



Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem
Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék

A farmakológiai aszkorbát és a klorokin együttes hatásának vizsgálata

Készítette:
Szabados Larina

Témavezető:
Dr. Hajdinák Péter

Konzulens:
Makk-Merczel Kinga

2023.09.27.

Tartalomjegyzék

1.	Rövidítésjegyzék	3
2.	Absztrakt	5
3.	Szakirodalmi áttekintés	6
3.1.	A Warburg-effektus.....	6
3.2.	KRAS útvonal	7
3.2.1.	RAS aktivációja	8
3.3.	Autofágia	9
3.4.	A farmakológiai aszkorbát	11
3.5.	Klorokin.....	14
3.6.	Hipotézis	15
3.6.1.	Kísérletes vizsgálatok.....	17
3.6.1.1.	Életképesség-vizsgálatok a KRAS mutáns PDAC sejteken	17
3.6.1.2.	KRAS mutáns PDAC sejtek kombinált kezelése farmakológiai aszkorbáttal és klorokinnal	18
3.6.1.3.	Klorokinnal kezelt KRAS mutáns PDAC sejtek hatásmechanizmus-vizsgálata	20
4.	Célkitűzés.....	22
5.	Módszerek és eszközök.....	23
5.1.	Vizsgált sejtvonalak	23
5.2.	Sejtfenntartás.....	23
5.3.	Sejtszám mérés.....	23
5.4.	Sejtkiültetés.....	23
5.5.	Kezelések	23
5.6.	MTT Assay	24
5.7.	mRNS expresszió	24
5.8.	Western blot	25
5.9.	Statisztikai vizsgálatok	25
6.	Eredmények és értékelésük	26
6.1.	KRAS mutáns PDAC sejtek GLUT1 transzportereinek mRNS-szintű expressziós változása kombinált kezelés hatására	26
6.2.	KRAS mutáns PDAC sejtek specifikus fehérjéinek vizsgálata Western blot technikával	28
6.3.	Vad típusú BxPc-3 PDAC sejtek kombinált kezelése által indukált sejthalálfolyamat vizsgálata MTT Assay használatával.....	30
6.4.	Vad típusú MCF-7 emlő adenokarcinóma sejtek kombinált kezelése által indukált sejthalálfolyamat vizsgálata MTT Assay használatával	32
6.5.	A kezelőszerek hatásmechanizmus-vizsgálata.....	34

6.5.1.	A klorokin hatásmechanizmusának vizsgálata	34
6.5.2.	A farmakológiai aszkorbát hatásmechanizmusának vizsgálata	37
7.	Összefoglalás	39
8.	Köszönetnyilvánítás.....	41
9.	Irodalomjegyzék	42

1. Rövidítésjegyzék

AMP	Adenozin-monofoszfát
AMPK	AMP-aktivált protein kináz
ASC	Aszkorbát
ATP	Adenozin-trifoszfát
BafA1	Bafilomycin A1
BSA	bovine serum albumin
CQ	Klorokin
CRC	Vastagbélrák
DHA	Dehidroaskorbát
EGFR	Epidermális növekedési faktor
ERK	Extracelluláris jel szabályozott kinázok
GAPDH	Glicerinaldehyd-3-foszfát-dehidrogenáz
GDP	Guanozin-difoszfát
GLUT	Glükóz transzporter
GPX1	Glutation-peroxidáz
GSH	Glutation
GTP	Guanozin-trifoszfát
HCQ	Hidroxiklorokin
H ₂ O ₂	Hidrogén-peroxid
MAPK	Mitogén-aktivált protein kináz
MEK	Mitogén-aktivált protein kináz kináz
mTOR	Mammalian target of rapamycin
NAC	N-acetil-cisztein
NAD	Nikotinamid-adenin-dinukleotid
PBS	Foszfátpuffer sóoldat (phosphate buffered saline)
PDAC	Hasnyálmirigy adenokarcinóma (Pancreatic ductal adenocarcinoma)
PFK1	Foszfofruktokináz 1
PFK2	Foszfofruktokináz 2

PKM	Piruvát-kináz M
ROS	Reaktív oxigénszármazékok

2. Absztrakt

A 20. század elején a Nobel-díjas Ottó Heinrich Warburg megállapította, hogy a különböző eredetű rákos sejteknek más a glükóz-anyagcseréjük, sokkal nagyobb glükózfogyasztással bírnak, mint a normális sejtek. A rákos sejtek hibrid metabolikus állapotuk miatt számos stressztényezőhöz képesek alkalmazkodni, ez a Warburg-effektus, mely lényege, hogy az oxidatív foszforiláció és glikolízis egy időben játszódik le. A humán tumorok jelentős részében megfigyelhető a RAS fehérjecsalád tagjait aktiváló mutáció, mely következtében megváltozik a sejtek túlélésének, proliferációjának, differenciációjának folyamata. Többek között a KRAS izoforma mutációja is kimutatható számos daganatos megbetegedésnél, például a hasnyálmirigy ductalis adenokarcinómánál (PDAC), a vastagbél- és tüdődaganatoknál. Ez utóbbi jelentős szerepet játszik az imént említett Warburg-effektus kialakulásában, hiszen kimutatták a KRAS mutáns sejtekben a piruvát-kináz M2 enzim hiperaktivációját, ami egy onkogén transzkripciós faktoron keresztül indukálta a glükóz-transzporter GLUT1 expressziót. Kutatócsoportunk a közelmúltban felállított egy matematikai modellt, mellyel leírhatók a KRAS mutáns rákos sejtek metabolizmusát szabályozó főbb elemek. Kutatócsoportunkban korábban Bogárdi Letícia diplomamunkája keretében kipróbált egy, a fenti modell alapján prediktált ígéretes antitumor terápiás lehetőséget, amely a KRAS mutáns rákos sejtek metabolizmusát célozta. Az alkalmazott klorokin és aszkorbát kombinált kezelése szinergikus hatást váltott ki a KRAS mutáns PDAC sejtvonalakon. Dolgozatom célja a kombinált antitumor terápiás lehetőség hatásmechanizmusának vizsgálata volt. Megvizsgáltuk, hogy a KRAS mutáns PDAC sejtekben a Warburg-anyagcserére jellemző fokozott GLUT1 expressziót csökkenteni lehet-e a farmakológiai aszkorbát és a klorokin együttes alkalmazásával. Majd ezen kezelőszerek hatásmechanizmusát vizsgáltuk a KRAS jelátviteli útvonalra, a MEK/ERK fehérjék aktivitásának változását Western blot technikával. Kimutattuk, hogy a két szer kombinált kezelésével kiváltott szinergia nem függ a KRAS útvonaltól, így vizsgálatainkat KRAS mutációra nézve vad típusú rákos sejtek vizsgálatával folytattuk. Utóbbiakon életképesség-méréseket végeztünk, kombináltan kezelve a sejteket szinergikus életképesség-csökkenést figyeltünk meg, a sejtek elpusztultak. Továbbá a kezelőszerek hatását külön-külön is megvizsgáltuk. Igazoltuk, hogy a klorokin valóban gátolja az autofágiát, de úgy tűnik, hogy MIA PaCa-2 sejtekben citotoxicitását valamilyen egyéb, autofágia-független mechanizmuson keresztül fejt ki. Valamint bebizonyítottuk, hogy a farmakológiai aszkorbát MIA PaCa-2 sejtekben is a H_2O_2 termelődését keresztül éri el sejtölő hatását. Összefoglalóan a farmakológiai aszkorbát és a klorokin együttes alkalmazása egy nagy potenciállal bíró kombinált kezelés lehet nem csak a komoly prognózissal rendelkező KRAS mutáns tumorok esetében, hanem szélesebb körben, más típusú rákos sejteken is.

3. Szakirodalmi áttekintés

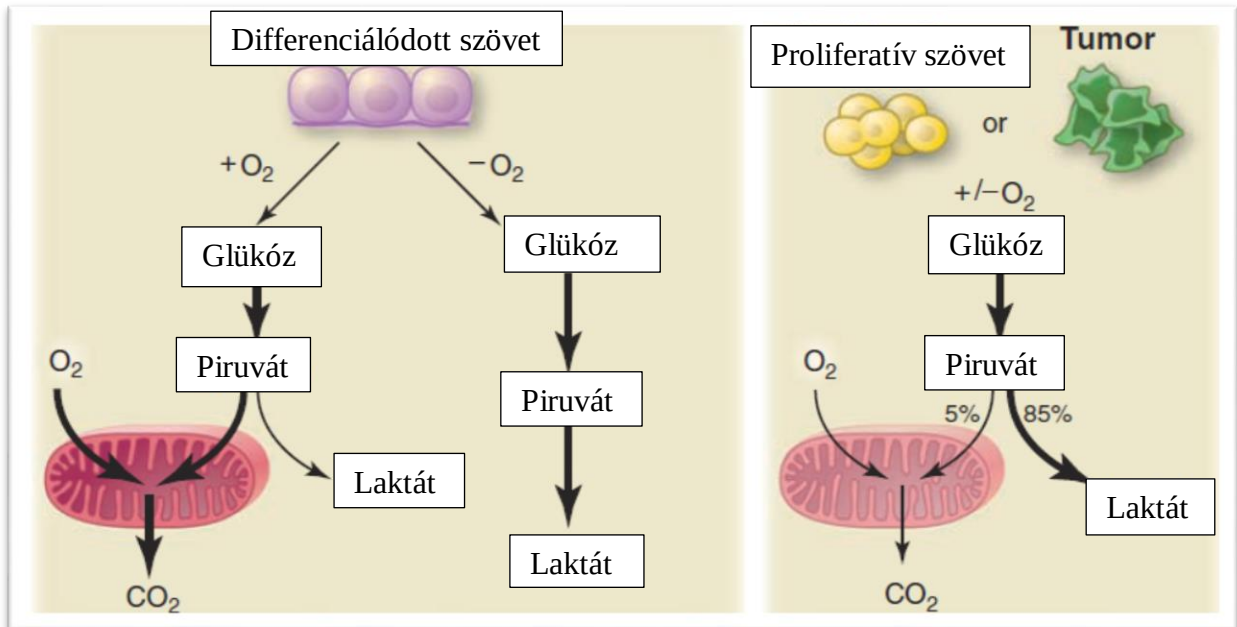
3.1. A Warburg-effektus

A 20. század elején a Nobel-díjas Otto Heinrich Warburg megállapította, hogy a különböző eredetű rákos sejteknek más a glükóz-anyagcseréjük, sokkal nagyobb glükózfogyasztással bírnak, mint a normális sejtek. A daganatsejtek hibrid metabolikus állapotuknak köszönhetően számos stressztényezőhöz képesek gyorsan alkalmazkodni életben maradásuk és növekedésük érdekében. Ez a Warburg-effektus (aerob glikolízis), melynek lényege, hogy az oxidatív foszforiláció és a glikolízis egy időben játszódik le. A folyamat során az oxigénellátottságtól függetlenül fokozott a glikolízis, emelkedett a glükózfelhasználás és a laktát szintézis. A glükóznak körülbelül kétharmada alakul át laktáttá (Otto Warburg, Wind, és Negelein 1926). Warburg úgy vélte, hogy ez az effektus az oxidatív foszforiláció defektusával magyarázható, de ezen elméletre később rácéfoltak. Kiderült, hogy nem sérült az oxidatív foszforiláció, hanem egyidejűleg zajlik az aerob glikolízissel. A fokozott glükózfogyasztás ellenére a légzési oxigénszükséglet nem nő meg, amelyből arra lehet következtetni, hogy a glükóz felhasználásakor a tejsavas fermentáció során a piruvát nem lép be a citrát-körbe, a felesleget a laktát-dehidrogenáz enzim dolgozza fel, amely laktátot képez (1. ábra) (Koppenol, Bounds, és Dang 2011). A nagy mennyiségben termelődött laktát elsavasítja a daganatsejt mikrokörnyezetét, amely szintén egy stresszhatást vált ki, de a tumor sejtek ehhez könnyen alkalmazkodnak.

Warburg és társai mesterséges körülmények között kiszámították az effektus energetikai hátterét. Megállapították, hogy normoxiás esetben, mikor az oxigén megfelelő mennyiségben van jelen, ugyanannyi idő alatt egy glükóz molekula oxidatív metabolizmusánál 36 ATP keletkezik, rákos sejtekben további 10 glükózmolekula alakul át az aerob glikolitikus útvonalon 20 tejsavmolekulává, ami még 20 ATP-t eredményez. Anoxiás (oxigénhiányos) körülmények között rákos sejtekben 13 glükózmolekula 26 tejsavmolekulává alakul át, és így 26 ATP termelődik (Otto Warburg és mtsai. 1926). Összességében a rákos sejtek oxigénhiányos állapotban sokkal több ATP-t termeltek, mint a normális sejtek. Továbbá a daganatsejtek folyamatos proliferációja megköveteli, hogy a bioszintetikus prekursorok megállás nélkül termelődjenek, tehát folytonos az aminosav-, nukleinsav-, lipidszintézis. A fokozott glikolízis miatt felhalmozódnak a glikolitikus intermedierek is, amelyek fokozzák a pentóz foszfát útvonalat (PPP), ennek következtében pedig a NADPH és ribóz-5-foszfát mennyisége is megnő, melyek a foszfolipidek és nukleinsavak építőelemei. A NADPH ezek mellett lehetővé teszi a tumorsejtek számára, hogy újrahasznosítsák a glutationt (GSH), amely egy antioxidáns, és döntő szerepet játszik az intracelluláris tér redox állapotának fenntartásában, és megvédi a rákos sejteket az oxidatív károsodástól (Abdel-Wahab, Mahmoud, és Al-Harizy 2019).

A túlzott glikolízis mellett a különböző glükóz transzportereknek, például a GLUT1, 3 és 4-nek is fokozott a működése. A glükóz szállítása a sejtekbe egy fontos, szabályozott lépés, ám a GLUT1 és a nátrium-glükózhoz kapcsolódó transzporter (SGLT1) a legtöbb rákos sejtben túlműködik. Továbbá a GLUT1 és GLUT3 magas expressziója fokozott glükózfelvétellel, illetve aktivált onkogén jelátviteli útvonalakkal jár együtt. A glikolitikus útvonalon 3 enzim expressziója fokozódik a tumorsejtekben. Az egyik ilyen a hexokináz (HK), mely 4 izoformával rendelkezik. Köztük a HK2 inzulinérzékeny zsír- és izomszövetekben expresszálódik, és több daganatsejtben is túltermelődik. A következő szabályozott pont egy foszforilációs lépés, a

fruktóz-6-foszfát átalakítása fruktóz-1,6-bifoszfáttá, amit a foszfofruktokináz 1 katalizál (PFK1). Ezt a folyamatot többek között a fruktóz-2,6-bifoszfát szintje szabályozza, ami szintén fruktóz-6-foszfátból állít elő a foszfofruktokináz 2-t (PFK2). A PFK2 túlermelődése a rákos sejtekben a fruktóz-2,6-biszfoszfát magas szintjét okozza, amely aktiválja a PFK1-et, ami ATP-szinttől független magas glikolitikus arányt eredményez. Az utolsó szabályozott lépés a foszfoenolpiruvát átalakítása piruváttá és ATP-vé piruvát-kináz (PK) által (Kapuy, Makk-Merczel, és Szarka 2021).



1. ábra: A Warburg-effektus során az oxidatív foszforiláció és a glikolízis egy időben játszódik le. A folyamat során az oxigénellátottságtól függetlenül fokozott a glikolízis, emelkedett a glükózfelhasználás és a laktát szintézis. A fokozott glükózfogyasztás ellenére a légzési oxigénszükséglet nem nő meg, amelyből arra lehet következtetni, hogy a glükóz felhasználásakor a tejsavas fermentáció során a piruvát nem lép be a citrát-körbe. Az ábrán megfigyelhető, hogy míg a normális sejtekben képződő piruvát bekerül a mitokondriumba és ott lejátszódik a citrát-ciklus, addig a rákos sejtekben a piruvát laktáttá is alakul, ami kijut a sejtközzöti térbe, elsavasítva azt (Heiden, Cantley, és Thompson 2009).

3.2. KRAS útvonal

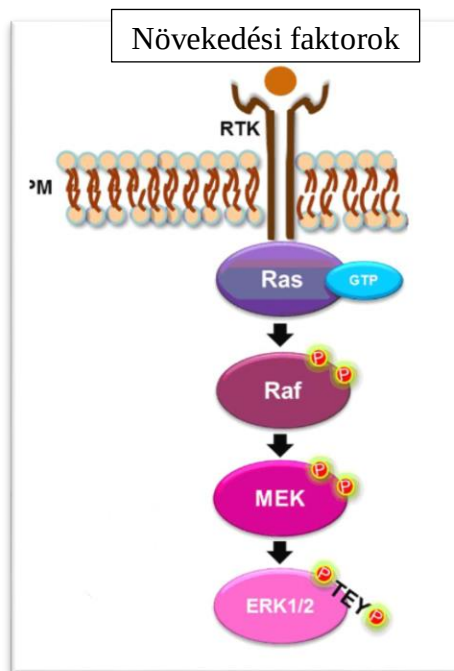
A RAS fehérjecsald tagjai kisméretű, membránhoz kötött guanin nukleotid-kötő fehérjék; amelyek molekuláris kapcsolóként működnek az aktív GTP és inaktív GDP állapotok között. A humán tumorok jelentős részében megfigyelhető a RAS fehérjecsald tagjait aktiváló mutáció, mely következtében megváltozik a sejtek túlélésének, proliferációjának, differenciációjának folyamata. A RAS fehérjék négy különböző izoformával rendelkeznek: HRAS, NRAS és KRAS (KRAS4A, KRAS4B). Ezen izoformák bármelyikében bekövetkező genetikai változások nagyon gyakoriak a daganatos megbetegedésekben, akár a humán daganatok 20-30%-ban is megjelennek. A legtöbb esetben a KRAS mutációk jelenléte a leggyakoribb, de főleg a hasnyálmirigy- (95%), vastagbél- (40-45%), végbél- és a tüdőráknál (16-40%) figyelhető meg. Ezen mutációk túlnyomó többsége a 12. pozícióban fordul elő. Ezzel szemben az onkogén mutációk aránya az NRAS és HRAS izoformák esetében jóval alacsonyabb (3-8%). Az NRAS mutáció leggyakrabban a melanománál és a mieloid leukémiánál fordul elő. A mutáció általában a 61. pozícióban található (Johnson és mtsai. 1997).

3.2.1. RAS aktivációja

Egy receptorhoz kötött tirozin kináz, például az epidermális növekedési faktor receptor (EGFR) aktiválható egy extracelluláris ligand által, mint amilyen például az epidermális növekedési faktor (EGF). A kötés következtében az EGFR foszforilálódik. Végül számos fehérje kötődése és aktivációja után a RAS fehérjéről leválik egy GDP molekula, melynek köszönhetően meg tud kötni egy GTP-t, ezzel aktiválódva (Knight és Irving 2014).

Kináz kaszkád

Az aktivált RAS aktiválja a Raf kináz protein kinázt, amely utána foszforilálás útján aktiválni fogja a MAPK/ERK kinázt (MEK1, MEK2), ez utóbbi pedig foszforilálja az extracelluláris jel szabályozott kináz1/2-t (ERK 1/2), mely szintén aktívvá válik (2. ábra).



2. ábra: ERK 1/2 útvonal. Első lépése, hogy egy extracelluláris mitogén beköt a sejt felszínén található EGFR receptorba, ami ez által aktiválódik. Ennek következtében pedig a RAS egy GDP-t lecserél egy GTP-re, ezzel aktiválva az útvonalat. A RAS aktiválja a RAF fehérjét, mely aktiválja a MEK-et, ez utóbbi pedig képes aktiválni az ERK 1/2-t. (Serna-Blasco és mtsai. 2019).
Kép forrása: (Zhao és mtsai. 2019)

A RAS mutációk indukálják legtöbbször a RAF–MEK–ERK jelátviteli útvonalak fokozott aktivitását.

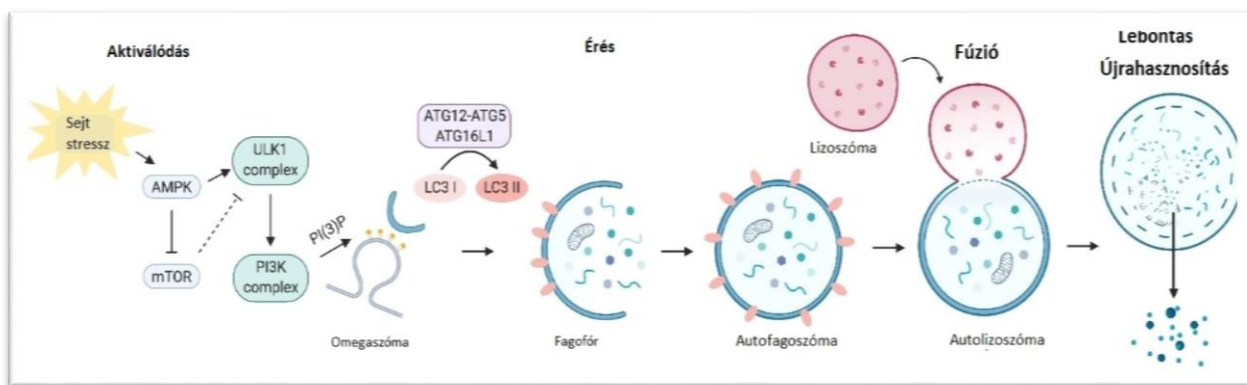
Továbbá a KRAS jelentős szerepet játszik a már említett Warburg-effektus kialakulásában, hiszen kimutatták a KRAS mutáns sejtekben a piruvát-kináz M2 enzim hiperaktivációját, ami egy onkogén transzkripció faktoron, a c-Myc-n keresztül indukálta a glükóz-transzporter GLUT1 expresszióját. Bár a PKM1 (piruvát-kináz M1) és a PKM2 (piruvát-kináz M2) is ugyanabból a PKM pre-mRNS-ből származik alternatív splicing eredményeként, a PKM1-nek alig van hatása a sejtek proliferációjára. Ugyanakkor a PKM2 elősegíti a Warburg-effektust és a sejtciklus progresszióját, így jó célpont lehet a daganatellenes terápiákban. Kimutatták, hogy a farmakológiai aszkorbát rontja a Warburg-hatást KRAS mutáns sejtekben azáltal, hogy mind a GLUT1-, mind a PKM2-függő fehérjék expresszióját csökkenti. Ez arra utal, hogy a farmakológiai aszkorbát rákterápiákban felhasználható (Yang és mtsai. 2013a).

A sejtanyagcsere egyik kulcsfontosságú szabályozója, az mTOR, a KRAS mutánsokban is aktiválódik, az aerob glikolízist pedig fokozza a PKM2 felaktiválással a c-Myc indukción keresztül, ami arra utal, hogy az mTOR-nak és az autofágiának (lásd részletesen a 3.3 fejezetben) terápiás jelentősége lehet a rák kezelésében. Vizsgálták, hogy a PKM2 központi szerepet játszhat a GLUT1 transzport szabályozásában a KRAS mutáns sejtekben. Bár az mTOR fiziológiai körülmények között egy jól ismert autofágia inhibitor, mégis számos tanulmány feltárta, hogy az autofágia hiperaktívvá válik a KRAS mutáns rákos sejtekben. (Bryant és mtsai. 2019). Továbbá a KRAS mutáns rákos sejtek autofágiafüggők, mert ez a folyamat aminosavakat és lipideket biztosít a sejt számára, hogy túléljen olyan körülmények között is, amikor korlátozott a tápanyagmennyiség. Az autofágiát szabályozni lehet különböző gyógyszerekkel (pl. klorokin, hidroxiklorokin), amely komoly terápiás potenciállal bírhat (Zhao és Zheng 2019)

Megfigyelték, hogy a MEK-ERK jelátviteli útvonalnak is szerepe van az autofágia szabályozásában (Bryant és mtsai. 2019). A KRAS- vagy az ERK-gátlókkal (ERKi) végzett kezelés növelte az autofágia fluxusát számos KRAS mutáns humán PDAC sejt vonalakban. E megfigyelés egy lehetséges magyarázata, hogy a glikolízis fluxusa és a mitokondriális aktivitás nagymértékben lecsökkent a KRAS gátlásakor, kompenzációként viszont megnőtt az autofágia fluxusa, hogy a sejtek túléljenek a metabolikus stressz ellenére is. Továbbá az ERKi-kezelés megváltoztatta a nukleotid anyagcserét és megnövelte az AMP szintet a PDAC sejtekben, ezzel aktiválva az AMP-aktivált protein kinázt (AMPK), illetve kiváltotta az autofágia-aktivált kináz ULK1 foszforilációját. Több vizsgálatban is klorokint (CQ) és hidroxiklorokint (HCQ) alkalmaztak, mivel úgy vélték, hogy daganatellenes aktivitással rendelkezhetnek (Kimura és mtsai. 2013). Úgy találták, hogy a CQ, illetve a HCQ nagymértékben javítja MEK vagy ERK gátlás hatékonyságát különböző sejt vonalakban, pl. KRAS mutáns PDAC-ban. A MEK-gátló anyagok hatását is vizsgálták, de egyik sem bizonyult klinikailag hatásosnak a RAS-mutált rákos megbetegedések esetén (Zhao és Zheng 2019).

3.3. Autofágia

Az autofágia egy görög eredetű kifejezés, mely az „auto” (saját) és a „phagy” (enni) szavakból tevődik össze, magyar nyelvben önmérsztésként hivatkoznak rá. Ez a folyamat egy evolúciósan konzervált túlélő mechanizmus, mely táplálékhiány, sejtstressz, illetve sejtöregedés hatására kezdődik el és a sejt lebomlásával végződik. Az autofágiának három típusa létezik: makroautofágia, mikroautofágia és chaperon által közvetített autofágia, amelyek mindegyike elősegíti a citoszol komponenseinek proteolitikus lebomlását a lizoszómában. A makroautofágia során autofagoszóma jön létre, mely a lizoszómával fuzionálva autolizoszómát hoz létre (3. ábra) (Glick, Barth, és Macleod 2010). Ezzel szemben a mikroautofágiában a citoszol lebontandó elemeit a lizoszóma közvetlenül veszi fel endocitózissal. Mind a makro-, mind a mikroautofágia képes elnyelni a nagyobb struktúrákat szelektív és nem szelektív mechanizmusokon keresztül (Mizushima 2007).



3. ábra: Az autofágia folyamata során az mTOR negatívan, az AMPK pozitívan szabályozódik. Az autofágia aktiválódására létrejön az ULK1 (unc-51 autofágia aktiváló kináz1) és PI3K (foszfoinozitolid-3-kináz) fehérjekomplex. Először kialakul az omegaszóma a PI(3)P (Foszfátidil-inozitol-3-foszfát) keletkezésével, majd létrejön a fagofór, ezt követően az autofagoszóma az LC3I -nek a LC3 II formába való átalakulásakor. Autolizoszómák keletkeznek a megérett autofagoszómák és lizoszómák egyesülésével, hogy lebontsák az intracelluláris elemeket. Később a lebontott makromolekula komponensek újrahasznosulnak. Kép forrása: (Chang 2020)

A makroautofágia (továbbiakban autofágia) egy olyan katabolikus folyamat, mely során a sejt szervecskék és makromolekulák lebontódnak (Mizushima és mtsai. 2008). Az autofágia szerepe a rákban összetett, a daganat típusától függően eltérő is lehet, emiatt lassan fejlődnek az autofágiát célzó szerek, melyek alkalmasak lennének a rák kezelésére. Az onkológiában jelenleg az autofágiát úgy tartják számon, mint egy védekező mechanizmust a különböző rák kezelésekkel szemben, mint pl kemoterápia, immunterápia. Először egy tumorsuppresszív mechanizmusként írták le, ugyanis az emlős Beclin1 heterozigóta deléciója vezetett a különböző rosszindulatú daganatok kialakulásához egerekben. Azonban ez a részleges autofágia-deléciós fenotípus nem volt látható az olyan egér modellekben, melyek teljesen autofágiahiányosak lettek volna. Ezen egerek májában spontán jóindulatú daganat alakult ki. Ennek a megfigyelésnek az a magyarázata, hogy az autofágiának viszonylag gyenge tumorsuppresszív hatása van, és a jóindulatú daganatok bizonyos idő elteltével átalakultak rosszindulatúvá (Qu 2003).

Az autofágiának kettős szerepe van a tumorok kialakulásában és fejlődésében. Az egyik, hogy enyhíti a sejt károsodást (beleértve a DNS károsodását is), ami előnyös, mivel a rák kialakulását elnyomja. Ugyanakkor az energiahomoeosztázisban betöltött szerepe pedig segítheti a rosszindulatú rákos sejtek túlélését és növekedését a stresszes mikro környezetben.

Az autofágia genetikai vagy farmakológiai gátlása következtében fokozódik az ROS (*reactive oxygen species*) mennyisége, DNS-károsodás következik be, illetve egy metabolikus krízis lép fel, amely csökkenti az oxidatív foszforiláció mértékét a mitokondriumban. Számos olyan gyógyszer van, amely hatékonyan gátolja az autofágiát, ilyen például a klorokin (CQ) és származékai. Ezen vegyületek gátolják a lizoszómális savasodást és az autofagoszóma degradációját (Piffoux, Eriau, és Cassier 2021).

Számos alkalommal kimutatták, hogy a humán PDAC-ban magas az autofágia fluxusa. Modell egereken végzett kísérletekben az autofágia gátlásával (akár gyógyszeres kezelést alkalmazva, klorokinval) csökkent a sejtprolifерáció *in vitro* és a tumornövekedés *in vivo*. Ez specifikusan csak a PDAC sejtvonalakon volt megfigyelhető, az emlő-, tüdőrákos sejtvonalakon nem.

Továbbá a PDAC sejtekben megfigyelték, hogy ha a RAS–RAF–MEK–ERK/MAPK jelátviteli kaszkádot gátolták, ott fokozódott az autofágia fluxusa. Ez arra utal, hogy a PDAC

sejtvonalakban az ERK/MAPK aktiválása ellenére is előfordulhat fokozott autofágia a KRAS mutációjából származó jelátviteli utakon. Az ERK/MAPK aktiválása a TFEB/TFE3 citoplazmatikus retenciójához vezetett (az ERK/MAPK2 általi foszforiláció miatt), és csökkentette az autofágia/ lizoszóma gének számát (Bryant és mtsai. 2019b).

Bár az ERK/MAPK egyértelműen részt vesz az autofágia szabályozásában, nem valószínű, hogy az ERK/MAPK aktiváció okozná a megnövekedett autofágiát a PDAC-ban.

A PDAC sejtvonalakban az autofágia gátlása csökkent oxigénfogyasztási rátához vezetett, ami miatt lecsökkent a mitokondriális oxidatív foszforiláció (Piffoux és mtsai. 2021).

3.4. A farmakológiai aszkorbát

Az aszkorbát, vagy más néven C-vitamin egy vízoldható antioxidáns, amely szerves szerepet játszik a sejtek redox metabolizmusában, mivel hatékonyan megköti a ROS-t és a reaktív nitrogénfajtaikat, amelyek különböző stresszhatások következtében keletkeznek. Az aszkorbát továbbá fontos szerepet játszik a tokoferoxil gyök redukciójában, amely során tokoferollá alakul. Ez egy előnyös folyamat, mivel a tokoferol védelmet nyújt a lipid-peroxidáció ellen. Továbbá számos enzim kofaktora, részt vesz a karnitin és katekolaminok bioszintézisében. Az aszkorbátnak katalitikus aktivitása is van a Fe(II)-2-oxoglutarát-függő dioxigenázokon a poszt-transzlációs lépésben. Kimutatták, hogy az aszkorbát az mRNS transzkriptum stabilizálásával képes fokozni a prokollagén mRNS transzkripciót. Az aszkorbát ezeken túl szerepet játszik az epigenetikai szabályozásban is a hiszton-lizin-demetilázokban és DNS 5-metil-citozin hidroxilázokban, amelyek aszkorbát-függő hidroxiláz aktivitással rendelkeznek. A hidroxilázok kötődnek a Fe(II)-hez, mely közös jellemző a Fe(II)-2-oxoglutarát-függő dioxigenázokkal (Matsui és mtsai. 2020).

A C-vitamin az emberi bél teljes hosszában fel tud szívódni aszkorbát és dehidroaszkorbát (DHA) formájában. A DHA transzportnak viszonylag alacsonyabb az affinitása az aszkorbát transzportjához képest, tehát a C-vitamin főleg redukált formában szívódik fel. Az aszkorbát szállítását a nátriumfüggő C-vitamin transzporter (SVCT) család tagjai (SVCT1 és 2) közvetítik. A DHA szállításáért a glükóz transzporter (GLUT) család felel, (GLUT1, 2, 3, 4, 8 és 10), amelyeken keresztül Na^+ -független diffúzió zajlik (Tóth, Lőrincz, és Szarka 2018). Az aszkorbát szintje a szervezetben szigorúan szabályozott, orális adagolással maximum 80-100 μM -os plazma koncentráció érhető el. Ennek az az oka, hogy az aszkorbát autooxidációjával egy aszkorbil gyök és egy szuperoxid anion képződik, majd hidrogén-peroxid (H_2O_2) keletkezik. Az önoxidáció pH-függő és fiziológiás körülmények között viszonylag lassan megy végbe. Biológiai rendszerekben az aszkorbil gyök képződése során az aszkorbát egy elektront ad át egy átmeneti fémnek, mint például a vas vagy a réz (1). A redukált fém reagálhat oxigénnel, ezáltal előbb szuperoxid anion képződik (2), majd később hidrogén-peroxid (H_2O_2) (3).

Nagyobb, millimoláris koncentrációjú aszkorbát (farmakológiai aszkorbát) jelenlétében a H_2O_2 könnyen reagál további átmenetifém-ionokkal a Fenton reakcióban, amelyben a nagy reakcióképességű citotoxikus hidroxilgyök képződik (4) (Schoenfeld és mtsai. 2019).

Fenton reakció:

- 1) $Fe^{3+} + AscH^- \rightarrow Fe^{2+} + Asc^{\cdot-}$
- 2) $Fe^{2+} + O_2 \rightarrow Fe^{3+} + O_2^{\cdot-}$
- 3) $O_2^{\cdot-} + O_2^{\cdot-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$
- 4) $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + OH^{\cdot}$

Az aszkorbátszint szigorú szabályozása megkerülhető parenterális adagolással, amely lehetővé teszi H_2O_2 képződését jól meghatározott időn belül, csökkenti a károsodás valószínűségét, és farmakológiai alapot biztosít az aszkorbát tumorterápiás alkalmazásához. Ez az adagolási módszer azért is előnyös, mert bármilyen különbség a tumoros és normális sejtek között lehetőséget ad ezek szelektív eliminációjára.

Általában a rákos sejteket jellemezni lehet a megnövekedett ROS- és metabolikus aktivitás szintjükkel, mitokondriális diszfunkcióval, peroxiszóma aktivitással, fokozott sejtreceptor jelátvitellel, illetve fokozott onkogén, oxidáz-, ciklooxygenáz-, lipoxigenáz-, és timidin-foszforiláz aktivitással. Ugyanakkor nehéz álláspontot foglalni a rákos sejtek antioxidáns rendszerével kapcsolatban. Vizsgálták, hogy ennek köszönhetően élnek túl a magas oxidatív stresszes környezetben, és ennek a rendszernek lehet nagy szerepe a RAS- és Myc-vezérelt rákos sejtek kezelésében. Néhány tanulmány megnövekedett kataláz expresszióról számolt be daganatos sejtekben az azonos eredetű normál sejtekhez képest. Többben azonban a kataláz szabályzásának gátlását tapasztalták magas H_2O_2 -koncentrációnál, ami például a farmakológiai aszkorbát általi kezelésnél termelődik. A H_2O_2 eltávolításának sebességét lényegében a kataláz befolyásolja. A másik H_2O_2 -elimináló enzim, a glutation-peroxidáz (GPX) aktivitásának mérése hasonló eredményeket mutatott, a tumorsejtvonalak aktivitása 10-15-szer alacsonyabb lett. Ezért előfordulhat, hogy az exogén H_2O_2 -nak való kitettség következtében kevésbé képesek megbirkózni a fokozott oxidatív stresszel. A ROS-t a rákos sejtek a proliferáció, invázió, migráció serkentésére használják. Úgy tűnik, hogy a rákos sejtek képesek az oxidatív stresszt olyan szintre állítani, ami elégséges a túlélésükhöz és szaporodásukhoz, de ahhoz nem, hogy elpusztuljanak. Ezt az egyensúlyt zavarhatja meg a farmakológiai aszkorbát.

A farmakológiai aszkorbát által indukált sejthalál egyértelműen a ROS-képző tulajdonságtól és a H_2O_2 -termeléstől függ, hiszen a sejthalál kivédhető exogén kataláz, vagy adenovírus által közvetített kataláz, vagy GPX1 fokozott expressziójával. Fontos megjegyezni, hogy a farmakológiai aszkorbát szerepét a sejthalálban régóta kutatják, ámbar hatásának pontos mechanizmusát a mai napig nem sikerült tisztázni (Schoenfeld és mtsai. 2017).

Számos tanulmány kimutatta, hogy az aszkorbát által előidézett sejthalál az autofágiát okozó, kaszpáz-független útvonal aktiválásával történik. A jól ismert autofágia-gátlók, a wortmannin és bafilomicin A1 egy bizonyos mértékig gátló hatást mutattak a kis koncentrációjú aszkorbáttal szemben (0,5 mM) a HT-1080 N-RAS mutáns fibroszarkóma sejtekben. Ámbár ez a védőhatás nagyobb koncentrációknál elveszett (1mM felett). A fiziológias és magasabb koncentrációjú aszkorbát (0,1 és 0,6 mM) növelte az LC3II/LC3I szintjét, ami tovább növelte az autofágia szerepét az aszkorbát által előidézett sejthalálban (Lőrincz és mtsai. 2019).

A MIA PaCa-2 humán PDAC sejtvonal használatával megerősödött az a feltevés, hogy az aszkorbát dózis- és ROS-függő módon segítette elő a kaszpáz-független autofágiát, mivel a kataláz vagy a trolox (az E-vitamin vízben oldódó származéka) jelentősen elnyomta az aszkorbát által kiváltott sejthalált (Fukui és mtsai. 2015a).

A rákos sejtek fokozott glükózfogyasztása részben magyarázható a megnövekedett GSH fogyasztással, a fokozott NADPH igénnyel, mely utóbbi pedig a megnövekedett ROS szinttel magyarázható. Emiatt a rákos sejtek érzékenyebbek voltak a glükóz megvonásra vagy a GLUT-ok gátlására. A farmakológiai aszkorbát által kiváltott oxidatív stressz miatt megnövekedett NADPH-szükséglet, az oxidatív stressz fokozása pedig biokémiai célpontot jelenthet, mert citotoxicitást idéz elő az emberi rákos sejtekben (Szarka és mtsai. 2021).

Magas koncentrációjú C-vitaminnal történő kezelésnél kimutatták a KRAS mutáns humán vastagbélrák (CRC) sejtek pusztulását. Ez a pusztulás a C-vitamin oxidált formájának volt köszönhető, ugyanis a dehidroaszkorbátnak (DHA) fokozott volt a felvétele a GLUT1 glükóz transzporterén keresztül (Yun és mtsai. 2015).

A KRAS mutációja megváltoztatta a metabolikus homeosztázist a glükózfelvételen, a glikolitikus fluxus és a glutamin felhasználásán keresztül olyan vastagbél- és hasnyálmirigydagadatokban, amelyek gyakran magas rezisztenciával rendelkeznek a kemoterápiával szemben. A mérési eredmények alapján arra jutottak, hogy az EGFR szabályozza az anyagcserét EGFR-mutált tüdő adenokarcinómában. Továbbá azt is kimutatták, hogy az EGFR-tirozin kináz inhibitorok (TKI-k) képesek voltak csökkenteni a laktát termelést, a glükóz fogyasztást és a glükóz által kiváltott extracelluláris savasodási rátát, ami arra utal, hogy a EGFR felelős lehet a sejt aerob glikolízisének fenntartásáért, ami a Warburg-effektus esetén figyelhető meg (Eser és mtsai. 2014).

Molekuláris bizonyítékok alátámasztják, hogy az onkogén KRAS, amely megzavarja a normál sejtanyagcsere folyamatokat, szoros összefüggésben van a tumorok anti-EGFR terápiával szembeni rezisztenciájával.

Kimutatták, hogy az aszkorbát citotoxikus hatást fejt ki a KRAS mutáns vastagbélrák sejtvonalakra, mind egymagában, mind cetuximabbal kombinálva. A cetuximab egy anti-EGFR terápiás gyógyszer, az EGFR-t felismerő és azt blokkoló ellenanyag. Aguilera és munkatársai arra a következtetésre jutottak, hogy a C-vitamin hatása valószínűsíthetően függ a KRAS mutációs státuszától. Feltételezve, hogy a C-vitamin megtámadja a hibás metabolizmussal rendelkező sejteket, megakadályozhatja a cetuximab rezisztenciát a KRAS mutáns tumorokban. Ezért különböző KRAS mutáns vastagbélrákos sejtvonalakon vizsgálták a cetuximab hatását. Ha a KRAS mutációval rendelkezik a sejt, akkor a mutáció befolyásolja az EGFR működését, amely konstitutív aktivációt indít el RAS/RAF/MAPK útvonalon, ami ellenállást vált ki az anti-EGFR terápiákkal szemben. Sok sejtvonal nem mutatott érzékenységet a cetuximabbal szemben, ellenben a vad típusú KRAS sejtnövekedést a cetuximab egyértelműen jelentősen gátolta. Három sejtvonalon vizsgálták az aszkorbát hatását farmakológiai koncentrációban. A HT29 sejtvonal volt a legérzékenyebb az aszkorbát citotoxikus hatására. Amikor a HT29, SW480 és LoVo sejteket kombináltan kezelték cetuximabbal (0,4 μ M) és aszkorbáttal (5mM), megállt a sejtnövekedés, és sokkal hatásosabb volt, mint az önmagában alkalmazott aszkorbát, így megállapították, hogy a két szer szinergizál. Továbbá bebizonyították, hogy a vad típusú KRAS sejt kevésbé volt érzékeny a kezelésre, mint a KRAS mutáns sejtvonalak (Aguilera és mtsai. 2016).

Az EGFR/MAPK jelátvitel megváltozását a KRAS mutáns vastagbélrákban figyelték meg. Az EGFR/MAPK útvonal mutációja és az anti-EGFR terápiával szembeni ellenállás ahhoz a

metabolikus változáshoz kapcsolódik, amit Otto Warburg jegyzett le. Makinoshima H és társai (Makinoshima és mtsai. 2014) megállapították, hogy az EGFR egy egész metabolikus hálózatot szabályoz az EGFR-mutáns tüdőráksejtekben. Kimutatták, hogy az EGFR-tirozin-kináz inhibitorok lecsökkentették a laktát termelést, a glükóz fogyasztást és a glükóz által kiváltott savasodási rátát, ezzel jelezve, hogy az EGFR jelátvitel felelős volt a sejt aerob glikolízisének fenntartásáért, ami a Warburg-effektusban figyelhető meg.

A C-vitamin megváltoztatja a Warburg-effektusban fontos szerepet játszó GLUT-1-et és a PKM2-t azáltal, hogy inhibeálja a PKM2 foszforilációját. A rákos sejtekre jellemző a megváltozott metabolizmus és a magas glükóz bevitel. A GLUT1 katalizálja a glükóz passzív diffúzióját a sejt belsejébe, mely rákos sejtek esetben túlműködik. Megvizsgálták, hogy a KRAS mutáns vastagbélrák sejtekben hat-e a GLUT1 expressziójára a C-vitamin. Kimutatták, hogy farmakológiai mennyiségben kezelt sejtekben egy nap után látványosan lecsökkentette a GLUT1 működését. Yang W és társai (Yang és mtsai. 2013b) vizsgálták, hogy a rákos sejtekben megváltozott EGFR útvonal indukálja a PKM2 nukleáris transzlokációját, amit a PKM2 ERK általi foszforilációja közvetít; ennek a következménye, hogy fokozódik a glikolitikus enzimek expressziója (pl: GLUT1 és LDHA). Emiatt a KRAS mutáns sejtekben kialakul a PKM2 enzim hiperaktivációja, ami egy onkogén transzkripció faktoron, a c-Myc-en keresztül indukálni tudja a GLUT1 expresszióját. A PKM2 továbbá elősegíti a Warburg-effektust és a sejtciklus progresszióját, így jó célpont lehet a daganatellenes terápiákban. Leírták, hogy a farmakológiai aszkorbát rontja a Warburg-hatást KRAS mutáns sejtekben azáltal, hogy gátolja a PKM2 foszforilációját, így csökkenti mind a GLUT1-, mind a PKM2-függő fehérjék expresszióját. A PKM2 a sejtmagba transzportálódik és úgy viselkedik, mint a β -catenin koaktivátor, ami c-Myc expressziót indukál, amely fokozza a glikolitikus enzimek expresszióját, mint például a GLUT1-et (Aguilera és mtsai. 2016).

3.5. Klorokin

A klorokint malária megelőzésére és kezelésére használják, ezért a maláriaellenes és amebicid szerek csoportjába tartozik. Továbbá immunszuppresszív tulajdonsága miatt alkalmazzák autoimmun betegségek ellen is (Sz n 1972).

A klorokin és hidroxiklorokin eredetileg a malária ellen kifejlesztett gyógyszerek, de alkalmasak lehetnek a rák kezelésére is. Klinikai vizsgálatokkal bizonyították, hogy ezek a gyógyszerek kedvező hatást váltottak ki a rákos sejtekkel szemben. Ennek a pontos mechanizmusa még nem ismert, de két lehetséges elképzelés van arról, hogy mi állhat ennek a hátterében. Az egyik, hogy a klorokin rákellenes hatása a makroautofágia-gátló képessége miatt lehetséges, mivel amikor a klorokin belép a lizoszómába, ott protonálódik az alacsony pH következtében. A klorokin protonált formájának felhalmozódása kevésbé savas körülményekhez vezet, ezáltal csökken a lizoszóma működése. Ha klorokinnal gátoljuk a lizoszóma aktivitást, leállhat az autofágia későbbi lépése, a lizoszóma lebontása, meghibásodhat az autofágia folyamata, emiatt nem képződik elég energia a sejtekben. Valószínűsíthető, hogy emiatt a klorokin sejthalálra érzékenyítheti a rákos sejteket (Slater 1993). A másik nézet szerint ez a maláriaellenes gyógyszer az autofagoszóma és lizoszóma fúzióját akadályozza meg. Ezt azzal magyarázták, hogy a lizoszómán belüli vegyületek pozitívan hatnak az ATPáz protonpumpára, emiatt a töltésviszonyok megváltoznak, megváltozik a pH is, és ezáltal a Golgi vezikuláknak, endoszómáknak, lizoszómáknak a

funkciója csökken. Ennek hatására a lizoszóma és az autofagoszóma nem fúzióál autolizoszómává. Ez utóbbi csökkenti az autofágia fluxusát. Továbbá a klorokin és hidroxiklorokin felhalmozódása az endoszómákban, liszozómákban meggátolhatja az újonnan szintetizálódott fehérjék posztranszlációs módosulását az endoplazmatikus retikulumban, illetve a Golgi vezikulákban (pl glikozil-transzferázok és proteázok, melyek részt vennének az alacsony pH-t igénylő posztranszlációs módosításban). Ezzel a folyamattal pedig apoptózist idézett elő a sejtekben (Ferreira és mtsai. 2021).

A klorokin jól alkalmazható gyógyszer, mert a mellékhatások alacsony dózisok esetén minimálisak. Magasabb dózisok esetén azonban sokkal több toxikus hatás lép fel, például látászavarok, gyomor-bélrendszeri zavarok, elektrokardiográfiás változások, fejfájás és viszketés.

A klorokin mellett más autofágia-gátlókat, például a bafilomicin A1-et, a 3-metil-adenint és a pepsztin A-t is tanulmányozták daganatellenes gyógyszerként. Az egyik elképzelés szerint ezek a gyógyszerek, beleértve a klorokint és származékait, nem specifikusan befolyásolják az autofágia aktivitását, vagyis ezeknek a szereknek más hatásai is vannak a sejtfunkciókra, például a lizoszómális működésre és az endocitózisra (Cheong és mtsai. 2012).

3.6. Hipotézis

Kutatócsoportunk a közelmúltban egy matematikai modellt állított fel, mellyel jól leírhatók a KRAS mutáns rákos sejtek metabolizmusát szabályozó főbb elemek. Ez a modell lehetőséget ad arra, hogy terápiás stratégiákat tárhassunk fel. A dinamikus analízis rámutatott, hogy a KRAS, az mTOR és az autofágia gátlása kulcsfontosságú lehet a rákellenes terápiákban (Kapuy és mtsai. 2021). Továbbá feltételezték, hogy ebben a folyamatban a PKM2 is igen fontos szerepet játszik, mivel, ahogy az már korábban említésre került, elősegíti a Warburg-effektust, így pedig a sejtek progresszióját (Yang és mtsai. 2013b).

A KRAS mutációt hordozó rákos sejtek metabolizmus-szabályozásának leírásán túl a modell segítségével egy terápiás lehetőséget is javasoltak a kutatócsoport tagjai. Feltételezték, hogy a farmakológiai aszkorbát és klorokin kombinált kezelésével blokkolódik a KRAS és mTOR útvonal is, ezáltal pedig csökkenni fog a GLUT1 expresszió, míg a KRAS mutáns rákos sejtek számára nélkülözhetetlen autofágia gátlódik (4. ábra), mely következtében a rákos sejtek elpusztulnak.

3.6.1. Kísérletes vizsgálatok

Kutatócsoportunkban korábban Bogárdi Letícia diplomamunkája keretében KRAS mutáns rákos sejtvonalakon vizsgálta a fenti modellben prediktált farmakológiai aszkorbát és klorokin kombinált kezelésének hatását (Bogárdi 2022). A megfigyelések MIA PaCa-2 és PANC-1, KRAS mutáns PDAC sejteken történtek. A cél az előbbieken már említett elméleti hipotézis (Kapuy és mtsai. 2021) *in vitro* kísérletes vizsgálata volt, hogy megvizsgálják, a két szer együttes alkalmazása valóban blokkolja-e KRAS és mTOR útvonalakat, valamint gátlódik-e az autofágia a KRAS mutációt hordozó rákos sejtekben. A kísérletek során életképesség-mérések és hatásmechanizmus vizsgálatok zajlottak.

3.6.1.1.Életképesség-vizsgálatok a KRAS mutáns PDAC sejteken

Elsőként mindkét sejtvonalon 24 órás monoterápiás életképesség-vizsgálatokat végeztek, külön-külön az aszkorbáttal és klorokinnal. Erre azért volt szükség, hogy megállapítsák, milyen koncentrációtartományokban érdemes dolgozni a kezelőszerekkel, és hogy külön-külön milyen hatást képesek kifejteni a sejtekre.

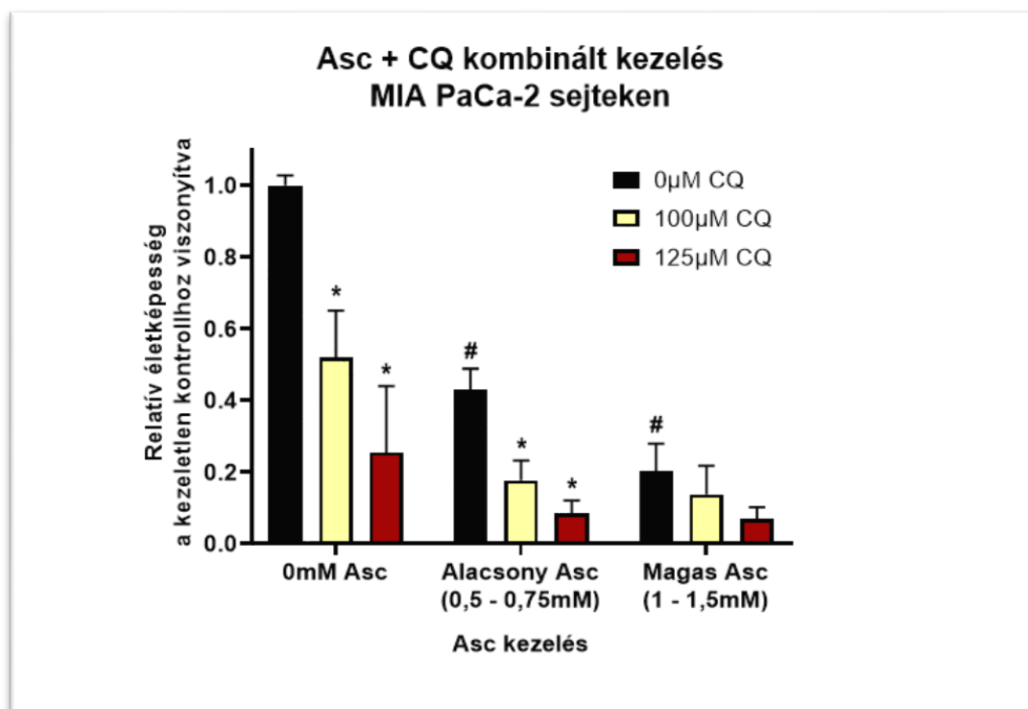
A MIA PaCa-2 és PANC-1 sejtvonalakat 24 órát kezelték különböző koncentrációjú aszkorbáttal, majd MTT Assay-el megmérték a sejtek életképességét. Kimutatták, hogy mindkét sejtvonal esetében a nagyobb aszkorbát koncentrációnál (1 mM<) az életképesség drasztikusan lecsökkent. Az aszkorbáttal történő mérések után a klorokinnal is elvégezték ugyanezt a vizsgálatot, hogy a különböző koncentrációban adagolt klorokin hogyan hat a sejtek életképességére. Az eredmények azt mutatták, hogy a klorokin kétféle hatást fejt ki a sejtekre, mivel bizonyos koncentrációnál a klorokin megnövelte az életképességet, ahogy pedig növelték a koncentrációját, úgy sejtpusztulást idézett elő. Ezzel kimutathatták, hogy a klorokin koncentrációtól függően rendelkezik citoprotektív és citotoxikus képességgel is.

3.6.1.2. KRAS mutáns PDAC sejtek kombinált kezelése farmakológiai aszkorbáttal és klorokinnal

Miután az életképesség-vizsgálatokkal megállapították a kezelőszerek megfelelő koncentrációtartományát, már elkezdheték a kombinált terápiát mindkét sejtvonalon. Azt feltételezték, hogy a kombinált kezeléssel jelentősebb életképesség-csökkenést érnek el a KRAS-mutáns rákos sejteken, mint amit tapasztalni lehetett a kezelőszerek önmagukban való alkalmazásánál. A feltevés az volt, hogy az aszkorbát növeli az oxidatív stressz-szintet, illetve a KRAS jelátviteli útvonala aktivitása is mérséklődik, a klorokin pedig gátolja az autofágiát a már említett autofágia-függéssel rendelkező KRAS-mutáns rákos sejtekben (Kapuy és mtsai. 2021).

A MIA PaCa-2 sejteket különböző koncentrációban kombináltan kezelték aszkorbáttal és klorokinnal, 24 órás inkubálás után pedig MTT Assay-vel a sejtek relatív életképességét mérték meg. A kombinált kezelés eredményeit az 5. ábra tartalmazza, a diagram függőleges tengelyén a relatív életképességet ábrázoltuk a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva, a vízszintes tengelyen a csoportok pedig aszerint voltak csoportosítva, hogy az aszkorbátot milyen koncentrációtartományokban adagolták a sejtekhez. Ez nem egy megszokott ábrázolásmód, de erre ebben az esetben azért volt szükség, mivel a méréseket 96 well plate-eken végezték, és az aszkorbát életképességre gyakorolt hatása ebben az esetben nehezen volt reprodukálható. A különböző koncentrációk különböző időpontokban végzett kísérletekben más-más eredményeket adtak, az aszkorbát hatását sok befolyásoló tényező változtathatta meg. Ilyen lehet például a kiültetett sejtszám nagysága: kimutatták, hogy kisebb sejtszámnál erősebb volt az aszkorbát sejtpusztító hatása, mint nagyobb sejtszám esetében. Ez utóbbi azzal magyarázható, hogy az alkalmazott tápoldatban jelen vannak vasionok, melyek hatására extracellulárisan H_2O_2 keletkezik az aszkorbátból. Ezáltal pedig egy sejtre több H_2O_2 jut, ha kevesebb sejtet sikerült kiültetni egy-egy plate-re. Az aszkorbát hő és fény hatására gyorsan bomlik, így, ha egy bizonyos idő eltelt a beoldott kezelőoldatok elkészítése és a sejtek kezelése között, a sejtekre gyakorolt hatás csökkent. Végül pedig az aszkorbát sejtpusztító hatását az is befolyásolhatta, hogy mennyi ideje volt bontva a tápoldat, melyet az aszkorbát por oldószereként használtak. Ha hosszabb ideje volt nyitva, abban oxigén dúsult fel, és az aszkorbátnak fokozottabb volt a citotoxikus hatása.

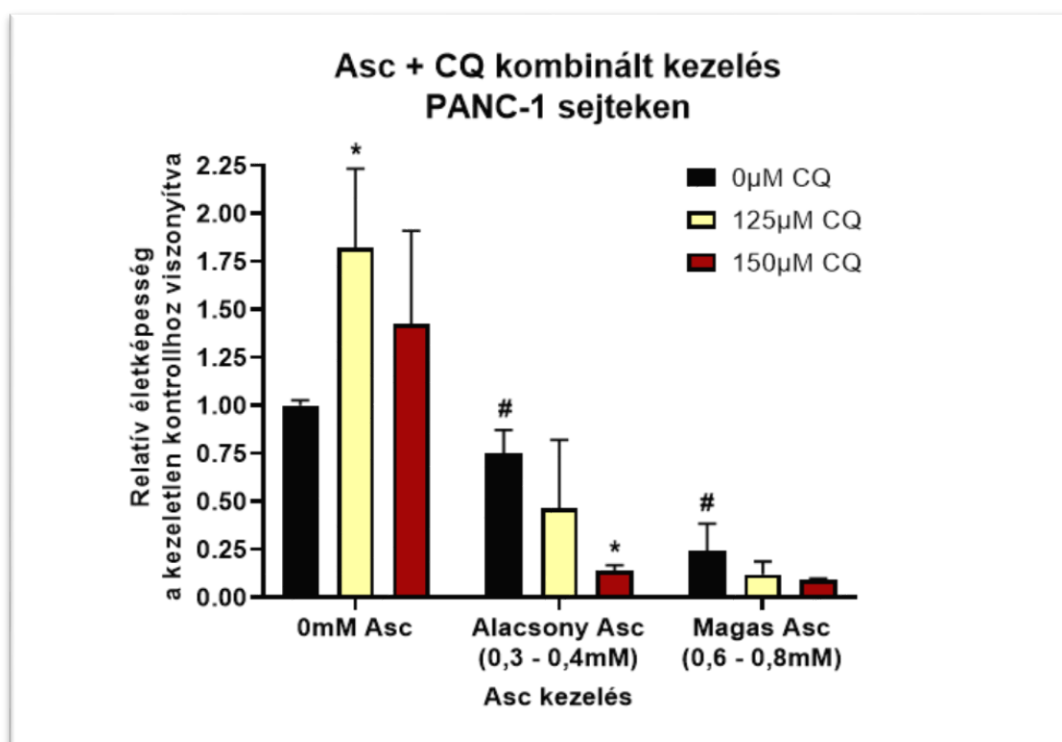
Az eredmények azt mutatták, hogy a kezelőszerek kombinált alkalmazásával szinergikusan lecsökkent a sejtek életképessége. Megfigyelhető, hogy a klorokin nélküli aszkorbát kezelésnél a kontrollhoz képest hogyan csökkentette le jelentősen a sejtek életképességét az aszkorbát (#-tel jelölve). Szignifikáns különbségek figyelhetőek meg továbbá adott koncentrációtartományú aszkorbáttal kezelt csoportokon belül, a csoportkontroll (csak aszkorbáttal kezelt minta) és a kombináltan kezelt minták között (*-gal jelölve).



5. ábra: MIA PaCa-2 sejtek 24 órás kombinált kezelését követően MTT Assay segítségével megmérték a relatív életképességet. A fent ábrázolt értékek a kezeletlen kontrollhoz viszonyított százalékos életképességi értékek. Az értékek csoportosítása pedig az alapján történt, hogy az aszkorbátot milyen koncentrációtartományokban adagolták a sejtekhez (x tengely). Megfigyelhető, hogy a kezelőszerek kombinált kezelésének hatására a sejtek életképessége lecsökkent. A mérés 96 well plate-en történt. #-tel jelölve: Amikor csak aszkorbáttal voltak kezelve a sejtek, klorokinnal nem, akkor a kontrollhoz viszonyított relatív életképesség szignifikánsan lecsökkent az aszkorbát hatására. *-gal jelölve: Szignifikáns különbségek figyelhetők meg adott koncentrációtartományú aszkorbáttal kezelt csoportokon belül, a csoportkontroll (csak aszkorbáttal kezelt minta) és a kombináltan kezelt minták között. Kép forrása: (Bogárdi 2022)

A PANC-1 sejtvonal 24 órás kombinált kezelése után is MTT Assay segítségével megmérték a relatív életképességet (6. ábra). Az ábrázolt értékek a kezeletlen kontrollhoz viszonyított százalékos életképességi értékek. Az adatok csoportosítása pedig a sejtekhez adott különböző aszkorbát koncentrációtartományok alapján történt, ugyanazon okokból kifolyólag, mint a MIA PaCa-2 sejtek esetén.

Az eredmények azt mutatták, hogy a klorokin önmagában alkalmazva megnövelte a relatív életképességet, ekkor megjelent a klorokin citoprotektív hatása, ám az aszkorbáttal együtt alkalmazva szinergikusan lecsökkentette az életképességet. Tehát az aszkorbát és klorokin megfelelő koncentrációjú kombinált kezelésével fokozottan nőtt a sejtpusztulás. A klorokin nélküli aszkorbát kezelésnél a kontrollhoz képest mindegyik csoport életképességét jelentősen lecsökkentette az aszkorbát (#-tel jelölve). Szignifikáns különbségek figyelhetők meg továbbá adott koncentrációtartományú aszkorbáttal kezelt csoportokon belül, a csoportkontroll (csak aszkorbáttal kezelt minta) és a kombináltan kezelt minták között (*-gal jelölve).



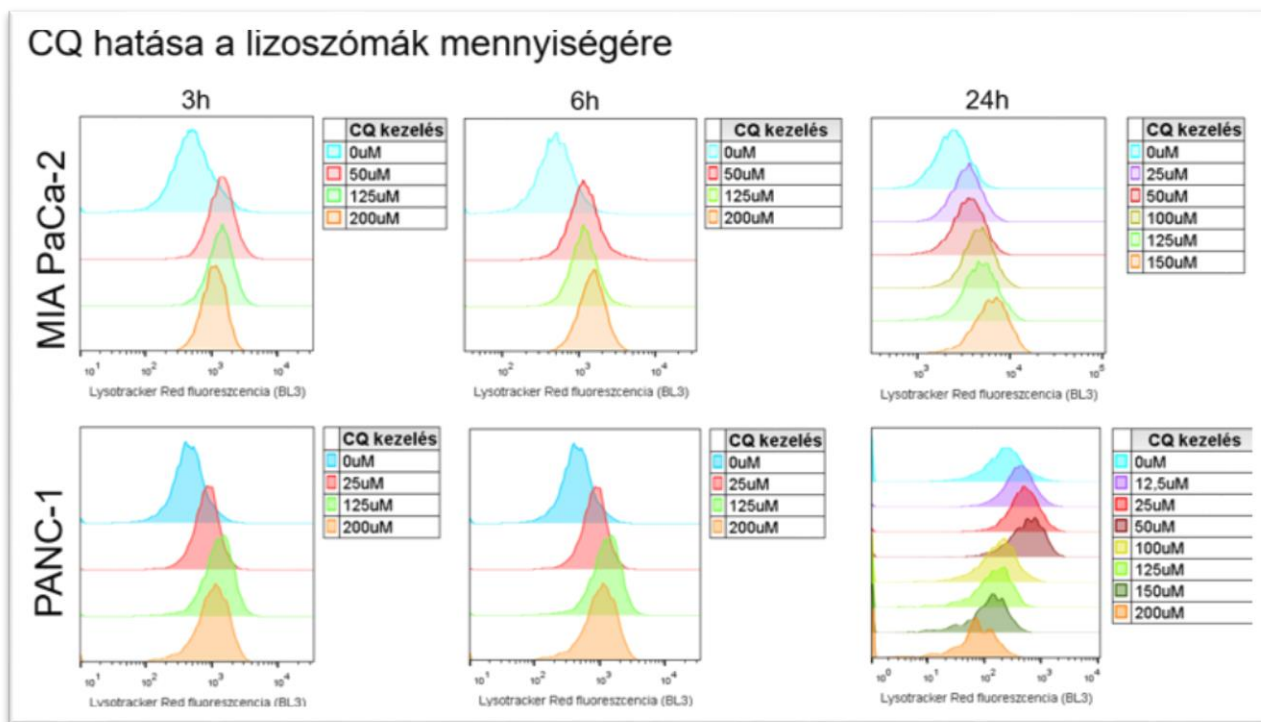
6. ábra: PANC-1 sejtek 24 órás kombinált kezelésének relatív életképesség vizsgálata MTT Assay-el. Az ábrázolt értékek a kezeletlen kontrollhoz viszonyított százalékos életképességi értékek. Az értékek csoportosítása pedig az alapján történt, hogy az aszkorbátot milyen koncentráció tartományokban adagolták a sejtekhez (x tengely). Megfigyelhető, hogy a klorokin önmagában alkalmazva megnövelte a relatív életképességet, ekkor megjelent a klorokin citoprotektív hatása, ám az aszkorbáttal együtt alkalmazva szinergikusan lecsökkentette az életképességet. Tehát az aszkorbát és klorokin megfelelő koncentrációjú kombinált kezelésével fokozottan nőtt a sejtpusztulás. A mérés 96 well plate-el történt. #-tel jelölve: Amikor csak aszkorbáttal voltak kezelve a sejtek, klorokinnal nem, akkor a kontrollhoz viszonyított relatív életképesség jelentősen lecsökkentette csak az aszkorbát hatására. *-gal jelölve: Szignifikáns különbségek figyelhetők meg adott koncentrációtartományú aszkorbáttal kezelt csoportokon belül, a csoportkontroll (csak aszkorbáttal kezelt minta) és a kombináltan kezelt minták között. Kép forrása: (Bogárdi 2022)

A fenti eredmények részben alátámasztották a hipotézist (Kapuy és mtsai. 2021), hiszen a megfelelő koncentrációban alkalmazott klorokin és az aszkorbát kombinált kezelése szinergikus sejtpusztulást okozott KRAS mutáns sejtekben. Feltehetően az aszkorbát gátolta a KRAS útvonalat, ezzel megzavarta a tumorsejtek anyagcseréjét (Aguilera és mtsai. 2016). Valószínűsíthető, hogy ekkor fokozódott a sejt autofágia-függősége, melyet adott koncentrációjú klorokinnal gátolni lehetett, ezzel eredményezve fokozott életképesség-csökkenést.

3.6.1.3. Klorokinnal kezelt KRAS mutáns PDAC sejtek hatásmechanizmus-vizsgálata

Az életképesség-méréseket követően megvizsgálták a klorokin hatásmechanizmusát is mindkét sejtvonalon (7. ábra). A mérést LysoTracker-rel Red DND-99 (Invitrogen™) festékkel végezték. Ez egy olyan módszer, mely során fluoreszcens módon festik a lizoszómát és a festék jelintenzitását az egyes sejtekben áramlási citometriával vizsgálták. Amikor a sejteket klorokinnal kezelték, a kontrollhoz képest jelnövekedést lehetett megfigyelni, ekkor a lizoszómák mennyisége megnőtt. Ez valószínűleg abból adódott, hogy klorokin hatására a

lizoszómák képtelenek voltak fúzionálni az autofagoszómákkal autolizoszómákká. Ez tehát az autofágia fluxusának megakadására utalt (autofágia folyamatát lásd részletesebben a 3.3 fejezetben). A mérést különböző kezelési időnként (3, 6, 24 óra) megismételték, ezzel azt vizsgálva, hogy a klorokin mennyi idő alatt növeli meg a lizoszómák számát. Mindkét sejtvonalon már az első 3 óra elteltével jelentős jelnövekedést lehetett megfigyelni, vagyis már ennyi idejű kezelés következtében is megnőtt a lizoszómák mennyisége. Ezzel bebizonyosodott, hogy a klorokin tényleg gátolja az autofágia folyamatát.



7. ábra: A klorokin hatásmechanizmusának vizsgálata a MIA PaCa-2 és PANC-1 sejtvonalakon. A mérést különböző időpontokban végezték LysoTracker-rel Red DND-99 InvitrogenTM fluoreszcens festék segítségével. Mindkét sejtvonalon már az első 3 óra elteltével jelentős jelnövekedést lehetett megfigyelni, vagyis már ennyi idő kezelés következtében is megnőtt a lizoszómák mennyisége. Kép forrása: (Bogárdi 2022)

Aszkorbát kezelés után is kipróbálták a hatásmechanizmus-vizsgálatot LysoTrackerrel festett sejtekkel, de nem volt szembetűnő változás a LysoTracker adta fluoreszcens jelben, amiből arra következtettek, hogy az aszkorbát közvetlenül nem képes befolyásolni az autofágiát, vagy ha befolyásolja is, akkor azt ezzel a módszerrel nem lehet kimutatni.

4. Célkitűzés

Kutatócsoportunk a közelmúltban az előzőekben már bemutatott szakirodalomban található kísérletes adatok alapján egy matematikai modellt állított fel a KRAS mutáns rákos sejtek metabolizmusát szabályozó hálózat működéséről (Kapuy és mtsai. 2021). Ezen vizsgálatok lehetőséget adtak arra, hogy további terápiás stratégiákat tárhassunk fel. A dinamikus analízis rámutatott, hogy a KRAS, az mTOR és az autofágia gátlása kulcsfontosságú lehet a KRAS mutáns rákos sejtek elleni terápiában. A predikció szerint, ha farmakológiai aszkorbáttal és klorokinval kombináltan kezeljük a sejteket, akkor az aszkorbát egy metabolikus krízist idéz elő a sejtekben, miközben a KRAS mutáns autofágia-függő rákos sejtekben az autofágia blokkolódik a klorokinval köszönhetően, és ebből kifolyólag gátlódni fog mind a KRAS, mind az mTOR útvonal. Tehát a feltevés az volt, hogy ez a kombinált kezelés jelentős terápiás potenciállal bírhat a KRAS mutáns rákos sejtek kezelésében. Feltételezték, hogy ezen eredmények csak KRAS mutáns rákos sejteknél mutathatóak ki. Kutatócsoportunkban korábban Bogárdi Letícia a diplomamunkája keretében az előbb említett modell segítségével felállított hipotézist vizsgálta KRAS mutáns MIA PaCa-2 és PANC-1 PDAC sejteken. Mindkét sejtvonalat kombináltan kezelték farmakológiai aszkorbáttal és klorokinval, majd megvizsgálták a sejtekre kifejtett hatást. Megállapították, hogy a kezelőszereket kombináltan adagolva szinergikus hatást váltottak ki.

Dolgozatom célja a már előzőekben ismertetett matematikai modell további *in vitro* kísérletes vizsgálata volt, továbbá arra a kérdésre kerestük a választ, hogy a kombinált terápia hatásossága valóban a KRAS útvonaltól függ-e. Elsőként tanulmányozni kívántuk a GLUT1 transzporter mRNS szintű expressziójának változását, mivel, ahogy azt már a szakirodalmi részben említettem, a KRAS mutáns rákos sejtekben a fokozott GLUT1 expressziót figyelték meg (lásd részletesen 3.1 fejezet) (Kapuy és mtsai. 2021) és várhatóan a kombinált kezelés hatására a GLUT1 expressziója mérséklődik. Előzetes kutatások azt mutatták, hogy aszkorbáttal kezelve a KRAS mutáns rákos sejteket, bizonyos fehérjék aktivása fokozódik, ebből kiindulva Western blot technikával kívántuk megvizsgálni a KRAS mutáns sejtek viselkedését aszkorbát kezelés hatására. Ezzel arra a kérdésünkre kerestük a választ, hogy a kezelőszerek által kiváltott szinergia a KRAS útvonal aktivitásától függ-e. Továbbá nem KRAS mutáns (BxPc-3) PDAC sejtvonalon, illetve egy más szöveti eredetű KRAS-ra nézve szintén vad típusú (MCF-7 emlő adenokarcinóma) sejtvonalon terveztük vizsgálni, hogy a fentebb említett eredmények csak a KRAS mutáns PDAC sejtekre igazak-e. Tehát, hogy csak a KRAS mutációt hordozó rákos sejtekre képes szinergikusan hatni a kezelőszerek kombinált kezelése, vagy pedig más, nem KRAS mutáns sejtekben is megfigyelhető a szinergikus hatás. Ezzel bebizonyítható, hogy a farmakológiai aszkorbát és klorokin együttes alkalmazása valóban egy potenciális terápiás jelleggel bírhat a KRAS mutáns daganatok esetében. Végül pedig a kezelőszerek hatásmechanizmusát is vizsgálni terveztük MIA PaCa-2 KRAS mutáns sejtvonalon külön-külön: igazolni szeretnénk volna, hogy a CQ kezelés hatására az autofágia valóban blokkolódik, illetve arra a kérdésre kerestük a választ, hogy a farmakológiai aszkorbát citotoxicitásában valóban szerepet játszik-e a ROS képződés.

5. Módszerek és eszközök

5.1. Vizsgált sejtvonalak

- MIA PaCa-2: KRAS mutáns (humán PDAC)
- PANC-1: KRAS mutáns (humán PDAC)
- BxPc-3: KRAS vad típus (humán PDAC)
- MCF-7: KRAS vad típus (humán emlő adenokarcinóma)

5.2. Sejtfenntartás

A sejtenyésztés az ATCC (*American Type Culture Collection*) irányelvei alapján történt. A sejteket magas glükóztartalmú DMEM-ben (Sigma-Aldrich®) 10% magzati szarvasmarha szérummal (Sigma-Aldrich®) kiegészítve, illetve a MIA PaCa-2 esetén 2,5% lószérumot (heat inactivated, New Zealand origin, Gibco™) tartalmazó komplett tápoldatban tenyésztettük. A sejtfenntartás BioLite™ Cell Culture Treated Flasks (Thermo Scientific™) típusú, 25 és 75 cm²-es flaskában történt. A vizsgált sejteket CO₂ termosztátban (Thermo Scientific™ Forma™ 310) 37°C-on inkubáltuk 100% relatív páratartalom mellett. A sejteket 1:3 – 1:6 arányban passzáltuk a 100% konfluencia elérését megelőzően.

5.3. Sejtszám mérés

A sejtszám mérését CytoFLEX (Beckman Coulter) áramlásos citométerrel végeztük. A mérés első lépéseként a sejteket tripszinnel inkubáltuk rövid ideig, hogy a letapadt sejteket felszedjük a flaska aljáról, majd ehhez komplett médiumot adtunk hozzá, hogy a tripszin hatását leállítsuk. Végül a kapott sejtszuszpenziót homogenizáltuk. A citométer segítségével meghatároztuk a sejtszámot/sejtkoncentrációt, mely segítségével kiszámoltuk a plate kiültetéshez szükséges sejtmennyiséget, továbbá a sejtek állapotáról is visszajelzést kaptunk.

5.4. Sejtkiültetés

A sejteket különböző sűrűségben 6, illetve 96 well formátumú sejtenyésztésre alkalmas plate-re (Thermo Scientific BioLite 6/96 Well Multidish) oltottuk komplett médiumban, attól függően, hogy milyen vizsgálatot végeztünk velük. A MIA PaCa-2 sejteket 1 millió/well sűrűségben oltottuk ki 6 well plate-re. A PANC-1-nél szintén 6 well plate-et használtunk, 700 ezer sejt/well-et ültettünk ki. 96 well plate-tel dolgoztunk az MCF-7 (15 ezer sejt/well) és a BxPc-3 (30 ezer sejt/well) sejtek esetén. Ezt követően a sejtenyésztéshez használt inkubátorban a plate-re kiültetett sejteket 24 órát inkubáltuk, hogy a sejtek letapadjanak.

5.5. Kezelések

A sejtkiültetést követő 24 óra inkubálás elteltével a sejteket aszkorbáttal és klorokinnal kezeltük külön-külön, illetve kombináltan. Ekkor ezeket az eredetileg por formájában levő anyagokat médiumban oldottuk fel úgy, hogy a végkoncentráció 100 mM-os legyen, majd 5 M-os NaOH-

dal (nátrium-hidroxid) beállítottuk a pH-t a fenolvörös átcsapásáig. Ezt követően a kapott oldatokat steril fülke alatt steril szűrővel (0,22 µm pore size Mixed Cellulose Esters membrane, Millex®) leszűrtük. Az aszkorbát esetén 10 mM, a klorokinnél 1mM-os munkaooldatból készítettük el a kezelési koncentrációkat. Végül az adott plate-ekre adagoltuk a kezelőszereket a megfelelő koncentrációkban és 24 órát inkubáltuk a plate-eket.

5.6. MTT Assay

Az MTT Assay egy kolorimetriás vizsgálat, melynek köszönhetően a sejtek életképessége megmérhető. Az MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) egy sárgás színű tetrazólium só, mely lilás formazánná redukálható. Színváltozáson alapuló mérés, a kialakuló színreakció a sejt életképességéről ad információt. A színváltozás akkor történik meg, ha a sejt még életképes és a mitokondriális oxidoreduktáz enzimek működnek.

A 96 well plate-ekre kiültetett és 24h-án keresztül kezelt MCF-7 és BxPc-3 sejtek életképességét mértük. A mérés kezdetén a plate-en levő médiumot leöntöttük, majd kétszer mostuk PBS-sel (*phosphate buffered saline*). Ezt követően 1:10 arányban oldottunk MTT folyadékot (5mg/ml) DMEM-ben. Ezt a plate-re adagoltuk, majd inkubáltuk 37°C-on 35-40 percig. Az inkubálási idő leteltével az MTT oldatot leöntöttük a plate-ről és DMSO oldatot (dimetil-szulfoxid) pipettáztunk rá. Ezután ismét inkubátorba helyeztük 10 percre, végül az abszorbanciát mikrolemezes spektrofotométerrel (Thermo Scientific Multiskan™ GO) határoztuk meg 37°C-on, 570 nm-en. A háttérrel 690 nm-en mértük, mellyel utólag korrigáltuk a mért abszorbanciát.

5.7. mRNS expresszió

Valós idejű PCR-rel egy adott DNS szakasz mennyiségi meghatározása végezhető el. A vizsgálat fluoresszcencia mérésen alapul. A mérés során a DNS két szála közé interkalálódó fluoresszcens festéket adunk, majd a gerjesztés hatására mérhető fluoresszcencia mennyisége egyenesen arányos lesz az amplikon (két szálú DNS) mennyiségével. Bizonyos mRNS-szintek is kimutathatók ezen vizsgálattal: génexpressziós vizsgálatoknál reverz transzkripción alapuló real-time PCR-t szokás alkalmazni. Ekkor RNS-t izolálunk a sejtekből, majd reverz transzkriptáz enzim segítségével átírjuk az RNS-t cDNS formába, mely aztán a PCR reakció DNS templátjaként szolgál (Dezső Péter 2007). A 6 well plate-en tenyésztett és 24h-n keresztül kezelt MIA PaCa-2 és PANC-1 sejteken mRNS expressziós mérést végeztünk reverz transzkripciót követő valós idejű PCR-rel. A kezelési idő lejártát követően a sejtekből RNS-t izoláltunk az innuPREP RNA Mini Kit (analytikjena) segítségével, majd reverz transzkripciót végeztünk a RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kittel (Thermo Scientific) a gyártó irányelveit és protokollját követve. A cDNS amplifikációhoz a PikoReal RealTime PCR készüléket (Thermo Scientific) és Sensifast™ SYBR® No-ROX Kitet (Bioline) alkalmaztuk. Belső kontrollként a h18S gén cDNS-ét használtuk. A primer szekvenciák a következők voltak:

forward **hGLUT1**: 5'-ATCAACCGCAACGAGGAGAA-3,
reverz **hGLUT1**: 5'-TGCAGGTCATGGGTCACG-3,
forward **h18S**: 5'-CGAATGGCTCATTAATCAGTTATGG,
reverz **h18S**: 5'-AGCTCTAGAATTACCACAGTTATCCA,
forward **hGLUT1**: 5'-TCGGAGTCAACGGATTTGGT,

reverz **hGLUT1**: 5'-TTCCCGTTCTCAGCCTTGAC.

5.8. Western blot

A Western blot technika különböző fehérjék specifikus detektálására szolgál, melyeket előzőleg poliakrilamid gélen választunk el. Az előzőekben már ismertetett sejt kiültetések alapján (lásd 5.4 fejezet) a 6 welles kísérletekből fehérjét izoláltunk, majd a minták fehérje koncentrációját meghatároztuk. A sejteket először RIPA pufferben (150 mM NaCl, 1% NP-40, 50 mM Tris pH 8,0) oldottuk, amelyhez előzetesen 1 mM PMSF-t továbbá még proteáz-, valamint foszfatáz-inhibitor oldatot (Sigma-Aldrich®) kevertünk a megfelelő hígításban. A mintákat 30 percet lizáltuk jégen, majd 14 000 g-n 4°C-on 15 percet centrifugáltuk. A minta felülúszóját használtuk a fehérje kvantifikálásra Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific™) használatával a gyártó leírása szerint. A SureCast™ Handcast System gélöntő készülékkel (Thermo Scientific™) 10 és 15%-os poliakrilamid geleket készítettünk, majd a mintákat Tris-glicin futtató pufferben (25 mM Tris, 250 mM glicin, 0,1% w/V SDS) oldva géلزsebekbe töltöttünk 40 µg fehérjét. Ezt követően a NuPAGE™ MOPS SDS Running Buffer (20X) (Thermo Scientific™) futtatópufferbe áztatva a gélen elválasztottuk a fehérjéket elektromos áram segítségével. Ehhez a „Mini Gel Tank” (Thermo Scientific™) futtató készüléket alkalmaztuk. A futtatás végén a gél buborékmentesen, transzferpufferrel előnedvesített nitrocellulóz membránra helyeztünk, melyhez a NuPAGE™ Transfer Buffer (Thermo Scientific™) transzferpuffert használtuk. A membrán alá és a gél felső részére előnedvesített szűrőpapírokat helyeztünk egymásra több rétegben. A Mini Blot Module For transfer of proteins using the Mini Gel Tank készülékkel, „wet-transfer”-módban transzferáltuk a fehérjéket a gélről a membránra. Egy óra BSA-ban (*bovine serum albumin*) történő blokkolás után rátettük az elsődleges antitesteket tartalmazó oldatokat és egy éjszakán keresztül 4°C-on inkubáltuk. A használt elsődleges antitestek a Phospho-MEK ½ (Ser217/221) (#9154, Cell Signaling Technology), anti-MEK ½ (#9122, Cell Signaling Technology), Phospho-P44/42 ERK ½ (Thr202/Tyr204) (#4370, Cell Signaling Technology), p44/42 ERK ½ (#4695, Cell Signaling Technology) és GAPDH (#5174, Cell Signaling Technology) voltak. Az inkubáció és az antitest oldat leöntése után a membránt többször mostuk TBS-tweennel (0,15 M NaCl, 0,050 M Tris-HCl, 0,05 % Tween™ 20). Majd ezt követően a HRP-vel (*Horseradish Peroxidase*) konjugált másodlagos antitestet (HRP-Goat anti-Rabbit IgG (H+L), Proteintech) Rabbit PolyAb Anti-ACTB (Proteintech®, Rosemont, IL, USA, 20536-1-AP); Rabbit PolyAb Anti-LC3 (Proteintech®, 12135-1-AP) is hozzáadtuk, nagy hígításban. A sávokat Clarity ECL Western blotting Substrates (Bio-Rad) kemilumineszcenciás detektáló készlettel tettük láthatóvá, és gél dokumentációs készülékben vizsgáltuk (Wunderlich Lívius 2016).

5.9. Statisztikai vizsgálatok

A statisztikai vizsgálatokat (egyfaktoros ANOVA, Dunnett-teszt, nem paraméteres Kruskal-Wallis próba) TIBCO® Statistica™ program (verzió: 14.0.0.15) segítségével végeztük. A választott szignifikanciaszint 0,05 volt.

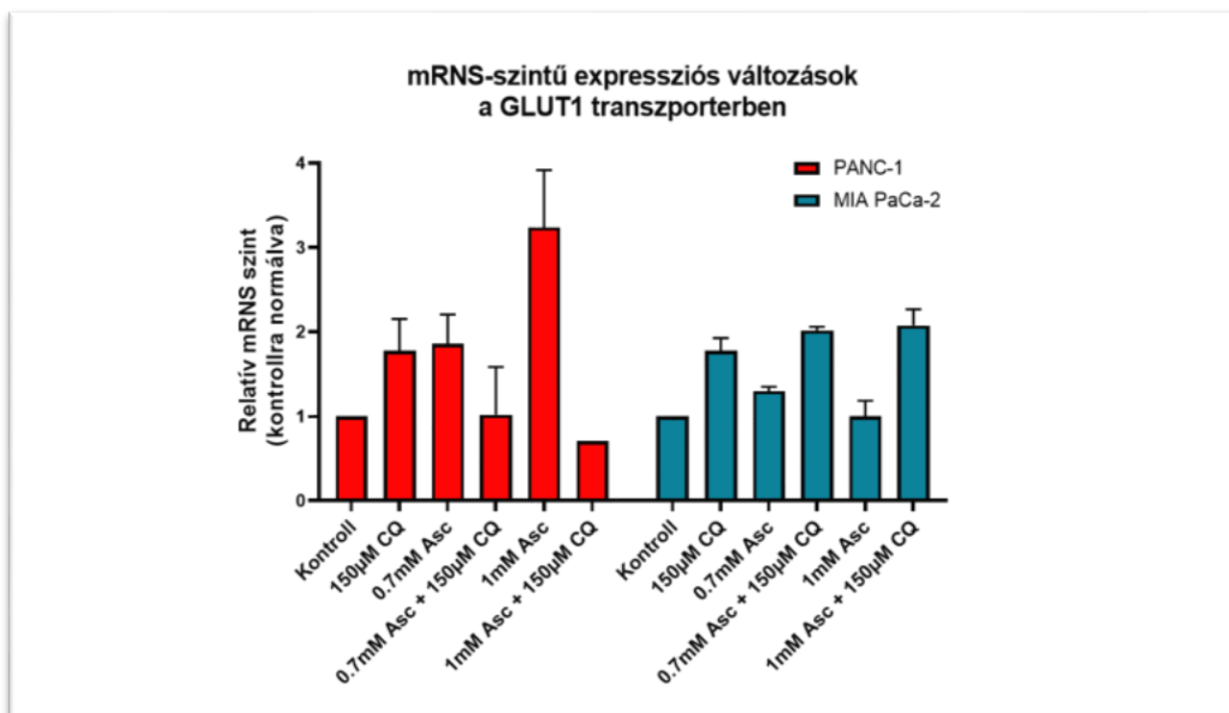
6. Eredmények és értékelésük

6.1. KRAS mutáns PDAC sejtek GLUT1 transzportereinek mRNS-szintű expressziós változása kombinált kezelés hatására

Kutatócsoportunk a közelmúltban már tanulmányozta az aszkorbát és klorokin együttes hatását KRAS mutáns rákos sejtekben, mely következtében a kezelőszerek szinergikusan lecsökkentették a sejtek életképességét (Bogárdi 2022). Ez feltehetően annak volt köszönhető, hogy a KRAS és mTOR útvonalak blokkolódtak, illetve a KRAS mutáns rákos sejtek számára nélkülözhetetlen autofágia gátlódott. KRAS mutáns rákos sejtekben a túlzott glikolízis mellett a különböző glükóz transzportereknek, például a GLUT1-nek is fokozott a működése. A GLUT1 magas expressziója fokozott glükózfelvétellel, illetve aktivált onkogén jelátviteli útvonalakkal jár együtt (Kapuy és mtsai. 2021). Kimutatták a KRAS mutáns sejtekben a PKM2 enzim hiperaktivációját, ami egy onkogén transzkripció faktoron, a c-Myc-en keresztül indukálta a glükóz-transzporter GLUT1 expresszióját. A PKM2 továbbá elősegíti a Warburg-effektust és a sejtciklus progresszióját, így jó célpont lehet a daganatellenes terápiákban. Leírták, hogy a farmakológiai aszkorbát rontja a Warburg-hatást KRAS mutáns sejtekben azáltal, hogy gátolja a PKM2 foszforilációját, így csökkenti mind a GLUT1-, mind a PKM2-függő fehérjék expresszióját (Yang és mtsai. 2013a).

Aguilera és munkatársai azt vizsgálták, hogy a KRAS mutáns vastagbélrák sejtekben miként hat a GLUT1 expressziójára az aszkorbát. Kimutatták, hogy farmakológiai mennyiségben aszkorbáttal kezelt sejtekben egy nap után látványosan lecsökkentette a GLUT1 mRNS-szintű expresszióját (Aguilera és mtsai. 2016). Hipotézisünk az volt, hogy ha megvizsgáljuk a kombináltan kezelt KRAS mutáns rákos sejtek GLUT1 transzporter mRNS-szintű expressziós változását, hasonló eredményeket kapunk. A 8. ábra mutatja be a kapott eredményeinket. PANC-1 és MIA PaCa-2 KRAS mutáns PDAC sejteket kezeltünk különböző koncentrációkban aszkorbáttal és klorokinnal külön-külön és kombináltan, majd 24 órát inkubáltuk. Ezt követően valós idejű PCR alkalmazásával megmértük a sejtekben levő GLUT1 transzporter mRNS-szintű expressziós változásait. A vízszintes tengelyen a kezelések koncentrációi, a függőleges tengelyen a relatív mRNS-szint látható a kezeletlen kontrollra normálva. Ennél a kísérletnél (a 6 well rendszernek köszönhetően) könnyen reprodukálhatóak voltak az eredmények, az aszkorbát hatása nem ingadozott annyira, mint az életképesség méréseknél (amelyeket 96 well plate-eken végeztünk, lásd 3.6.1.2 fejezet).

Feltételezéseinknek ellentmondó eredményeink azt mutatták, hogy az aszkorbát kezelés ellenére a sejtek GLUT1 mRNS-szintű expressziója nem csökkent le. Az esetek többségében vagy a kontrollal megegyező, vagy annál nagyobb mRNS-szintet kaptunk. Ebből arra lehet következtetni, hogy a hipotézis ellenére sem az aszkorbát, sem a klorokin nem volt hatással a sejtek GLUT1 expresziójára, így feltehetően az aktivitására sem.



8. ábra: PANC1 és MIA PaCa-2 KRAS mutáns sejtek GLUT1 transzporterének mRNS-szintű expressziós változása a kezeletlen kontrollhoz képest. A sejteket aszkorbáttal és klorokinnal kezeltünk különböző koncentrációkban külön-külön és kombináltan, majd inkubáltuk 24 órát. Ezt követően valós idejű PCR alkalmazásával megmértük a sejtekben levő GLUT1 transzporter mRNS-szintű expressziós változásait. A vízszintes tengelyen a kezelések koncentrációi, a függőleges tengelyen a relatív mRNS-szint látható a kezeletlen kontrollra normálva. Jól látható, hogy különböző koncentrációk adagolásánál nem csökken le a GLUT1 expressziója.

A fenti eltérések Aguilera és munkatársai eredményeihez képest magyarázhatók azzal, hogy az ő kísérleteikben KRAS mutáns vastagbélrák sejtvonalakon dolgoztak, melyek metabolizmusa különbözhet az általunk alkalmazott KRAS mutáns PDAC sejtvonalaktól.

Kutatásunk során így bebizonyítottuk, hogy a kombinált kezelés nem a GLUT1 expressziójának változásán keresztül váltja ki a szinergikus citotoxicitást.

Az előbbi eredmények alapján felmerül a kérdés, hogy az aszkorbát és klorokin kombinált kezelés következtében létrejövő szinergikus hatás a sejtekben valóban a KRAS útvonaltól függ-e, vagy attól teljesen független.

A fentebb már említett PKM2-nek nagyon fontos szerepe van a KRAS mutáns rákos sejtekben, mivel ennek a fokozott működése elősegíti a Warburg-effektust, illetve a sejtciklus progresszióját, ezért jó célpont lehet a daganatellenes terápiákban. Kimutatták, hogy aszkorbáttal kezelve a KRAS mutáns sejteket, a Warburg-hatás romlott, mivel mind a GLUT1-, mind a PKM2-függő fehérjék expresszióját lecsökkentette, azáltal, hogy gátolta a PKM2 foszforilációját. Feltételezhető, hogy van kapcsolat az aszkorbáttal történő kezelés hatásakor a sejtekben a MAPK/EGFR útvonal és a GLUT1 működésének mérséklődése között. 2012-ben Yang W és társai (Yang és mtsai. 2013b) vizsgálták, hogy a rákos sejtekben megváltozott EGFR útvonal indukálja a PKM2 nukleáris transzlokációját, amit a PKM2 ERK általi foszforilációja közvetít; ennek a következménye, hogy fokozódik a glikolitikus enzimek expressziója (pl: GLUT1 és LDHA) (Aguilera és mtsai. 2016). Feltehetően az aszkorbát által kiváltott PKM2 expresszió változás összefügghet a GLUT1 működés csökkenésével, melyet a MAPK/EGFR útvonal gátlása okoz. Western blot vizsgálatokkal megállapították, hogy az aszkorbát hatására

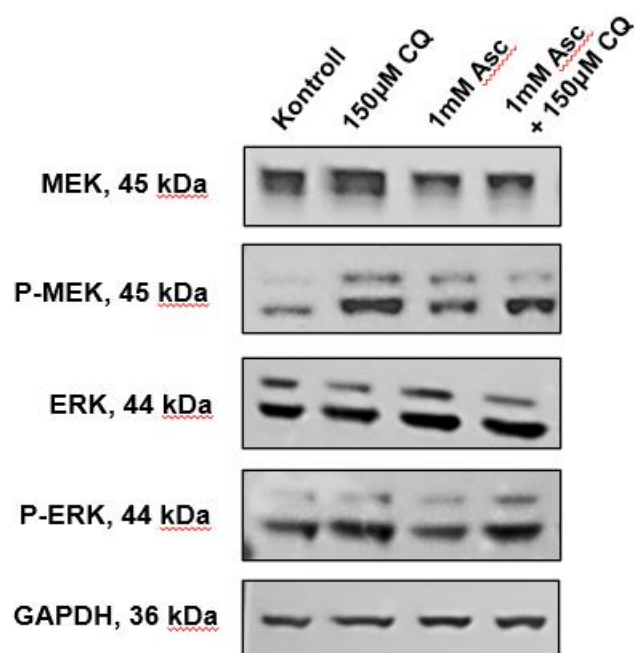
nem csak a PKM2-nek, hanem a foszforilált alakjának aktivitása is megváltozott. Mivel nekünk nem sikerült kimutatni a GLUT1 mRNS-szintű expressziós csökkenését rákos sejtekben, az előbb említett kutatást követve próbáltuk ellenőrizni, hogy az aszkorbát és klorokin kombinált kezelése következtében létrejövő szinergikus hatás a sejtekben a KRAS útvonaltól függhet-e, vagy attól teljesen független.

6.2. KRAS mutáns PDAC sejtek specifikus fehérjéinek vizsgálata Western blot technikával

Bryant és munkatársai megfigyelték, hogy a MEK-ERK jelátviteli útvonalnak is szerepe van az autofágia szabályozásában (Bryant és mtsai. 2019). A KRAS- vagy az ERK-gátlókkal (ERKi) végzett kezelés növelte az autofágia fluxusát számos KRAS-mutáns humán PDAC sejtvonalakban. Megmérték, hogy a klorokin nagymértékben javítja MEK vagy ERK gátlás hatékonyságát különböző sejtvonalakban, pl. KRAS mutáns PDAC sejtekben (Zhao és Zheng 2019). Aguilera és társainak kutatásai azt mutatták, hogy KRAS mutációt hordozó vastagbélrákos sejtekben a MEK/ERK foszforilált (aktivált) alakja nőtt az aszkorbát hatására, mi pedig ennek alapján szándékoztuk tanulmányozni, hogy a már előzőekben említett aszkorbát és klorokin kombinált kezelése okozta szinergia valóban a KRAS útvonaltól függ-e.

A KRAS mutáns PDAC sejteket különböző koncentrációkban kombináltan kezeltünk aszkorbáttal és klorokinnal, majd 24 órát inkubáltuk. Ezt követően a sejtekből fehérjét izoláltunk és fehérjekoncentrációt mértünk, majd Western blot technikával bizonyos fehérjék mennyiségét detektáltuk. A 9. ábra egy reprezentatív kísérletet mutat be, melyet többször megismételtünk, hogy megbizonyosodjunk az eredményeink reprodukálhatóságáról.

A feltételezésünk az volt, hogy ha a kezelőszerek által kiváltott szinergia a KRAS útvonal aktivitásától függ, akkor a MEK/ERK aktivitás fokozódik. Az eredmények azt mutatták (9. ábra), hogy a kombinált kezelés ellenére nem változott meg a sejtekben a MEK/ERK foszforilált, azaz aktív alakjának mennyisége, tehát a MEK/ERK fehérjék aktivitása. A szakirodalom alapján várt eredményektől való eltérés alapulhat azon, hogy Aguilera és munkatársai vastagbélrákos sejteken dolgoztak, mi pedig hasnyálmirigy rákos sejtekkel kísérletezünk, és előfordulhat, hogy eredettől/szövettől függően a különböző rákos sejtek máshogy viselkednek az adott kezelés hatására. Mindenesetre az alábbi eredményekkel arra következtetésre jutottunk, hogy a két szer kombinált kezelésével kiváltott szinergia nem a KRAS útvonal aktivációjától függ, hanem más módon okozhat citotoxicitást a MIA PaCa-2 sejtekben.



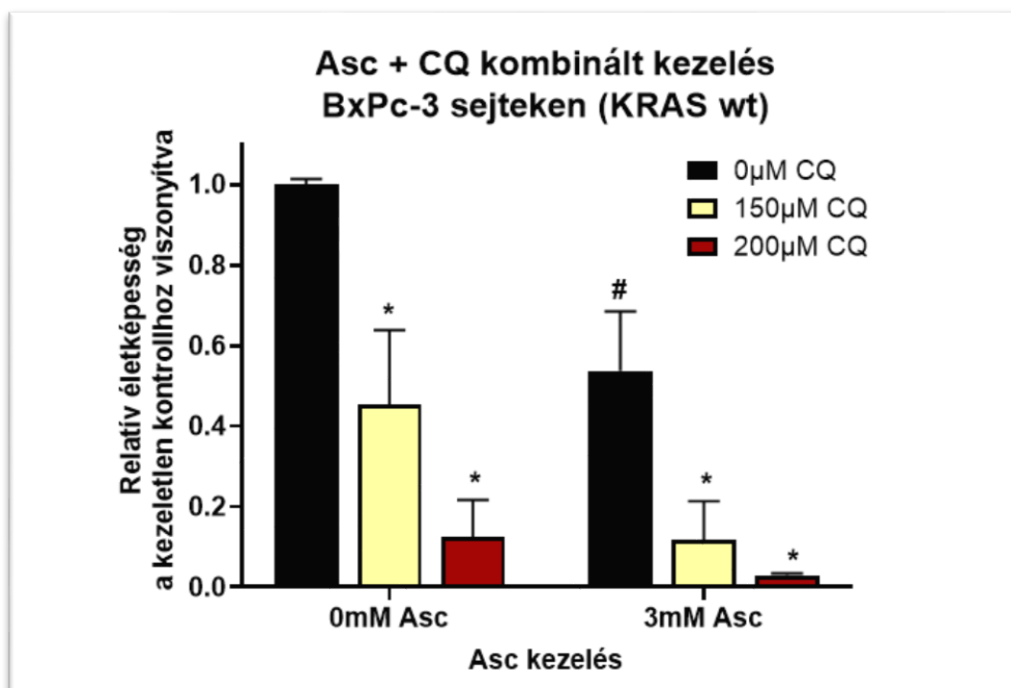
9. ábra: MIA PaCa-2 KRAS mutáns PDAC sejtek kombinált kezelését követő 24 órás inkubálás után fehérjét izoláltunk, majd Western blot technikával megmértük különböző fehérjék mennyiségét. GAPDH-t alkalmaztunk belső kontrollként, elsődleges antitestként a MEK, ERK total és foszforilált formái ellen termeltetett antitesteket használtunk. Az eredmények azt mutatták, hogy feltevésünk ellenére nem fokozódott a MEK/ERK aktív formájának mennyisége. Ebből arra lehetett következtetni, hogy a kezelőszerek által kiváltott szinergia a KRAS útvonal aktivitásától független, más módon okoz citotoxicitást a sejtekben.

Az eddig kapott eredményeink alapján elmondható, hogy az aszkorbát és klorokin által kiváltott szinergikus hatás nem a KRAS útvonaltól függ. Egyik kísérletnél sem azokat a várt változásokat kaptuk, melyekre a KRAS-tól való függés esetén számítottunk volna. Ez magyarázható azzal, hogy más eredetű szövetekből izolált rákos sejtvonalakat használtunk, mint a szakirodalomban leírt kísérletekben, csak a mutáció volt azonos bennük. Ezt követően új útvonalon indultunk el, és elkezdtük vizsgálni, hogy szélesebb körben alkalmazva ezt a terápiát, hasonló eredményeket kaphatunk-e.

6.3. Vad típusú BxPc-3 PDAC sejtek kombinált kezelése által indukált sejthalál folyamat vizsgálata MTT Assay használatával

KRAS mutációra nézve vad típusú sejteken kezdtünk vizsgálódni, hogy ebben az esetben is kialakul-e szinergia a kezelőszerek kombinált alkalmazásának hatására. Az előzetes tapasztalatok azt mutatták, hogy különbség volt a hasonló mutációval rendelkező, de eltérő szövetből izolált rákos sejtek viselkedésében. Ezt bizonyítja, hogy Aguilera és munkatársai által használt KRAS mutáns vastagbélrákos sejtekkel végzett vizsgálatoknál teljesen eltérő eredményeket kaptak, mint amit mi kaptunk az általunk használt szintén KRAS mutáns PDAC sejtek vizsgálatánál. Ezt figyelembe véve kísérleteinket egy KRAS-ra nézve vad típusú hasnyálmirigy sejtvonallal kezdtük.

Először BxPc-3 vad típusú PDAC sejtekkel kísérleteztünk, hogy megtudjuk, azonos eredetű szövetből izolált, de más tulajdonságú rákos sejt is hasonlóan reagál-e a kezelésre. A sejteket különböző koncentrációban kezeltük aszkorbáttal és klorokinnal, majd 24 órás inkubálást követően megmértük a sejtek relatív életképességét MTT Assay segítségével. Ennek az eredményét a 10. ábra tartalmazza. A függőleges tengelyen a kezeletlen kontrollhoz viszonyított relatív életképesség található, a vízszintes tengelyen a különböző koncentrációban adagolt aszkorbátot ábrázoltuk. Ezen méréseknél az aszkorbát hatása jól reprodukálható volt mindkét sejtvonalon. Ez feltételezhetően abból adódott, hogy már kellően kitapasztaltuk a bizonytalanságot okozó körülmények kiküszöbölésének módjait. Az eredmények azt mutatták, hogy mindkét önmagában alkalmazott klorokin koncentráció esetén szignifikánsan lecsökkent a sejtek életképessége, majd a kezelőszerek kombinált használatával egy szinergikus hatás alakult ki, a sejtek életképessége ez esetben is lecsökkent. Megfigyelhető, hogy a klorokin nélküli aszkorbát kezelés a kontrollhoz képest hogyan csökkentette le jelentősen a sejtek életképességét (#-tel jelölve). Szignifikáns különbségek figyelhetők meg továbbá adott koncentrációjú aszkorbáttal kezelt csoportokon belül, a csoportkontroll (csak aszkorbáttal kezelt minta) és a kombináltan kezelt minták között (*-gal jelölve).



10. ábra: BxPc-3 vad típusú KRAS-t hordozó rákos sejtek 24 órás kombinált kezelésének relatív életképesség vizsgálata MTT Assay segítségével. A sejtek aszkorbáttal és klorokinval voltak kezelve különböző, előzetesen már meghatározott koncentrációkban. A kezelések hatását a kezeletlen kontrollhoz viszonyítottuk. A mérések 96 well plate-en történtek. Ennél a sejtvonalnál is megfigyelhető a kombinált kezeléssel kiváltott szinergikus hatás. #-tel jelölve: Amikor csak aszkorbáttal voltak kezelve a sejtek, klorokinval nem, akkor a kontrollhoz viszonyított relatív életképesség szignifikánsan lecsökkent az aszkorbát hatására. *-gal jelölve: Szignifikáns különbségek figyelhetők meg adott koncentrációtartományú aszkorbáttal kezelt csoportokon belül, a csoportkontroll (csak aszkorbáttal kezelt minták) és a kombináltan kezelt minták között.

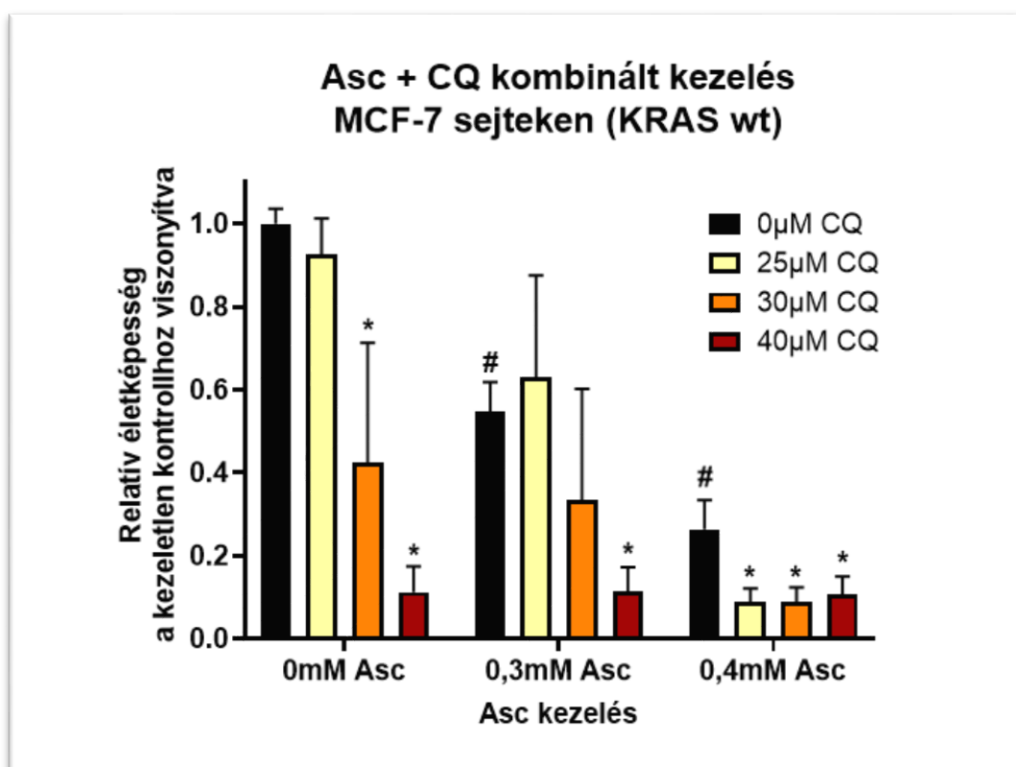
Megfigyelhető, hogy a fentiekben kapott eredmények nagyon hasonlítanak a hipotézisben leírt eredményekhez. A vad típusú BxPc-3 sejtvonal esetében is hasonló koncentráció tartományban dolgoztunk, mint a KRAS mutáns PANC-1 és MIA PaCa-2 sejtvonalak vizsgálatánál és hasonló koncentrációkban történtek az életképesség-változások is (lásd részletesen 3.6.1.2 fejezet). Valószínűsíthető, hogy a sejtek kezelés iránti érzékenysége azért egyezik meg ennyire, mivel azonos eredetű szövetből származtak, attól függetlenül, hogy valamelyik KRAS mutációt hordozott vagy arra a mutációra nézve vad típusú volt. Ezen eredménnyel is támogatható a kiváltott szinergikus hatás KRAS útvonaltól való függetlensége.

Tovább szélesítve kutatási célunkat, elkezdtünk vizsgálni más szövetből származó, KRAS mutációra nézve vad típusú sejtvonalat, hogy erre miképpen fog hatni az aszkorbát és klorokin kombinált kezelése. Ehhez MCF-7 vad típusú emlő adenokarcinóma sejtvonalat használtunk, a sejtek kezelése után életképességet mértünk.

6.4. Vad típusú MCF-7 emlő adenokarcinóma sejtek kombinált kezelése által indukált sejthalálfolyamat vizsgálata MTT Assay használatával

Miután kimutattuk, hogy a szintén hasnyálmirigyből izolált KRAS mutációra nézve vad típusú BxPc-3 sejtekben is megjelent a szinergia, tovább kutattunk, hogy más eredetű szövetből izolált vad típusú rákos sejtekben is megfigyelhető lesz-e. Ekkor MCF-7 vad típusú emlő adenokarcinóma sejtvonallal dolgoztuk. A sejteket különböző koncentrációban kezeltük aszkorbáttal és klorokinnal, majd 24 órát inkubáltuk. Ezt követően MTT Assay segítségével megmértük a sejtek életképességét. Eredményeinket a 11. ábra tartalmazza, a vízszintes tengelyen a különböző koncentrációban adagolt aszkorbát található, a függőleges tengelyen a kezeletlen kontrollhoz viszonyított relatív életképességet ábrázoltuk. A méréseket itt is 96 well plate-eken végeztük.

Az eredmények alapján jól látható, hogy a klorokinnak kis koncentrációban (25 μ M) való alkalmazásánál nem volt jelentős hatás, ám nagyobb klorokin koncentrációknál (30 μ M-40 μ M) 0,4mM koncentrációjú aszkorbáttal kombinálva a sejtek életképessége szinergikusan lecsökkent. A klorokin nélküli aszkorbát kezelésnél a kontrollhoz képest mindegyik csoport életképességét jelentősen lecsökkentette az aszkorbát (#-tel jelölve). Szignifikáns különbségek figyelhetők meg továbbá adott koncentrációtartományú aszkorbáttal kezelt csoportokon belül, a csoportkontroll (csak aszkorbáttal kezelt minták) és a kombináltan kezelt minták között (*-gal jelölve).



11. ábra: MCF-7 KRAS mutáns emlő adenokarcinóma sejtek 24 órás kombinált kezelés utáni relatív életképesség vizsgálat MTT Assay használatával. A kezelőszerek sejtekre kifejtett hatását a kezeletlen kontrollhoz viszonyítottuk. Az MCF-7 sejtvonal esetében kisebb klorokin koncentrációval dolgoztunk (25 μ M, 30 μ M, 40 μ M). Kombinált kezelés hatására drasztikusan lecsökkent a sejtek életképessége, ez főleg a nagyobb aszkorbát és nagyobb klorokin koncentrációknál volt megfigyelhető (30 μ M - 40 μ M). A mérés 96 well plate-ten történt. #-tel jelölve: Amikor csak aszkorbáttal voltak kezelve a sejtek, klorokinnal nem, akkor a kontrollhoz viszonyított relatív életképesség szignifikánsan lecsökkent az aszkorbát hatására. *-gal jelölve: Szignifikáns különbségek figyelhetők meg adott koncentrációtartományú aszkorbáttal kezelt csoportokon belül, a csoportkontroll (csak aszkorbáttal kezelt minták) és a kombináltan kezelt minták között.

Ugyanakkor fontos megjegyezni azt, amely egyébként eltérés az imént említett MIA PaCa-2 és PANC1 sejtvonalakhoz képest, hogy az MCF-7 sejtvonal sokkal érzékenyebben reagált a kezelésekre, mivel itt már 40 μ M-os klorokin koncentrációnál szinte teljesen lecsökkent a sejtek életképessége, míg más sejtvonalak esetében ez magasabb (125-200 μ M) koncentrációnál következett be (lásd 3.6.1.2 fejezet). Ez az eltérés azzal magyarázható, hogy a vizsgált sejtvonalak másféle szövetből származtak és az emlőráksejtek érzékenyebbek a hasnyálmirigyrákos sejteknél.

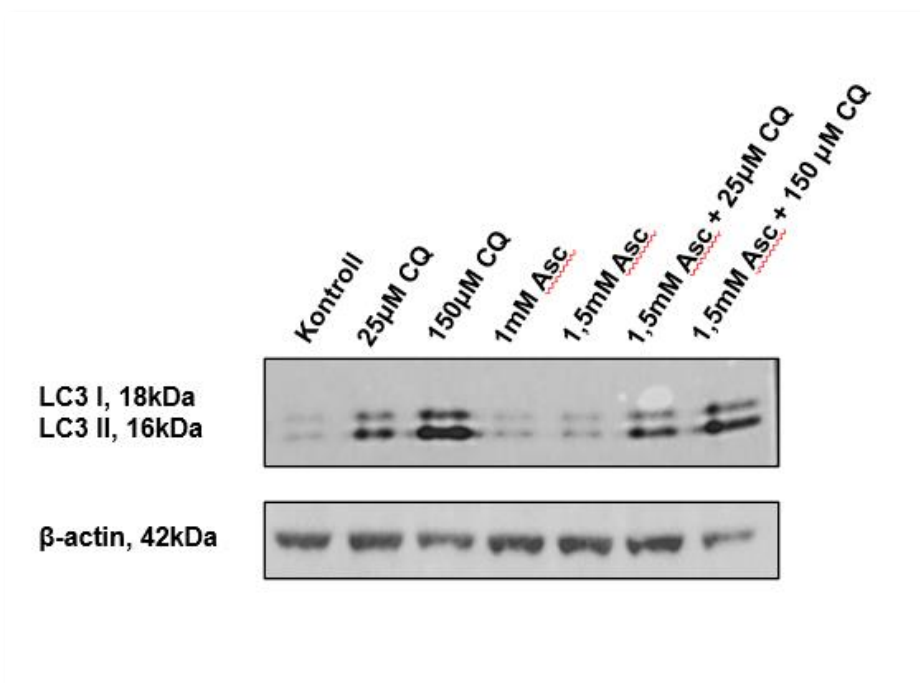
Kutatásaink során bebizonyítottuk, hogy a rákos sejtekben az aszkorbát és klorokin kombinált kezelésével kiváltott sejthalál nem a KRAS útvonaltól függ, hanem egy más, egyelőre ismeretlen mechanizmus állhat az okozott citotoxicitás hátterében. Kimutattuk, hogy a kezelések hasonló életképesség-csökkenést tudnak előidézni vad típusú sejtekben, melynek köszönhetően az alábbi kezelőszerek kombinált kezelése egy sokkal szélesebb körű terápiás lehetőséget nyújt a rákos megbetegedések kezelésére.

6.5. A kezelőszerek hatásmechanizmus-vizsgálata

Az eddigi eredményeink alapján úgy találtuk, hogy a kombinált kezelés által kiváltott szinergikus sejthalál nem függ a KRAS útvonaltól, a kezelőszerek ugyanúgy lecsökkentették a sejtek életképességét a vad típusú sejtvonalon, mint a KRAS mutáns rákos sejteknél. A továbbiakban pedig arra voltunk kíváncsiak, hogy az alkalmazott szerek külön-külön milyen hatásmechanizmussal váltják ki sejtpusztító hatásukat. Kísérleteinket a széles körben alkalmazott MIA PaCa-2 KRAS mutáns PDAC modellsejteken végeztük (Buranasudja és mtsai. 2019); (Fukui és mtsai. 2015b).

6.5.1. A klorokin hatásmechanizmusának vizsgálata

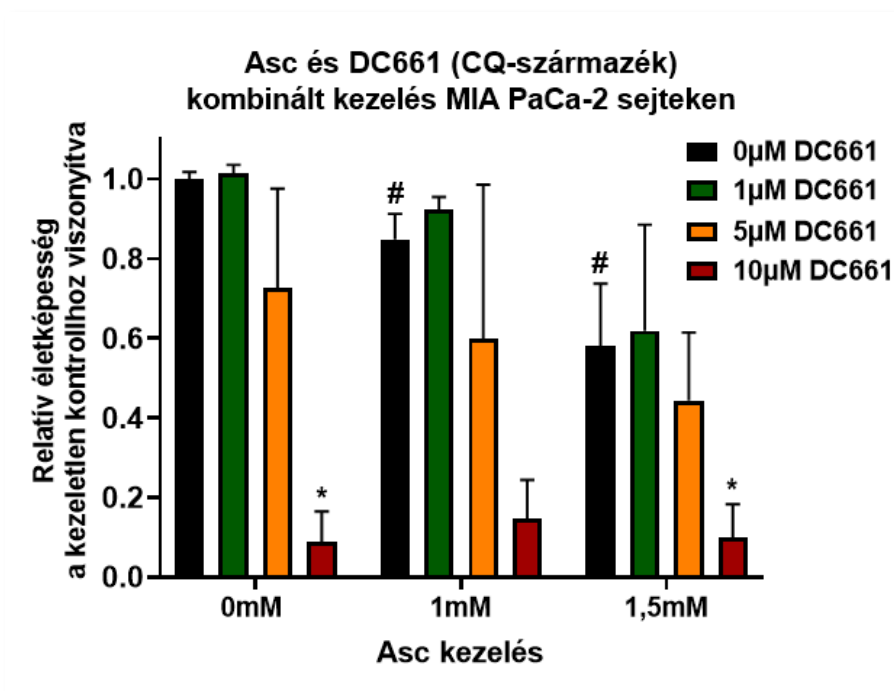
Ahogy az már említésre került, kutatócsoportunk a közelmúltban tanulmányozta a klorokin lehetséges hatásmechanizmusát (7. ábra), majd a vizsgálat során bebizonyosodott, hogy a klorokin valóban képes volt gátolni az autofágiát. Ezt követően, mi ezt az eredményt kívántuk megerősíteni egy másik módszer alkalmazásával: megvizsgáltuk az LC3B autofágia kulcsfehérjét. Az eredmények azt mutatták (12. ábra), hogy az LC3-II hasítási forma aránya megnövekedett a klorokin kezelés hatására, ez pedig szintén az autofágia blokkját igazolja, ugyanis az LC3-I/II átalakulás, illetve az LC3-II hasítási forma felhalmozódása a gátolt lizoszóma-autofagoszóma fúzió előtt jön létre, ezért ez a feldúsulás a későbbi blokkot igazolja.



12. ábra: MIA PaCa-2 KRAS mutáns PDAC sejtek CQ-val és/vagy Asc-tal való kezelését követő 24 órás inkubálás után a sejtekből fehérjét izoláltunk, majd Western blot technikával analizáltuk az LC3-I és LC3-II fehérjéket. Az eredmények azt mutatták, hogy az LC3-II hasítási forma aránya megnövekedett a klorokin kezelés hatására, ez pedig szintén az autofágia blokkját igazolja.

Ezen eredmények alapján feltételeztük, hogy más autofágia inhibitor is szinergikus hatást válthat ki a farmakológiai aszkorbáttal, hiszen úgy tűnt, hogy a klorokin az autofágia gátlásán keresztül idézte elő a sejthalált. Így a továbbiakban a DC661 és a Bafilomycin A1 autofágiát gátló szerek aszkorbáttal való kombinációját próbáltuk ki (Yang és mtsai. 2011). A DC661 egy klorokinszármazék, melyről kimutatták, hogy ezzel kezelve a rákos sejteket az LC3-II hasítási forma a klorokin alkalmazásához képest már alacsonyabb koncentrációtartományban is feltűnően felhalmozódott. Továbbá egyéb módszerekkel is megerősítették, hogy a DC661 erősebben képes gátolni az autofágiát a klorokinhoz képest (Rebecca és mtsai. 2019).

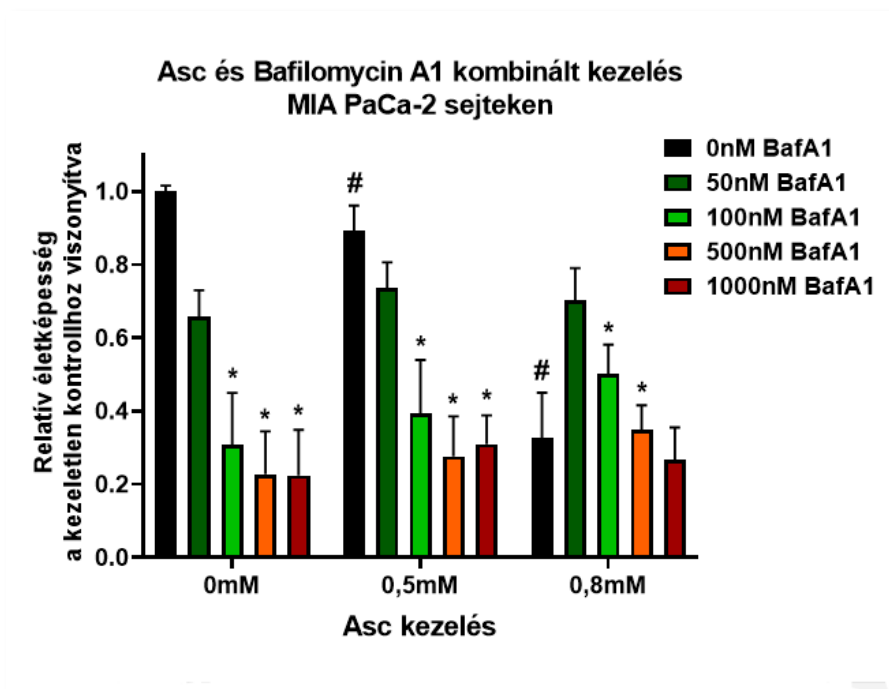
Tehát először a MIA PaCa-2 rákos sejteket kombináltan kezeltük farmakológiai aszkorbáttal és a DC661 autofágia inhibitorral, majd 24 órás inkubálást követően megmértük a sejtek relatív életképességét MTT Assay segítségével. Eredményeinket a 13. ábra tartalmazza, a vízszintes tengelyen a különböző koncentrációban adagolt aszkorbát található, a függőleges tengelyen a kezeletlen kontrollhoz viszonyított relatív életképességet ábrázoltuk. A méréseket itt is 96 well plate-eken végeztük. Megfigyelhető, hogy amikor csak aszkorbáttal voltak kezelve a sejtek, és DC661-gyel nem, akkor a kontrollhoz viszonyított relatív életképesség szignifikánsan lecsökkent az aszkorbát hatására (#-el jelölve). Jól látható, hogy a DC661 10 μ M-os koncentrációban alkalmazva aszkorbát nélkül és azzal együtt is hasonló életképesség-csökkenést okozott. A DC661 kisebb koncentrációban (1-5 μ M) adagolva nem okozott jelentősebb életképesség-csökkenést, ahhoz képest, mint ahogy az aszkorbát önmagában való alkalmazásánál az megfigyelhető volt. Ezek alapján a két szer nem viselkedett szinergikusan, tehát a DC661 nem fokozta az aszkorbát életképesség-csökkentő hatását.



13. ábra: MIA PaCa-2 sejteket kombináltan kezeltünk aszkorbáttal és DC661 autofágia inhibitorral, majd 24 órás inkubálás után MTT Assay segítségével mértük meg a sejtek életképességét. A vízszintes tengelyen a különböző koncentrációban adagolt aszkorbát található, a függőleges tengelyen a kezeletlen kontrollhoz viszonyított relatív életképességet ábrázoltuk. A méréseket itt is 96 well plate-eken végeztük. Eredményeink azt mutatták, hogy ebben az esetben nincs szinergikus életképesség-csökkenés. Ugyanakkor megfigyelhető, hogy a DC661 önmagában ugyanolyan mértékű életképesség-csökkenést indukálhat, mint a CQ, de egy nagyságrenddel alacsonyabb koncentrációban.

Ezt követően továbbvizsgáltuk, hogy egy másik hatásmechanizmusú jól ismert autofágia-gátlószer, a Bafilomycin A1 (BafA1) az aszkorbáttal kombinálva milyen hatást fejt ki a sejtekre. A BafA1 egy antibiotikum, amely szelektíven gátolja a vakuoláris típusú H^+ -ATPáz és megakadályozza az ezt tartalmazó organellek elsavasodását. Feltételezték, hogy mivel a BafA1 megzavarja a savasodást, megakadályozza a lizoszóma-autofagoszóma fúziót, így nem tud az autolizoszóma kialakulni. Ennek következtében az autofagoszóma felhalmozódnak és az autofágia fluxusa gátlódik (Keeling és mtsai. 1997).

MIA PaCa-2 rákos sejteket kombináltan kezeltünk aszkorbáttal és BafA1-gyel, majd 24 órás inkubálást követően megmértük a sejtek életképességét MTT Assay módszer segítségével. Eredményeinket a 14. ábra tartalmazza. A vízszintes tengelyen a különböző koncentrációban adagolt aszkorbát található, a függőleges tengelyen a kezeletlen kontrollhoz viszonyított relatív életképességet ábrázoltuk. A méréseket itt is 96 well plate-eken végeztük. Ahol BafA1-gyel nem kezeltük a sejteket, ott az aszkorbát önmagában lecsökkentette az életképességet a kezeletlen kontrollhoz képest (#-el jelölve). Jól látható, hogy ahol a sejtekhez 100-1000 nM-os BafA1-et adagoltunk, ott jelentősen lecsökkentette az életképességet az aszkorbát mennyiségétől függetlenül. Ebből arra következtettünk, hogy ezen kezelőszerek kombinált alkalmazásával sem idéztünk elő szinergikus életképesség-csökkenést.



14. ábra: MIA PaCa-2 rákos sejteket kombináltan kezeltünk aszkorbáttal és BafA1-gyel, majd 24 órás inkubálást követően megmértük a sejtek életképességét MTT Assay módszer segítségével. A vízszintes tengelyen a különböző koncentrációban adagolt aszkorbát található, a függőleges tengelyen a kezeletlen kontrollhoz viszonyított relatív életképességet ábrázoltuk. A méréseket itt is 96 well plate-eken végeztük. Megfigyelhető, hogy az aszkorbát és BafA1 kombinált alkalmazása nem okozott szinergikus életképesség-csökkenést.

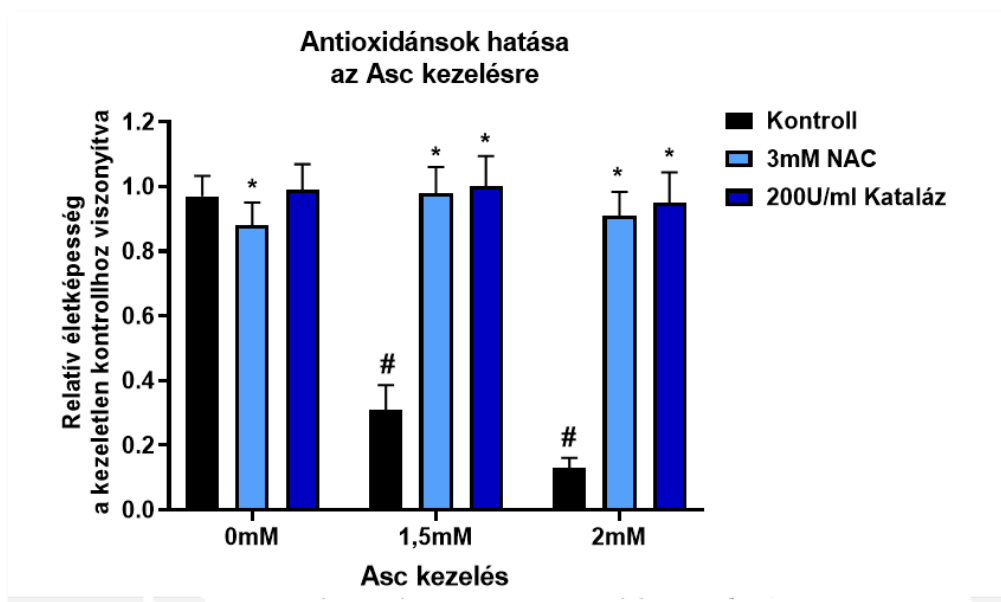
Azt tapasztaltuk tehát, hogy sem a DC661, sem pedig a BafA1 nem okozott olyan szinergikus életképesség-csökkenést az aszkorbáttal, mint a klorokin. Ebből pedig arra jutottunk, hogy a klorokin ugyan gátolja az autofágiát, mégsem azon keresztül fejt ki a citotoxikus hatását, hanem valamilyen egyéb, autofágia-független módon. Ezzel kapcsolatban Eng és társai (Eng és mtsai. 2016) is végeztek kutatásokat, amely során nem tudták megerősíteni, hogy a KRAS mutáns sejtek növekedése valóban makroautofágiát igényelne, ugyanakkor kimutatták, hogy a

klorokin antiproliferatív hatása független lehet az autofágiára kifejtett szuppresszív hatásaitól. Eredményeink is megkérdőjelezték az autofágia szerepét a farmakológiai aszkorbát-klorokin együttes kezelés által kiváltott PDAC sejtek citotoxicitásában. Végül tanulmányozni kívántuk az aszkorbát hatásmechanizmusát, a szakirodalomban már említett tulajdonságainak ismeretében (lásd részletesen a 3.4 fejezetben).

6.5.2. A farmakológiai aszkorbát hatásmechanizmusának vizsgálata

Előzetes kísérleteink során arra jutottunk, hogy feltételezéseink ellenére a farmakológiai aszkorbát nem gátolja a KRAS útvonalat és a Warburg-effektust. Ezután arra voltunk kíváncsiak, hogy vajon szerepet játszik-e a H_2O_2 a rákellenes hatásban (lásd részletesen 3.4. fejezet). A rákos sejtekre jellemző a megnövekedett ROS-szint, amit a proliferáció, invázió, migráció serkentésére használnak. Schoenfeld és munkatársai tanulmányozták a sejtek antioxidáns rendszerét, mivel azt feltételezték, hogy ennek köszönhető a túlélőképességük a magas oxidatív stressznek kitett környezetben. Néhány tanulmány megnövekedett kataláz expresszióról számolt be daganatos sejtekben az azonos eredetű normál sejtekhez képest, többben azonban a kataláz szabályzásának gátlását tapasztalták magas H_2O_2 -koncentrációnál, ami például a farmakológiai aszkorbát általi kezelésnél termelődhet. A H_2O_2 eltávolításának sebességét lényegében a kataláz befolyásolja. Feltételezték, hogy a rákos sejtek képesek az oxidatív stresszt olyan szintre állítani, ami elégséges a túlélésükhöz és szaporodásukhoz, de ahhoz nem, hogy elpusztuljanak. Ezt az egyensúlyt zavarhatja meg a farmakológiai aszkorbát. Majd megállapították, hogy a farmakológiai aszkorbát által indukált sejthalál egyértelműen a ROS-képző tulajdonságtól és a H_2O_2 -termeléstől függ, hiszen a sejthalál kivédhető exogén módon adagolt katalázzal, vagy a kataláz fokozott expressziójával (Schoenfeld és mtsai. 2017).

A MIA PaCa-2 humán PDAC sejtvonalat aszkorbáttal kezeltünk, majd egy enzimes, illetve nem enzimes antioxidánsot adtunk hozzá. Ezzel azt tanulmányoztuk, hogy a különböző antioxidánsok milyen hatással vannak az aszkorbát által kiváltott sejthalálra. Az egyik antioxidáns a kataláz volt, mely az egyik legfontosabb antioxidáns enzim, szinte minden aerob szervezetben megtalálható. A kataláz két hidrogén-peroxid molekulát bont le egy oxigén és két víz molekulává egy kétlépéses reakció során (Nandi és mtsai. 2019). A másik vegyület az N-acetil-cisztein (NAC), amely a GSH endogén prekursora és az egyik legszélesebb körben használt antioxidáns, amit alkalmaznak klinikai vizsgálatokban, illetve állati és sejtenyészési kísérleteknél is (Ezeriņa és mtsai. 2018). Eredményeinket a 15. ábra tartalmazza, a vízszintes tengelyen a különböző koncentrációban adagolt aszkorbát található, a függőleges tengelyen a kezeletlen kontrollhoz viszonyított relatív életképességet ábrázoltuk. Megfigyelhető, hogy minél nagyobb koncentrációban adagoltuk az aszkorbátot, ott a sejtek életképessége egyre inkább lecsökkent. Ám, ha katalázt, illetve NAC-t adtunk a sejtekhez, akkor ezen antioxidánsok teljes mértékben felfüggesztették az aszkorbát által kiváltott sejthalált.



15. ábra: Aszkorbát hatásmechanizmusának vizsgálata MTT Assay módszerrel. MIA PaCa-2 sejteket kezeltünk aszkorbáttal, majd különböző antioxidánsokat adagoltunk hozzájuk. Eredményeink azt mutatták, hogy önmagában alkalmazva az aszkorbátot a sejtek életképessége jelentősen lecsökkent, ám antioxidánst adagolva hozzá, a kataláz és az NAC is felfüggesztette az aszkorbát által kiváltott sejthalált.

Ezen eredményünkkel bebizonyítottuk, hogy a farmakológiai aszkorbát által indukált sejthalál MIA PaCa-2 sejtekben is valóban a ROS-képző tulajdonságtól és a H_2O_2 -termeléstől függ, mivel a sejthalált fel tudtuk függeszteni a kataláz, illetve az NAC alkalmazásával.

7. Összefoglalás

Kutatócsoportunk a közelmúltban a szakirodalomban már említett kísérletes adatok alapján egy matematikai modellt állított fel a KRAS mutáns rákos sejtek metabolizmusát szabályozó hálózat működéséről, a szabályozás főbb elemeinek működéséről (Kapuy és mtsai. 2021). Ezen modell pedig lehetőséget kínál arra, hogy sejtek metabolizmus-szabályozásának leírásán túl további terápiás stratégiákat tárhassunk fel e súlyos prognózist okozó KRAS mutációt hordozó rákos sejtekkel szemben. Feltételezték, hogy a farmakológiai aszkorbát és klorokin kombinált kezelésével blokkolódik a KRAS és mTOR útvonal is, ezáltal pedig csökkenni fog a GLUT1 expresszió, míg a KRAS mutáns rákos sejtek számára nélkülözhetetlen autofágia gátlódik, mely következtében a rákos sejtek elpusztulnak. Kutatócsoportunkban korábban Bogárdi Letícia diplomamunkája keretében tanulmányozta az aszkorbát és klorokin együttes hatását KRAS mutáns rákos sejtekben, mely során bebizonyosodott, hogy a kezelőszerek szinergikusan lecsökkentik a sejtek életképességét (Bogárdi 2022).

Dolgozatom célja az volt, hogy ezt a matematikai modellt *in vitro* kísérletes módszerekkel tovább vizsgáljam. Vizsgálataink során arra a kérdésre kerestük a választ, hogy a kombinált terápia hatásossága valóban a KRAS útvonaltól függ-e. Valós idejű PCR alkalmazásával tanulmányoztuk a GLUT1 transzporter mRNS szintű expressziójának változását, hogy a KRAS mutáns PANC-1 és MIA PaCa-2 hasnyálmirigyrákos sejtekben a kombinált kezelés hatására a GLUT1 expresszió valóban mérséklődik-e, mint ahogy azt előzetes kísérletek alapján vártuk (Aguilera és mtsai. 2016). Várakozásaink ellenére nem történt változás a GLUT1 expressziójában, a kezeletlen kontrollhoz hasonló eredményt kaptunk. Az okozhatta az eltérést Aguilera és munkatársai eredményeihez képest, hogy ők vastagbélrákos sejteken dolgoztak, mi pedig hasnyálmirigyrákos sejteken. Aguilera és munkatársai azt találták, hogy KRAS mutációt hordozó vastagbélrákos sejtekben a MEK/ERK foszforilált (aktivált) alakjának mennyisége nőtt az aszkorbát hatására, mi pedig ennek segítségével szándékoztuk tanulmányozni, hogy a már előzőekben említett szinergia valóban a KRAS útvonaltól függ-e. Ezért a MIA PaCa-2 sejtvonalon Western blot technikával vizsgáltuk a MEK/ERK totál és foszforilált (aktivált) formák arányainak változását a kombinált kezelés hatására. Ha valóban a KRAS útvonal aktivációjától függött volna a szinergia, a MEK/ERK foszforilált forma arányának nőnie kellett volna, ennek ellenére nem volt megfigyelhető változás. Bár Aguilera és munkatársai eredményeitől való eltérést okozhatta az, hogy másmilyen eredetű rákos szövetekkel történtek a kísérletek, arra a következtetésre jutottunk, hogy a MIA PaCa-2 sejtekben nem a KRAS útvonaltól függ a kezelőszerek kombinált alkalmazása által kiváltott sejthalál, hanem más mechanizmus állhat az okozott citotoxicitás mögött. Ennek tudatában, szélesítve a kutatási célunkat, elkezdtünk KRAS mutációra nézve vad típusú sejtvonalakon dolgozni, hogy az előbbieken már kimutatott szinergia is itt megjelenik-e. Az előzetes tapasztalatok azt mutatták, hogy volt különbség a hasonló mutációval rendelkező, de eltérő szövetből izolált rákos sejtek viselkedésében. Ezt figyelembe véve vizsgálatainkat egy vad típusú, a BxPc-3 PDAC sejtvonallal kezdtük, hogy ha már mutáció terén eltérnek, de ugyanolyan típusú szövetből származzanak. Majd ezt követően más szöveti eredetű, szintén vad típusú MCF-7 emlő adenokarcinóma sejtvonallal kísérleteztünk. A két vad típusú sejt esetén hasonló eredményeket kaptunk. A vizsgálatok során a sejteket aszkorbáttal és klorokinnal különböző koncentrációkban kombináltan kezeltük, 24 órán át inkubáltuk, majd MTT Assay használatával megmértük a sejtek életképességét. Az életképesség mérés eredményei a vad típusú BxPc-3

PDAC és MCF-7 emlő adenokarcinóma esetében is azt mutatták, hogy önmagában alkalmazva az aszkorbátot, képes volt egyedül is lecsökkenteni a sejtek életképességét. Kombinált kezelés során a kezelőszerek szinergikusan lecsökkentették a sejtek életképességét. Vad típusú BxPc-3 sejtvonal esetében hasonló koncentrációtartományban dolgoztunk, mint a KRAS mutáns PANC1 és MIA PaCa-2 sejtvonalak vizsgálatánál és hasonló koncentrációkban történtek az életképesség-változások is. Valószínűsíthető, hogy a sejtek érzékenysége a kezelésre azért egyezik meg ennyire, mivel azonos szövetből származtak, attól függetlenül, hogy valamelyik KRAS mutációt hordozott vagy arra a mutációra nézve vad típusú volt. Ezzel az eredménnyel is támogatható a kiváltott szinergikus hatás KRAS útvonaltól való függetlensége. Ehhez képest az MCF-7 sejtvonal sokkal érzékenyebben reagált a kezelésekre, mivel itt már 40 μ M-os klorokin koncentrációnál szinte teljesen lecsökkent a sejtek életképessége, míg más sejtvonalak esetében ez magasabb (125 μ M - 200 μ M) koncentrációnál következett be. Ez az eltérés azzal magyarázható, hogy a vizsgált sejtvonalak másféle szövetből származtak és az emlőráksejtek érzékenyebbek a hasnyálmirigyrákos sejtekénél.

Továbbá tanulmányoztuk a két kezelőszersz hatásmechanismusát, hogy megtudjuk, külön-külön hogyan fejtik ki sejtölő hatásukat. Előzetes hatásmechanismus-vizsgálatok során kutatócsoportunk bebizonyította a klorokin autofágiagátló képességét a lizoszómák festésével, mi pedig az LC3 kulcsfehérjét vizsgáltuk, mely során az LC3-II hasítási forma felhalmozódott, így ezzel is beigazolódott autofágia inhibitor szerepe. Ezt követően azt kívántuk megvizsgálni, hogy más autofágia gátló szerekkel (DC661 és BafA1) kombinálva az aszkorbátot, hasonló szinergikus sejtéletképesség-csökkenést tapasztalunk-e, mint a klorokin és aszkorbát kezelés esetén. Azonban eredményeink azt mutatták, hogy bár a két autofágia inhibitor képes volt lecsökkenteni a sejtek életképességét, nem volt megfigyelhető szinergia az aszkorbáttal. Ebből pedig arra jutottunk, hogy a klorokin ugyan gátolja az autofágiát, mégsem azon keresztül fejt ki a citotoxikus hatását, hanem valamilyen egyéb, autofágia-független módon. Végül pedig az aszkorbát hatásmechanismusát vizsgáltuk: különböző antioxidánsokat (kataláz, NAC) adtunk az aszkorbáttal kezelt sejtekhez. Azt tapasztaltuk, hogy ezen antioxidánsok jelentősen felfüggesztették az aszkorbát által kiváltott sejthalált, amellyel alátámasztottuk azt a szakirodalomból már ismert tényt, hogy a farmakológiai aszkorbát által indukált sejthalál MIA PaCa-2 sejtekben is valóban a ROS-képző tulajdonságtól és a H_2O_2 -termeléstől függ.

Kutatásaink során bebizonyítottuk, hogy a kombinált kezelés nem a GLUT1 expressziójának változásán keresztül váltja ki a szinergikus citotoxicitást. Továbbá azt is kimutattuk, hogy a KRAS útvonal aktivitásától sem függ a kezelőszerek kombinált kezelésével kiváltott szinergikus sejthalál, hanem egy más, egyelőre ismeretlen mechanizmus állhat az okozott citotoxicitás hátterében. Igazoltuk, hogy a klorokin valóban gátolja az autofágiát, de úgy tűnik, hogy MIA PaCa-2 sejtekben cititoxicitását valamilyen egyéb, autofágia-független mechanizmuson keresztül fejt ki. Továbbá bebizonyítottuk, hogy a farmakológiai aszkorbát MIA PaCa-2 sejtekben is a H_2O_2 termelődését keresztül éri el sejtölő hatását. Bár hipotéziseinkkel ellenkező eredményeket kaptunk, de ennek köszönhetően kimutattuk, hogy a kezelések hasonló életképesség-csökkenést tudnak előidézni vad típusú KRAS-t hordozó sejtekben, így az Asc és CQ kombinált kezelése egy sokkal szélesebb körű terápiás lehetőséget nyújt a rákos megbetegedések kezelésére.

8. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék ezúton is köszönetet mondani Dr. Hajdinák Péter témavezetőmnek és Makk-Merczel Kinga konzulensemnek, kik messzemenőig segítettek, kezdetektől igazgatták lépéseimet, észrevételeikkel formálták kutatómunkámat, és mind szakmailag, mind magánemberként támogattak, nem csak tisztes alázatra intő hatalmas tudásukkal, de kimeríthetetlen emberi sugárzásukkal is.

Emellett külön köszönettel tartozom a BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék, Biokémia és Molekuláris Biológia Laboratórium további munkatársainak, hogy részt vehettem a kutatócsoport munkájában és elkészíthettem a dolgozatomat, mindezek mellett köszönöm, hogy szakmai segítségükkel támogatták a munkámat.

9. Irodalomjegyzék

- Abdel-Wahab, Ali F., Waheed Mahmoud, és Randa M. Al-Harizy. 2019. „Targeting glucose metabolism to suppress cancer progression: prospective of anti-glycolytic cancer therapy”. *Pharmacological Research* 150:104511. doi: 10.1016/J.PHRS.2019.104511.
- Aguilera, Oscar, María Muñoz-Sagastibelza, Blanca Torrejón, Aurea Borrero-Palacios, Laura Del Puerto-Nevado, Javier Martínez-Useros, María Rodríguez-Remirez, Sandra Zazo, Estela García, Mario Fraga, Federico Rojo, és Jesús García-Foncillas. 2016. *Vitamin C uncouples the Warburg metabolic switch in KRAS mutant colon cancer*. Köt. 7.
- Bogárdi, Letícia. 2022. *A farmakológiai aszkorbát és klorokin együttes alkalmazásának vizsgálata D I P L O M A M U N K A D O L G O Z A T Készítette*.
- Bryant, Kirsten L., Clint A. Stalneck, Daniel Zeitouni, Jennifer E. Klomp, Sen Peng, Andrey P. Tikunov, Venugopal Gunda, Mariaelena Pierobon, Andrew M. Waters, Samuel D. George, Garima Tomar, Björn Papke, G. Aaron Hobbs, Liang Yan, Tikvah K. Hayes, J. Nathaniel Diehl, Gennifer D. Goode, Nina V. Chaika, Yingxue Wang, Guo Fang Zhang, Agnieszka K. Witkiewicz, Erik S. Knudsen, Emanuel F. Petricoin, Pankaj K. Singh, Jeffrey M. Macdonald, Nhan L. Tran, Costas A. Lyssiotis, Haoqiang Ying, Alec C. Kimmelman, Adrienne D. Cox, és Channing J. Der. 2019a. „Combination of ERK and autophagy inhibition as a treatment approach for pancreatic cancer”. *Nature Medicine* 25(4):628–40. doi: 10.1038/s41591-019-0368-8.
- Bryant, Kirsten L., Clint A. Stalneck, Daniel Zeitouni, Jennifer E. Klomp, Sen Peng, Andrey P. Tikunov, Venugopal Gunda, Mariaelena Pierobon, Andrew M. Waters, Samuel D. George, Garima Tomar, Björn Papke, G. Aaron Hobbs, Liang Yan, Tikvah K. Hayes, J. Nathaniel Diehl, Gennifer D. Goode, Nina V. Chaika, Yingxue Wang, Guo Fang Zhang, Agnieszka K. Witkiewicz, Erik S. Knudsen, Emanuel F. Petricoin, Pankaj K. Singh, Jeffrey M. Macdonald, Nhan L. Tran, Costas A. Lyssiotis, Haoqiang Ying, Alec C. Kimmelman, Adrienne D. Cox, és Channing J. Der. 2019b. „Combination of ERK and autophagy inhibition as a treatment approach for pancreatic cancer”. *Nature Medicine* 25(4):628–40. doi: 10.1038/s41591-019-0368-8.
- Buranasudja, Visarut, Claire M. Doskey, Adrienne R. Gibson, Brett A. Wagner, Juan Du, David J. Gordon, Stacia L. Koppenhafer, Joseph J. Cullen, és Garry R. Buettner. 2019. „Pharmacologic ascorbate primes pancreatic cancer cells for death by rewiring cellular energetics and inducing DNA damage”. *Molecular Cancer Research* 17(10):2102–14. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-19-0381.
- Chang, Natasha C. 2020. „Autophagy and Stem Cells: Self-Eating for Self-Renewal”. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 8.
- Cheong, Heesun, Chao Lu, Tullia Lindsten, és Craig B. Thompson. 2012. „Therapeutic targets in cancer cell metabolism and autophagy”. *Nature Biotechnology* 30(7):671–78.

- Dezső Péter. 2007. *BUDAPESTI MŰSZAKI ÉS GAZDASÁGTUDOMÁNYI EGYETEM Vegyész-mérnöki és Biomérnöki Kar Kvantitatív PCR alkalmazása a gyógyszerkutatásban.*
- Eng, Christina H., Zuncai Wang, Diane Tkach, Lourdes Toral-Barza, Savuth Ugwonali, Shanming Liu, Stephanie L. Fitzgerald, Elizabeth George, Elizabeth Frias, Nadire Cochran, Rowena De Jesus, Gregory McAllister, Gregory R. Hoffman, Kevin Bray, Lu Anna Lemon, Judy Lucas, Valeria R. Fantin, Robert T. Abraham, Leon O. Murphy, és Beat Nyfeler. 2016. „Macroautophagy is dispensable for growth of KRAS mutant tumors and chloroquine efficacy”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113(1):182–87. doi: 10.1073/pnas.1515617113.
- Eser, S., A. Schnieke, G. Schneider, és D. Saur. 2014. „Oncogenic KRAS signalling in pancreatic cancer”. *British Journal of Cancer* 111(5):817–22.
- Ferreira, Paulo Michel Pinheiro, Rayran Walter Ramos de Sousa, José Roberto de Oliveira Ferreira, Gardenia Carmen Gadelha Militão, és Daniel Pereira Bezerra. 2021. „Chloroquine and hydroxychloroquine in antitumor therapies based on autophagy-related mechanisms”. *Pharmacological Research* 168.
- Fukui, Masayuki, Noriko Yamabe, Hye Joung Choi, Kishore Polireddy, Qi Chen, és Bao Ting Zhu. 2015a. „Mechanism of Ascorbate-Induced Cell Death in Human Pancreatic Cancer Cells: Role of Bcl-2, Beclin 1 and Autophagy”. *Planta Medica* 81(10):838–46. doi: 10.1055/s-0035-1546132.
- Fukui, Masayuki, Noriko Yamabe, Hye Joung Choi, Kishore Polireddy, Qi Chen, és Bao Ting Zhu. 2015b. „Mechanism of Ascorbate-Induced Cell Death in Human Pancreatic Cancer Cells: Role of Bcl-2, Beclin 1 and Autophagy”. *Planta Medica* 81(10):838–46. doi: 10.1055/s-0035-1546132.
- Glick, Danielle, Sandra Barth, és Kay F. Macleod. 2010. „Autophagy: Cellular and molecular mechanisms”. *Journal of Pathology* 221(1):3–12.
- Heiden, Matthew G. Vander, Lewis C. Cantley, és Craig B. Thompson. 2009. „Understanding the warburg effect: The metabolic requirements of cell proliferation”. *Science* 324(5930):1029–33.
- Johnson, Leisa, Doron Greenbaum, Karen Cichowski, Kim Mercer, Elizabeth Murphy, Eric Schmitt, Roderick T. Bronson, Heywood Umanoff, Windfried Edelman, Raju Kucherlapati, és Tyler Jacks. 1997. *K-ras is an essential gene in the mouse with partial functional overlap with N-ras.*
- Kapuy, Orsolya, Kinga Makk-Merczel, és András Szarka. 2021. „Therapeutic approach of kras mutant tumours by the combination of pharmacologic ascorbate and chloroquine”. *Biomolecules* 11(5). doi: 10.3390/biom11050652.
- Keeling, D. J., M. Herslof, B. Ryberg, és L. Solvell. 1997. *Vacuolar H⁺-ATPases Targets for Drug Discovery?*
- Kimura, Tomonori, Yoshitsugu Takabatake, Atsushi Takahashi, és Yoshitaka Isaka. 2013. „Chloroquine in cancer therapy: A double-edged sword of autophagy”. *Cancer Research* 73(1):3–7.

- Knight, Thomas, és Julie Anne Elizabeth Irving. 2014. „Ras/Raf/MEK/ERK pathway activation in childhood acute lymphoblastic leukemia and its therapeutic targeting”. *Frontiers in Oncology* 4 JUN.
- Koppenol, Willem H., Patricia L. Bounds, és Chi V. Dang. 2011. „Otto Warburg’s contributions to current concepts of cancer metabolism”. *Nature Reviews Cancer* 11(5):325–37.
- Lőrincz, Tamás, Marianna Holczer, Orsolya Kapuy, és András Szarka. 2019. „The Interrelationship of Pharmacologic Ascorbate Induced Cell Death and Ferroptosis”. *Pathology and Oncology Research* 25(2):669–79. doi: 10.1007/s12253-018-0539-9.
- Makinoshima, Hideki, Masahiro Takita, Shingo Matsumoto, Atsushi Yagishita, Satoshi Owada, Hiroyasu Esumi, és Katsuya Tsuchihara. 2014. „Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling regulates global metabolic pathways in EGFR-mutated lung adenocarcinoma”. *Journal of Biological Chemistry* 289(30):20813–23. doi: 10.1074/jbc.M114.575464.
- Mizushima, Noboru. 2007. „Autophagy: Process and function”. *Genes and Development* 21(22):2861–73.
- Mizushima, Noboru, Beth Levine, Ana Maria Cuervo, és Daniel J. Klionsky. 2008. „Autophagy fights disease through cellular self-digestion”. *Nature* 451(7182):1069–75.
- Otto Warburg, BY, Franz Wind, és N. Negelein. 1926. *THE METABOLISM OF TUMORS IN THE BODY*.
- Piffoux, Max, Erwan Eriau, és Philippe A. Cassier. 2021. „Autophagy as a therapeutic target in pancreatic cancer”. *British Journal of Cancer* 124(2):333–44.
- Qu, X. 2003. „Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene”. *Journal of Clinical Investigation* 112(12):1809–20. doi: 10.1172/jci200320039.
- Rebecca, Vito W., Michael C. Nicastrì, Colin Fennelly, Cynthia I. Chude, Julie S. Barber-Rotenberg, Amruta Ronghe, Quentin McAfee, Noel P. McLaughlin, Gao Zhang, Aaron R. Goldman, Rani Ojha, Shengfu Piao, Estela Noguera-Ortega, Alessandra Martorella, Gretchen M. Alicea, Jennifer J. Lee, Lynn M. Schuchter, Xiaowei Xu, Meenhard Herlyn, Ronen Marmorstein, Phyllis A. Gimotty, David W. Speicher, Jeffrey D. Winkler, és Ravi K. Amaravadi. 2019. „PPT1 promotes tumor growth and is the molecular target of chloroquine derivatives in cancer”. *Cancer Discovery* 9(2):220–29. doi: 10.1158/2159-8290.cd-18-0706.
- Schoenfeld, Joshua D., Matthew S. Alexander, Timothy J. Waldron, Zita A. Sibenaller, Douglas R. Spitz, Garry R. Buettner, Bryan G. Allen, és Joseph J. Cullen. 2019. „Pharmacological Ascorbate as a Means of Sensitizing Cancer Cells to Radio-Chemotherapy While Protecting Normal Tissue”. *Seminars in Radiation Oncology* 29(1):25–32.
- Schoenfeld, Joshua D., Zita A. Sibenaller, Kranti A. Mapuskar, Brett A. Wagner, Kimberly L. Cramer-Morales, Muhammad Furqan, Sonia Sandhu, Thomas L. Carlisle, Mark C. Smith, Taher Abu Hejleh, Daniel J. Berg, Jun Zhang, John Keech, Kalpaj R. Parekh,

- Sudershan Bhatia, Varun Monga, Kellie L. Bodeker, Logan Ahmann, Sandy Vollstedt, Heather Brown, Erin P. Shanahan Kauffman, Mary E. Schall, Ray J. Hohl, Gerald H. Clamon, Jeremy D. Greenlee, Matthew A. Howard, Michael K. Schultz, Brian J. Smith, Dennis P. Riley, Frederick E. Domann, Joseph J. Cullen, Garry R. Buettner, John M. Buatti, Douglas R. Spitz, és Bryan G. Allen. 2017. „Erratum: O₂·⁻ and H₂O₂-Mediated Disruption of Fe Metabolism Causes the Differential Susceptibility of NSCLC and GBM Cancer Cells to Pharmacological Ascorbate (Cancer Cell (2017) 32 (2)(268) (S1535610817300624) (10.1016/j.ccell.2017.02.018))”. *Cancer Cell* 32(2):268.
- Serna-Blasco, Roberto, Marta Sanz-Álvarez, Óscar Aguilera, és Jesús García-Foncillas. 2019. „Targeting the RAS-dependent chemoresistance: The Warburg connection”. *Seminars in Cancer Biology* 54:80–90.
- Slater, Andrew F. G. 1993. *CHLOROQUINE: MECHANISM OF DRUG ACTION AND RESISTANCE IN PLASMODIUM FALCIPARUM*. Köt. 57.
- Sz n. 1972. „homewood1972”. *Nature* 235:50–52.
- Szarka, András, Orsolya Kapuy, Tamás Lőrincz, és Gábor Bánhegyi. 2021. „Vitamin C and Cell Death”. *Antioxidants and Redox Signaling* 34(11):831–44.
- Tóth, Szilvia Z., Tamás Lőrincz, és András Szarka. 2018. „Concentration Does Matter: The Beneficial and Potentially Harmful Effects of Ascorbate in Humans and Plants”. *Antioxidants and Redox Signaling* 29(15):1516–33.
- Wunderlich Lívius. 2016. *Molekuláris biológiai technikák Wunderlich Lívius*.
- Yang, Shenghong, Xiaoxu Wang, Gianmarco Contino, Marc Liesa, Ergun Sahin, Haoqiang Ying, Alexandra Bause, Yinghua Li, Jayne M. Stomme, Giacomo Dell’Antonio, Josef Mautner, Giovanni Tonon, Marcia Haigis, Orian S. Shirihai, Claudio Doglioni, Nabeel Bardeesy, és Alec C. Kimmelman. 2011. „Pancreatic cancers require autophagy for tumor growth”. *Genes and Development* 25(7):717–29. doi: 10.1101/gad.2016111.
- Yang, Weiwei, Yanhua Zheng, Yan Xia, Haitao Ji, Xiaomin Chen, Fang Guo, Costas A. Lyssiotis, Kenneth Aldape, Lewis C. Cantley, és Zhimin Lu. 2013a. „Erratum: ERK1/2-dependent phosphorylation and nuclear translocation of PKM2 promotes the Warburg effect (Nature Cell Biology (2012) 14 (1295-1304))”. *Nature Cell Biology* 15(1):124.
- Yang, Weiwei, Yanhua Zheng, Yan Xia, Haitao Ji, Xiaomin Chen, Fang Guo, Costas A. Lyssiotis, Kenneth Aldape, Lewis C. Cantley, és Zhimin Lu. 2013b. „Erratum: ERK1/2-dependent phosphorylation and nuclear translocation of PKM2 promotes the Warburg effect (Nature Cell Biology (2012) 14 (1295-1304))”. *Nature Cell Biology* 15(1):124.
- Yun, Jihye, Edouard Mullarky, Changyuan Lu, Kaitlyn N. Bosch, Adam Kavalier, Keith Rivera, Jatin Roper, Iok In Christine Chio, Eugenia G. Giannopoulou, Carlo Rago, Ashlesha Muley, John M. Asara, Jihye Paik, Olivier Elemento, Zhengming Chen, Darryl J. Pappin, Lukas E. Dow, Nickolas Papadopoulos, Steven S. Gross, és Lewis C. Cantley. 2015. „Vitamin C selectively kills KRAS and BRAF mutant colorectal cancer cells by targeting GAPDH”. *Science* 350(6266):1391–96. doi: 10.1126/science.aaa5004.
- Zhao, Hongyun, és Bin Zheng. 2019. „Dual Targeting of Autophagy and MEK in KRAS Mutant Cancer”. *Trends in Cancer* 5(6):327–29.

Zhao, Yumin, Weifeng Gui, Fuqiu Niu, és Shigui Chong. 2019. „The MAPK Signaling Pathways as a Novel Way in Regulation and Treatment of Parasitic Diseases”. *Diseases* 7(1):9. doi: 10.3390/diseases7010009.