

37.OTDK Biológia Szekció

ER stressz tűrőképesség intercelluláris átvitele a tumoros mikrokörnyezetben

Kovács Ákos

általános orvos

6.évfolyam

Szegedi Tudományegyetem Természettudományi és Informatikai Kar

Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszék

Témavezetők:

Dr. Csontné Dr. Kiricsi Mónika

Dr. Huliák Ildikó

1. Tartalomjegyzék

1.	Tartalomjegyzék	2
2.	Bevezető	4
2.1.	Tumoros mikrokörnyezet	4
2.2.	Extracelluláris vezikulumok a TMK sejtek kommunikációjában	5
2.3.	ER stressz.....	5
2.3.1.	PERK útvonal	7
2.3.2.	IRE1 α útvonal	7
2.3.3.	ATF6 útvonal.....	7
2.3.4.	TMK és ER stressz	8
3.	Célkitűzés.....	9
4.	Anyagok és módszerek	10
4.1.	Sejtvonalak	10
4.1.1.	MDA-MB-231.....	10
4.1.2.	MCF-7	10
4.1.3.	MCF10-A2	10
4.1.4.	MRC-5.....	10
4.1.5.	THP-1	10
4.2.	ER stressz tűrőképesség vizsgálata	11
4.3.	ER stressz markergénekről képződő mRNS szintek mérése tunicamycin kezelést követően....	11
4.4.	EV izolálás.....	13
4.5.	EV karakterizálás	14
4.6.	Immunogén sejthalál vizsgálata	14
4.7.	Statistikai feldolgozás	15
5.	Eredmények és értékelésük	15
5.1.	Sejtvonalak ER stressz tűrőképessége	15

5.2.	ER stressz marker mRNS szintek változása tunicamycin kezelés hatására	18
5.3.	EV izolálás.....	21
5.4.	Immunogén sejthalál vizsgálata EV kezelt sejteken.....	23
6.	Összefoglalás	24
7.	Köszönetnyilvánítás.....	27
8.	Tételes szerzői hozzájárulás	28
9.	Irodalom	29
10.	Függelék	32

2. Bevezetés

A rosszindulatú daganatok a vezető halálokok közé tartoznak világszerte. A Globocan 2022 felmérés eredményei alapján évente mintegy 20 millió új esetet diagnosztizálnak és majdnem 10 millióan halnak meg valamilyen tumoros megbetegedés miatt.¹

Bár az elmúlt évtizedekben a molekuláris biológia és a genetika vívmányainak köszönhetően robbanásszerűen nőtt a tudásunk a tumorok biológiai hátteréről, mind a mai napig vannak feltáratlan kérdések, amelyeknek a megválaszolásával lépéseket tehetünk a tumorok megelőzése és sikeres kezelése érdekében.

Az egyik ilyen, nem teljesen tisztázott kérdés a tumorral „együtműködő” sztrómasejtek túlélése a tumoros mikrokörnyezetben (TMK), illetve a tumorsejtek és sztrómasejtek közötti parakrin kommunikáció. Kutatásunkban ezt a kapcsolatot szeretnénk jobban feltárni, az endoplazmatikus retikulum (ER) stresszre fókuszálva.

2.1. Tumoros mikrokörnyezet

A tumoros mikrokörnyezet (TMK) nem ideális a sejtek életben maradásához és szaporodásához: általában alacsonyabb pH-jú, oxigénben és tápanyagokban szegényebb, mint a normális szöveti környezet, ezáltal számos, a sejtekre káros hatása mellett, endoplazmatikus retikulum (ER) stresszt generál.² A tumorsejtek alapvető tulajdonságai közé tartozik, hogy képesek elviselni a jórészt saját populációjuk által teremtett zord körülményeket.³ A rosszindulatú daganatok azonban nem csak tumorsejtekből, hanem tumor támogató sztrómasejtekből - tumor-asszociált fibroblasztokból, pericytákból, endothel sejtekből, és immunsejtekből, pl. tumor asszociált makrofágokból - állnak.^{4,5} Ezek a tumoros mikrokörnyezetben jelenlévő sztrómasejtek, a tumorsejtekkel ellentétben, jellemzően nem halmoznak fel nagy számú mutációt, azaz genetikailag nem, sokkal inkább epigenetikailag változnak.⁶ Az így kialakuló tumor-asszociált sztrómasejt populáció képes túlélni a TMK igen zord, ER stresszt generáló körülményei között és számos módon segíteni a tumor fejlődését.

A sztrómasejtek közül legnagyobb számban a fibroblasztok vannak jelen a TMK-ben.⁷ A tumor-asszociált fibroblasztok hozzájárulnak a tumorsejtek epithelialis-mesenchymalis átalakulásához, a tumor szöveti inváziójához, metasztázis képzéséhez és a tumorok angiogeneziséhez.⁸⁻¹¹ Ez alapján kijelenthető, hogy nem csak a számuk, de a jelentőségük is igen nagy a tumorokban. A

fibroblasztokon kívül a tumor-asszociált makrofágok is fontos szereplői a TMK-nek: ezek a sejtek is hozzájárulnak a tumorok angiogeneziséhez, szöveti inváziójához és metasztázis képzéséhez¹²⁻¹⁴, emellett a tumorban bekövetkező alternatív aktivációjuknak köszönhetően Th2 típusú immunválaszt aktiválva gátolják a tumorelles immunhatásokat.¹⁵

A fentiek alapján kijelenthetjük, hogy ennek a két sejtpopulációnak a TMK-ben való túlélése kulcsfontosságú a tumor fejlődése/progressziója szempontjából.

2.2. Extracelluláris vezikulumok a TMK sejtek kommunikációjában

Az intercelluláris kommunikáció minden többsejtű szervezetre jellemző, két fő formája a direkt sejt-sejt kontaktus és a szekretált anyagok általi kommunikáció. A tumor- és a sztrómasejtek kommunikációja alapvető jelentőséggel bír a TMK formálásában és a sejtek életben maradásában. Az elmúlt évtizedben számos publikáció jelent meg, melyek ennek a kapcsolatnak különböző aspektusait taglalják, hangsúlyozzák, és ezek egyre nagyobb hányada emeli ki az extracelluláris vezikulumok (EV-k) szerepét a kétirányú kommunikációban. Bár a nomenklatura közel sem egységes, de az EV egy gyűjtőfogalomnak tekinthető, mely magában foglalja egyrészt az exoszómákat (melyek ún. multivezikuláris endoszómák membránfúziójával jönnek létre), másrészt a mikrovezikulumokat, melyek a plazmamembrán egy részének lefűződésével jönnek létre.¹⁶ Mivel a mérettartományukban lehetnek átfedések (exoszóma: 40-100 nm; mikrovezikulum: 100-1000 nm), ezért a mai eljárásokkal elválasztásuk nem tekinthető megoldottnak, ráadásul azonos sejtek képesek mindkét EV típus kibocsátására^{17,18}, így a továbbiakban az EV megnevezést fogom alkalmazni a dolgozatban. .

A tumorsejt eredetű EV-k szerepét kimutatták már többek közt a gyógyszerrezisztencia, az angiogenezis, az endothel-transzmigráció, a metasztázisképzés, és a makrofág M2-polarizáció tekintetében.¹⁹⁻²² Fordított irányban, a fibroblaszt eredetű EV-k a tumorsejtek epithelialis-mesenchymalis átmenetéhez és metasztázis képzéséhez, míg a makrofág eredetű EV-k a gyógyszerrezisztenciához és metasztázishoz járulhatnak hozzá.^{10,23-25}

2.3. ER stressz

Az endoplazmás retikulum (ER) számos funkciója közül az egyik, ha nem a legfontosabb, a szekrécióra kerülő fehérjék, az integráns membránfehérjék és a lizoszómális fehérjék poszttranszlációs módosítása. Ezen poszttranszlációs módosítások közé tartozik a fehérjék N-glikozilációja, a diszulfid hidak létrehozása, a fehérjék megfelelő térszerkezetének kialakítása, azaz foldingja, végül a fehérjék minőségellenőrzése a célzott transzfer előtt.²⁶

Ha azonban a sejtet különböző aspecifikus - más sejtfunkciókat is zavaró -, vagy specifikus - csak az ER fehérje modifikációjára és/vagy foldingjára káros - hatások érik, az ER funkciója zavart szenvedhet, ilyenkor ER stresszről beszélünk. A legalapvetőbb ER stresszt kiváltó aspecifikus hatások közé tartozik a sejteket érő hipoxia, a tápanyaghiány, illetve különböző extra- és intracelluláris forrásból származó stressz szignálok, mint amilyenek pl. gyulladásos környezet vagy infekciók hatására keletkeznek. A specifikus stresszorok közé sorolhatjuk a fehérjekódoló gének mutációit, melyek a hibás fehérjék feltekeredésének zavarához, ER-ben való felhalmozódásukhoz vezetnek.²⁷ További ER specifikus káros hatást váltanak ki bizonyos toxikus szerves molekulák, melyek lehetnek természetes toxinok vagy mesterségesen előállítottak. Eredettől függetlenül felhasználhatjuk ezeket az anyagokat az ER stressz indukciójára, így modellezhethetjük a sejtet a szervezetben érő aspecifikus stresszorok hatását.

A természetes „ER toxinok” közé tartozik a tunicamycin, egy nukleozid antibiotikum, amit bizonyos *Streptomyces* fajok termelnek. Eukariótákban a fehérjék N-glikozilációját gátolva²⁸, a hibás fehérjék felhalmozódása révén vált ki ER stresszt és emiatt széles körben alkalmazzák az ER stressz farmakológiai induktoraként. Kutatásunkban mi is a tunicamycint választottuk ER stressz indukálószernek.

Az ER stressz leküzdésére a sejtek adaptív választ hoznak létre, hogy helyreállítsák az ER folding kapacitását. Ez az ún. „Unfolded Protein Response” (UPR). Ha azonban a sejtet érő stresszhatás elnyújtott vagy túlzottan nagymértékű, az UPR az apoptotikus jelút aktivációjának révén programozott sejthalálhoz vezet.²⁹ Az UPR-hez tartozó jelutak, illetve az ehhez kapcsolódó pro-, vagy antiapoptotikus hatás pontos körülményeinek és szabályozásának feltárása még várat magára, de alapvetően három fő molekuláris útvonalat ismerünk az UPR-ben: a PERK-, az IRE1 α és az ATF6 útvonalat. Mindhárom útvonalat a BiP nevű chaperon gátolja, mely fiziológiás állapotban a három ER stressz receptor (PERK, IRE1 α , ATF6) lumenális felszínéhez asszociálva helyezkedik el. Ha az ER lumenben megnő a hibás térszerkezetű fehérjék mennyisége, a BiP a fehérjék foldingját segítő, disszociál a receptorokról, így azok aktivációját idézi elő, ennek révén elindítva az adaptív UPR-t.³⁰ Ha az adaptív mechanizmusok kudarcot vallanak, a proapoptotikus UPR szignalizáció túlsúlya elindítja a sejteket az intrinsic apoptózis útvonalon az ún. terminális UPR program révén. Ebben a proapoptotikus folyamatban szintén mindhárom receptor részt vesz, ugyanakkor az ATF6 szerepe sokkal kevésbé jelentős, mint a PERK és IRE1 α szerepe.³¹ Hetz és

Papa összefoglaló munkájukban az alábbi útvonalak szerepét emelték ki a downstream jelutakban:²⁷

2.3.1. PERK útvonal

Az egyik útvonal kulcsmolekulája a PERK receptor, mely a BiP disszociációt követően dimerizálódik vagy oligomerizálódik, majd autofoszforyláció után citoszolikus fehérjét foszforylál. Legfontosabb ezek közül az eIF2 α , melynek foszforylált formája gátolja az mRNS disszociációját a riboszómákról, így lassítja a transzlációt, továbbá alternatív leolvasási keretek transzlációját okozza. Az alternatív leolvasás által transzlálódott fehérjék jórészt transzkripciós faktorok. Ezek közül a legfontosabb az ATF4, ami ER chaperonok, apoptózis indukáló fehérjék (pl. CHOP), illetve negatív visszacsatolásként a GADD34 foszfátáz transzkripcióját aktiválja.

2.3.2. IRE1 α útvonal

Az IRE1 α szintén autofoszforylálódik a BiP disszociációját követő oligomerizációja után, így aktiválódik az RNáz doménje a citoszolikus felszínen, aminek két hatása lesz:

1. Az XBP1t mRNS-ből kivágódik egy intron, így stabil formája transzlálódik, ezáltal egy transzkripciós faktort hoz létre. Ez az XBP1s, ami alapvetően fehérje folding-ban, szekréción, ER-asszociált degradációban (ERAD), ER transzlokációban és lipid szintézisben szabályozó szerepet betöltő fehérjék génjeit aktiválja. Ezen felül heterodimereket képez más transzkripciós faktorokkal, még feltáratlan hatásokat kiváltva.
2. További RNS-eket hasít, bizonyos szekvenciákra és másodlagos szerkezetekre specifikusan. Ez a folyamat a „Regulated IRE1 Dependent Decay” (RIDD), melynek mind transzlációt gátló, mind szabályozó szerepe van az UPR során.

A két RNáz aktivitás szabályozása nem ismert, feltételezik, hogy a különböző oligomer állapottól és/vagy az RNS szubsztrátok IRE1-hez szállításától függ az egyes folyamatok túlsúlya.

Az RNáz aktivitáson kívül az aktivált IRE1 α aktivációs platformot képez a TRAF-ASK1-JNK szignáltranszdukció számára is.

2.3.3. ATF6 útvonal

Az ATF6 útvonal különbözik a másik kettőtől, itt nem foszforyláció indítja el a jelutat. A BiP disszociáció után COP-II kötőhely válik szabaddá az ATF6 luminális felszínén, ami így vezikulumot formálva transzlokálódik a Golgi-készülékbe, ahol S1P és S2P proteázok hasítása révén a citoszolikus domén (ATF6f) szabaddá válik, és a fehérje így aktív transzkripciós faktorként UPR géneket képes aktiválni.

2.3.4. A TMK és az ER stressz

Tumorsejtekben az ER funkciók a korábban említett környezeti stressz, illetve a folyamatos nagy intenzitású fehérjeszintézis miatt állandó nyomás alatt vannak, mely permanens, nagy mértékű ER stresszt generál. Ennek következtében az UPR szignalizáció folyamatosan aktív, mégsem aktiválódnak a proapoptotikus folyamatok.³² A TMK-ben a sztrómasejtekre szintén komoly ER stressz nyomás nehezedik a környezeti stressz és a szintúgy megnövekedett fehérjeszintézis igény miatt, ráadásul a tumorsejtekkel ellentétben genetikailag nem, vagy csak sokkal kevésbé képesek adaptálódni. Feltételezhető, hogy az ER stressz tűrőképesség részben átadódik a tumorsejtektől a sztrómasejteknek, azaz a tumorsejtek modulálhatják a sztrómasejtek UPR szignalizációját.³³ Mindezzel összefüggésben lehet az a megfigyelés, hogy ER stressz hatására a tumorsejtekből az UPR szignalizációban résztvevő RNS-eket tartalmazó EV-k kerülnek kibocsátásra a tumorsejtekből.³⁴

A bevezetőben részletezettek alapján azt a hipotézist szeretnénk górcső alá venni, hogy a tumorsejtek képesek-e „átadni” az ER stressz tűrőképességet a sztrómasejteknek, és ha igen, akkor ezt EV-kben transzportált anyagok, fehérjék, kódoló és elsősorban nem kódoló RNS-ek által teszik-e.

3. Célkitűzés

A bevezetőben tárgyaltak alapján kijelenthetjük, hogy a tumorsejtek és a tumoros sztrómasejtek kölcsönösen segítik egymás túlélését, még ha ez a hatás a tumor növekedése és áttétképzése révén gyakran végzetes kimenetelű is. Kutatócsoportunk célja a tumorsejtek és a sztrómasejtek közötti kölcsönös információcsere jobb megértése, specifikusan az ER stressz tűrőképesség potenciális átadásának vizsgálata a tumorsejtektől a sztrómasejtek felé. A szakirodalom és csoportunk korábbi eredményei alapján az a hipotézisünk, hogy a tumorsejtek elsősorban EV-okban átjuttatott nem kódoló RNS-ek révén befolyásolják az UPR-ben résztvevő faktorokat. A hipotézist *in vitro*, emlő adenokarcinóma (MCF-7, MDA-MB-231), emlő epithel (MCF10-A2), fibroblaszt (MRC-5), és makrofág (THP-1) sejtek felhasználásával vizsgáljuk.

A munka ezen fázisában az alábbi kérdésekre kerestünk választ:

1. Mi az optimális tunicamycin kezelési koncentráció az általunk vizsgált sejtvonalak esetében, ami még nem befolyásolja túlzott mértékben a sejtek életképességét, de képes megfelelő mértékű ER stresszt indukálni?
2. Hogyan változik az ER-stressz markergénekről képződő RNS-ek relatív mennyisége a sztrómasejtekben tunicamycin kezelés hatására?
3. A tumorsejtekből származó EV-k milyen útvonalon keresztül gátolják az ER stressz kiváltotta sejthalált a THP-1 sejtek esetében?

4. Anyagok és módszerek

4.1. Sejtvonalak

Kutatásunkban eltérő genetikai háttérű emlő adenocarcinoma sejtvonalakat, MCF-7-et és MDA-MB231-et-használtunk, míg nem-tumoros kontroll sejtvonalként MCF-10A2 emlő epithel sejteket, sztrómasejteként pedig THP-1 monocytákból differenciáltatott makrofágokat és MRC-5 fibroblaszt sejtvonalat alkalmaztunk. A sejteket 37 °C-on, 5% CO₂-ot tartalmazó atmoszférában 95%-os páratartalom mellett növesztettük.

4.1.1. MDA-MB-231

Az MDA-MB-231 egy ún. tripla negatív emlő adenocarcinoma sejtvonal. A tripla negativitás azt jelenti, hogy a tumorsejtek nem expresszálják humán epidermális növekedési faktor receptor 2 HER-2, ösztrogén és progeszteron receptort sem, ami az emlődaganatoknál általában meglehetősen rossz prognosztikai jelnek számít. A sejtvonalat 10% főtális borjú szérumot (FBS), 4 mM glutamint és 1% penicillin-streptomicint tartalmazó RPMI-1640 médiumban tartottuk fent.

4.1.2. MCF-7

Az MCF-7 egy hormon-szenzitív - ösztrogén és progeszteron receptort expresszáló - emlő adenocarcinoma sejtvonal, melyet 10% főtális borjú szérumot (FBS), 4 mM glutamint és 1% penicillin-streptomicint tartalmazó RPMI-1640 médiumban tartottunk fent.

4.1.3. MCF10-A2

Az MCF10-A2 egy immortalizált emlő epithelialis sejtvonal, melyet nem-tumoros kontrollként használunk kísérleteinkben. A sejtvonalat DMEM/F12 médiumban tartottuk fent, melyet az alábbi anyagokkal egészítettünk ki: 5% ló szérum, 100ng/ml cholera toxin, 20 ng/ml humán epidermális növekedési faktor (EGF), 0,5 µg/ml hidrokortizon, 10 µg/ml humán inzulin, 4 mM glutamin, 1% penicillin-streptomycin.

4.1.4. MRC-5

Az MRC-5 egy humán fibroblaszt sejtvonal, melyet kísérleteinkben sztrómasejtként használunk. A sejtvonalat 10% főtális borjú szérumot (FBS), 4 mM glutamint és 1% penicillin-streptomicint tartalmazó EMEM médiumban tartottuk fent.

4.1.5. THP-1

A THP-1 egy humán monocyta sejtvonal, melyet indukciót és polarizációt követően - mint M1 makrofágot – sztrómasejt modellként használunk. A monocyta sejtvonalat 10% főtális borjú

szérumot (FBS), 4 mM glutamint és 1% penicillin-streptomicint tartalmazó RPMI-1640 médiumban tartottuk fent. Az M0 makrofággá való indukcióhoz a fenntartó médiumot 20 nM forbol-mirisztol-acetáttal (PMA) egészítettük ki. 48 óra inkubáció után az M0 makrofágokat polarizáltattuk, ehhez a médiumot lecseréltük 5 ng/ml interferon gammát (IFN γ) és 2 ng/ml lipopoliszacharidot (LPS) tartalmazó médiumra.

4.2. ER stressz tűrőképesség vizsgálata

A tunicamycin toxikus hatását, melyből következtethetünk az általunk használt tumor-, sztróma-, és epithel kontroll sejtek ER stressz tűrőképességére, MTT esszével vizsgáltuk. Az esszé azon alapul, hogy az élő sejtek mitokondriális redox enzimek az MTT reagenst (tetrazólium só) színes formazánkristállyá alakítják. A keletkezett kristályokat DMSO-ban feloldottuk, majd a színes oldatot 570 nm-en fotometrálni meghatároztuk az oldat abszorbanciáját, ami arányos az élő sejtek számával.

Az MTT esszékhez 96-lyukú mikrotiter lemezekbe cellánként 10^4 db sejtet osztottunk mindegyik sejtvonalból, melyre 100 μ l a sejteknek megfelelő, korábban részletezett fenntartó médiumot mértünk. 24 óra inkubációt követően a sejtek médiumát leszívtuk és cellánként 100 μ l különböző koncentrációjú tunicamycint vagy DMSO-t (ez utóbbit a kontroll minták esetén alkalmaztuk, mert ez a tunicamycin oldószere) tartalmazó tápfolyadékra cseréltük. Újabb 24 óra inkubációt követően a médiumot eltávolítottuk, majd PBS-es mosás után 100 μ l 0,5 mg/ml MTT reagenst tartalmazó médiumot mértünk a sejtekre. 1 óra inkubáció után a médiumot eltávolítottuk, és a keletkezett formazán kristályokat 100 μ l DMSO-ban feloldottuk. Amikor a formazán kristályok teljesen feloldódtak, 570 nm-es hullámhosszon mértük a minták abszorbanciáját Synergy HTX multimode plate reader segítségével. A 630 nm-es hullámhosszon mért abszorbancia értékeket tekintettük háttérnek. A sejtek életképességének jellemzésére a két hullámhosszon mért abszorbancia különbségét használtuk, a kontroll sejteken mért abszorbancia különbséget tekintettük 100 %-os életképességnek.

4.3. Az ER stressz markergénekről képződő mRNS szintek mérése tunicamycin kezelést követően

Az ER stressz markergénekről átíródó mRNS szintek változásának vizsgálatához 10^6 darab sejtet osztottunk ki a sztróma és kontroll sejtvonalainkból, 6 cm-es Petri-csészékbe, a sejteknek megfelelő fenntartó médiumban. 24 óra inkubációt követően a médiumot cseréltük, DMSO-val (a

tunicamycin oldószer), vagy különböző koncentrációjú tunicamycinnel kiegészített fenntartó médiumra. 24 óra inkubációt követően a médiumot eltávolítottuk, a csészéket PBS-sel mostuk.

A sejtekből RNS-t izoláltunk RNeasy® Mini Kit-tel (Qiagen) a gyártói ajánlásainak megfelelően. Az izolálás után NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific) spektrofotométerrel vizsgáltuk a minták koncentrációját és tisztaságát. Az OD260/OD280 és OD260/OD230 arányok alapján mintáink megfelelő tisztaságúak voltak.

Az RNS mintákból 1-1 µg RNS-t írtunk át (20 µL-es reakcióban) Revertaid kit (Thermo Scientific) segítségével a gyártó utasításai szerint. A reverz transzkripció reakciók PCR készülékben (Veriti™, Applied Biosystems) történtek az 1. táblázat programja alapján. A kapott cDNS-t 100 µl végtérfogatra hígítottuk.

Hőmérséklet [°C]	Idő [perc]
25	10
42	60
70	5
4	5

1. táblázat Reverz transzkripció programja

A qPCR reakciókat 10 µL végtérfogatban végeztük el, amely 5 µL SYBR Green qPCR Master Mixet (Thermo Scientific), 1 µL cDNS-t, 1 µL primer mixet, 3 µL nukleáz-mentes vizet tartalmazott. A vizsgálatot Pico Real-Time qPCR gépben (Thermo Scientific) végeztük az alábbi protokoll alapján: kezdő denaturáció 95°C 7 perc, majd 2 lépés: 95°C 10 mp, 60°C 60 mp, 40 cikluson keresztül, végül 60°C 1 perc. Az eredményeket a -ΔΔCt módszerrel értékeltük ki. A primerek szekvenciáit és az alkalmazott végkoncentrációikat a **2. táblázat** tartalmazza.

Gén	Forward primer	Végkoncentráció [nM]
	Reverse primer	
GAPDH	5'-TGCACCACCAACTGCTTAGC-3'	200
	5'-GGCATGGACTGTGGTCATGAG-3'	

CHOP	5'-GGAGCATCAGTCCCCCACTT-3' 5'-TGTGGGATTGAGGGTCACATC-3'	200
BIP	5'-TGTTCAACCAATTATCAGCAAACCTC-3' 5'-TTCTGCTGTATCCTCTTCACCAGT-3'	200
XBP1s	5'-AACCAGGAGTTAAGACAGCGCTT-3' 5'-CTGCACCCTCTGCGGACT-3'	200
XBP1t	5'-CTGAATCTGAAGAGTCAATACCGCCAGAAT-3' 5'-AGGAGTTAAGACAGCGCTTGGGGATGGAT-3'	200
ATF4	5'-GGCCACCATGGCGTATTA-3' 5'-TGCTGAATGCCGTGAGAA-3'	200
ATF6	5'-CTTTTAGCCCCGGGACTCTTT-3' 5'-TCAGCAAAGAGAGCAGAATCC-3'	200

2. táblázat ER stressz marker gének expressziós vizsgálatához alkalmazott primerek szekvenciái és koncentrációik.

4.4. EV izolálás

A tumorsejtekből (MCF-7, MDA-MB-231) való EV izoláláshoz azonos protokollt használtunk: a sejtekből 20 db 10 cm-es Petri-csészébe osztottunk ki csészénként 10 ml fenntartó médiumban 10^6 db sejtet. Amikor elérték a kb. 70-80 %-os konfluenciát (kb. 72 órát követően), 2X mostuk a sejteket PBS-sel. Ezt követően 10 ml 2,5 % exoszóma-depletált főtális borjú szérumot, 4 mM glutamint és 1% penicillin-streptomycint tartalmazó médiumot mértünk a sejtekre. 48 óra inkubációt követően az így kondicionált médiumot összegyűjtöttük, a sejtörmeléket kiülepítettük 10 perc centrifugálással 4000 rcf-en. A felülúszót óvatosan leszívva átszűrtük 0,2 μ m-es szűrőn, majd a filtrátumot 2 ml-re töményítettük 3 kDa-os centrifugafiltert használva (Amicon). A 2 ml koncentrált kondicionált médiumból az EV-okat méret-kizárásos kromatográfiával izoláltuk Izon qEV2 35 nm oszlopokat használva, a gyártó ajánlásainak megfelelően, PBS-es eluálás mellett. Az

így tisztított EV-okat 200 μ l-re töményítettük 3 kDa-os centrifugafiltert használva (Amicon), majd -80°C-on tároltuk a későbbi felhasználásig.

4.5. EV karakterizálás

Az izolálás sikerességének ellenőrzése, továbbá az izolált vezikulák koncentrációjának és méreteloszlásának meghatározása NanoSight©-tal történt. A Nanosight© felvételeket a HUN-REN Szegedi Biológiai Kutatóközpontjában Dr. Buzás Krisztina kutatócsoportjának munkatársa Pintér Lilla készítette. A mérések során az izolált vezikulákat részecske mentes DPBS-ben (Dulbecco's phosphate-buffered saline) hígította, majd minden mintáról 6 db 60 másodperces felvételt készített a műszerrel (Nanosight NS300, Malvern Panalytical). Minden mérés azonos beállításokkal történt (532 nm-es lézer, 25 °C, 16-os kameraszint, 4-es küszöbérték).

4.6. Immunogén sejthalál vizsgálata

Az EV-k immunogén sejthalált gátló hatását High Mobility Group Box 1 HMGB-1 immunoesszével vizsgáltuk. A HMGB-1 immunoesszé a sejtekből történő HMGB1 fehérje kibocsátását mérő módszer. A HMGB-1 a sejtek immunogén sejthalála következtében aktív módon is felszabadul, ezáltal veszély asszociált molekuláris mintázatként (DAMP-ként)aktiválva az immunrendszert.

Az esszéhez THP-1 sejteket osztottunk 96-lyukú mikrotiter lemezre, cellánként 2×10^4 db sejtet 100 μ l fenntartó médiumban. 24 órával később az M0 makrofággá való indukcióhoz a fenntartó médiumot 20 nM PMA-val egészítettük ki. 48 óra inkubáció után az M0 makrofágokat polarizáltattuk, ehhez a médiumot lecseréltük 5 ng/ml IFN γ -t és 2 ng/ml LPS-t tartalmazó médiumra. Másnap a polarizáló médiumot a fenntartó médiumra cseréltük. Két nappal később, PBS-es mosást követően 2,5 % exoszóma-depletált főtális borjú szérumot tartalmazó médiumot mértünk a sejtekre. Ezzel a sejteket 24 órán át inkubáltuk, majd PBS-es mosás után a sejtekre 2,5 % exoszóma-depletált főtális borjú szérumot tartalmazó médiumot mértünk, melyet a kontroll sejtek kivételével MCF-7 mintákból vagy MDA-MB-231 mintákból származó EV-kal egészítettünk ki 4×10^7 db/well (2×10^3 db EV/sejt) koncentrációban. 24 órával később egyes sejtekre 100 μ l 2,5 % exoszóma-depletált főtális borjú szérumot tartalmazó médiumot mértünk, melyet 500 ng/ml tunicamycinnel egészítettünk ki. A kontroll sejteket tunicamycin helyett azonos térfogatú DMSO-val kezeltük (a DMSO a tunicamycin oldószere).

Az esszét ezt követően a gyártó (Promega LumitTM HMGB1 Human/Mouse Immunoassay) ajánlásainak megfelelően hajtottuk végre.

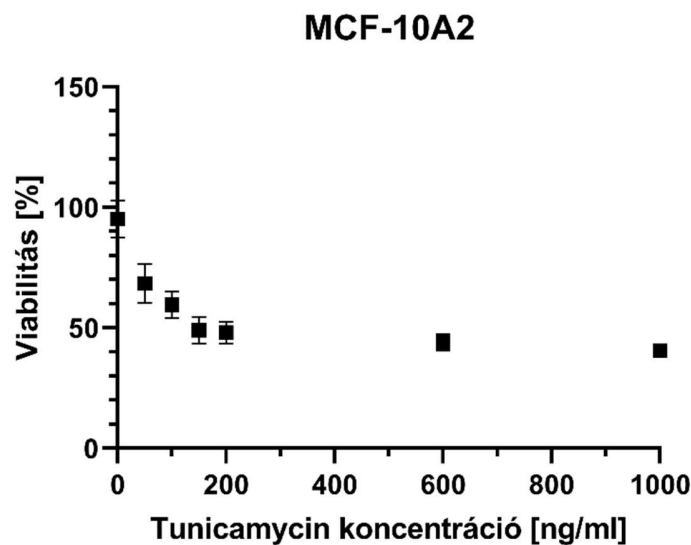
4.7. Statisztikai feldolgozás

A statisztikai analízist GraphPad Prism 8 programmal végeztük. Az egyes különbségeket akkor tekintettük statisztikailag szignifikánsnak, ha a meghatározott p érték kisebb volt, mint 0,05. A különböző rövidítések a következőket jelölik: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$. A nem szignifikáns értékeket nem jelöltük.

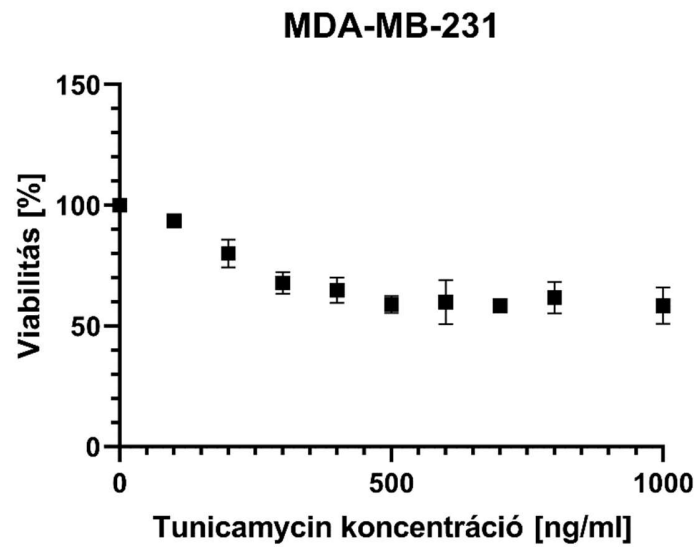
5. Eredmények és értékelésük

5.1. Sejtvonalak ER stressz tűrőképessége

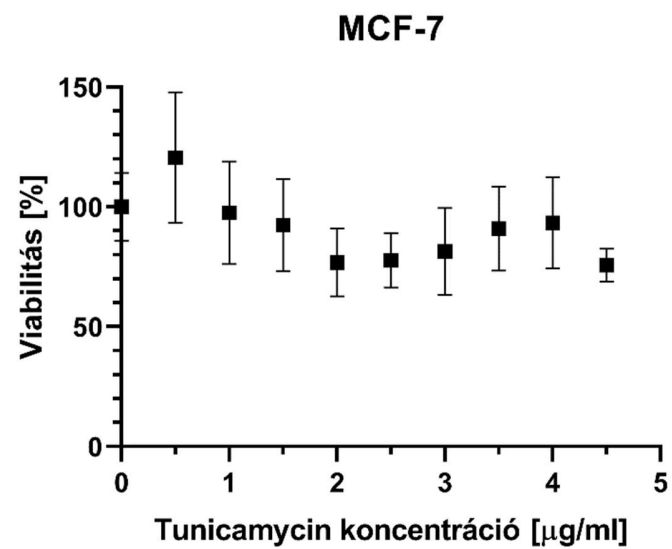
Mind az öt sejtvonalunk ER stressz tűrőképességét meghatároztuk különböző koncentrációjú tunicamycin kezelés hatására 24 óra inkubációs időt követően. Minden sejtvonal esetében legalább háromszor ismételtük meg a kísérletet, a kezelési koncentrációkat ennek megfelelően optimalizáltuk. Az **1-5. Ábrákon** reprezentatív életképesség-koncentráció grafikonokat láthatunk melyek ezeknek a kísérleteknek az eredményeit mutatják be.



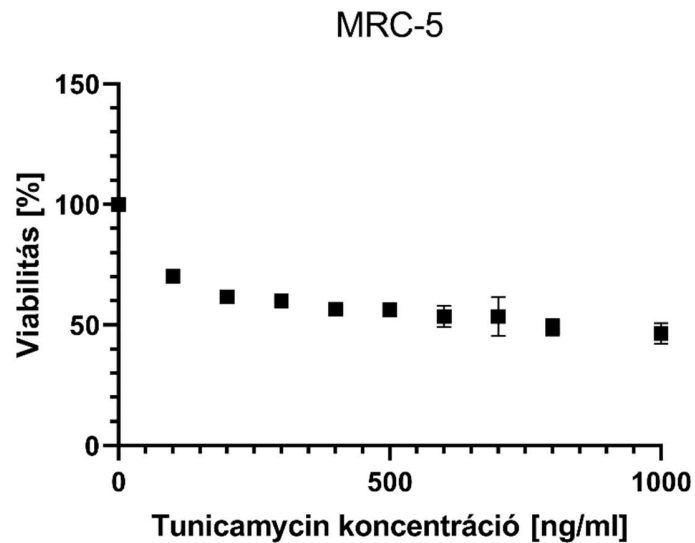
1. Ábra: Az MCF10-A2 emlő epithél sejtek életképesség változása tunicamycin kezelés hatására



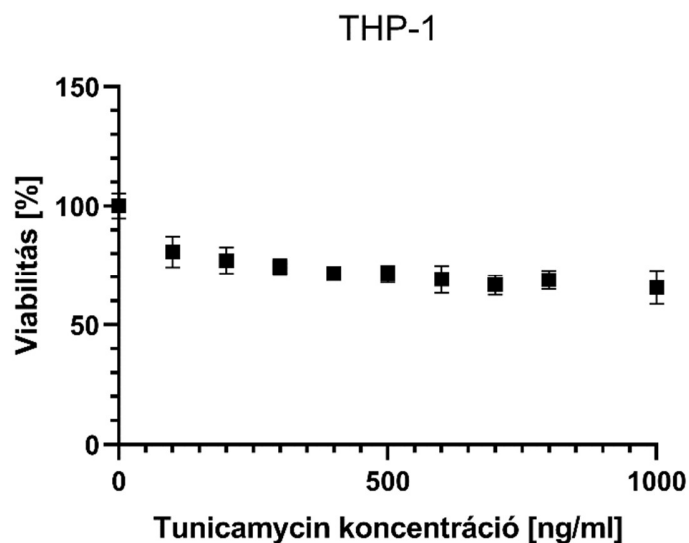
2. **Ábra:** Az MDA-MB-231 emlő adenocarcinoma sejtek életképességének változása tunicamycin kezelés hatására



3. **Ábra:** Az MCF-7 emlő adenocarcinoma sejtek életképességének változása tunicamycin kezelés hatására



4. Ábra: Az MRC-5 fibroblaszt sejtek életképességének változása tunicamycin kezelés hatására



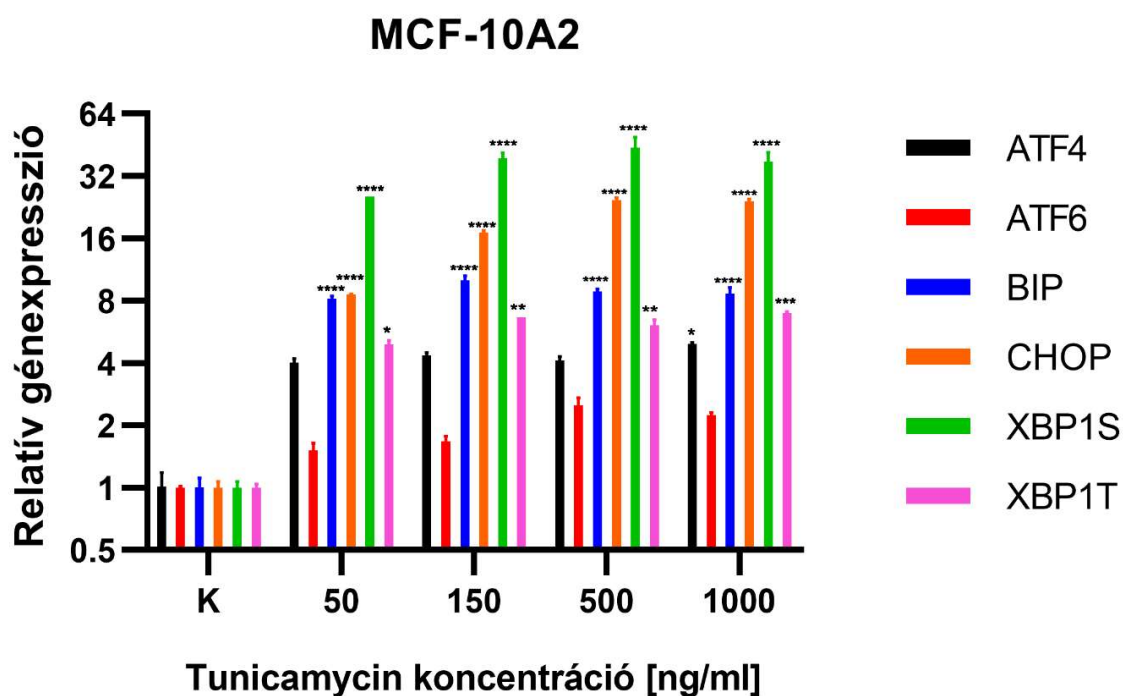
5. Ábra: A THP-1 M1 makrofág sejtek életképesség-változása tunicamycin kezelés hatására

Az MCF10-A2 bizonyult a leginkább érzékenynek a tunicamycin kezelésre, így ott a 0-200 ng/ml koncentrációtartományban 50 ng/ml-es koncentráció felbontás mellett is megvizsgáltuk az életképesség változását (**1.ábra**). Az MCF-7 sejtek esetében a 0-1000 ng/ml tunicamycin koncentrációtartományban nem tapasztaltunk számottevő életképesség csökkenést, ezért ott 0-4500 ng/ml-es koncentráció tartományban is végeztünk méréseket (**3.ábra**), ám ez a sejtvonal meglehetősen rezisztensnek bizonyult a tunicamycin kezelésekre.

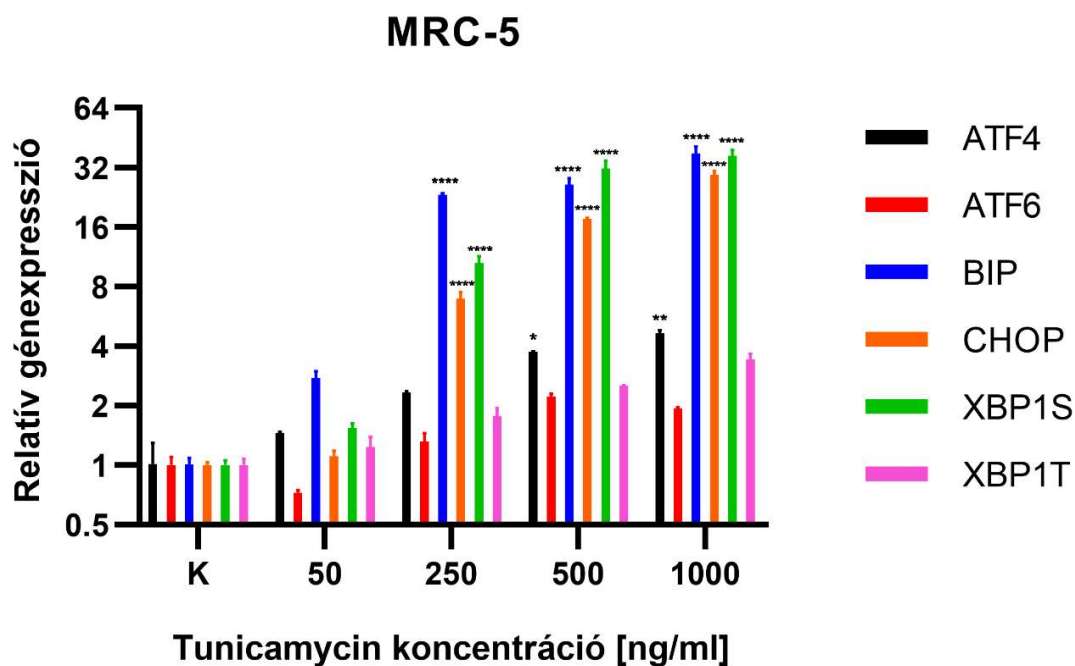
Az eredmények alapján megállapíthatjuk, hogy a tumoros sejtvonalaink közül az MDA-MB-231 mérsékelten érzékeny a tunicamycin által kiváltott viabilitáscsökkenésre, azaz feltehetően az ER stresszre, míg az MCF-7 rezisztensebbnek tekinthető. A tumoros sejtvonalakkal szemben az MCF10-A2 immortalizált emlő epithelsejtek kifejezetten érzékenynek bizonyultak a tunicamycin kezelésre. A sztrómasejtek közül mind a THP-1 makrofágok, mind az MRC-5 fibroblasztok mérsékelten érzékenynek tekinthetők a tunicamycin expozícióra.

5.2. ER stressz marker mRNS szintek változása tunicamycin kezelés hatására

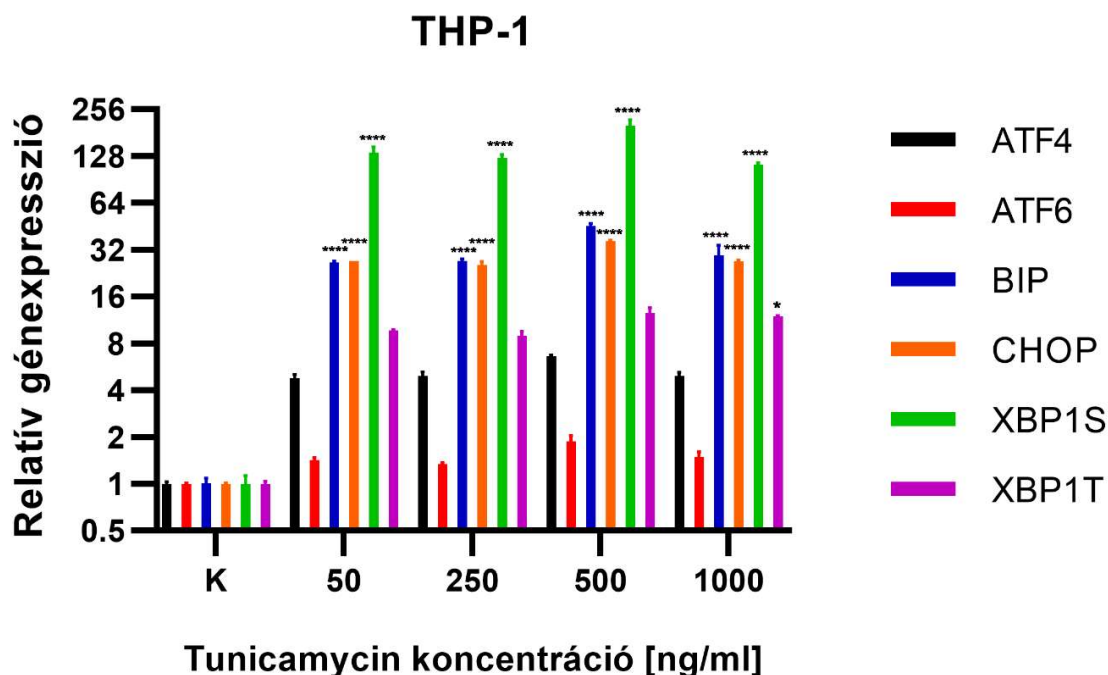
Mivel a tunicamycin ER stressz indukáló hatása már ismert volt, szerettünk volna meggyőződni arról, hogy a kiválasztott tunicamycin koncentrációknak kitett különféle sejtekben valóban ER stressz indukálódik. Ennek érdekében tanulmányoztuk számos ER stressz markergén kifejeződését a tunicamycin kezelés hatására. A qPCR eredmények alapján mindegyik kezelt sejtvonalon a vizsgált ER stressz markerek (CHOP, BIP, XBP1s, XBP1t, ATF4, ATF6) közül több génexpressziós változása is statisztikailag szignifikáns volt, mint azt a **6-8. ábrán** láthatjuk. Fontos figyelembe venni, hogy qPCR mérések során kapott relatív génexpressziós változás akkor tekinthető biológiailag is szignifikánsnak, ha nagyobb, mint a relatív 2-es érték, vagy kisebb, mint a relatív 0,5-ös érték.



6. **Ábra:** MCF10-A2 sejtekben egyes ER stressz marker gének relatív expressziós szintjei (logaritmikus skálán ábrázolva) tunicamycin kezelés hatására. Kétszemponos varianciaanalízis: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$; nem szignifikáns: jelölés nélkül



7. **Ábra:** ER stressz marker gének relatív expressziós szintjei (logaritmikus skálán ábrázolva) tunicamycin kezelésnek kitett MRC-5 sejtekben. Kétszemponos varianciaanalízis: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$; nem szignifikáns: jelölés nélkül



8. Ábra: THP-1 sejtek ER stressz marker génjeinek relatív expressziós szintjei (logaritmikus skálán ábrázolva) tunicamycin kezelés hatására. Kétszemponτος varianciaanalízis: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$; nem szignifikáns: jelölés nélkül

Az MCF10-A2 sejtek esetén, már az alkalmazott legkisebb, 50 ng/ml-es tunicamycin koncentráció hatására is számos ER stressz marker gén, mint a CHOP, BIP, XBP1S és XBP1T, statisztikailag és biológiailag is szignifikáns változást mutatott, míg az ATF4 kifejeződésében szignifikáns változást csak a legnagyobb 1000 ng/ml-es tunicamycin koncentrációnál értünk el.

Az MRC-5 sejteknél nem volt statisztikailag szignifikáns változás az ER stressz markergének relatív expressziójában a legkisebb tunicamycin koncentráció mellett, viszont emelve a stresszor koncentrációját, 250 ng/ml-től a CHOP, BIP, XBP1S, 500 ng/ml-től az ATF4 is statisztikailag és biológiailag szignifikáns génexpressziós növekedést mutatott.

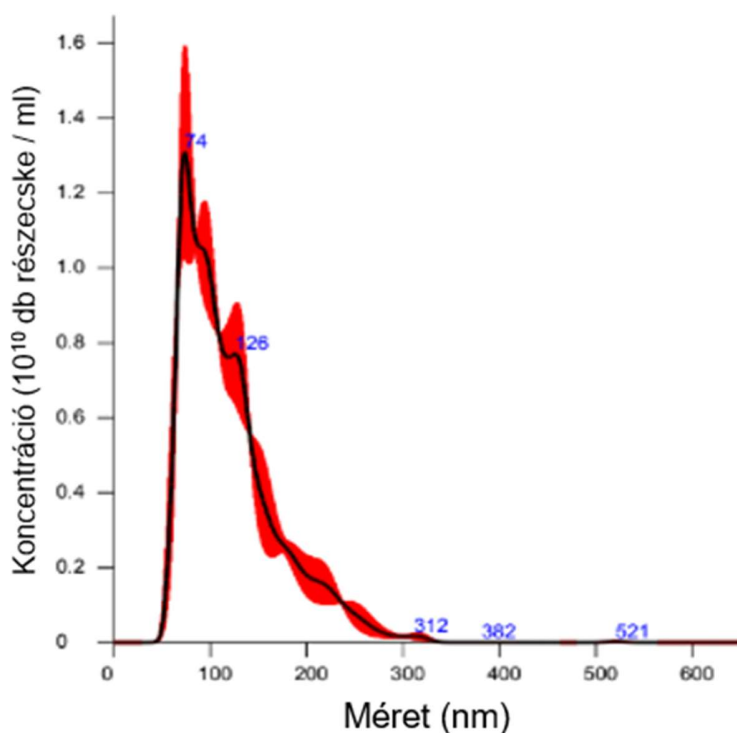
A THP-1 sejteknél, hasonlóan, mint ahogy az MCF10-A2 sejteknél láthattuk, már a legkisebb, 50 ng/ml-es tunicamycin koncentráció mellett is a CHOP, BIP, XBP1S statisztikailag és biológiailag is szignifikáns változást mutatott, az XBP1T esetében pedig a legnagyobb 1000 ng/ml-es koncentrációnál vált szignifikánssá a változás.

Összesítésben elmondható, hogy a CHOP, BIP, XBP1S voltak a legszenzitívebb ER stressz markerek tunicamycinnel kiváltott indukciót követően, hiszen statisztikailag és biológiailag is szignifikáns génexpresszió változást mutattak minden sejtvonal esetében, már 250 ng/ml

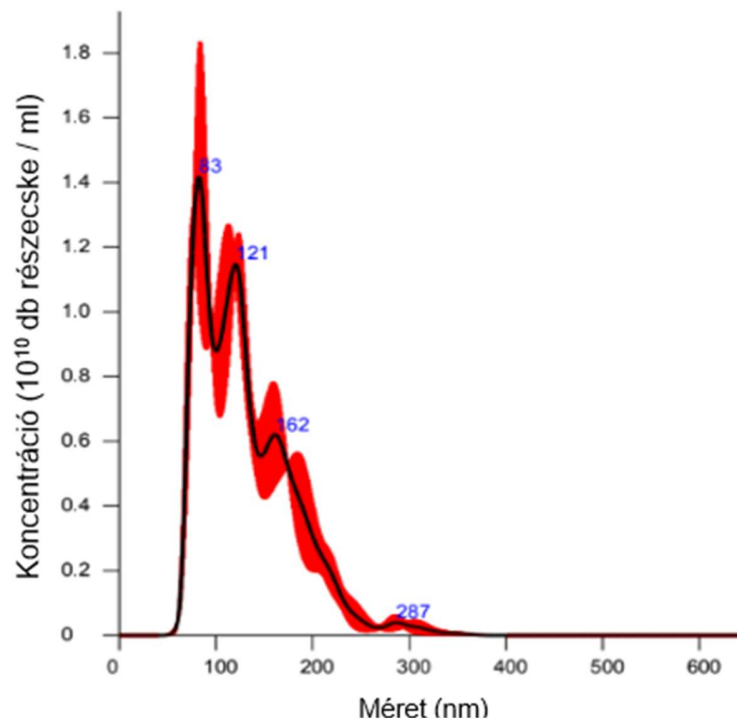
tunicamycin koncentráció mellett is. Így ezeket a markereket tervezzük a továbbiakban is alkalmazni a tunicamycin által kiváltott ER stressz követésére. A másik 3 marker génkifejeződése több esetben is biológiailag jelentős növekedést mutatott, ugyanakkor ezek a változások nem minden esetben voltak statisztikailag szignifikánsak.

5.3. EV izolálás

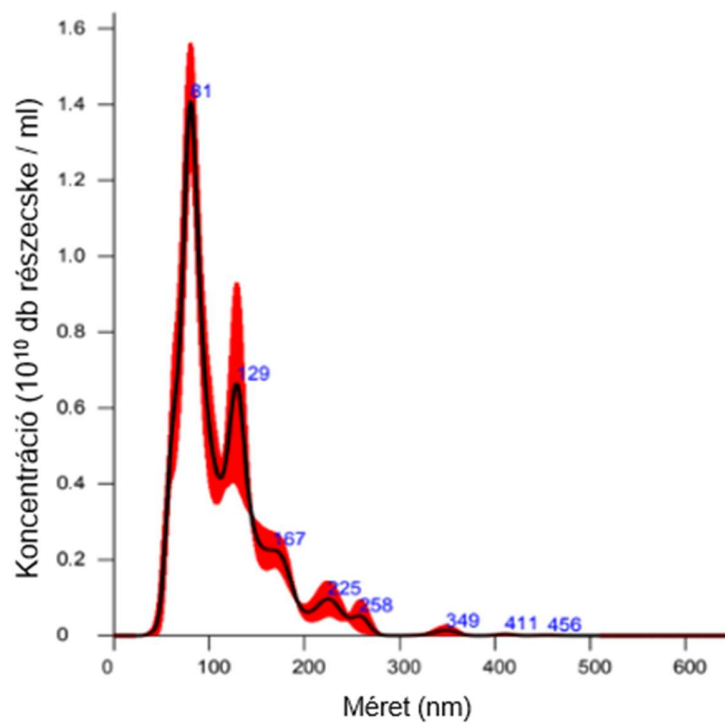
EV izolálást az emlő adenokarcinoma sejtvonalakból (MCF-7, MDA-MB-231) és az emlő epithel sejtvonalból (MCF-10A2) végeztünk. Mindhárom esetben sikeres volt az izolálás, ahogy a **9-11.Ábrákon** láthatjuk, hiszen a mintákban detektált részecskék mérete és méreteloszlása is jórészt a várt tartományba esett (50-150 nm).



9. Ábra: Az általunk izolált MCF-7 eredetű EV-k méreteloszlása



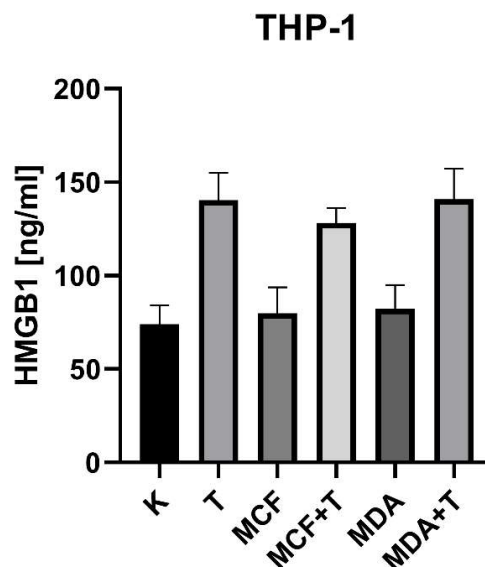
10. Ábra: Az általunk izolált MDA-MB-231 eredetű EV-k átlagos méreteloszlása



11. Ábra: Az általunk izolált MCF10-A2 eredetű EV-k átlagos méreteloszlása

5.4. Immunogén sejthalál vizsgálata EV kezelt sejteken

Csoportunk korábban már tanulmányozta tumorsejt eredetű EV-k hatását THP-1 makrofágokon tunicamycin-indukált ER stresszt követően. Munkatársunk, Mohana Krishna Gopisetty jelenleg még nem publikált eredményei alapján feltételezhető volt, hogy az EV-k által kiváltott ER stressz csökkentő hatás nem gátolja a sejtek apoptotikus sejthalálát, viszont az immunogén sejthalál gátlásán keresztül mégis növelik a sejtek életképességét (Mohana Krishna Gopisetty eredményeit lásd: **Függelék**). Ennek további alátámasztására HMGB1 immunoesszéket végeztünk az EV-kal és tunicamycinnel kezelt THP-1 sejteken (**12.Ábra**). Az immunoesszéket kettő, illetve öt biológiai párhuzamossal kétszer végeztük el, de egyik esetben sem sikerült statisztikailag szignifikáns különbséget detektálni a csak tunicamycinnel és a tunicamycin+EV-vel kezelt sejtek között.



12. Ábra: THP-1 makrofág sejteken végzett HMGB1 immunoesszé eredménye (reprezentatív ábra) K: kontroll; T: tunicamycin kezelt sejtek; MCF: MCF-7 EV kezelt sejtek; MCF+T: MCF-7 EV+tunicamycin kezelt sejtek; MDA: MDA-MB-231 EV kezelt sejtek; MDA+T: MDA-MB-231 EV+tunicamycin kezelt sejtek. Az egyszempontos varianciaanalízis alapján nem volt szignifikáns különbség a tunicamycin és az EV+tunicamycin kezelt sejtek között.

6. Összefoglalás

Jelen munkánkban tárgyalt kérdésfelvetések és a kérdések megválaszolására szolgáló kísérletek egy nagyobb projekt részét képezik, melynek célja, hogy jobban megértsük a tumorsejtek és a sztrómasejtek közötti kölcsönös információcserét az ER stressz tűrőképesség tumorsejtektől sztrómasejteknek történő átadásának vizsgálata révén.

Ehhez megvizsgáltuk az általunk használt különböző genetikai háttérű emlő adenokarcinóma (MCF-7, MDA-MB-231), emlő epithél (MCF10-A2), fibroblaszt (MRC-5), és makrofág (THP-1) sejtek tunicamycin indukálta ER stressz tűrőképességét. Az elvégzett MTT esszék eredményei alapján kijelenthető, hogy az MCF-7 tumorsejtek voltak leginkább ellenállóak az ER stressz induktor hatásának. Érdekes módon a tripla negatív MDA-MB-231 tumorsejtek érzékenyebbnek bizonyultak a tunicamycin kezelésre, mint az MCF-7 sejtek. A nem-tumoros kontroll sejtvonalként választott MCF10-A2 epithelsejtek voltak a legszenzitívebbek az ER stresszre. Ezek a kísérletek tehát nem csupán arra szolgáltak, hogy megtaláljuk a megfelelő, a későbbiekben alkalmazandó tunicamycin koncentrációt, hanem arra is, hogy felmérjük, melyik sejt milyen intenzitással reagál és milyen mértékben tolerálja a környezetében megjelenő tunicamycint. A következő lépés a tunicamycin által a sejtekben indukált ER stressz validálása volt és annak a feltérképezése, hogy mely ER stressz markerek lehetnek a legmegfelelőbbek a kiváltott hatás detektálására és követésére. Vizsgáltuk ezért számos ER stressz markergén expressziójának változását az epithél, fibroblaszt és makrofág sejtekben RT-qPCR módszerrel. Olyan géneket választottunk, melyek az ER stressz hatására beinduló UPR jelutak, illetve a pro-, vagy antiapoptotikus hatás megítélésére alkalmasak és mindhárom fő molekuláris útvonal (a PERK-, az IRE1 α és az ATF6) indukciójának tanulmányozására alkalmasak. Eredményeink alapján kijelenthetjük, hogy a tunicamycin a kiválasztott koncentrációban alkalmas ezen sejtvonalakban ER stressz indukcióra, valamint azt is, hogy az RT-qPCR módszer jól használható az ER stressz szintjének nyomonkövetésére. Miután feltételezésünk szerint a tumor mikrokörnyezetben a sejtek közötti kommunikációban, így az ER stressz tűrés képességének kialakításában is szerepet játszhatnak az EV-k, ezért következő lépésként megpróbáltunk ilyen vezikulákat nyerni. Az alkalmazott protokoll megfelelőnek bizonyult, hiszen sikeresen izoláltunk EV-eket tumor és epithél sejtekből, és a kapott EV mintákban az EV-k mérete és méreteloszlása is a vártak megfelelően alakult. Majd a tumorsejt eredetű EV-k felhasználásával próbáltunk további bizonyítékot szolgáltatni azok immunogén sejthalált gátló hatására THP-1 makrofág sejtekben, HMGB1 immunoesszé alkalmazásával. A módszer beállítása

sikeresnek mondható, több párhuzamos kísérletben is elvégeztük az esszét, de sajnos nem sikerült alátámasztani az EV-k immunogén sejthalált gátló képességét a THP-1 sejtek esetén. Ugyanakkor szeretnénk a későbbiekben megvizsgálni az EV-k potenciális immunogén sejthalált gátló hatását MRC-5 fibroblaszt sejteken is.

Jövőbeli terveink között szerepel még a tumorsejtek (MCF-7, MDA-MB231) és a kontroll epithél sejtvonal (MCF10-A2) sztrómasejtekkel történő társ kultúráinak kialakítása. Ehhez az EV-k számára permeábilis pórusméretű, eltávolítható membráninszerteket fogunk használni. A társ kultúra létrehozását követően az inszerteket eltávolítva a sztrómasejteket tunicamycinrel fogjuk kezelni, majd a sejtekből RNS-t és fehérjét izolálunk. Az izolált RNS-ből a pályamunkában leírt módon meghatározzuk az ER stressz markerek génexpresszió változását a kezelések hatására. A fehérje preparátumból ER stressz marker fehérjék mennyiségének változását fogjuk vizsgálni western blottal.

Tervezzük továbbá, hogy a tumor- és kontroll sejteket EV-mentes médiumban tenyésztve az így "kondicionált" médiumnak egy részéből EV-t izolálunk, egy másik részéből ultracentrifugálással eltávolítjuk az EV-kat. Ezt követően EV-kal, illetve az EV-mentessé tett médiummal kezeljük a sztrómasejteket, majd tunicamycin kezelést követően vizsgáljuk a sztrómasejtekben az ER stressz markerek RNS és fehérje szintjeinek változását. Amennyiben ezek a korábbi eredményekkel összhangban változnak, az EV-kból és az EV-depletált médiumból RNS-t izolálunk és újgenerációs szekvenálással (NGS) azonosítjuk a szekretált RNS-eket. Az EV-kal vagy EV-mentes médiummal kezelt sztrómasejtekből izolált RNS-ből pedig a kezelés hatására bekövetkező „válasz” RNS szint változást mérjük. Végül az NGS adatokat felhasználva bioinformatikai összehasonlítást végzünk a tumoros és a kontroll sejtek által szekretált RNS-ek és a kiváltott válaszok között.

Eredményeinket a célkitűzéseknek megfelelően összefoglalva kijelenthetjük:

1. Az MTT esszék alapján az ER stresszt kiváltó tunicamycin kezelések optimális koncentrációja 500 ng/ml a 24 órás inkubációnál, bár az MCF-10A esetében megfontolandó alacsonyabb koncentráció alkalmazása.
2. A 24 órás, 500 ng/ml-es tunicamycin kezelések hatására a sztrómasejtek és az emlő epithelsejtek is biológiailag és statisztikailag egyaránt szignifikáns génexpresszió növekedést mutattak 3 ER stressz marker gén, a CHOP, BiP és XBP1s tekintetében. A másik 3 marker gén (ATF6, ATF4, XBP1t) kifejeződésének változása nem minden esetben bizonyult szignifikánsnak.

3. A makrofágok immunogén sejthalálának tumorsejt eredetű EV-k általi gátlását nem sikerült statisztikailag szignifikánsan alátámasztanunk a HMGB1 immunoesszével.

7. Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni mindazoknak akik hozzájárultak ezen tudományos diákköri munka létrejöttéhez. Témavezetőimnek: Dr. Kiricsi Mónikának, aki lehetőséget biztosít arra, hogy a csoportjában dolgozzak és akihez bármikor fordulhatok iránymutatásért; Dr. Huliák Ildikónak aki bevezetett a sejtes munkák rejtelseibe és aki mindig hasznos tanácsokkal lát el. Dr. Mohana Gopisettynek, akivel ugyan nem volt szerencsém együtt dolgozni, de munkája megalapozta ezt a projektet. Dr. Igaz Nórának és Adamecz Dórának a THP-1 sejtek bemutatásáért, a HMGB esszébe való bevezetésért, illetve az EV izolálás megtanításáért. Makra Ildikónak, hogy hősiesen küzd a meglehetősen igényes MCF10-A2 sejtekkel és segít amiben kérjük. Árva Hédinek, a vidám közös munkákért. Végül, de nem utolsó sorban Nagy Ferencnek, akivel vállt vállnak vetve harcolunk és aki nélkül ez a pályamunka nem jöhetett volna létre.

8. Tételes szerzői hozzájárulás

Alulírott (**Kovács Ákos**) nyilatkozom, hogy a 37. OTDK-ra benyújtott (**ER stressz tűrőképesség intercelluláris átvitele a tumoros mikrokörnyezetben.**) című pályamunkámban leírtak esetében az alábbi munkafolyamatok elvégzésében vettem részt:

Részfeladat	A részvétel mértéke (ötfokozatú skálán jellemezve)
MCF-7, MDA-MB-231, MRC-5, THP-1 sejtvonalak fenntartása	3
MTT esszék végzése MCF-7, MDA-MB-231, MRC-5, THP-1 sejtvonalakon	3
EV izolálás MCF-7, MDA-MB-231, MCF10-A2 kondicionált médiumból	3
RNS izolálás tunicamycin kezelt sejtekből	2
THP-1 sejtek indukciója, polarizációja, EV és tunicamycin kezelése, HMGB1 esszé végzése	3

Kelt: 2024. 04. 11. Szeged

A nyilatkozatban foglaltak helyességét megerősítem:

Kovács Ákos
Pályamunkát benyújtó hallgató

Dr. Kiricsi Mónika - SZTE TTIK Biokémiai és
Molekuláris Biológiai Tanszék
Témavezető

A skála egyes értékeinek jelentése:

5 – Felkészítés után a feladat teljes egészét önállóan végeztem a pályamunkához szükséges mennyiségben.

4 – Felkészítés után a feladat több mint felét önállóan végeztem a pályamunkához szükséges mennyiségben.

3 – Felkészítés után a részfeladat felét önállóan végeztem a pályamunkához szükséges mennyiségben.

2 – Felkészítés után a részfeladat kevesebb mint felét önállóan végeztem a pályamunkához szükséges mennyiségben.

1 – A részfeladatot folyamatos segítséggel végeztem a pályamunkához szükséges mennyiségben.

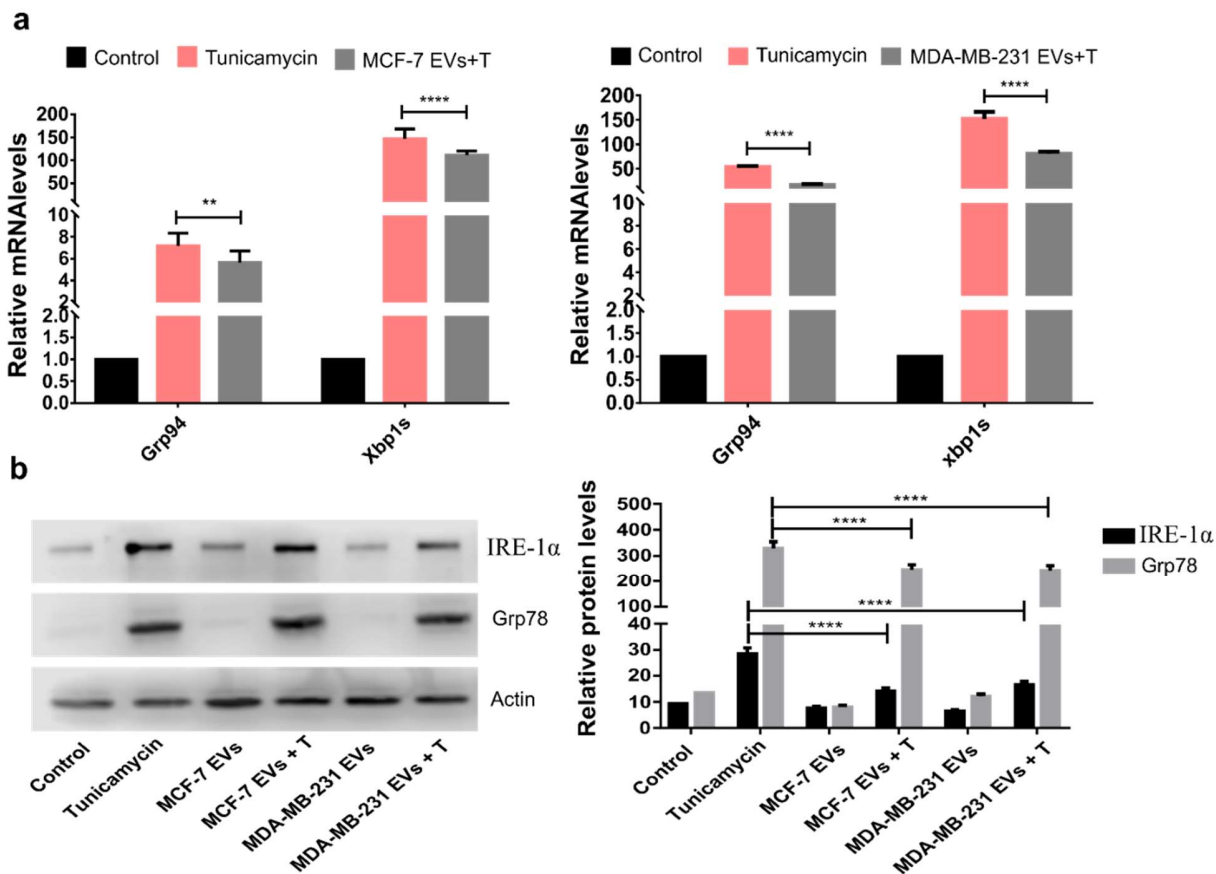
9. Irodalom

1. Bray, F. *et al.* Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* (2024) doi:10.3322/CAAC.21834.
2. Urrea, H., Dufey, E., Avril, T., Chevet, E. & Hetz, C. Endoplasmic Reticulum Stress and the Hallmarks of Cancer. *Trends Cancer* **2**, 252–262 (2016).
3. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
4. Quail, D. F. & Joyce, J. A. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med* **19**, 1423–1437 (2013).
5. Hanahan, D. & Coussens, L. M. Accessories to the Crime: Functions of Cells Recruited to the Tumor Microenvironment. *Cancer Cell* **21**, 309–322 (2012).
6. Garcia-Gomez, A., Rodríguez-Ubreva, J. & Ballestar, E. Epigenetic interplay between immune, stromal and cancer cells in the tumor microenvironment. *Clin Immunol* **196**, 64–71 (2018).
7. Kalluri, R. The biology and function of fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer* **16**, 582–598 (2016).
8. Su, S. *et al.* CD10+GPR77+ Cancer-Associated Fibroblasts Promote Cancer Formation and Chemoresistance by Sustaining Cancer Stemness. *Cell* **172**, 841–856.e16 (2018).
9. Shiga, K. *et al.* Cancer-Associated Fibroblasts: Their Characteristics and Their Roles in Tumor Growth. *Cancers (Basel)* **7**, 2443–2458 (2015).
10. Donnarumma, E. *et al.* Cancer-associated fibroblasts release exosomal microRNAs that dictate an aggressive phenotype in breast cancer. *Oncotarget* **8**, 19592–19608 (2017).
11. Tommelein, J. *et al.* Cancer-associated fibroblasts connect metastasis-promoting communication in colorectal cancer. *Front Oncol* **5**, (2015).
12. Pollard, J. W. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nature Reviews Cancer* 2004 4:1 **4**, 71–78 (2004).

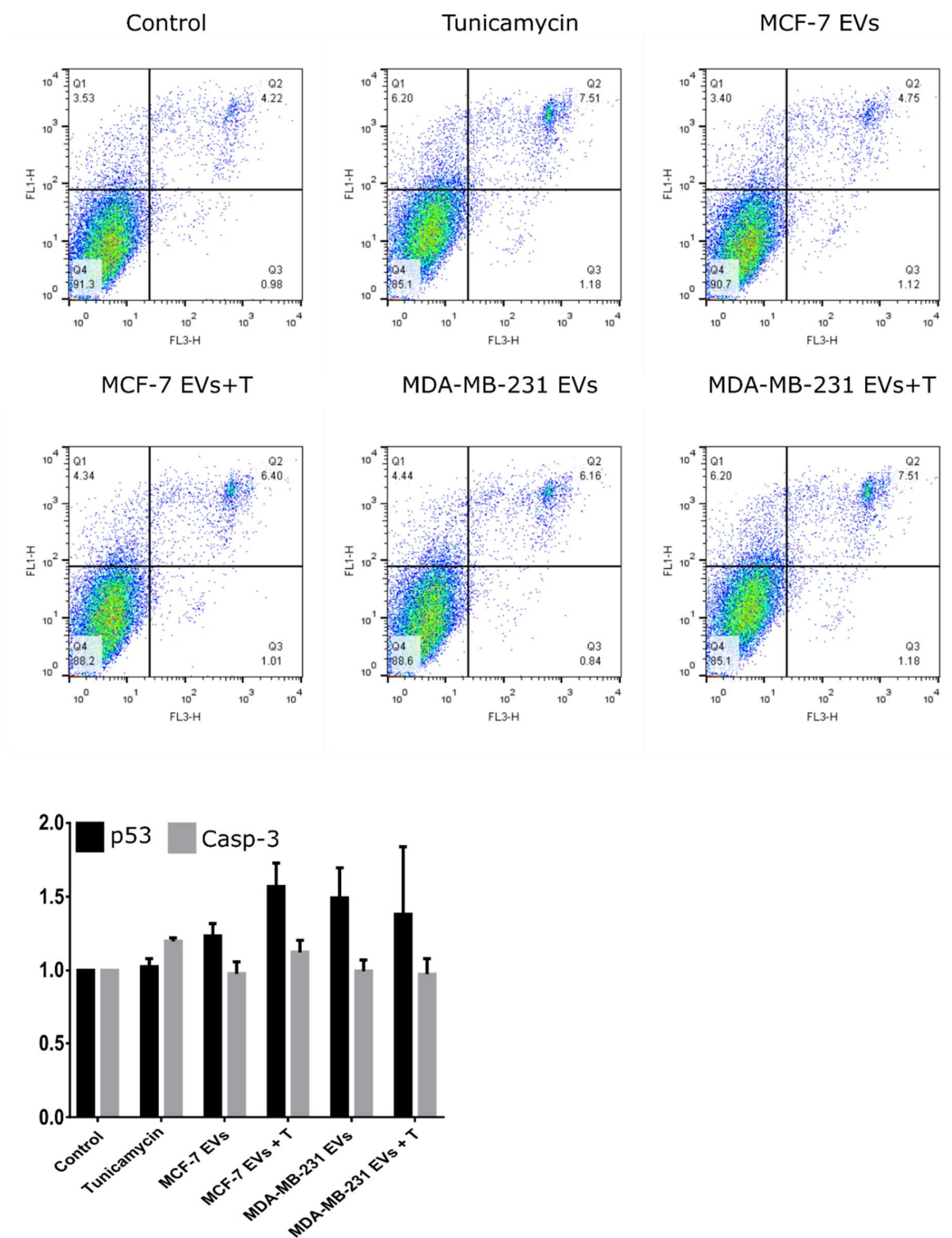
13. Ojalvo, L. S., King, W., Cox, D. & Pollard, J. W. High-density gene expression analysis of tumor-associated macrophages from mouse mammary tumors. *Am J Pathol* **174**, 1048–1064 (2009).
14. Su, S. *et al.* A positive feedback loop between mesenchymal-like cancer cells and macrophages is essential to breast cancer metastasis. *Cancer Cell* **25**, 605–620 (2014).
15. Gordon, S. & Martinez, F. O. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity* **32**, 593–604 (2010).
16. Raposo, G. & Stoorvogel, W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol* **200**, 373–383 (2013).
17. Heijnen, H. F. G., Schiel, A. E., Fijnheer, R., Geuze, H. J. & Sixma, J. J. Activated Platelets Release Two Types of Membrane Vesicles: Microvesicles by Surface Shedding and Exosomes Derived From Exocytosis of Multivesicular Bodies and α -Granules. *Blood* **94**, 3791–3799 (1999).
18. Muralidharan-Chari, V. *et al.* ARF6-regulated shedding of tumor-cell derived plasma membrane microvesicles. *Curr Biol* **19**, 1875 (2009).
19. Qu, L. *et al.* Exosome-Transmitted lncARSR Promotes Sunitinib Resistance in Renal Cancer by Acting as a Competing Endogenous RNA. *Cancer Cell* **29**, 653–668 (2016).
20. Umezū, T. *et al.* Exosomal miR-135b shed from hypoxic multiple myeloma cells enhances angiogenesis by targeting factor-inhibiting HIF-1. *Blood* **124**, 3748–3757 (2014).
21. Tominaga, N. *et al.* Brain metastatic cancer cells release microRNA-181c-containing extracellular vesicles capable of destructing blood-brain barrier. *Nat Commun* **6**, (2015).
22. Zhu, L. *et al.* Exosomal microRNAs induce tumor-associated macrophages via PPAR γ during tumor progression in SHH medulloblastoma. *Cancer Lett* **535**, (2022).
23. Luga, V. *et al.* Exosomes Mediate Stromal Mobilization of Autocrine Wnt-PCP Signaling in Breast Cancer Cell Migration. *Cell* **151**, 1542–1556 (2012).

24. Zhu, X. *et al.* Macrophages derived exosomes deliver miR-223 to epithelial ovarian cancer cells to elicit a chemoresistant phenotype. *J Exp Clin Cancer Res* **38**, (2019).
25. Zhang, L. *et al.* Microenvironment-induced PTEN loss by exosomal microRNA primes brain metastasis outgrowth. *Nature* **527**, 100–104 (2015).
26. Braakman, I. & Bulleid, N. J. Protein folding and modification in the mammalian endoplasmic reticulum. *Annu Rev Biochem* **80**, 71–99 (2011).
27. Hetz, C. & Papa, F. R. The Unfolded Protein Response and Cell Fate Control. *Mol Cell* **69**, 169–181 (2018).
28. Elbein, A. D. INHIBITORS OF THE BIOSYNTHESIS AND PROCESSING OF N-LINKED OLIGOSACCHARIDE CHAINS. *Annu Rev Biochem* **56**, 497–534 (1987).
29. Sano, R. & Reed, J. C. ER stress-induced cell death mechanisms. *Biochim Biophys Acta* **1833**, 3460–3470 (2013).
30. Bertolotti, A., Zhang, Y., Hendershot, L. M., Harding, H. P. & Ron, D. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol* **2**, 326–332 (2000).
31. Pontisso, I., Ornelas-Guevara, R., Combettes, L. & Dupont, G. A journey in UPR modelling. *Biol Cell* **115**, (2023).
32. Wang, M. & Kaufman, R. J. The impact of the endoplasmic reticulum protein-folding environment on cancer development. *Nat Rev Cancer* **14**, 581–597 (2014).
33. Zanetti, M. Cell-extrinsic effects of the tumor unfolded protein response on myeloid cells and T cells. *Ann N Y Acad Sci* **1284**, 6–11 (2013).
34. Hosoi, T., Nakashima, M. & Ozawa, K. Incorporation of the Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Spliced Form of XBP1 mRNA in the Exosomes. *Front Physiol* **9**, (2018).

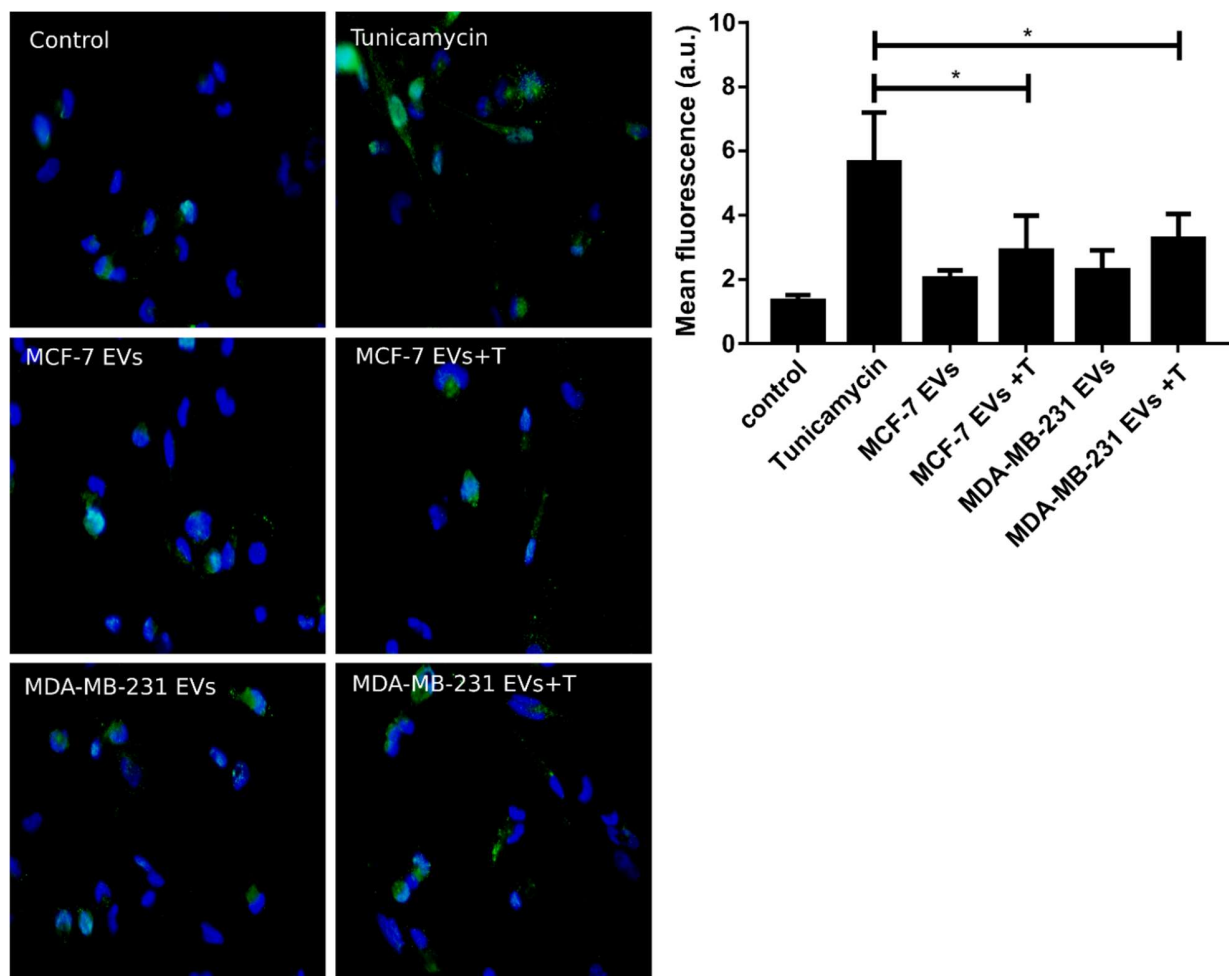
10. Függelék



Függelék ábra 1: Mohana Krishna Gopisetty korábbi eredményei alapján a makrofágok ER stressz válaszát a tumorsejt eredetű EV-k módosítják RT-qPCR-ral és western blottal vizsgálva (Grp78=BiP).



Függelék ábra 2: Mohana Krishna Gopisetty korábbi eredményei alapján a THP-1 makrofágok ER stressz kiváltotta sejthalála nem apoptotikus módon következik be (AnnexinV-FITC és propidium-jodid áramlási citometria és RT-qPCR alapján), így annak tumorsejt eredetű EV-k általi gátlása is más módon történhet.



Függelék ábra 3: Mohana Krishna Gopisetty korábbi eredményei alapján a THP-1 makrofágok ER stressz kiváltotta immunogén sejthalálának alátámasztása calreticulin immunfestéssel (kék: sejtmag DAPI, zöld: membrán asszociált calreticulin FITC)