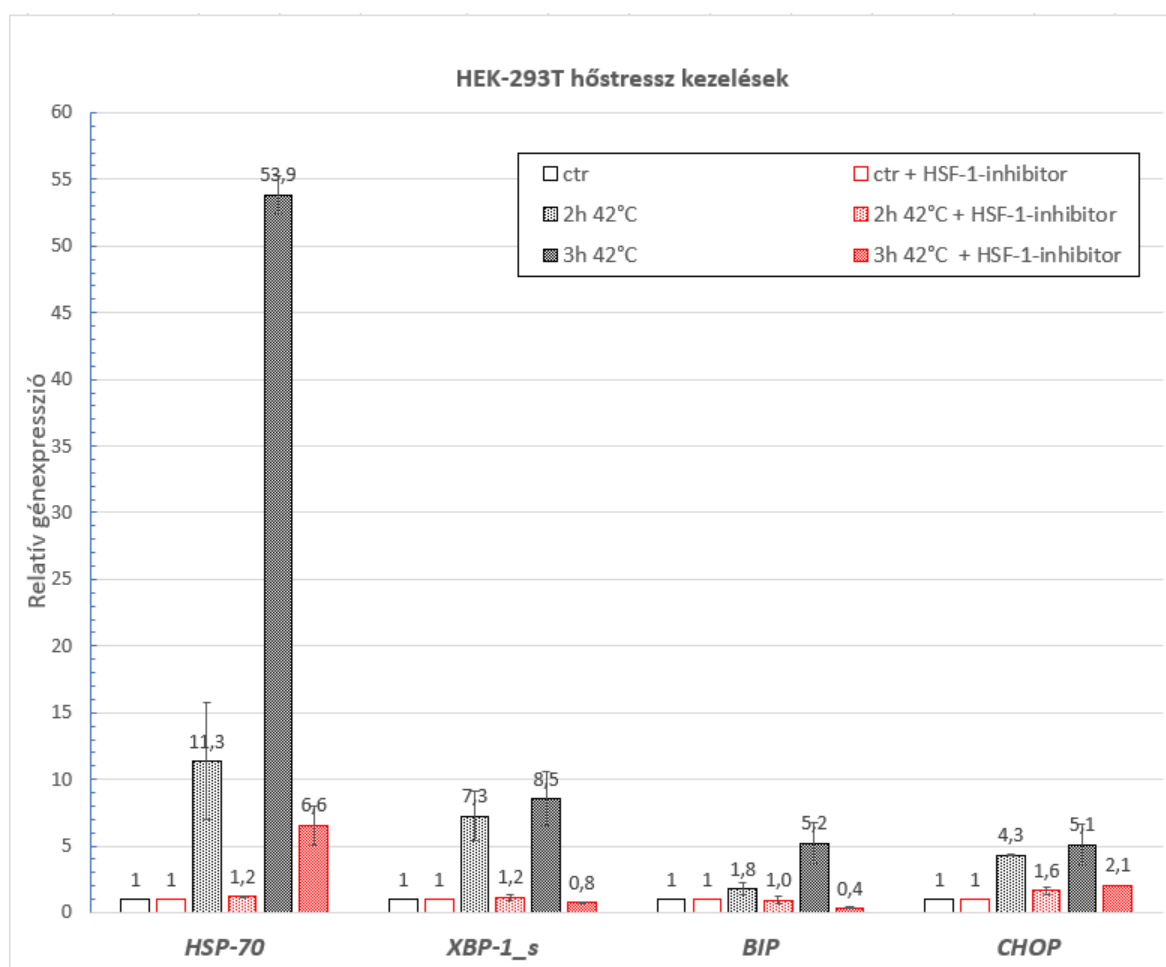


13. ábra: HT-1080 - hőstressz hatása a relatív génexpresszióra. Kontroll, 2h és 3h hőstresszt követően a relatív génexpressziós szintek változása kezeletlen és HSF1 inhibitorral kezelt sejtekben HSP70, XBP1s, BiP és CHOP marker mRNS-ek esetében.

A harmadik marker, a *CHOP* vizsgálata során megállapítottuk, hogy a szintje alig változik a vizsgált időintervallumban, és inhibitor jelenlétében is hasonló nagyságrendben mozog. Ez alapján a HT-1080-ban a PERK szenzorok vagy nem érintettek a hőstresszben – mivel azok fokoznák a *CHOP* transzkripcióját –, vagy szintén több időre lenne szükség a transzkripciós szint megemelkedéséhez.

4.1.2. HŐKEZELÉSEK HATÁSA HEK-293T SEJTEKBEN (A HEK-5/6/7 KÍSÉRLETEK EREDMÉNYEI)

A HEK-293T esetében mérsékeltebb növekedést tudunk kimutatni az *XBP1s* mRNS szintjében (a HT-1080 sejtvonalhoz képest). Felmerül ez alapján annak a lehetősége, hogy bár használja ez a sejttípus is az IRE1 útvonalat, de benne ez kevésbé releváns a hőstressz leküzdésében. HSF1 inhibitor hozzáadásakor az *XBP1s* szint ugyanakkor itt is gyakorlatilag a hőstressz időtartama alatt változatlan maradt, ami megerősíti a gyanúunkat, hogy hőstressz során az *XBP1*-hasítás HSF1 függő lehet a HEK-293T sejtvonalban is.



14. ábra: HEK-293T – hőstressz hatása a relatív génexpresszióra. Kontroll, 2h és 3h hőstresszt követően a relatív génexpressziós szintek változása kezeletlen és HSF1 inhibitorral kezelt sejtekben HSP70, XBP1s, BiP és CHOP marker mRNS-ek esetében.

A HEK-293T esetében a *BiP* szintje kis mértékben növekedett a 3 órás hőstressz hatására. Az inhibitort is tartalmazó kísérleti összeállításokban ugyanakkor *BiP* expresszió-növekedés nem volt tapasztalható, tehát a HSF1 függés itt is valószínűsíthető. A HT-1080 sejtvonalhoz hasonlóan itt is azt feltételezzük, hogy több időre lenne szükség a *BiP* válaszreakció kimutatásához, melynek igazolására további kísérleteket tervezünk.

A *CHOP* esetében szintén megfigyelhető kis mértékű növekedés hőstressz hatására, ami a PERK útvonal működésére utal, vagyis a HEK-293T sejtek legalább kettő féle ER szenzor útvonalat használnak a hőstressz leküzdésére. A HSF1 függés ez esetben is valószínűsíthető.

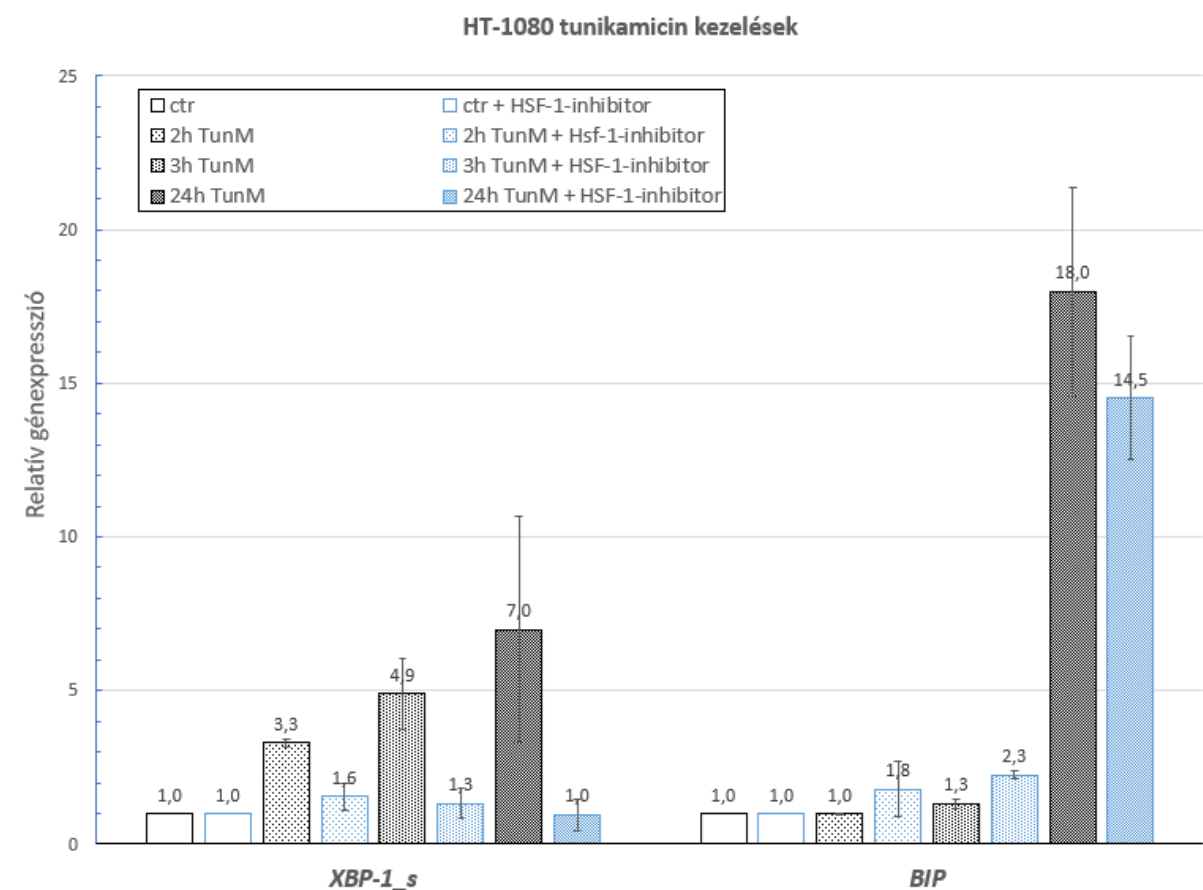
4.2. A HSF1 ÉS AZ UPR^{ER} KAPCSOLATÁNAK VIZSGÁLATA TUNIKAMICIN-INDUKÁLT STRESSZBEN

Az ER stressz klasszikusan akkor indukálódik, ha a specifikusan az endoplazmatikus retikulum lumenében halmozódnak fel rosszul hajtogatódott fehérjék. [13] Az előző fejezetben bemutatott eredményeink arra utalnak, hogy a hősokk által indukált fehérjetoxikus stressz esetén a HSF1 aktivitás szükséges az ER stresszválaszában szerepet játszó gének aktiválásához. Kíváncsiak voltunk, hogy specifikusan az ER-ben kiváltott stressz esetén kimutatható-e a HSF1 szerepe a stresszválaszban. Ezért egy jól jellemzett, specifikusan ER stresszt kiváltó kémiai anyaggal kezeltük a sejteket és megvizsgáltuk, hogy befolyásolja-e a HSF1 inaktiválása az *XPB1* mRNS hasítását, illetve a *BiP* transzkripcióját.

4.2.1. TUNIKAMICIN KEZELÉS HATÁSA HT-1080 SEJTEKBEN (A HT-6/7/8/10 KÍSÉRLETEK EREDMÉNYEI)

A HT-1080 sejtekben 2 órás tunikamicin kezelést követően közel háromszorosára emelkedett a *XPB1s* szintje a kezeletlen kontrollhoz képest, míg a HSF1 aktivitás gátlása esetén az *XPB1s* expressziója nem emelkedett meg (14. ábra). Ehhez hasonlóan a három és a 24 órás tunikamicin kezelés hatására nagyobb mértékű *XPB1s* szintemelkedést figyeltünk meg, és ez a HSF1 inhibitor hozzáadásával szupresszálnak bizonyult. Ez alapján feltételezhető, hogy a HSF1 aktivitása fontos szerepet játszik az UPR aktivációban akkor is, ha specifikusan az ER-ben váltunk ki fehérjetoxikus stresszt. Érdekes módon a dolgozatban nem bemutatott előzetes eredményeink azt mutatták, hogy tunikamicinnel kiváltott ER stressz hatására a *HSP70* expresszió nem változott meg, vagyis a tunikamicin – legalábbis a *HSP70* célgén vonatkozásában – nem növelte meg a HSF1 aktivitást.

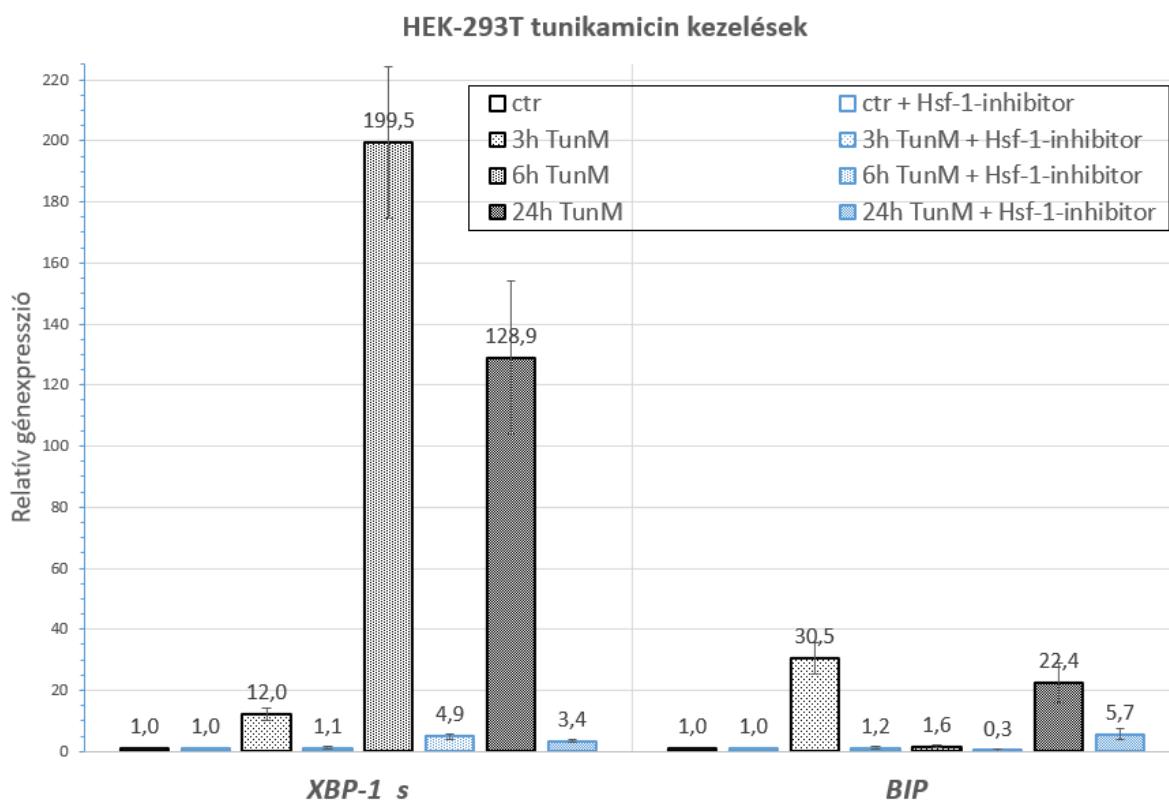
Az ER rezidens dajkafehérjét kódoló *BiP* gén esetében a két illetve 3 órás tunikamicin kezelés még nem váltott ki mRNS szint emelkedést. Ugyanakkor csak 24 órás tunikamicin kezelést követően kimutatható a *BiP* kifejeződésének nagymértékű emelkedése, azonban ezt nem befolyásolta a HSF1 aktivitás gátlása. Mindezek arra utalnak, hogy a HSF1 szerepet játszik az ER stressz indukált IRE1 útvonal aktiválásában, de nem elengedhetetlenül szükséges a *BiP* transzkripciójának indukciójához. A *BiP* aktivációja ER stressz esetén az IRE1/XBP1 útvonaltól függetlenül, az ATF6 függő útvonalon keresztül is megvalósulhat. [6] Érdemes lenne megvizsgálni a *BiP* expresszióját a 6, 12 és 18 órás tunikamicin kezelést követően is, elképzelhető ugyanis, hogy a HSF1 aktivitás gátlásának a hatása ebben az időtávban tetten érhető lenne.



15. ábra: HT-1080 – kémiai stressz hatása a relatív génexpresszióra. Kontroll, 2h, 3h és 24h tunikamicines kezelést követően a relatív génexpressziós szintek változása kezeletlen és HSF1 inhibitorral kezelt sejtekben *XBP1s* és *BiP* marker mRNS-ek esetében.

4.2.2. TUNIKAMICIN KEZELÉS HATÁSA HEK-293T SEJTEKBEN (A HEK-6/10 KÍSÉRLETEK EREDMÉNYEI)

A HEK-293T sejtekben 2 órás tunikamicin kezelést követően tizenkétszeresére, míg 3, illetve 24 órás kezelés hatására több mint százszorosára emelkedett a *XBP1s* szintje a kezeltetlen kontrollhoz képest. A HSF1 aktivitás gátlása ezt jelentősen gátolta mindhárom időpontban végzett vizsgálat esetén (15. ábra). Ez arra utal, hogy hasonlóan a HT-1080 sejtekben tapasztaltakhoz, a HEK293T sejtekben a HSF1 aktivitása szükséges az UPR^{ER} aktivációhoz. A HT-1080 sejtekben tapasztaltaktól eltérően a *BiP* expressziója 2 és 24 órás kezelést követően egyaránt HSF1 függő emelkedést mutatott. 3 órás kezelés esetén azonban *BiP* mRNS szint növekedése nem volt kimutatható. Elképzelhető, hogy ez valamilyen technikai hiba következtében áll elő, így ezt a kísérletet szükséges lenne megismételni. Ennek ellenére az eredmények alapján úgy tűnik, hogy a HEK293T sejtek érzékenyebben reagálnak a tunikamicin által kiváltott ER stresszre, mint a HT-1080 sejtek, valamint a HEK293T sejtekben a hatékony UPR aktivációhoz szükséges a HSF1.



16. ábra: HEK-293T – kémiai stressz hatása a relatív génexpresszióra. Kontroll, 2h, 3h és 24h tunikamicines kezelést követően a relatív génexpressziós szintek változása kezeltetlen és HSF1 inhibitorral kezelt sejtekben *XBP1s* és *BiP* marker mRNS-ek esetében.

4.3. HSF-1 INHIBÍCIÓ HATÁSA A SEJTEK TÚLÉLÉSÉRE

A HSF1 fontos szerepet játszik a sejtek folyamataiban, és mint azt a szakirodalmi forrásokból és saját kísérleteinkből megállapítottuk, nem csupán hőstressz esetén van funkciója. [26] [27] Ez alapján fontosnak tartottuk megvizsgálni, hogy milyen hatással van a HSF1 gátlása a sejtek életképességére. Ennek megállapítására az elvégzett 24 órás tunikamicines kezelések voltak a legalkalmasabbak. A sejtek életképességét festési eljárással igyekeztünk felmérni: a flow citométeren történő mérés előtt 10 µg/ml propidium-jodid (PI) festéket adtunk 200 µL sejtuszpenzióhoz. Ez a festék csak a már nem élő sejtek DNS-ét festi meg, mivel az élő sejtek aktív transzporttal eltávolítják önmagukból. Tapasztalataink szerint ugyanakkor a PI festés hatékonysága közel sem 100%-os, mivel nagyon sok – az FSC / SSC alapján – már nem életképes sejtet nem tudott megfesteni, illetve azokat a sejttörmelékeket sem tudja megfesteni, amik nem tartalmazznak DNS-t.

A tunikamicines kémiai stressz önmagában nagymértékben hozzájárult a sejtek pusztulásához a mérések alapján. A (11. táblázat)-ból látható, hogy a kontroll tenyészethez képest a HT-1080 és a HEK-293T esetében is kevesebb mint a sejtek fele maradt életben 24 óra kezelést követően. Ennek elsődleges oka a tunikamicin által okozott stressz jellegében keresendő, ugyanis az N-glikoziláció gátlása miatt gyakorlatilag a teljes fehérjeszintézist felborítja, ami hosszú távon az apoptózis felé tereli a sejteket. A HT-1080 esetében a tunikamicin hatására kismértékű morfológiai változást láttunk csak mikroszkópon, a sejtek kevésbé terülnek el, vékonyabbak, ugyanakkor a detektált sejttörmelék mennyisége jelentősen megugrott, miközben a halott sejtek száma nem volt jelentős. (18. ábra) A HEK-293T sejtek esetében már jelentős morfológiai változásra figyeltünk fel, mivel a sejtek aggregálódtak és feljöttek a Petri csésze aljáról, valamint a citométeren is jelentős mennyiségű törmelékre utaló jelet láttunk. (22. ábra)

A kizárólag HSF-1 inhibitorral kezelt minták esetében az élő sejtszám csupán 33%-a volt a kezeletlen kontroll mintához képest 24 óra inkubáció után. Ez egyértelmű jele, hogy a HSF1 gátlása hosszú távon káros a sejteknek, beindíthatja az apoptózis felé vezető útvonalakat és/vagy gátolja a sejtek osztódását. A HT-1080 sejtek morfológiája különös, elvékonyodott („szálas”) alakot vesz fel inhibitoros kezelést követően. A korábbi kísérletekből tudjuk, hogy ez már 1 órás inkubáció után is kialakul. (19. ábra) Ugyanez igaz a HEK-293T sejtekre is, melyek azonban ezzel párhuzamosan aggregálódnak is a TunM kezeléshez hasonló módon. (23. ábra) Az inhibitor hatására megnő a halott sejtek és a sejttörmelék aránya is, azonban

összevetve a tunikamicines kezeléssel látható, hogy a HSF-1 inhibitor arányaiban több halott (de még nem szétesett) sejtet és kevesebb sejttermelést eredményez.

Amikor a kémiai kezelést és a HSF-1 inhibíciót egyszerre alkalmaztuk, akkor a sejtek a kettős stressz hatására értelemszerűen sokkal nagyobb arányban pusztultak a 24 órás inkubáció alatt: alig negyedük maradt életben a HEK-293T esetében és 15%-uk a HT-1080 esetében. Jól látható, hogy a HSF-1 inhibitor hatására a sejtek érzékenyebbek lettek a kémiai sokk hatásával szemben, kevésbé működtek bennük az önvédelmi mechanizmusok (IRE1, ATF6, PERK útvonalak). A mikroszkópos képeken megfigyeltük a két fenotípus együttes jelentkezését: a HT-1080 sejteknél elsősorban az inhibitor hatására megváltozó morfológia, míg a HEK-293T esetében az inhibitor és a tunikamicin hatásának együttese látható. (20. ábra és 24. ábra)

11. táblázat: Tunikamicines kezelés és HSF-1 inhibitor hatása a két sejtvonallal életképességére külön és egyszerre alkalmazva.

Leültetett induló sejtszám (48h-val a mérés előtt): $5 \cdot 10^5$		Élő sejtszám/ μ l (flow-citóméterben mért adat)	Élő sejtszám a teljes tenyészetben	Élő sejtszám % (a kezeltetlen tenyészetre vetítve)
HEK-293	Kontroll	1117	$3,9 \cdot 10^6$	100
	24h HSF-1 inhibitor	368	$1,3 \cdot 10^6$	33
	24h TunM	449	$1,6 \cdot 10^6$	40
	24h TunM + HSF-1 inhibitor	279	$9,8 \cdot 10^5$	25
HT-1080	Kontroll	783	$2,7 \cdot 10^6$	100
	24h HSF-1 inhibitor	260	$9,1 \cdot 10^5$	33
	24h TunM	275	$9,6 \cdot 10^5$	35
	24h TunM + HSF-1 inhibitor	119	$4,2 \cdot 10^5$	15

5. ÖSSZEFOGLALÁS

A projekt során igazoltuk, hogy valóban beindul az irodalomban már jegyzett HSF1-függő hősokk válasz az általunk vizsgált humán sejtvonalakban (HEK-293T és HT-1080). Ennek egyik legismertebb markerének, a *HSP70*-nek, mely a *HSP70* dajkafehérjét kódolja, hősokk hatására időarányosan növekedik a szintje, továbbá, a HSF1-inhibitor jelenlétében a *HSP70* indukció sokkal gyengébb volt. Megfigyeltük, hogy hősokkot követően az *XPB1s* szintje a HT-1080 esetében jelentősen megnőtt, aktiválódik az UPR^{ER} IRE1 függő útvonala. Amikor KRIBB11 segítségével gátoltuk a HSF1 aktivitását, az *XPB1s* expresszió jelentősen csökkent, ami egy eddig a szakirodalomban nem publikált jelenség: az *XPB1* mRNS hasítása is HSF1 függő, vagyis kapcsolat áll fent az ER stressz válasz (UPR^{ER}) és a citoszolikus hősokk válasz mester regulátora, a HSF1 transzkripciós faktor között. Ezen feltételezésünket – hőstressz során az *XPB1*-hasítás HSF1 függő lehet – sikerült megfigyelnünk a HEK-293T sejtvonalban is. Ezt a *BiP* szintjének mérése is alátámasztotta, illetve ez egyben megmutatta, hogy az egyes sejtvonalak más-más mértékben támaszkodnak az egyes ER szenzorokhoz köthető útvonalakra. A PERK szenzorok útvonala vizsgálatára során a *CHOP* szintekben nem tapasztaltunk jelentős változást a HT-1080 esetében, míg a HEK-293T esetében tapasztalt kismértékű növekedés legalább kettő féle ER szenzor útvonali aktivitásra utalt, de itt további mérések elvégzését ítéljük szükségesnek.

Ezt követően megvizsgáltuk, hogy specifikusan az ER-ben kiváltott stressz esetén kimutatható-e a HSF1 szerepe a stresszválaszban, amihez tunikamicin kezelést alkalmaztunk mindkét vizsgált sejtvonalon. Eredményeink azt mutatták, hogy tunikamicinnel kiváltott ER stressz nem növelte meg a HSF1 aktivitást a *HSP70* célgén vonatkozásában a HT-1080 sejtekben, ugyanakkor nagyobb mértékű *XPB1s* szintemelkedést figyeltünk meg, és ez a HSF1 inhibitor hozzáadásával szuppresszálhatónak bizonyult. A *BiP* gén esetében a 24 órás tunikamicin kezelést követően kimutatható volt a *BiP* kifejeződésének nagymértékű emelkedése, azonban ezt nem befolyásolta a HSF1 aktivitás gátlása. Mindezek arra utalnak, hogy a HSF1 szerepet játszik az ER stressz indukált IRE1 útvonali aktiválásában, de nem elengedhetetlenül szükséges a *BiP* transzkripciójának indukciójához. A HEK-293T sejtekben tunikamicin kezelést követően emelkedett az *XPB1s* szintje a kezeletlen kontrollhoz képest és ezt a HSF1 gátlása jelentősen csökkentette. Ez alapján hasonlóan a HT-1080 sejtekben tapasztaltakhoz, a HEK293T sejtekben is a HSF1 aktivitása szükséges az UPR^{ER} aktivációhoz. Ebben a sejtvonalban a *BiP* expressziója HSF1 függő emelkedést mutatott, valamint az

eredmények alapján úgy tűnik, hogy a HEK293T sejtek érzékenyebben reagálnak a tunikamicin által kiváltott ER stresszre, mint a HT-1080 sejtek.

A sejtek életképességének vizsgálata során megállapítottuk, hogy HSF1 inhibitor hatására a sejtek érzékenyebbek lettek a kémiai sokk hatásával szemben, kevésbé működtek bennük az önvédelmi mechanizmusok (IRE1, ATF6, PERK útvonalak). Ez a morfológiájukra is hatással volt. Különbséget véltünk felfedezni a tunikamicines kezelés és a HSF1 gátlás során bekövetkező sejtpusztulás folyamatában, előbbi esetben több törmelék képződött, míg utóbbinál a sejtek kevésbé estek szét halálukat követően.

A fentebb leírt következtetések csak abban az esetben állják meg a helyüket, ha a KRIBB11 valóban HSF1-specifikus gátlószer, és nem valamilyen egyéb off-target hatása miatt gátolt az *XBP1* mRNS splicingja. A jövőben mindenképpen szükséges megerősíteni az eredményeinket más rendszerben is (pl. HSF1-RNAi csendesített sejtvonalakban).

6.KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Deák Veronikának, aki lelkiismeretesen és áldozatos munkával vezetett be a biológiai munkavégzés gyakorlatába, a témám vizsgálatához szükséges elméleti háttérbe, valamint a dolgozat megírása során is folyamatosan figyelemmel kísérte a haladásom és kész volt minden segítséget megadni amint akár csak egy kicsit is elbizonytalanodtam.

Hálás köszönet illeti Dr. Szarka András Tanár Urat, a kutatólaboratóriumunk vezetőjét, amiért egy rendkívül jól felszerelt és gondosan karbantartott környezetben végezhettem a munkám, lehetővé téve, hogy ilyen mélységű kutatást is magabiztosan és zavaró körülményektől mentesen végezhessenek el. Köszönet illeti a labor többi dolgozóját, Dr. Hajdinák Pétert, Makk-Merczel Kingát, Varga Dórát és a technikusunk, Podhragyi Viktor is, mivel bármikor készek voltak segítségemre lenni akár a laborban található eszközökkel, akár szakmai kérdésekkel kapcsolatban.

Az egész kutatás nem valósulhatott volna meg témavezetőm férje, Dr. Barna János, az ELTE Genetika Tanszék kiváló kutatója nélkül, aki a témához az ötletet adta és végig szakmai segítséget nyújtott a dolgozat elkészítése során, az eredmények értelmezésében.

Köszönettel tartozok a barátnőmnek, családomnak, barátaimnak, akik tartották bennem a lelket, végig türelmesek és megértők voltak velem és meggyőztek arról, hogy sikerül időben elkészítenem a dolgozatomat.

Végül, de nem utolsó sorban szeretném hálásan megköszönni a Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem Vegyészmérnöki és Biomérnöki Kar valamennyi oktatójának, dolgozójának lelkiismeretes munkáját, amivel hallgatóik képzését és tanulását támogatják.

7.FELHASZNÁLT IRODALOM

- [1] J. D. Malhotra and R. J. Kaufman, “The endoplasmic reticulum and the unfolded protein response,” *Semin. Cell Dev. Biol.*, vol. 18, no. 6, pp. 716–731, 2007, doi: 10.1016/j.semcdb.2007.09.003.
- [2] S. Taouji, S. Wolf, and E. Chevet, “Oligomerization in endoplasmic reticulum stress signaling,” *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.*, vol. 117, pp. 465–484, 2013, doi: 10.1016/B978-0-12-386931-9.00017-9.
- [3] J. Ting and A. S. Lee, “Human Gene Encoding the 78,000-Dalton Glucose-Regulated Protein and Its Pseudogene: Structure, Conservation, and Regulation,” *Dna*, vol. 7, no. 4, pp. 275–286, 1988, doi: 10.1089/dna.1988.7.275.
- [4] D. Ron and P. Walter, “Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 8, no. 7, pp. 519–529, 2007, doi: 10.1038/nrm2199.
- [5] A. Bertolotti *et al.*, “Increased sensitivity to dextran sodium sulfate colitis in IRE1 β -deficient mice,” *J. Clin. Invest.*, vol. 107, no. 5, pp. 585–593, 2001, doi: 10.1172/JCI11476.
- [6] J. Shen, X. Chen, L. Hendershot, and R. Prywes, “ER Stress Regulation of ATF6 Localization by Dissociation of BiP/GRP78 Binding and Unmasking of Golgi Localization Signals,” *Dev. Cell*, vol. 3, no. 1, pp. 99–111, Jul. 2002, doi: 10.1016/S1534-5807(02)00203-4.
- [7] X. Chen, J. Shen, and R. Prywes, “The luminal domain of ATF6 senses endoplasmic reticulum (ER) stress and causes translocation of ATF6 from the er to the Golgi,” *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 15, pp. 13045–13052, 2002, doi: 10.1074/jbc.M110636200.
- [8] T. Okada, H. Yoshida, R. Akazawa, M. Negishi, and K. Mori, “Distinct roles of activating transcription factor 6 (ATF6) and double-stranded RNA-activated protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) in transcription during the mammalian unfolded protein response,” *Biochemical Journal*, vol. 366, no. 2, pp. 585–594, 2002, doi: 10.1042/BJ20020391.
- [9] M. Schröder and R. J. Kaufman, “The mammalian unfolded protein response,” *Annu.*

- Rev. Biochem.*, vol. 74, pp. 739–789, 2005, doi: 10.1146/annurev.biochem.73.011303.074134.
- [10] S. B. Cullinan, D. Zhang, M. Hannink, E. Arvisais, R. J. Kaufman, and J. A. Diehl, “Nrf2 Is a Direct PERK Substrate and Effector of PERK-Dependent Cell Survival,” *Mol. Cell. Biol.*, vol. 23, no. 20, pp. 7198–7209, 2003, doi: 10.1128/mcb.23.20.7198-7209.2003.
- [11] S. Chan and P. A. Egan, “Hepatitis C virus envelope proteins regulate CHOP via induction of the unfolded protein response,” *FASEB J.*, vol. 19, no. 11, pp. 1510–1512, 2005, doi: 10.1096/fj.04-3455fje.
- [12] P. D. Lu, H. P. Harding, and D. Ron, “Translation reinitiation at alternative open reading frames regulates gene expression in an integrated stress response,” *J. Cell Biol.*, vol. 167, no. 1, pp. 27–33, 2004, doi: 10.1083/jcb.200408003.
- [13] C. Hetz, “The unfolded protein response: Controlling cell fate decisions under ER stress and beyond,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 13, no. 2, pp. 89–102, 2012, doi: 10.1038/nrm3270.
- [14] J. Zhou *et al.*, “The crystal structure of human IRE1 luminal domain reveals a conserved dimerization interface required for activation of the unfolded protein response,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 103, no. 39, pp. 14343–14348, 2006, doi: 10.1073/pnas.0606480103.
- [15] D. Oikawa, Y. Kimata, K. Kohno, and T. Iwawaki, “Activation of mammalian IRE1 α upon ER stress depends on dissociation of BiP rather than on direct interaction with unfolded proteins,” *Exp. Cell Res.*, vol. 315, no. 15, pp. 2496–2504, 2009, doi: 10.1016/j.yexcr.2009.06.009.
- [16] M. M. U. Ali *et al.*, “Structure of the Ire1 autophosphorylation complex and implications for the unfolded protein response,” *EMBO J.*, vol. 30, no. 5, pp. 894–905, 2011, doi: 10.1038/emboj.2011.18.
- [17] A. Chawla, S. Chakrabarti, G. Ghosh, and M. Niwa, “Attenuation of yeast UPR is essential for survival and is mediated by IRE1 kinase,” *J. Cell Biol.*, vol. 193, no. 1, pp. 41–50, 2011, doi: 10.1083/jcb.201008071.
- [18] H. Yoshida, T. Matsui, A. Yamamoto, T. Okada, and K. Mori, “XBP1 mRNA Is Induced

- by ATF6 and Spliced by IRE1 in Response to ER Stress to Produce a Highly Active Transcription Factor phosphorylation, the activated Ire1p specifically cleaves HAC1 precursor mRNA to remove an intron of 252 nucleotides. The cleaved 5' and 3', *Cell*, vol. 107, pp. 881–891, 2001.
- [19] A. Vihervaara and L. Sistonen, “HSF1 at a glance,” *J. Cell Sci.*, vol. 127, no. 2, pp. 261–266, 2014, doi: 10.1242/jcs.132605.
- [20] C. Wu, “HEAT SHOCK TRANSCRIPTION FACTORS: Structure and Regulation translocation, higher order assembly, and protein degradation (Gething &,” *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, vol. 11, pp. 441–469, 1995.
- [21] C. Biology, J. Acunzo, M. Katsogiannou, and P. Rocchi, “The International Journal of Biochemistry Small heat shock proteins HSP27 (HspB1), α -B-crystallin (HspB5) and HSP22 (HspB8) as regulators of cell death & , &&,” *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, vol. 44, no. 10. pp. 1622–1631, 2012.
- [22] J. Amin, J. Ananthan, and R. Voellmy, “Key features of heat shock regulatory elements,” *Mol. Cell. Biol.*, vol. 8, no. 9, pp. 3761–3769, 1988, doi: 10.1128/mcb.8.9.3761.
- [23] A. M. Jaeger, L. N. Makley, J. E. Gestwicki, and D. J. Thiele, “Genomic heat shock element sequences drive cooperative human heat shock factor 1 DNA binding and selectivity,” *J. Biol. Chem.*, vol. 289, no. 44, pp. 30459–30469, 2014, doi: 10.1074/jbc.M114.591578.
- [24] T. Neudegger, J. Verghese, M. Hayer-Hartl, F. U. Hartl, and A. Bracher, “Structure of human heat-shock transcription factor 1 in complex with DNA,” *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 23, no. 2, pp. 140–146, 2016, doi: 10.1038/nsmb.3149.
- [25] S. Dayalan Naidu and A. T. Dinkova-Kostova, “Regulation of the mammalian heat shock factor 1,” *FEBS J.*, vol. 284, no. 11, pp. 1606–1627, Jun. 2017, doi: 10.1111/febs.13999.
- [26] D. Kovács *et al.*, “HSF1Base: A comprehensive database of HSF1 (heat shock factor 1) target genes,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 20, no. 22, pp. 1–24, 2019, doi: 10.3390/ijms20225815.
- [27] G. Wang, P. Cao, Y. Fan, and K. Tan, “Emerging roles of HSF1 in cancer: Cellular and

- molecular episodes,” *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer*, vol. 1874, no. 1, 2020, doi: 10.1016/j.bbcan.2020.188390.
- [28] S. G. Ahn and D. J. Thiele, “Redox regulation of mammalian heat shock factor 1 is essential for Hsp gene activation and protection from stress,” *Genes Dev.*, vol. 17, no. 4, pp. 516–528, 2003, doi: 10.1101/gad.1044503.
- [29] Y. Y. E. Chuang *et al.*, “Gene expression after treatment with hydrogen peroxide, menadione, or t-butyl hydroperoxide in breast cancer cells,” *Cancer Res.*, vol. 62, no. 21, pp. 6246–6254, 2002.
- [30] J. Lee, A. J. Bruce-Keller, Y. Kruman, S. L. Chan, and M. P. Mattson, “2-Deoxy-D-glucose protects hippocampal neurons against excitotoxic and oxidative injury: Evidence for the involvement of stress proteins,” *J. Neurosci. Res.*, vol. 57, no. 1, pp. 48–61, 1999, doi: 10.1002/(SICI)1097-4547(19990701)57:1<48::AID-JNR6>3.0.CO;2-L.
- [31] R. Takii *et al.*, “Heat Shock Transcription Factor 1 Inhibits Expression of IL-6 through Activating Transcription Factor 3,” *J. Immunol.*, vol. 184, no. 2, pp. 1041–1048, 2010, doi: 10.4049/jimmunol.0902579.
- [32] K. H. Kim, J. Y. Jeong, Y. J. Surh, and K. W. Kim, “Expression of stress-response ATF3 is mediated by Nrf2 in astrocytes,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 38, no. 1, pp. 48–59, 2009, doi: 10.1093/nar/gkp865.
- [33] Y. Watanabe, A. Tsujimura, K. Taguchi, and M. Tanaka, *HSF1 stress response pathway regulates autophagy receptor SQSTM1/p62-associated proteostasis*, vol. 13, no. 1. 2017.
- [34] B. Samarasinghe, C. T. K. Wales, F. R. Taylor, and A. T. Jacobs, “Heat shock factor 1 confers resistance to Hsp90 inhibitors through p62/SQSTM1 expression and promotion of autophagic flux,” *Biochem. Pharmacol.*, vol. 87, no. 3, pp. 445–455, 2014, doi: 10.1016/j.bcp.2013.11.014.
- [35] H. Motohashi and M. Yamamoto, “Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism,” *Trends Mol. Med.*, vol. 10, no. 11, pp. 549–557, 2004, doi: 10.1016/j.molmed.2004.09.003.
- [36] A. Jain *et al.*, “p62/SQSTM1 is a target gene for transcription factor NRF2 and creates a positive feedback loop by inducing antioxidant response element-driven gene

- transcription,” *J. Biol. Chem.*, vol. 285, no. 29, pp. 22576–22591, 2010, doi: 10.1074/jbc.M110.118976.
- [37] P. Mehlen, C. Kretz-Remy, X. Prévaille, and A. P. Arrigo, “Human hsp27, *Drosophila* hsp27 and human α B-crystallin expression-mediated increase in glutathione is essential for the protective activity of these proteins against TNF α -induced cell death,” *EMBO J.*, vol. 15, no. 11, pp. 2695–2706, 1996, doi: 10.1002/j.1460-2075.1996.tb00630.x.
- [38] S. Desai *et al.*, “Heat shock factor 1 (HSF1) controls chemoresistance and autophagy through transcriptional regulation of autophagy-related protein 7 (ATG7),” *J. Biol. Chem.*, vol. 288, no. 13, pp. 9165–9176, 2013, doi: 10.1074/jbc.M112.422071.
- [39] M. L. Mendillo *et al.*, “HSF1 drives a transcriptional program distinct from heat shock to support highly malignant human cancers,” *Cell*, vol. 150, no. 3, pp. 549–562, 2012, doi: 10.1016/j.cell.2012.06.031.
- [40] S. M. Chafekar and M. L. Duennwald, “Impaired heat shock response in cells expressing full-length polyglutamine-expanded Huntingtin,” *PLoS One*, vol. 7, no. 5, pp. 1–11, 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0037929.
- [41] NIH, “Transmissible Spongiform Encephalopathies,” 2023. <https://www.ninds.nih.gov/health-information/disorders/transmissible-spongiform-encephalopathies>.
- [42] J. R. McConnell, L. K. Buckton, and S. R. McAlpine, “Regulating the master regulator: Controlling heat shock factor 1 as a chemotherapy approach,” *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, vol. 25, no. 17, pp. 3409–3414, 2015, doi: 10.1016/j.bmcl.2015.06.052.
- [43] Y. Nakamura, M. Fujimoto, N. Hayashida, R. Takii, A. Nakai, and M. Muto, “Silencing HSF1 by short hairpin RNA decreases cell proliferation and enhances sensitivity to hyperthermia in human melanoma cell lines,” *J. Dermatol. Sci.*, vol. 60, no. 3, pp. 187–192, 2010, doi: 10.1016/j.jdermsci.2010.09.009.
- [44] S. Chira *et al.*, “Progresses towards safe and efficient gene therapy vectors,” *Oncotarget*, vol. 6, no. 31, pp. 30675–30703, 2015, doi: 10.18632/oncotarget.5169.
- [45] V. L. Gabai, L. Meng, G. Kim, T. A. Mills, I. J. Benjamin, and M. Y. Sherman, “Heat Shock Transcription Factor Hsf1 Is Involved in Tumor Progression via Regulation of

- Hypoxia-Inducible Factor 1 and RNA-Binding Protein HuR,” *Mol. Cell. Biol.*, vol. 32, no. 5, pp. 929–940, 2012, doi: 10.1128/mcb.05921-11.
- [46] C. L. Moore *et al.*, “Transportable, Chemical Genetic Methodology for the Small Molecule-Mediated Inhibition of Heat Shock Factor 1,” *ACS Chem. Biol.*, vol. 11, no. 1, pp. 200–210, 2016, doi: 10.1021/acschembio.5b00740.
- [47] M. Velayutham, A. J. Cardounel, Z. Liu, and G. Ilangoan, “Discovering a reliable heat-shock factor-1 inhibitor to treat human cancers: Potential opportunity for phytochemists,” *Front. Oncol.*, vol. 8, no. APR, pp. 6–10, 2018, doi: 10.3389/fonc.2018.00097.
- [48] N. Hosokawa *et al.*, “Inhibition of the activation of heat shock factor in vivo and in vitro by flavonoids,” *Mol. Cell. Biol.*, vol. 12, no. 8, pp. 3490–3498, 1992, doi: 10.1128/mcb.12.8.3490.
- [49] H. Akagawa *et al.*, “Stresgenin B, an inhibitor of heat-induced heat shock protein gene expression, produced by *Streptomyces* sp. AS-9,” *J. Antibiot. (Tokyo)*, vol. 52, no. 11, pp. 960–970, 1999, doi: 10.7164/antibiotics.52.960.
- [50] Z. L. Zhou, Y. X. Yang, J. Ding, Y. C. Li, and Z. H. Miao, “Triptolide: Structural modifications, structure-activity relationships, bioactivities, clinical development and mechanisms,” *Nat. Prod. Rep.*, vol. 29, no. 4, pp. 457–475, 2012, doi: 10.1039/c2np00088a.
- [51] S. D. Westerheide, T. L. A. Kawahara, K. Orton, and R. I. Morimoto, “Triptolide, an inhibitor of the human heat shock response that enhances stress-induced cell death,” *J. Biol. Chem.*, vol. 281, no. 14, pp. 9616–9622, 2006, doi: 10.1074/jbc.M512044200.
- [52] C. Sharma and Y. H. Seo, “Small molecule inhibitors of HSF1-activated pathways as potential next-generation anticancer therapeutics,” *Molecules*, vol. 23, no. 11, 2018, doi: 10.3390/molecules23112757.
- [53] S. I. Yokota, M. Kitahara, and K. Nagata, “Benzylidene lactam compound, KNK437, a novel inhibitor of acquisition of thermotolerance and heat shock protein induction in human colon carcinoma cells,” *Cancer Res.*, vol. 60, no. 11, pp. 2942–2948, 2000.
- [54] N. Zaarur, V. L. Gabai, J. A. Porco, S. Calderwood, and M. Y. Sherman, “Targeting heat

- shock response to sensitize cancer cells to proteasome and Hsp90 inhibitors,” *Cancer Res.*, vol. 66, no. 3, pp. 1783–1791, 2006, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-3692.
- [55] Y. J. Yoon *et al.*, “KRIBB11 inhibits HSP70 synthesis through inhibition of heat shock factor 1 function by impairing the recruitment of positive transcription elongation factor b to the hsp70 promoter,” *J. Biol. Chem.*, vol. 286, no. 3, pp. 1737–1747, 2011, doi: 10.1074/jbc.M110.179440.
- [56] N. Vilaboa *et al.*, “New inhibitor targeting human transcription factor HSF1: Effects on the heat shock response and tumor cell survival,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 45, no. 10, pp. 5797–5817, 2017, doi: 10.1093/nar/gkx194.
- [57] M. Carter and J. C. Shieh, “Guide to Research Techniques in Neuroscience - Cell Culture ,” *Guid. to Res. Tech. Neurosci.*, pp. 281–296, 2010, doi: 10.1016/B978-0-12-374849-2.00013-7.
- [58] G. Kaur and J. M. Dufour, “Cell lines,” *Spermatogenesis*, vol. 2, no. 1, pp. 1–5, 2012, doi: 10.4161/spmg.19885.
- [59] V. Marx, “Cell-line authentication demystified,” *Nat. Methods*, vol. 11, no. 5, pp. 483–488, 2014, doi: 10.1038/nmeth.2932.
- [60] G. Todaro and H. Green, “QUANTITATIVE STUDIES OF THE GROWTH OF MOUSE EMBRYO CELLS IN CULTURE AND THEIR DEVELOPMENT INTO ESTABLISHED LINES,” *J. Cell Biol.*, vol. 17, no. 6, pp. 299–313, 1963.
- [61] W. F. Scherer, J. T. Syverton, and G. O. Gey, “STUDIES ON THE PROPAGATION IN VITRO OF POLIOMYELITIS VIRUSES] ~ PITH ~ LIAL CELLS (STRAIN HELA) DERIVED I ~ ROM AN EPIDEI ~ fOID (From tim Department of Bacteriology and Immunology , University of Minnesota , Minneapolis , and tke Department of Surger,” *J Exp Med*, vol. 97, no. 5, pp. 695–710, 1953.
- [62] F. M. Wurm, “Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells,” *Nat. Biotechnol.*, vol. 22, no. 11, pp. 1393–1398, 2004, doi: 10.1038/nbt1026.
- [63] V. M. Kavsan, A. V. Iershov, and O. V. Balynska, “Immortalized cells and one oncogene in malignant transformation: Old insights on new explanation,” *BMC Cell Biol.*, vol. 12, pp. 12–13, 2011, doi: 10.1186/1471-2121-12-23.

- [64] S. Rasheed, W. A. Nelson-Rees, E. M. Toth, P. Arnstein, and M. B. Gardner, "Characterization of a newly derived human sarcoma cell line (HT-1080)," *Cancer*, vol. 33, no. 4, pp. 1027–1033, 1974, doi: 10.1002/1097-0142(197404)33:4<1027::AID-CNCR2820330419>3.0.CO;2-Z.
- [65] M. I. Maqsood, M. M. Matin, A. R. Bahrami, and M. M. Ghasroldasht, "Immortality of cell lines: Challenges and advantages of establishment," *Cell Biol. Int.*, vol. 37, no. 10, pp. 1038–1045, 2013, doi: 10.1002/cbin.10137.
- [66] H. Burkhardt, "Epidemiologic aspects," *Drug Ther. Elder.*, vol. 9783709109, pp. 11–19, 2013, doi: 10.1007/978-3-7091-0912-0_2.
- [67] A. G. Bodnar *et al.*, "Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells," *Science (80-.)*, vol. 279, no. 5349, pp. 349–352, 1998, doi: 10.1126/science.279.5349.349.
- [68] M. J. Kwakkenbos, P. M. van Helden, T. Beaumont, and H. Spits, "Stable long-term cultures of self-renewing B cells and their applications," *Immunol. Rev.*, vol. 270, no. 1, pp. 65–77, 2016, doi: 10.1111/imr.12395.
- [69] I. Salts, C. Chloride, and F. Acid, "Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), full," *Cold Spring Harb. Protoc.*, vol. 2010, no. 12, p. pdb.rec12366, 2010, doi: 10.1101/pdb.rec12366.
- [70] J. Round, "RNA isolation," *Protoc. Exch.*, no. January, 2007, doi: 10.1038/nprot.2007.69.
- [71] K. J. Livak and T. D. Schmittgen, "Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method," *Methods*, vol. 25, no. 4, pp. 402–408, Dec. 2001, doi: 10.1006/meth.2001.1262.
- [72] B. Kozera and M. Rapacz, "Reference genes in real-time PCR," *J. Appl. Genet.*, vol. 54, no. 4, pp. 391–406, 2013, doi: 10.1007/s13353-013-0173-x.
- [73] M. Lewis *et al.*, "Different relationship between hsp70 mRNA and hsp70 levels in the heat shock response of two salmonids with dissimilar temperature preference," *Front. Physiol.*, vol. 7, no. NOV, pp. 1–12, 2016, doi: 10.3389/fphys.2016.00511.

- [74] S. Bin Yoon *et al.*, “Real-time PCR quantification of spliced X-box binding protein 1 (XBP1) using a universal primer method,” *PLoS One*, vol. 14, no. 7, pp. 1–12, 2019, doi: 10.1371/journal.pone.0219978.
- [75] C. M. Osowski and F. Urano, *Measuring ER stress and the unfolded protein response using mammalian tissue culture system*, 1st ed., vol. 490, no. C. Elsevier Inc., 2011.
- [76] S. M. Park, T. Il Kang, and J. S. So, “Roles of XBP1s in transcriptional regulation of target genes,” *Biomedicines*, vol. 9, no. 7, pp. 1–26, 2021, doi: 10.3390/biomedicines9070791.

8.FÜGGELÉK

12. táblázat: HEK-5/HT-3 RNS koncentrációk ng/μL koncentrációkban

	K	2h	2+1h
HEK293	860	600	810
HT1080	188	186	200
HEK293 + inhibitor	910	795	690
HT1080 + inhibitor	155	160	165

13. táblázat: HEK-6/HT-4 RNS koncentrációk ng/μL koncentrációkban

	K	2h	3h
HEK293	380	430	360
HT1080	120	150	180
HEK293 + inhibitor	340	410	270
HT1080 + inhibitor	180	90	100

14. táblázat: HEK-7/HT-5 RNS koncentrációk ng/μL koncentrációkban

	K	2h	2+2h
HEK293	290	460	420
HT1080	450	430	440
HEK293 + inhibitor	220	440	280
HT1080 + inhibitor	200	390	140

15. táblázat: HEK-8/HT-6 RNS koncentrációk ng/μL koncentrációkban

	K	24h
HEK293	1130	2300
HT1080	1490	1480

16. táblázat: HT-8 RNS koncentrációk ng/μL koncentrációkban

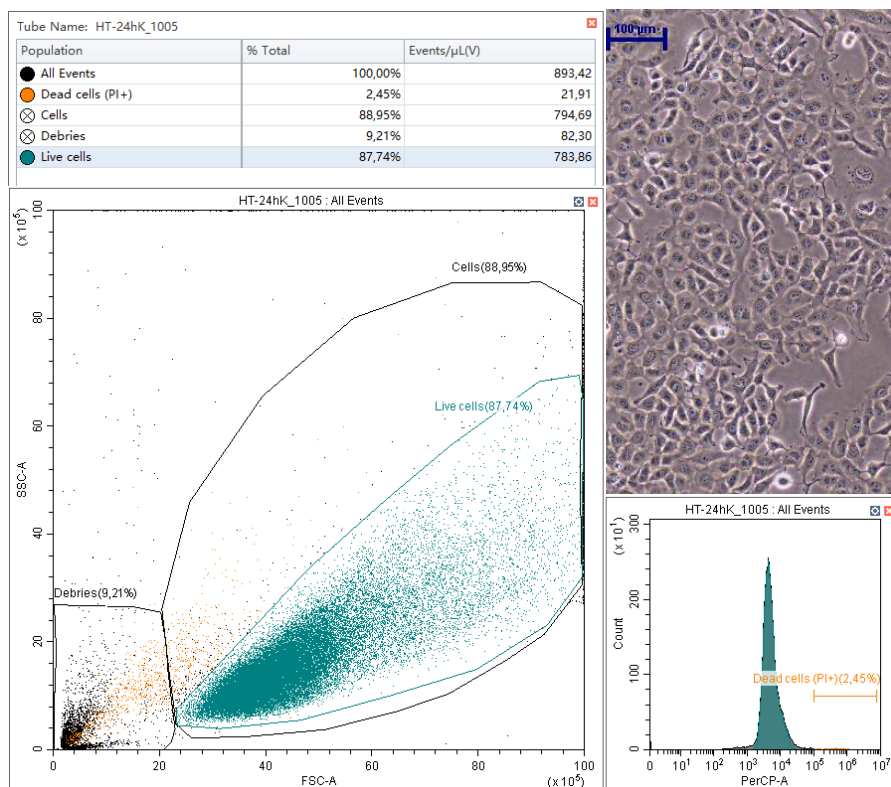
	K	2h	3h
HT1080	111	227	110
HT1080 + inhibitor	170	122	204

17. táblázat: HT-9 RNS koncentrációk ng/μL koncentrációkban

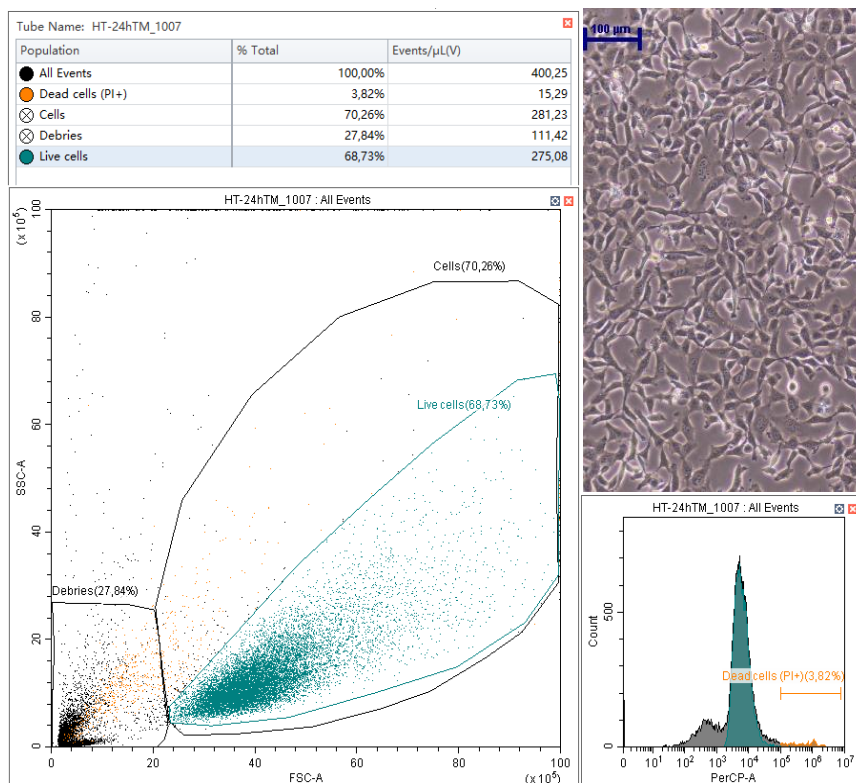
	K	2h	3h	24h
HT1080	600	480	450	350
HT1080 + inhibitor	390	210	280	-

18. táblázat: HEK-10/HT-10 RNS koncentrációk ng/μL koncentrációkban

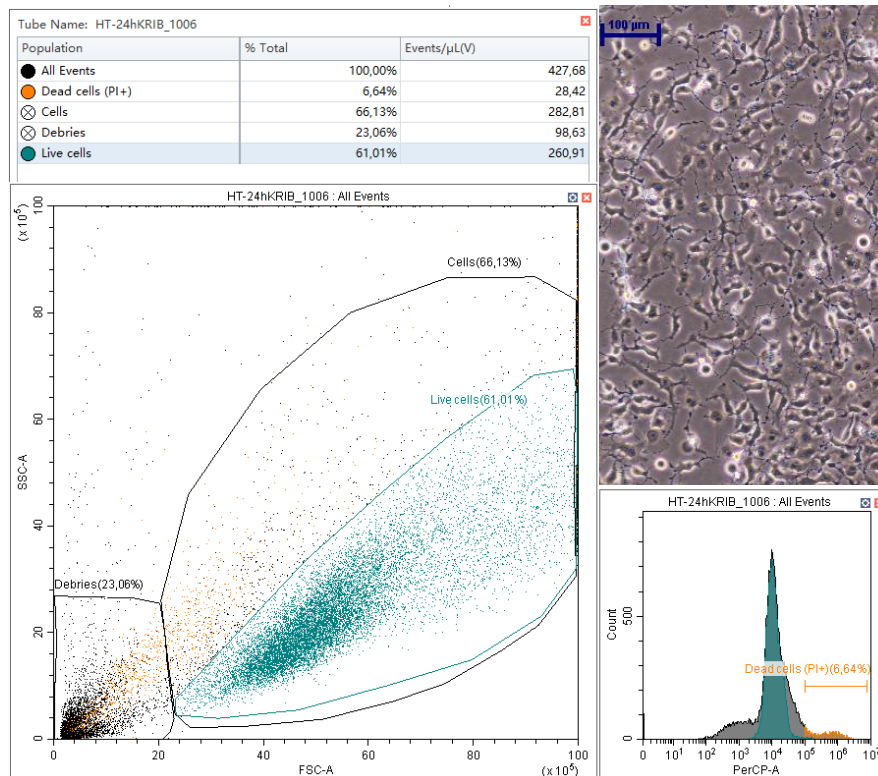
	K	3h	6h	24h
HEK293	1350	460	645	590
HT1080	450	900	570	260
HEK293 + inhibitor	540	570	500	500
HT1080 + inhibitor	440	445	480	180



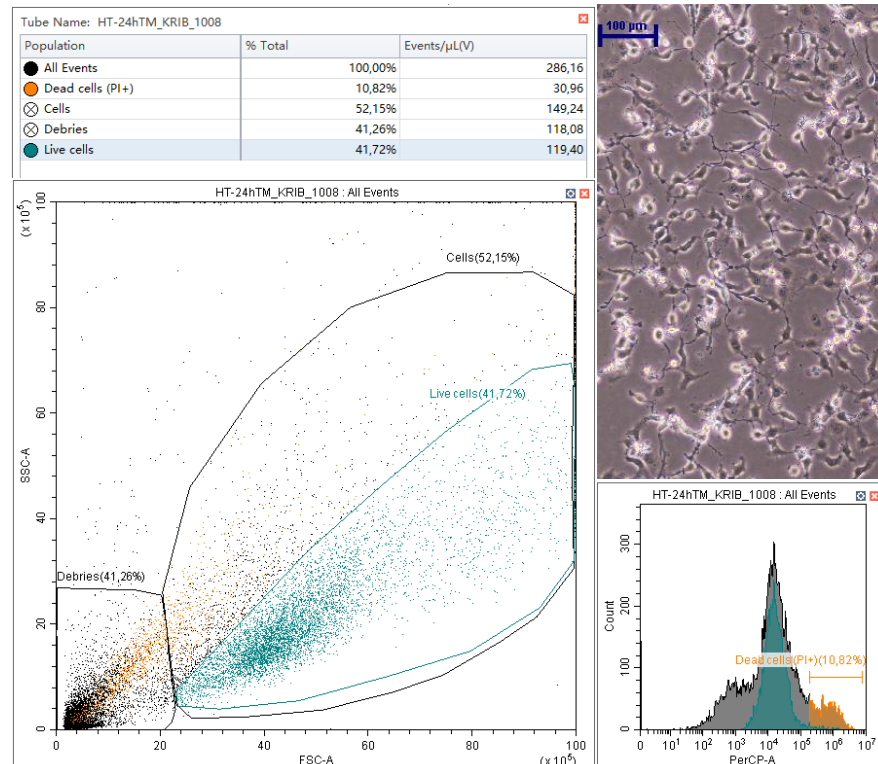
17. ábra: HT-1080 24 órás kontroll



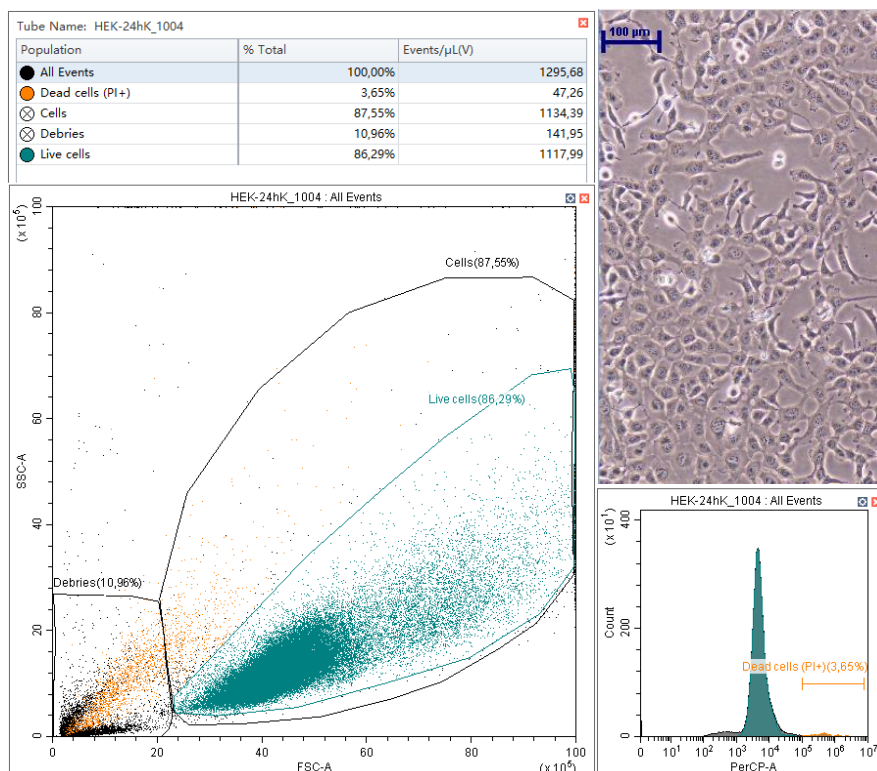
18. ábra: HT-1080 24 órás TunM kezelés



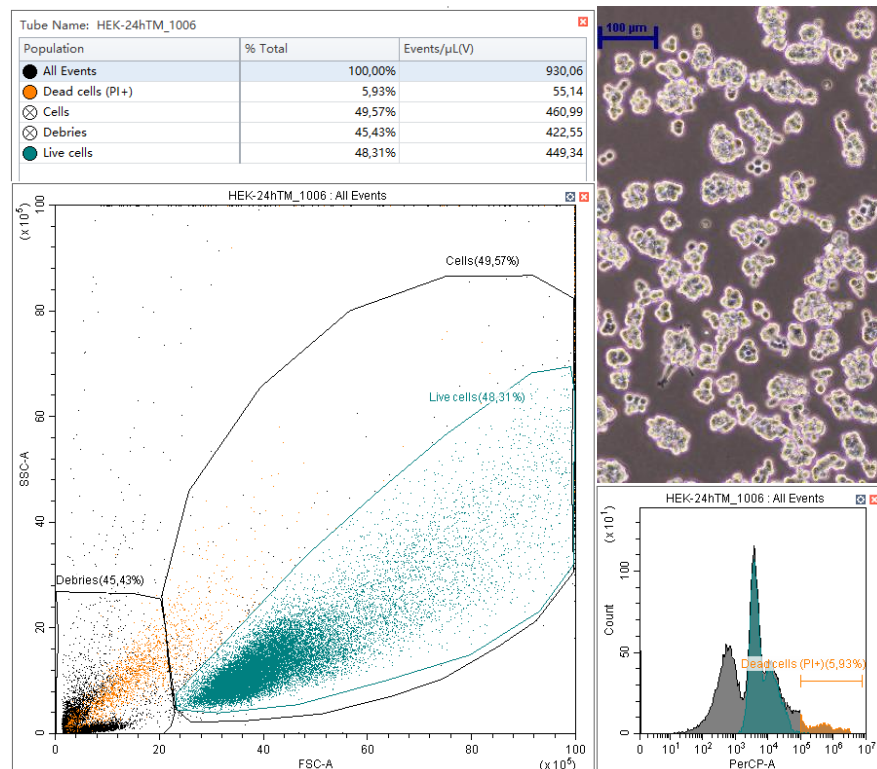
19. ábra: HT-1080 24 órás HSF-1 inhibitor kezelés



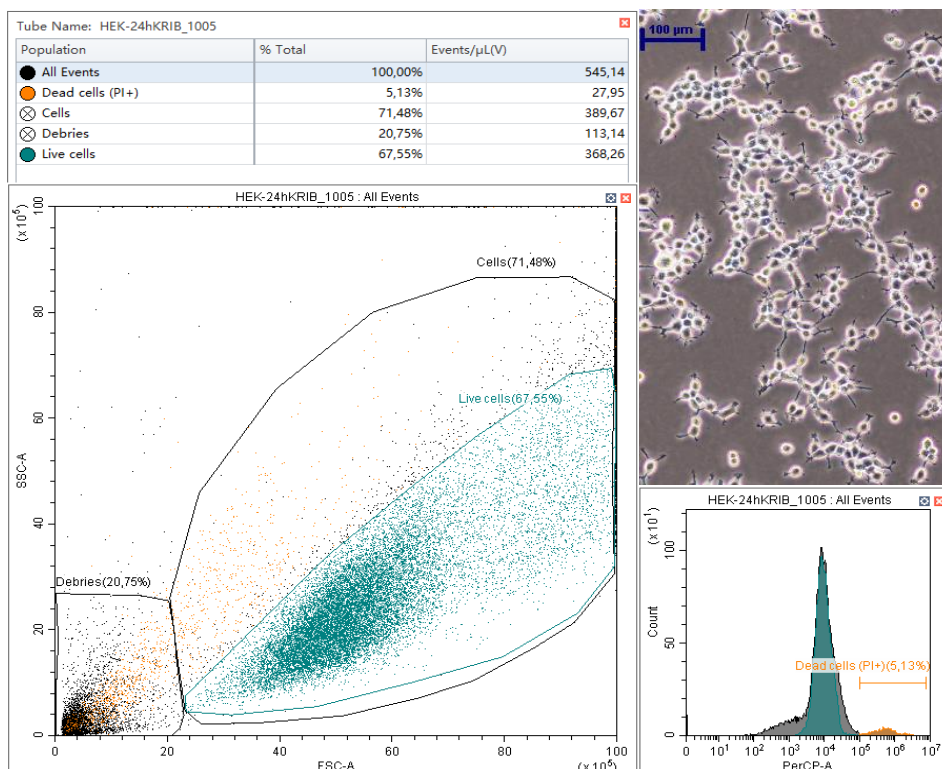
20. ábra: HT-1080 - 24 órás TunM és HSF-1 inhibitor kezelés



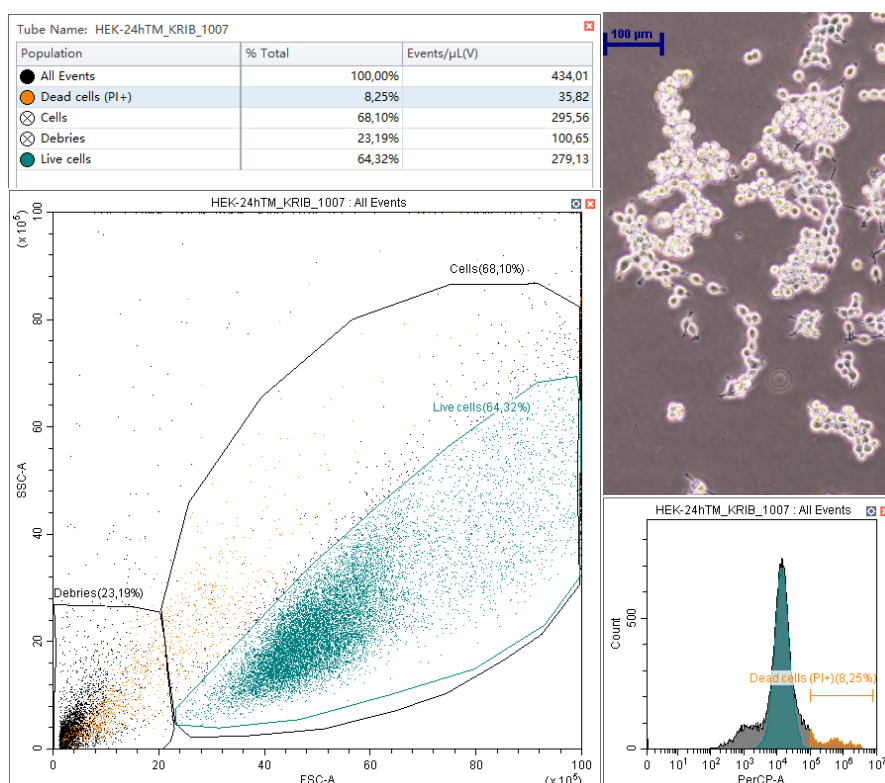
21. ábra: HEK-293T - 24 órás kontroll



22. ábra: HEK-293T - 24 órás TunM kezelés



23. ábra: HEK-293T - 24 órás HSF-1 inhibitor kezelés



24. ábra: HEK-293T - 24 órás TunM és HSF-1 inhibitoros kezelés