

Az endoplazmás retikulum stressz válasz UPR-PERK ágának rendszerszintű vizsgálata

Doktori értekezés

Márton Margita Ágnes

Semmelweis Egyetem
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Mészáros-Kapuy Orsolya Ph.D., egyetemi docens

Hivatalos bírálók: Dr. Homolya László, D.Sc., tudományos tanácsadó
Dr. Dóczi Judit, Ph.D., tudományos munkatárs

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Dr. Varga Gábor, D.Sc., egyetemi tanár

Tagok: Dr. Wunderlich Lívius, Ph.D., egyetemi docens
Dr. Káldi Krisztina, D.Sc., egyetemi oktató

Budapest
2021

TARTALOMJEGYZÉK

Rövidítések jegyzéke	5
Ábrák és táblázatok jegyzéke	9
1. Bevezetés	12
1.1. Az endoplazmatikus retikulum (ER) funkciói és az ER stressz	12
1.2. Autofágia	13
1.2.1. Az autofágia szerepe és típusai.....	13
1.2.2. A makroautofágia mechanizmusa, szabályozása.....	14
1.3. Apoptózis	16
1.3.1. Az apoptózis mechanizmusa	16
1.3.2. Az apoptózis szabályozása	17
1.4. Az autofágia és az apoptózis kapcsolata ER stressz során	19
1.5. A selejt fehérje válasz (UPR).....	20
1.5.1. IRE1 útvonal.....	21
1.5.1.1. XBP1	22
1.5.1.2. JNK.....	23
1.5.2. PERK útvonal.....	24
1.5.2.1. eIF2, eIF2 α	24
1.5.2.2. ATF4	27
1.5.2.3. CHOP	28
1.5.2.4. GADD34	31
1.5.3. ATF6 jelátvittele.....	34
1.6. Kapcsolatok az UPR elemei között	34
1.6.1. Kapcsolatok az UPR útvonalak között	34

1.6.2.	Molekuláris kapcsolatok a PERK útvonal elemei között	35
2.	Célkitűzések	37
3.	Módszerek	39
3.1.	Sejtvonal és kezelések	39
3.2.	Életképességi vizsgálat: Cell Titer Blue Assay	39
3.3.	Sejtszámolás.....	40
3.4.	Apoptózis assay: Apo-ONE® kaszpáz 3/7 próba.....	40
3.5.	Nátrium-dodecil szulfát gélelektroforézis (SDS-PAGE) és western blot analízis 41	
3.6.	RNS interferencia/géncsendesítés.....	43
3.7.	RNS izolálás, reverz transzkripció PCR és real-time PCR.....	43
3.8.	A matematikai modellezés és a rendszerbiológiai megközelítés.....	45
3.9.	Statisztika.....	48
4.	Eredmények.....	49
4.1.	Az autofágia és apoptózis kapcsolatának vizsgálata ER stressz során	49
4.2.	Kapcsolatok az UPR PERK és IRE1 útvonalai között	53
4.2.1.	A PERK csendesítés növeli a sejtek életképességét ER stressz során	55
4.2.2.	A PERK csendesítés ER stressz során meghosszabbítja az autofágia-függő túlélést és késlelteti az apoptotikus sejthalált	56
4.2.3.	A PERK pozitív hatást gyakorol az IRE1 apoptózis induktorára.....	58
4.2.4.	Pozitív visszacsatolási hurok jelenlétének megállapítása az IRE1 és PERK ágak között matematikai modell segítségével	60
4.2.5.	Az autofágia és apoptózis induktorok IRE1 és PERK útvonalak általi módosult működése meghatározza a sejt élet-és-halál közti döntését.....	63
4.3.	A PERK útvonalon belüli, molekuláris kapcsolatok hatása	64
4.3.1.	Az ATF4 és célgénjeinek aktivációja a két különböző ER stressz szinten 64	

4.3.2.	A GADD34 gátlása negatívan hat az ATF4-re és a CHOP-ra is ER stressz során	67
4.3.3.	Az CHOP csendesítés ER stressz esetén nincs hatással az ATF4 aktiválódásra.....	69
4.3.4.	Az ER stresszválasz megfelelő működéséhez további visszacsatolási hurkok szükségesek az ATF4 és annak célgénjei között.....	72
4.4.	További elméleti vizsgálatok az élet-és-halál közötti folyamat tanulmányozására ER stressz esetén	75
4.4.1.	A matematikai modell felépítése	76
4.4.2.	A rendszerszintű visszacsatolási hurkok biztosítják a szabályozási hálózat robusztusságát ER stressz során	77
4.4.3.	A PERK útvonal elemei közötti pozitív kapcsolat hatása a sejtek túlélésére ER stressz során.....	79
4.4.4.	A GADD34 és CHOP hiányának hatása a szabályozásra, predikció a GADD34 és CHOP overexpresszióra	80
5.	Megbeszélés.....	84
5.1.	Az autofágia és apoptózis kapcsolata ER stressz során	84
5.2.	Az IRE1 és a PERK útvonalak vizsgálata és szerepe a sejt élet-és-halál közötti döntésében ER stressz esetén	85
5.3.	Molekuláris kapcsolatok a PERK útvonalon belül: az ATF4 és célgénjei közötti új visszacsatolási hurkok szerepe	87
5.4.	További matematikai modellek a rendszer leírására.....	90
6.	Következtetések.....	95
7.	Összefoglalás	97
8.	Summary.....	98
9.	Irodalomjegyzék	99
10.	Saját publikációk jegyzéke	118
11.	Köszönetnyilvánítás	119

12. Mellékletek jegyzéke	120
1. Melléklet.....	121
2. Melléklet.....	124
3. Melléklet.....	127
4. Melléklet.....	131

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

5' UTR	untranslated region/nem transzlálódó régió
Akt	Akt serine/threonine kinase 1
AMPK	AMP-aktivált kináz
AP-1	activator protein 1
APAF1	apoptotic-protein activation factor-1
ASK1	apoptosis signal-regulating kinase 1
ATF4, ATF5, ATF6	activating transcription factor-4,-5,-6
ATG3, -7, -12, -14	autophagy-related protein-3, -7, -12, -14
ATP	adenozin-trifoszfát
Bad	BCL-2 associated agonist of cell death
Bak	BCL-2 homologous antagonist/killer
Bax	BCL-2-associated x protein
BCL-2	B-cell lymphoma 2
BCL-W	BCL-2 like 2
BCL-XL	BCL-2 like 1
Beclin-1	Coiled-Coil, Moesin-Like BCL2-Interacting Protein
BH3	BCL-2 homology domain 3
BID	BH3 interacting domain death agonist
BIM	BCL-2 interacting mediator of cell death
BiP	binding immunoglobulin protein
Bok	BCL-2 related ovarian killer
bZIP	basic leucine-zipper
C/EBP	CCAAT enhancer-binding protein
cAMP	ciklikus adenzin-monofoszfát

CARE	C/EBP-ATF response element
CHOP/GADD153	C/EBP homologous protein/ growth arrest and DNA damage-inducible protein 153
CRE	cAMP Response Element
CReP-PP1	constitutive repressor of eIF2 α phosphorylation
DAPK1	death-associated kinase 1
DFCP1	zinc-finger FYVE domain-containing protein 1
DISC	Death-Inducing Signaling Complex
DR4, DR5	death receptor 4, 5
DR5	death receptor 5
DTT	dithiothreitol
eIF2 α	eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 1
ER	endoplazmatikus retikulum
ERAD	ER-associated protein degradation
ERSE	ER stress response element
ER α	estrogen receptor alpha
Fas, Fas-L	fas cell surface death receptor, -ligand
FOS	FOS proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit
FOXO1	forkhead box O1
GABARAP12	Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein-like 2
GADD34	growth arrest and DNA-damage-inducible 34
GB	guanabenz
GCN2	general control nonderepressible-2
GTP, GDP	guanozin-trifoszfát, guanozin-difoszfát
HOPS	homotypic fusion and protein sorting-tethering complex

HRI	heme-regulated inhibitor
Hsc-70	heat shock cognate 71 kDa protein
HSPA5	heat shock protein family A (Hsp70) member 5
IDP	intrinsically disordered proteins
IRE1 α	inositol-requiring enzyme 1
ISR	integrated stress response
JNK	c-Jun NH2 terminal kinase
JUN	JUNK proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit
LIR	LC3-interacting motif
MAPK	mitogen-activated protein kinase 1
MAP-LC3 β /LC3	microtubule associated protein 1 light chain 3 beta
MCL-1	MCL1 apoptosis regulator, BCL2 family member
mTOR	mammalian target of rapamycin
Nbr1	Nbr1 Autophagy Cargo Receptor
Nix	NIP-3-Like Protein X
p62	Phosphotyrosine-Independent Ligand For The Lck SH2 Domain Of 62 kDa
PERK	protein kinase R-like ER kinase
PI3K III	class III phosphoinositide 3-kinases
PI3P	phosphatidylinositol-3-phosphate
PKR	doublestranded RNA (dsRNA)-dependent protein kinase
PP1A	protein phosphatase 1 catalytic subunit alpha
PUMA	P53 up-regulated modulator of apoptosis
Rab7	ras-associated protein Rab7
REDD1	regulated in development and DNA damage responses 1

RIDD	regulated IRE1 α -dependent decay of RNA
ROS	reactive oxygen species
RTCB	RNA 2',3'-cyclic phosphate and 5'-OH ligase
SNARE	soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors
TG	thapsigargin
TM	tunicamycin
TNF α	tumor necrosis factor, -receptor1
TRAF2	TNF receptor associated factor 2
TRAF6	TNF receptor associated factor 6
TRAIL	tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand
TSC1/TSC2	tuberous sclerosis (TSC) tumor suppressor complex
ULK1	unc-51-like kinase 1
uORF	upstream open reading frame
UPR	unfolded protein response
UPRE	UPR element
VPS15	phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 4
VPS34	phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit type 3
XBP1s/u	X-box binding protein spliced/unspliced

ÁBRÁK ÉS TÁBLÁZATOK JEGYZÉKE

1. ábra: Sematikus ábra a makroautofágia mechanizmusáról.....	15
2. ábra: Az apoptózis folyamata a sejt morfológiáját érintő lépésekkel.....	17
3. ábra: Az apoptózis extrinsic és intrinsic útvonalának legfontosabb szabályozó molekulái.....	18
4. ábra: Az autofágia és az apoptózis folyamatok közötti kapcsolatok ER stressz esetén.....	19
5. ábra: Az UPR három ága: az ATF6, a PERK és az IRE1.....	21
6. ábra: A multimer eIF2 α fehérje három alegysége, és az α alegység foszforiláltságának hatása.....	25
7. ábra: Az ATF4 stressz-függő képződésének szabályozási mechanizmusa.....	26
8. ábra: A CHOP fehérje szerkezete, doménjei.....	29
9. ábra: A CHOP számos jelátviteli útvonalra hatva indukál apoptotikus sejthalált.....	30
10. ábra GADD34-PP1 komplex működése, és az eIF2 α defoszforiláció hatása.....	32
11. ábra: GADD34 fehérje szerkezete, doménjei.....	33
12. ábra: Sematikus ábra a rendszerbiológiai megközelítés egyes lépéseiről.....	47
13. ábra: A sejtek alacsony és magas szintű ER stresszre adott válasza.....	51
14. ábra: Az ER stresszorok kezelési koncentrációjának kiválasztása a sejtek életképessége alapján.....	54
15. ábra: A PERK csendesítés növeli a sejtek életképességét tartós ER stressz esetén.....	56
16. ábra: A PERK csendesítés késlelteti az apoptózist TG és TM kezelések során.....	57
17. ábra: A PERK csendesítés hatással van az IRE1 apoptózis induktorára TG és TM kezelések során.....	59
18. ábra: A visszacsatolási hurkok szerepe a sejt élet és halál közti döntésének irreverzibilitásában.....	62
19. ábra: Alacsony és magas szintű ER stressz hatása a sejtszámra, kaspázaktivitásra és a PERK útvonal kulcselemeinek mRNS szintjére.....	65
20. ábra: Az autofágia, apoptózis folyamatok és a PERK-útvonal kulcselemeinek fehérje szintű aktivitása alacsony és magas szintű ER stressz esetén.....	66
21. ábra: A GADD34 gátlásának hatása a sejtszámra, kaspázaktivitásra és a PERK útvonal kulcselemeinek mRNS szintjére magas szintű ER stressz esetén.....	68

22. ábra: A GADD34 gátlásának hatása a PERK útvonal kulcselemeinek fehérje szintjeire magas szintű ER stressz esetén.....	69
23. ábra: A CHOP csendesítésének hatása magas szintű ER stressz során a sejtszámra, a sejt életképességre és a PERK útvonal kulcselemeinek mRNS szintjére.....	70
24. ábra: A CHOP csendesítés hatása magas szintű ER stressz esetén a PERK útvonal kulcselemeire fehérje szinten.....	71
25. ábra: A PERK útvonal kulcselemei közötti (A) már ismert és újabb (B) kapcsolatok.	73
26. ábra: Számítógépes szimuláció a PERK útvonal által szabályozott ER stresszválasz mechanizmusról.....	74
27. ábra: A rendszerszintű visszacsatolási hurkok szerepe a szabályozási hálózat robosztusságában ER stressz esetén.	78
28. ábra: A CHOP vagy a GADD34 hiányának hatása az ER stresszválasz mechanizmusra.	81
29. ábra: A CHOP vagy a GADD34 overexpresszió hatása az ER stresszválasz mechanizmusra.	83
30. ábra: Sematikus ábra a stressz-válasz mechanizmusról és annak különböző kimeneteleiről.....	91
31. ábra: Az UPR ágak közötti és azokon belüli szabályozási kapcsolatok hatása az ER stresszválaszra.	93
1. táblázat: A western blot során használt elsődleges antitestek.	42
2. táblázat: A tervezett primerek adatai.	44
3. táblázat: A modell elemek leírása.....	121
4. táblázat: A modell állandók leírása	121
5. táblázat: A modell biokémiai reakcióinak leírása	122
6. táblázat: A paraméter beállítások leírása, amikor a szimulációkban sem az ERSS1 és ERSS2, sem az autofágia és apoptózis induktorok között nincs kapcsolat.....	134
7. táblázat: A különböző fenotípusok szimulációja, amikor sem az ERSS1 és ERSS2, sem az autofágia és apoptózis induktorok között nincs kapcsolat.....	135
8. táblázat: A paraméter beállítások leírása, amikor a szimulációkban az autofágia és apoptózis induktorok között van egy negatív visszacsatolás	135

9. táblázat: a különböző fenotípusok szimulációja, mikor a szimulációkban az autofágia és apoptózis induktorok között van egy negatív visszacsatolás	136
10. táblázat: A paraméter beállítások leírása, amikor a szimulációkban az ERSS1 és ERSS2 között egy pozitív visszacsatolási hurok, és az autofágia és apoptózis induktorok között egy negatív visszacsatolás van jelen.....	136
11. táblázat: A különböző fenotípusok szimulációja, amikor az ERSS1 és ERSS2 között egy pozitív visszacsatolási hurok, és az autofágia és apoptózis induktorok között egy negatív visszacsatolás van jelen	137

1. BEVEZETÉS

1.1. Az endoplazmatikus retikulum (ER) funkciói és az ER stressz

A proteosztázis azon folyamatok összessége, melyek segítségével a sejt fenntartja és szabályozza teljes fehérjekészletének egyensúlyát. A szekréciónak megfelelő hajtogatásának kialakítását, módosításait és fehérjekomplexekké való alakítását az endoplazmális retikulumban (ER-ben) chaperon fehérjék, foldázok, oxidoreduktázok és glikoziláló enzimek biztosítják, mielőtt azok tovább haladnának a szekréciónak útjára. Az ER egy olyan „molekuláris átjárót” biztosít a szekréciónak útjára, amelyen keresztül a fehérjék körülbelül 30%-a áthalad (1, 2). A fehérjék az ER-ben érik el megfelelő hajtogatottságukat és konformációjukat, emiatt ez az organelum az egyik fő szabályozója a celluláris proteosztázisnak. Az ER proteosztázis zavarát okozhatják az azt szabályozó mechanizmusok hibái, a hibásan feltekeredett fehérjék felhalmozódása vagy a sejt fehérje folding kapacitása és fehérje igénye közötti egyensúly hiánya (3).

Az ER homeosztázisa folyamatosan ki van téve a fiziológiai és patológiai változásoknak, melyek hatással vannak az ER számos funkciójára a sejtben. Ilyen ER funkciók többek között: Ca^{2+} -raktározás, fehérje folding és összeszerelés, lipid és szterol bioszintézis, illetve a jelátviteli utak és a sejtsejtszervek közötti kommunikáció (4). A túlzottan megnőtt fehérjeszekréciónak vagy az ER fehérje folding hibái az ER lumenjében nem-, vagy hibásan feltekeredett fehérjék felhalmozódásához vezet, amelyet ER stressznek nevezünk. Az ER stressz serkenti azt az evolúciósan konzervált jelátviteli útvonal-hálózatot, amelyet UPR-nek (Unfolded Protein Response) nevezünk. Az eukarióta sejtekben az UPR feladata, hogy biztosítsa a fehérje folding pontosságát, fenntartsa az ER funkciókat, szembe szálljon az ER stressz káros hatásaival, helyreállítsa az ER homeosztázisát például az autofágia indukálásával, vagy ha ez nem lehetséges, aktiválja az apoptotikus sejtprogramot (4, 5).

1.2. Autofágia

1.2.1. Az autofágia szerepe és típusai

Az autofágia egy olyan evolúciósan konzervált, szabályozott folyamat, amely egy közös stresszútvonalként is értelmezhető, és számos körülmény aktiválhatja. Elősegíti a sejtek stresszhez való alkalmazkodását, ezzel növelve azok életképességét, azonban bizonyos körülmények között az autofágia sejthalához is vezethet. Három fő típusa ismert: a makroautofágia, a chaperon-mediált autofágia, és a mikroautofágia (6). Mindhárom típus a lizoszomális degradációs útvonalban végződik, ahol az elkülönített citoszolikus komponensek lebontásra lesznek ítélve (7).

A makroautofágia során *de novo* szintézissel kétrétegű membránvezikulák keletkeznek a citoszolban, amelyek növekedésük közben a lebontandó komponenseket - szelektív vagy nem szelektív módon - a keletkezett autofágiás vezikulumokba különítik el, majd lizoszómával egyesülve lebontják azokat (6). A chaperon-mediált autofágia olyan fehérjék direkt lizoszomás szállításáért és eliminációjáért felelős, amelyek egy különleges peptapeptid motívumot tartalmaznak (Lys-Phe-Glu-Arg-Gln). A lebontandó fehérjékhez citoszolikus chaperonok (például Hsc-70, hősokk-fehérje) kötődnek, majd ezek a lizoszóma-membránhoz irányítják a fehérjéket a további szabályozott lebontás érdekében (8). A harmadik mechanizmus, a mikroautofágia, amely során a szubsztrátok lizoszomás vagy endoszomás membrán betüremkedéssel és lefűződéssel történő direkt bekebelezése történik (9).

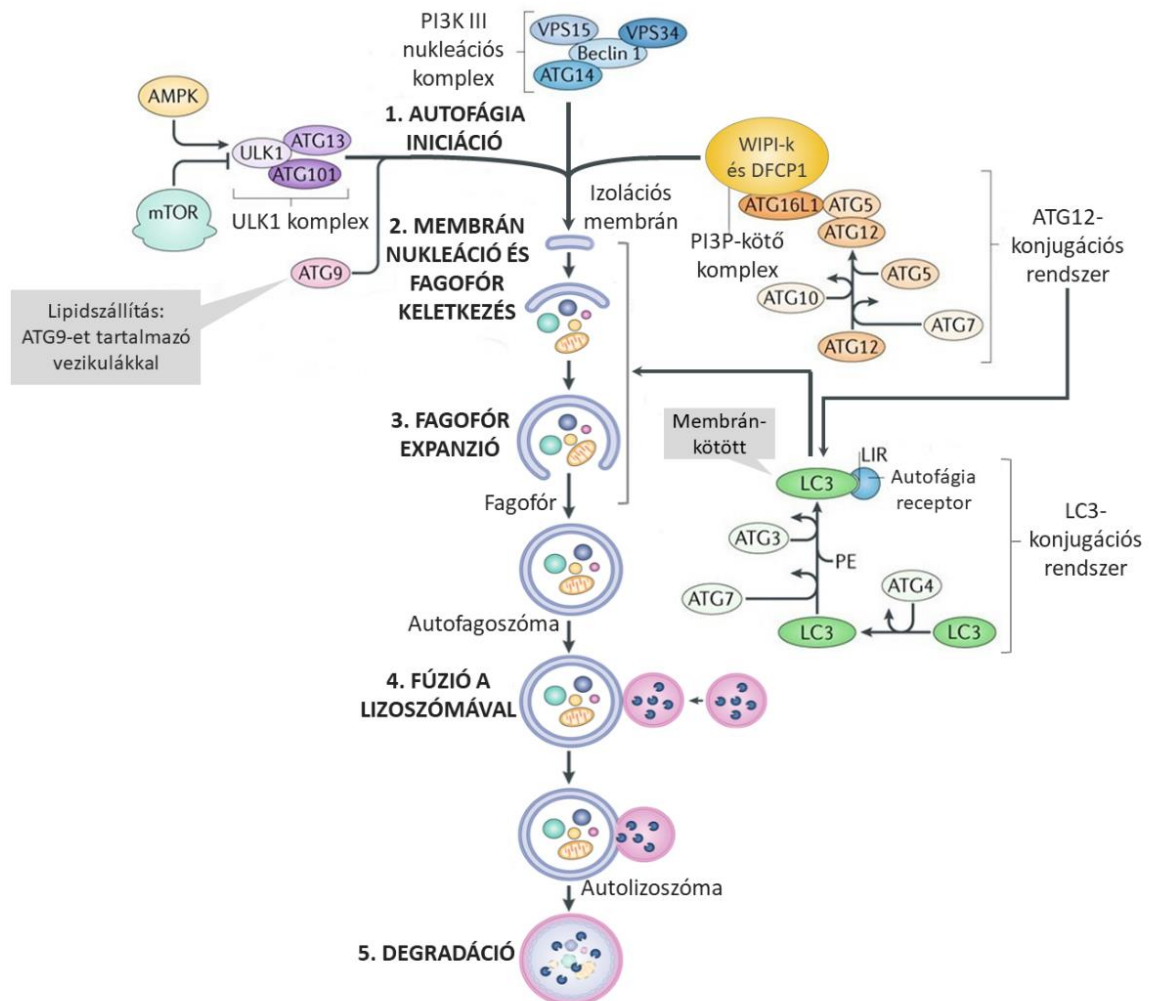
Az autofágia legismertebb formája, a makroautofágia egy intrinsic, lizoszómafüggő program, amely a fehérjék és az abnormális fehérje aggregátumok, továbbá a felesleges vagy sérült organellek (például mitokondrium, ER, peroxisómák, stb.), eltávolítását és újrafelhasználását végzi el. Olyan külső vagy belső stresszhatások indukálhatják, mint például az éhezés, az oxidatív stressz, az ER stressz, a DNS károsodás, a vezikuláris szállítás meghibásodása vagy a proteopátiás megbetegedések során keletkezett rendellenes fehérjék felhalmozódása. A makroautofágia eltávolítja a celluláris stressz faktorokat, hogy megszüntesse azok következményeit, például az így kialakuló ER stresszt vagy oxidatív stresszfolyamokat. Ezzel megvédi a sejteket és fenntartja azok homeosztázisát (6).

Az autofágia elsősorban az UPR működésével társított folyamat, mivel szerepet játszhat a rosszul feltekeredett fehérjék eltávolításában, hogy ezzel az UPR elősegítse a sejtek túlélését. Azonban számos organelum-specifikus autofágiát is vizsgálnak napjainkban, mivel fontos patofiziológiai szerepük lehet a különböző betegségekből (5). Ilyen autofágia altípus például a retikulofágia, nukleofágia, peroxifágia, mitofágia vagy a xenofágia (baktériumok eltávolítása) (5, 10-12). Tehát az UPR és az autofágia két különböző sejtes homeosztázisért felelős programnak tekinthető, amelyek a sejt specifikus területein működhetnek egymástól függetlenül, vagy egymást segítve, hogy megvédjék a sejtet a különféle stressz-folyamatoktól (5).

1.2.2. A makroautofágia mechanizmusa, szabályozása

A makroautofágia fő szabályozó mechanizmusában a legfontosabb metabolikus szenzor és szabályozó elem a folyamatban inhibitorként működő mTOR (mammalian target of rapamycin) és az aktivátorként szereplő AMPK (AMP-activated kinase) (13). Az autofágia fő lépései: iniciáció, membrán nukleáció és fagofór keletkezés, fagofór expansió, lizoszóma fúzió és a degradáció (1. ábra). Az autofágia kezdő lépésében a citoplazma lebontandó elemeit kétrétegű membrán veszi körül, ezzel elkezd kialakulni egy csésze-alakú struktúra, az ún. fagofór. A fagofór növekedésével a szubsztrátok a kettős-membránú vezikulumba kerülnek, amelyet autofagoszómának nevezünk. Az autofagoszóma a komponensek elkülönítését követően, a savas pH-jú lizoszómákkal egyesülve az elszeparált anyagok lebontására specializálódott autolizoszómává alakul. Ezeket a lépéseket számos fehérje szabályozza, amelyeket közösen ATG-fehérjéknek (autophagy-related proteins/autofágia-kapcsolt fehérjék) nevezünk. A különféle ATG fehérjék több komplexbe rendeződnek: az ULK1-iniciációs komplexbe (Unc-51-like kinase 1: ULK1), a PI3K III nukleációs komplexbe (class III PI3K nucleation complex) és a PI3P-kötő komplexbe (phosphatidylinositol 3-phosphate (PI3P)-binding complex) (14). Az ULK1 komplex egyik legfontosabb tagja az ULK1 fehérje, amelyet normál körülmények között az mTOR foszforilál, és ezzel gátolja az ULK1 komplexet (13, 15). Stressz során az mTOR inaktívvá válik, így az ULK1 komplex a gátlás alól felszabadulva aktiválódik és a fagofórba transzlokálódik, ahol iniciálja az autofágiát, aktiválva a nukleációs PI3K III komplexet, melynek tagjai: Beclin-1, VPS15, VPS34 és ATG14 (16).

Ezek a folyamatok az autofagoszóma keletkezéséhez vezetnek, amelynek növekedését és záródását követően kialakul az érett autofagoszóma (14).



1. ábra: Sematikus ábra a makroautofágia mechanizmusáról. A makroautofágia fő lépéseit, az iniciációt, a membrán nukleációt és fagofór keletkezést, a fagofór expansziót, lizoszóma fúziót és a degradációt fehérjekomplexek, illetve ubiquitin-szerű konjugáló rendszerek irányítják. Ilyen az ULK1-iniciációs komplex, a PI3K III nukleációs komplex, a PI3P-kötő komplex, az ATG9-konjugációs rendszer és az LC3-konjugációs rendszer (14).

Két ubiquitin-szerű konjugáló rendszer irányítja az autofagoszóma membrán növekedését és záródását, ezek az ATG12 és LC3 konjugáló rendszerek (17, 18). Az ATG12 konjugáló rendszerben az ATG12 összekapcsolódik az ATG5-tel és ATG16L1-gyel, majd dimerizációt követően kölcsönhatnak a PI3P-kötő komplex-szel és a DFCP1 (zinc-finger FYVE domain-containing protein 1) fehérjével. Az ATG12-ATG5-ATG16L1 komplex ezután elősegíti az LC3 konjugációt, ahol az LC3 hasítódik az ATG4 proteáz által, hogy LC3-I-gyé alakuljon. Az LC3-I összekapcsolódik a foszfatidiletanolamin-nal (PE), hogy

az LC3-II formát kialakítsa (7, 14). Ezt a lipid-konjugált LC3-II fehérjét gyakran használják az autofágiás vizsgálatok markereként, hiszen jelen van a fagofórok és autofagoszómák külső és belső membránjában is (19). Az LC3-II tehát hozzákapcsolódik a pre-autofagoszómális és autofagoszómális membránokhoz, ahol az LC3-II kölcsönhat az autofágiás receptorokkal, amelyek LIR motívumaik (LC3-interacting motif) segítségével az LC3-II formához ubiquitinált fehérjéket tudnak kapcsolni (20).

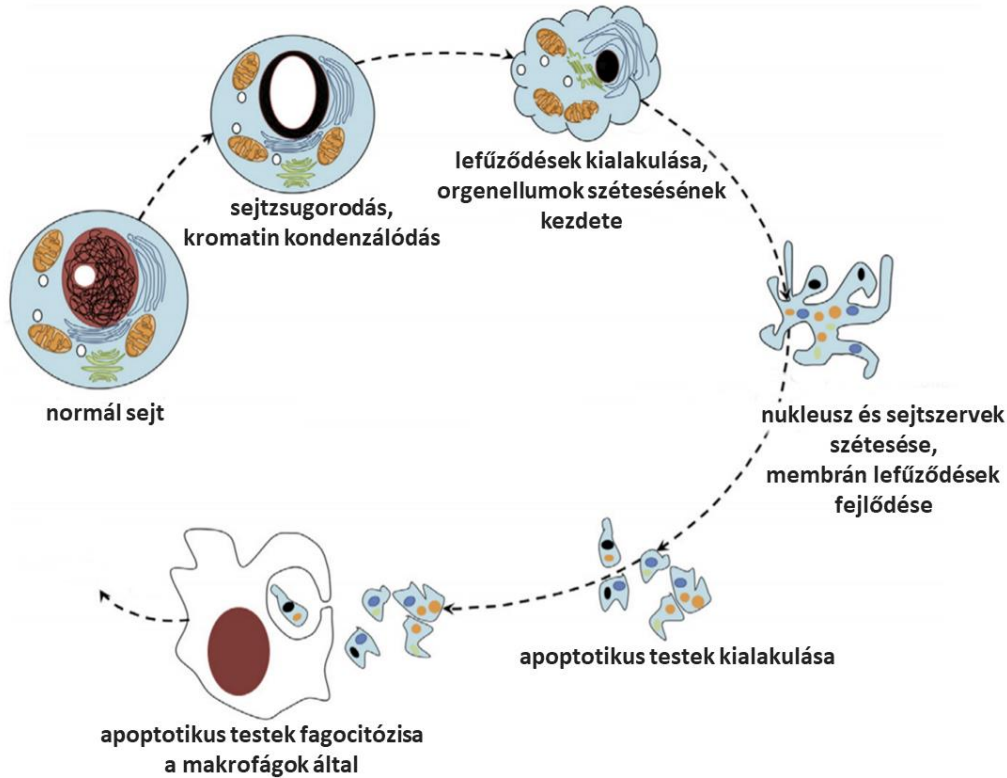
A fagofór expanzióhoz szükséges membránok ezután részben az ATG9-et tartalmazó vezikulák által szállítódnak (14). A végső lépés pedig az autofagoszóma lizoszómákkal történő fúziója, amelyet a Rab7 fehérje, a HOPS fehérjekomplex (homotypic fusion and protein sorting-tethering complex) és a SNARE fehérjék szabályoznak (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors) (21).

1.3. Apoptózis

1.3.1. Az apoptózis mechanizmusa

A túlzott mértékű ER stressz képes aktiválni az apoptózist, annak az intrinsic (mitokondriális) és/vagy extrinsic (halál-receptor) útvonalait is indukálva. Az apoptózis egy olyan genetikailag programozott sejthalál-folyamat, amellyel a szervezet ATP-függő módon, enzimek által szabályozva távolítja el azokat a sejteket, amelyekre már nincsen szükség vagy veszélyt jelenthet a számára. A folyamat során a haldokló sejtek a citoszkeleton lebomlása miatt összezsugorodnak, amit főként a szerin proteáz enzimek családjába tartozó kaszpázok okoznak. A sejtek elveszítik környező sejtekkel való kapcsolatukat, a sejtanyag kromatin állománya kondenzálódik, és a DNS az endonukleázok által kisebb fragmentekre hasítódik. Ezután a kondenzálódott citoplazma és nukleusz fragmentekre esik szét, amelyeket apoptotikus testeknek nevezünk és a sejtekről lefűződve a makrofágok által bekebeleződnek (2. ábra).

Az apoptotizáló sejtek eltávolítása gyorsan történik, ezért a környező szövetekben nem, vagy csak nagyon kis mértékben okoznak gyulladást. Az apoptózis egyik fontos tulajdonsága, hogy szemben a nekrozissal, a sejt membránja ép marad, és nem aktiválódnak a gyulladáshoz vezető folyamatok (23).

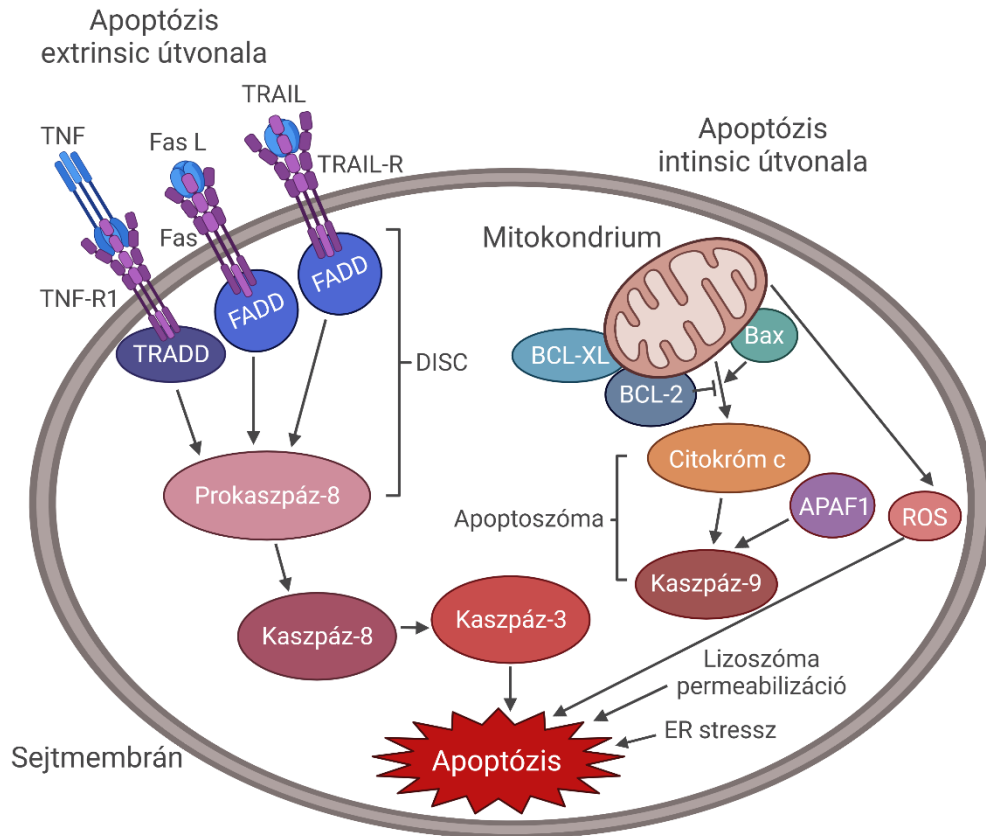


2. ábra: Az apoptózis folyamata a sejt morfológiáját érintő lépésekkel. Apoptózis során a sejtek összehsugorodnak, elveszítik kapcsolatukat a környező sejtekkel, és a sejtmag kromatin kondenzálódik. A folyamat végén kialakulnak az apoptotikus testek, amelyek a citoplazma és a nukleusz fragmensei, majd ezeket a sejtekről lefűződve a makrofágok távolítják el fagocitózissal (22).

1.3.2. Az apoptózis szabályozása

Mindkét apoptózis útvonal a kaspáz proteázok aktiválásához vezet, amelyek a sejt apoptotikus lebontását végzik majd el (3. ábra).

Az extrinsic, halál-receptor útvonal a halálligandok (Fas-ligand, $\text{TNF}\alpha$, és TRAIL) és a plazmamembránban lévő receptoraik (Fas, TNF-R1, TRAIL-R/DR) kooperációjaként működik (24). Miután a halál-receptorok ligandjaik által aktiválódnak, citoplazmatikus adapter molekulákat és apoptotikus jelátvivő molekulákat toboroznak. Az adaptor fehérjék kapcsolódva a jelátvivő molekulákkal, kialakítják az úgynevezett halál-indukáló szignál komplexet, a DISC-et (Death-Inducing Signaling Complex). A DISC indukálja a prokaspáz-8 hasítását aktív kaspáz-8 formává. Ezután a kaspáz-8 aktiválja az effektor kaspáz-3-at, ami a kaspáz-kaszád első lépése, és az apoptózis bekapcsolásához vezet (25).



3. ábra: Az apoptózis extrinsic és intrinsic útvonala legfontosabb szabályozó molekulái. Az extrinsic útvonalon a halál-receptorok (Fas, TNF-R1, TRAIL-R/DR) ligandjaik (Fas-ligand, TNF α , és TRAIL) által aktiválódnak, majd kialakítják a DISC-et. A DISC hatására a prokaspáz-8 hasítódik aktív kaspáz-8 formává, ami aktiválva az effektor kaspáz-3-at, apoptózishoz vezet. Az apoptózis intrinsic útvonala működésekor a mitokondriumból citokróm c szabadul fel, majd létrejön az apoptoszóma komplex. Az apoptoszóma a kaspáz-3-at aktiválva indukál apoptózist. Amennyiben a mitokondriumban a pro-apoptotikus fehérjék (pl. Bax) aránya az anti-apoptotikus fehérjékhez (BCL-2 vagy BCL-XL) képest megnő, szintén citokróm c felszabadulás történik (30).

Az intrinsic útvonalt a sejt szervek hibás működése indukálhatja, így az ER stressz mellett mitokondriális diszfunkciók, vagy más organelumok zavara is aktiválhatja. Az intrinsic apoptotikus út vonal a mitokondriumból történő citokróm c felszabadulással kezdődik, amely a citoplazmába áramlik, majd létrejön az apoptoszóma komplex a citokróm c, APAF1 (apoptotic-protein activation factor-1) és kaspáz-9 közreműködésével. Az apoptoszóma az effektor kaspáz-3 aktiválásával indukálja az apoptózist (24, 26). A mitokondrium apoptózishoz kapcsolható működését szabályozó fehérjék, a BCL-2 fehérjecsald tagjai három csoportra oszthatók: a pro-apoptotikus multidomén fehérjékre (pl. Bax, Bak, Bok), a pro-apoptotikus, csak BH3-doménnel rendelkező fehérjékre (BH3-only fehérjék, pl. BIM) és az anti-apoptotikus multi-domén fehérjékre (BCL-2, BCL-XL és BCL-W). A pro-apoptotikus fehérjék felszabadulásával

megnö azok aránya az anti-apoptotikus fehérjékkel szemben, és ezek a mitokondriális külső membrán permeabilizációra hatva képesek a citokróm c felszabadulását serkenteni, ezzel apoptózist indukálni (27). Emellett a mitokondrium hibás működése reakív oxigénvegyületek (ROS) keletkezéséhez is vezethet, ami növeli a mitokondriális stressz mértékét. Amennyiben ez a folyamat túlzott ROS termelésben végződik, akkor lipotoxicitás, illetve DNS és fehérje károsodások alakulhatnak ki (28, 29).

1.4. Az autofágia és az apoptózis kapcsolata ER stressz során

Az ER stressz kísérletes indukálása kiválthat túlélést és apoptózist elősegítő hatásokat is. Az autofágiás és apoptotikus folyamatok aktiválásának kinetikáját vizsgálva, korábbi kísérleteinkben megállapítottunk egy bizonyos ER stressz-küszöbértéket (31). Amennyiben a stressz mértékének enyhébb, és/vagy rövidebb ideje miatt a stressz-szint ezt a küszöbértéket nem haladja meg, a sejt túlélését elősegítve csak az autofágia folyamata indukálódik. Abban az esetben, amikor az ER stressz mértéke elég erős, vagyis a stressz meghaladja a küszöbértéket, bár az autofágia tranziensen indukálódik, de az apoptotikus jelátvitel visszafordíthatatlan, kapcsoló-szerű aktiválódása történik meg. Az autofágia és apoptózis folyamatok emellett kölcsönösen kizárják egymást, köztük egy dupla negatív visszacsatolást tételezhetünk fel (4. ábra), amit autofágia-inhibitorokkal vagy aktivátorokkal kombinált ER stressz indukcióval is megerősítettünk (31, 32).



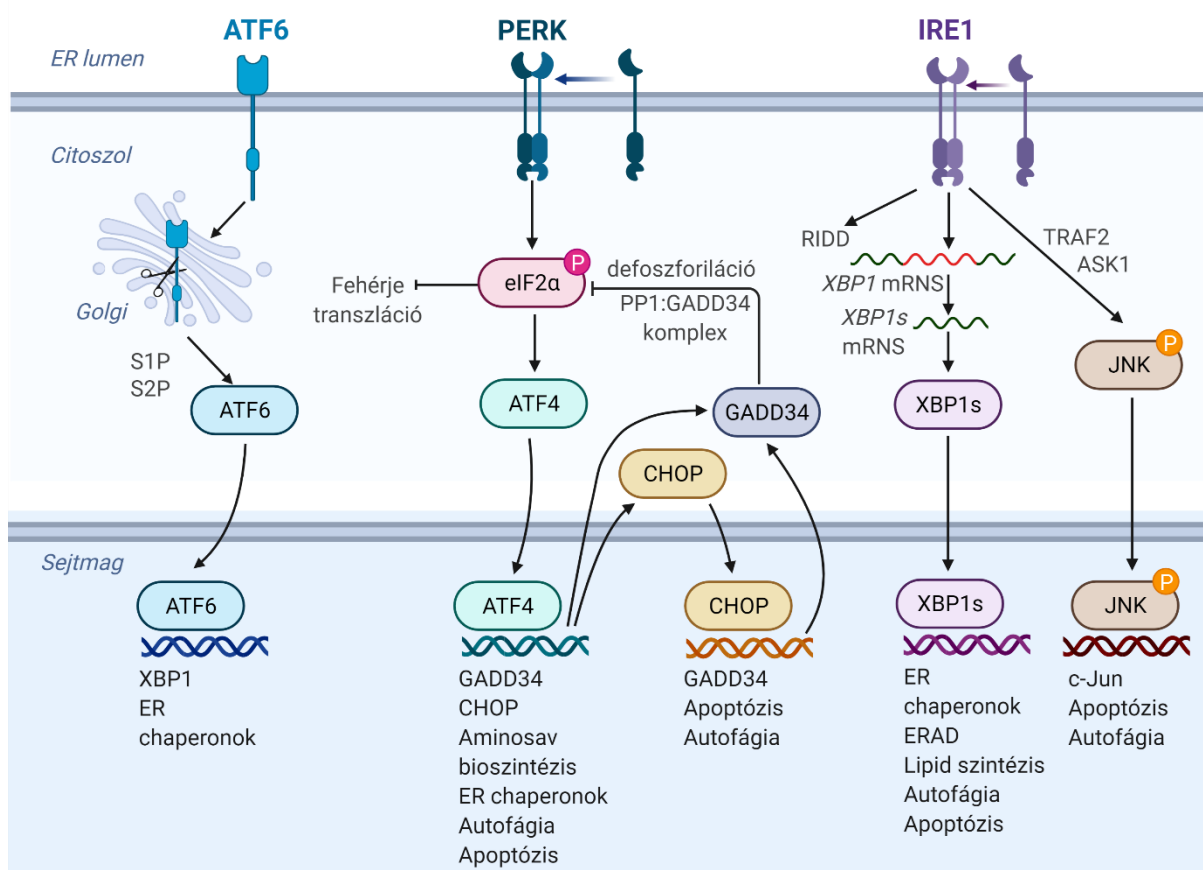
4. ábra: Az autofágia és az apoptózis folyamatok közötti kapcsolatok ER stressz esetén. ER stressz során az ER stressz szenzor molekulák először az autofágiát, majd az apoptózist aktiválják. A folyamatok sorrendje pontosan meghatározott, és mivel egymást kizárják, közöttük dupla negatív visszacsatolás van jelen. (saját készítésű ábra)

Ezt a kapcsolatot más tanulmányok is kimutatták, például humán bronchiális epitheliális sejtvonalon cigarettafüsttel indukált ER stressz során az autofágia gátlása serkentette az apoptózist (33). Tehát ER stressz során a sejtekben egy fontos döntéshozó mechanizmus megy végbe, amit bonyolult sejt-sejt kölcsönhatások irányítanak. Ennek a döntési folyamatnak néhány eleme ismert, de a pontos mechanizmus még mindig feltáráásra vár.

1.5. A sejt fehérje válasz (UPR)

A hibásan feltekeredett fehérjék aktiválják az UPR-t (Unfolded Protein Response), másnéven „sejt fehérje választ”, amely fő célja az ER proteosztázis helyreállítása. Az UPR egy olyan jelátviteli útvonal-hálózat, amely az ER-ben érzékeli a fehérje hajtogatódás pontosságát, és közvetíti ezt az információt a sejtmag és a citoszol felé. Működése a tranziens mRNS transzláció csillapításával a hibás fehérjék mennyiségének csökkenéséhez vezet. Emellett az ER-ben lévő chaperon fehérjék expresszóját növelve az UPR serkenti az ER folding kapacitását, illetve az ERAD (ER-associated protein degradation) aktiválásával segít eltávolítani a hibás fehérjéket, hogy helyreállítsa a fehérjék homeosztázisát és a sejt életképességét (34, 35). A tartós UPR aktivitás elősegíti a sejthalál folyamatok bekapcsolását hogy ezzel eltávolítsa a sérült vagy működésképtelen sejteket (36).

Az UPR-t három ER-ben elhelyezkedő szenzor fehérje irányítja, a PERK (Protein Kinase R-like ER kinase), az ATF6 (Activating transcription factor 6) és az IRE1 α (inositol-requiring enzyme 1) (5. ábra). Normál, stresszmentes körülmények között az ER stressz szenzorokat inaktív állapotban tartja a hozzájuk kapcsolódó ER chaperon fehérje, a BiP (binding immunoglobulin protein). Stressz esetén a hibás fehérjék felhalmozódásának hatására a BiP felszabadul a stressz szenzorokkal való kötésből, és ezzel képessé teszi őket az aktiválódásra (37, 38).



5. ábra: Az UPR három ága: az ATF6, a PERK és az IRE1.

ER stressz során az UPR három ágának aktiválódása különböző folyamatokat irányít. Az ATF6 hasítódva a sejtmagba kerül, ahol főként a sejt túlélését serkentő folyamatokat szabályozza. Az aktív PERK foszforilálja az eIF2 α transzkripciós faktort, ami gátolja a fehérje transzlációt, de szelektíven serkenti az ATF4 transzkripciós faktor transzlációját. Az ATF4 számos gént indukál transzkripciósan, ilyen a GADD34 és a CHOP is. Az IRE1 útvonal fő szubsztrátjai az XBP1 és JNK fehérjék. (saját készítésű ábra a Biorender programmal, Templát: Emma Madden)

1.5.1. IRE1 útvonal

Az UPR IRE1 útvonala a legjobban ismert UPR ág. Emlős sejtekben az IRE1 α és az IRE1 β izoformáit ismerjük, melyek közül az IRE1 α a legtöbb sejt típusban és szövetben jelen van, míg az IRE1 β leginkább az intesztinális epitheliális sejtekben expresszálódik (39). A továbbiakban ez a fejezet, a mellyel az IRE1-et és céljénjeit bemutatjuk, az IRE1 α -ra vonatkozik.

Az IRE1 α egy olyan I típusú transzmembrán fehérje, melynek citoszolikus doménje kináz és endoRNáz aktivitással is rendelkezik. RNáz doménje ER stressz során az IRE1 α oligomerizációját és transz-autofoszforilációját követő konformációs változás által aktiválódik. RNáz aktivitása segítségével alternatív módon bonthat le számos mRNS-t és

miRNS-t is. Ez utóbbi egy szekvencia-specifikus folyamat, amelyet szabályozott IRE1-függő RNS-lebontásnak vagy RIDD-nek (regulated IRE1 α -dependent decay of RNA) nevezünk (40). Az IRE1 útvonal két fontos célpontja az XBP1 transzkripciós faktor, és a TRAF2-ASK1 komplex aktiválásával a JNK kináz.

1.5.1.1. XBP1

Az IRE1 α RNáz aktivitása nem-konvencionális splicing-hoz vezet az XBP1 (X-box binding protein) mRNS-ében. Citoszolikus doménjén keresztül és a tRNS ligáz RTCB-vel közösen spliceoszóma független módon, egy 26 nukleotid méretű intront hasítanak ki az XBP1 mRNS-éből (41). Az XBP1 egy bZIP transzkripciós faktor, amelynek nem hasított formája, az XBP1u, a transzaktiváló doménjének hiánya miatt nem képes génextpressziót aktiválni (42). Az IRE1- mediált XBP1 mRNS-splicing egy nyitott leolvasási keret eltolódáshoz vezet, és indukálja a transzkripciósan aktív és stabil XBP1s izoforma expresszióját. Az XBP1s az új leolvasási keret translációja miatt 371 aminosav hosszú lesz, ami nagyobb méret, mint az XBP1u forma, amely csak 261 aminosavból áll (43). Az XBP1u negatívan szabályozza az XBP1s transzkripciós aktivitását és összekapcsolódva az XBP1s-sel, azt a nukleusz helyett a citoplazmába irányítja és ezzel serkenti annak proteaszomális lebontását (44).

Az XBP1s számos gén transzkripcióját irányítja, amelyek többek között chaperonok, foldázok, oxidoreduktázok, és az ERAD komponenseinek expressziójáért felelősek. Az XBP1 működése ezzel enyhíti az ER stresszt és megőrzi a sejt homeosztázisát (45, 46). Az XBP1s részt vesz még ezenkívül számos metabolikus útvonal szabályozásában is, például a lipid bioszintézisben, glükóz metabolizmusban, inzulin jelátvitelben, redox metabolizmusban, DNS javításban, a sejt túlélési folyamatában, és a sejt differenciálódásban (41). Ennek egyik módja, hogy kötődik a gének promóterében lévő CRE (cAMP Response Element) vagy CRE-hez hasonló („AGCT”, magasan konzervált) régiókhoz, ezzel serkentve azok transzkripcióját. Ezen kívül, fizikailag is kölcsönhatásba léphet más transzkripciós faktorokkal, mint amilyen az AP-1, ER α , FOXO1, és az ATF6 (47-50). Az ATF6-tal például heterodimerizálódva, közösen kapcsolódnak bizonyos gének promótereiben levő ERSE és UPRE (ER stress Response Element; UPR element) régiókhoz, amivel dajkafehérjék és az ERAD rendszer tagjait serkentik transzkripciósan (51).

Az IRE1/XBP1 útvonalnak fontos szerepe van az autofágiában is. Az XBP1s tranziens overexpressziója makrofágokban azzal indukált autofágiát, hogy szabályozta az anti-apoptotikus, és autofágiát serkentő Beclin-1 expresszióját (52). Érdekes módon az XBP1-nek hatása lehet az apoptózisra is: ugyanebben a tanulmányban az XBP1s tartós overexpressziója már apoptózishoz vezetett (52). Azonban az XBP1-nek az autofágiáért felelős hatása erősebb lehet, mivel több tanulmányt találtunk ennek igazolására. Például az XBP1s folyamatos aktiválása endothel sejtekben elősegítette az autofágiás vezikulumok keletkezését, az LC3-II konverzióját, és a Beclin-1 expresszióját (53). Emellett az XBP1 deficiencia is érdekes módon megnövekedett autofágiához vezetett, a megnövekedett FOXO1 transzkripció faktor expressziója mellett neuronsejtekben. Ezt azzal magyarázzák, hogy neurodegeneratív betegségekben az XBP1s az autofágiát serkentő FOXO1 transzkripció faktorhoz hozzákapcsolódva serkenti annak proteasomális lebomlását (54).

1.5.1.2. JNK

A JNK (c-Jun N terminal kinase) a MAPK fehérjecsalád tagja, amely főként a késői ER stressz válasz apoptózist aktiváló tagjaként ismert. ER stressz során a JNK-út vonal aktiválása komplexben történik, mely komplex kialakulásakor az IRE1 citoplazmatikus kináz doménje kapcsolódik az E3 ubikvitin ligáz TRAF2-vel és az ASK1 MAP3K fehérjével (Apoptosis-Signalling Kinase-1). Ez az ASK1 célpontjait aktiválja, a JNK-ot és a p38 MAPK-t, amely stressz kinázok elősegítik az apoptózist (55).

A JNK fehérjék a MAPK fehérjecsaládhoz tartoznak, számos splice-variánssal rendelkeznek, amelyeket emlősökben három gén kódol: a JNK1, JNK2 és JNK3. Mindhárom génről átíródó fehérje tulajdonsága, hogy N terminálisán található szerin-63 and szerin-73 aminosavakon foszforilálva aktiválja a c-Jun transzkripció faktort, és emellett aktiválja körülménytől függően a sejt proliferációs, vagy az apoptotikus folyamatait is (56).

A foszforilálva aktivált JNK a citoplazmából a nukleuszba kerülve transzaktiválja a c-Jun-t, ami az AP-1 keletkezéséhez vezet és ez számos más pro-apoptotikus gén transzkripcióját serkenti, mint például a TNF α , Fas-L, és Bak (56-58). A JNK foszforiláció szabályozza a BCL-2 fehérjét is: aktiválja a pro-apoptotikus BID-et és BIM-et, és gátolja az anti-apoptotikus BCL-2-t, BCL-XL-t és MCL-1-et. A JNK ezen

felül foszforilálva a 14-3-3 fehérjéket, amelyek a Bax-ot a citoplazmában tartanák, elősegíti a pro-apoptotikus Bax fehérje disszociációját és a fehérje mitokondriumba jutását. Emellett a szintén 14-3-3 asszociált Bad fehérje direkt foszforilációjával is annak mitokondriumba való transzlokációját segíti elő. A Bax és Bad a mitokondriumba jutva serkenti a citokróm c felszabadulást, ami apoptózist indukál (56, 59, 60).

A JNK képes az autofágia aktiválására is, két sejtalkotón keresztül. A nukleuszban aktiválja az ATG-géneket serkentő FOXO transzkripciós faktort, illetve stimulálja az expresszióját számos autofágiás génnek is, mint például ATF5, ATG7, LC3 és Beclin-1 (61-63). A citoplazmában pedig az aktív JNK direkt módon foszforilálja a BCL-2-t, hogy felszabaduljon a Beclin-1-gyel való komplexből (64). A felszabadult Beclin-1 más fehérjékkel közösen létrehozza az autofágiát aktiváló nukleációs PI3K III komplexet (16).

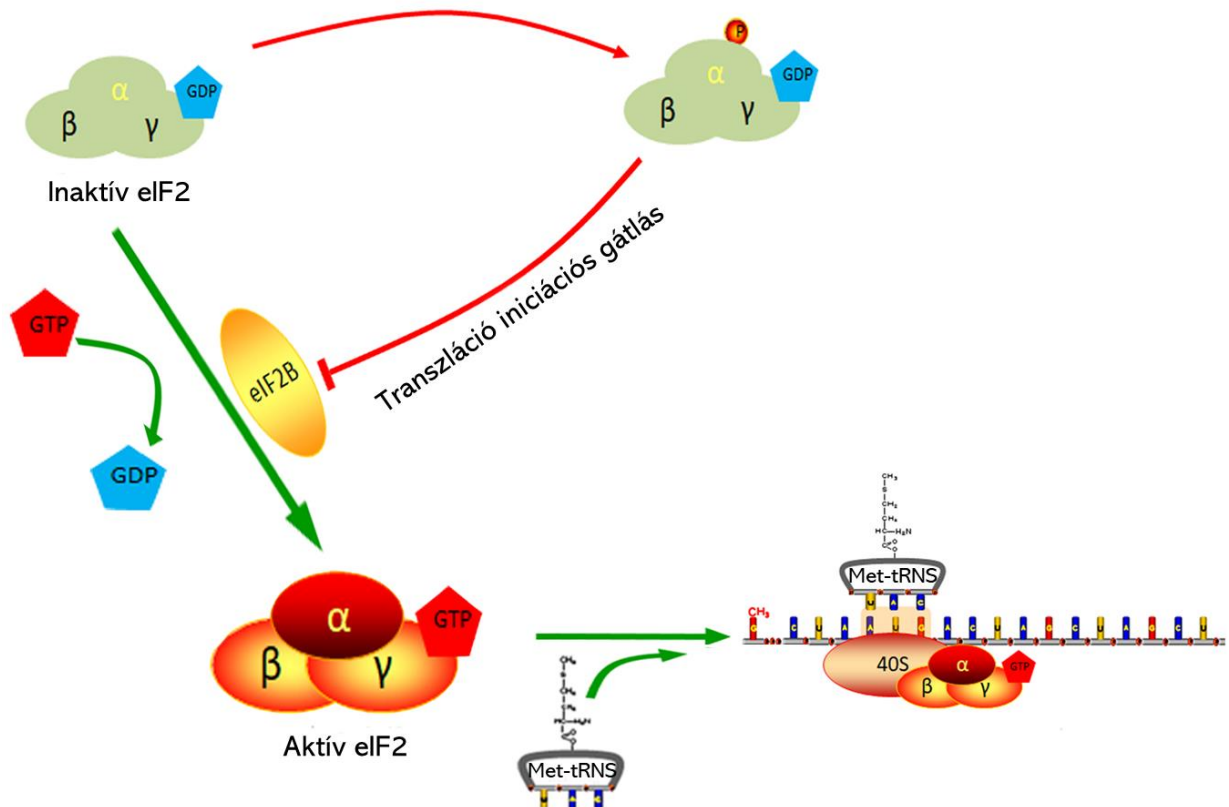
1.5.2. PERK útvonal

A PERK egy I-es típusú transzmembrán fehérje, amely szerin/theronin kináz aktivitással rendelkezik. ER stressz során a teljes kináz katalitikus aktivitás elérésének érdekében a PERK oligomerizálódik és transz-autofoszforilálódik. Így a PERK képessé válik foszforilálni a translációs iniciációs faktor eIF2 α -t, amely ebben az állapotban csökkenti a globális fehérjeszintézist (65, 66). Ez limitálja az újonnan szintetizálódó fehérjék ER-be való belépését, miközben lehetővé teszi néhány specifikus mRNS szelektív translációját. Ily módon a foszforilált eIF2 α serkenti az ATF4 transzkripciós faktort kódoló mRNS translációját, amely többek között transzkripciósan serkenti a GADD34 és CHOP fehérjék génjeit, és elősegíti az autofágiás és apoptotikus folyamatokat is (65).

1.5.2.1. eIF2, eIF2 α

A translációs iniciáció egy esszenciális lépése a fehérjeszintézisnek, amelyben számos eukarióta iniciációs faktor vesz részt. Az eIF2 egy olyan G-fehérje, amely GTP-t kötött formában fontos szabályozási elem az eukarióta transláció iniciáció során: a Met-tRNS és a riboszomális 40S alegység összekapcsolódását szabályozza, ezzel iniciálva a peptidlánc szintézisét (67). Az eIF2 fehérje egy α , β és γ alegységekből álló heterodimer, melynek aktivitását az α alegység 51-es pozícióban lévő szerinen történő foszforiláltsága határozza meg (6. ábra). Amennyiben az eIF2 α foszforilálódik, az eIF2 összekapcsolódik az eIF2B-vel egy inhibíciós komplexet alkotva, miközben az eIF2B képessége az eIF2-

GDP átalakítására eIF2-GTP-vé lecsökken, vagy teljesen eltűnik (68). Ennek a GTP átalakításnak hiánya végül legátolja a translációs iniciációt, mivel az eIF2-GDP affinitása 10x alacsonyabb a Met-tRNS-hez, mint GTP-kötött formája. Ráadásul az eIF2B mennyisége 10-20x kevesebb az eIF2 mennyiségénél a sejtben, így már az eIF2 foszforilációban történő apróbb változásoknak szignifikáns hatása lehet a fehérje translációra (69, 70).

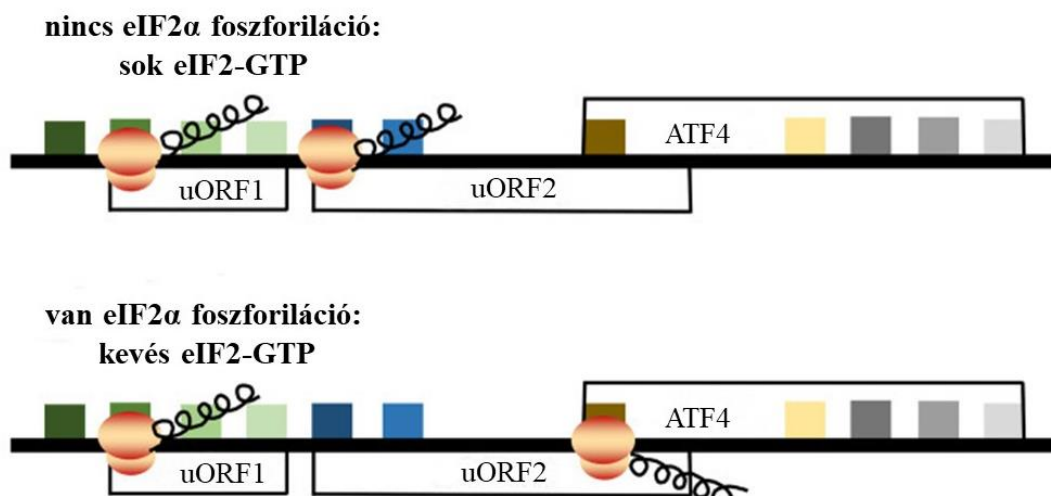


6. ábra: A multimer eIF2 α fehérje három alegysége, és az α alegység foszforiláltságának hatása. Az eIF2 fehérje α , β és γ alegységekből áll. Az α alegységen történő 51-es pozícióban lévő foszforilálódásakor az eIF2B-vel inhibíciós komplexet alkotva gátolja a transláció iniciációját (73).

Emlősökben négy szerin/treonin kináz foszforilálja az eIF2 α -t az 51-es szerinen, ezek különböző stresszfolyamatok esetén aktiválódnak. Aminosav-hiány és UV sugárzás hatására a GCN2 (general control nonderepressible-2), ER stressz esetén a PERK (protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase), vírusos fertőzés esetén a PKR (doublestranded RNA (dsRNA)-dependent protein kinase), vashiány és oxidatív stressz esetén a HRI (heme-regulated inhibitor) kinázok végzik a foszforilációt (71, 72). Ez

gyengíti az eIF2 képességét a GTP kötéshez transláció során, amely az általános translációs gátláshoz vezet.

A foszforilált eIF2 α mellett, hogy a fehérjeszintézist átmenetileg gátolja, serkenti az olyan mRNS-ekről történő translációt, amelyek 5' UTR-jeikben (untranslated region: nem translálódó régió) egy vagy több ún. korai nyitott leolvasási keretet (uORF: upstream open reading frame) hordoznak. Az egyik ilyen fehérje az ATF4, amely a translációját szabályozó két uORF-et is tartalmaz (7. ábra). Az uORF1 egy pozitív szabályozó elemként lehetővé teszi a riboszóma további pásztázását és iniciációját, újraindítva azt az mRNS további régiójában. A következő korai nyitott leolvasási keret, az uORF2 jelenléte egy gátló elemként blokkolja az ATF4 expreszióját: megelőzi annak kódoló régióját, és átfed azzal. Amennyiben a sejtek nincsenek kitéve stressznek, az uORF1 translációja után elősegíti a 40S riboszóma további pásztázását, amely visszakapva iniciációs képességét, a nagy mennyiségben jelenlévő eIF2 α -GTP-kötött Met-tRNS jelenlétében gyorsan kialakul a preiniciációs komplex. A nagy riboszóma bekapcsolódása után megtörténik az uORF2 transláció iniciációja, majd átíródása, és a riboszóma leválik az ATF4-et kódoló mRNS régióról. Stressz esetén az eIF2 α foszforiláció miatt lecsökkenő mennyiségű eIF2-GTP lelassítja a folyamatot és megnöveli azt az időt, amely alatt a riboszómák képessé válnak a transláció újratekzésére. Emiatt a 40S riboszómák egy része, az uORF1 translációja után, áthaladva az uORF2-en eléri az ATF4 iniciáló kodonját, mire összeszerelődik a preiniciációs komplex. Emiatt tud majd translálódni az ATF4-kódoló régió (70, 74).



7. ábra: Az ATF4 stressz-függő képződésének szabályozási mechanizmusa. Az ATF4 translációját az 5' végén található uORF1 és uORF2 átíródása szabályozza, amely miatt az ATF4 csak eIF2 α foszforiláció esetén, stresszes körülmények során íródik át (70).

1.5.2.2. ATF4

Az ATF4 egy bZIP (basic leucine-zipper) fehérjecsaldba tartozó DNS kötő transzkripciós faktor, amely a sejt stresszre való alkalmazkodásának egyik fő szabályozója (75). Az ATF4 részt vesz az Integrált Stressz Válaszban (ISR: Integrated stress response), mellyel fontos szerepe van az aminosav metabolizmusban, sejt differenciálódásban, a metasztázisban és angiogenezisben, az oxidatív stresszre való rezisztencia és gyógyszer-rezisztencia kialakulásában. Számos ATF4 célgén maga is transzkripciós faktor, amely sok más stressz-indukált célgén expresszióját szabályozza és felerősíti a stressz által indukált jelátvitelt (76).

A bZIP transzkripciós faktorok egyik fontos tulajdonsága, hogy homo-, vagy heterodimerizálódnak egymással. Bár lehetséges az ATF4 homodimerek in vitro előállítás, azonban ezek még DNS-hez kötődve is nagyon instabil molekulák. Ezzel szemben az ATF4 az ATF, a FOS/JUN és a C/EBP (CCAAT enhancer-binding protein) bZIP transzkripciós faktor családok számos tagjával stabil, funkcionális heterodimerek kialakítására képes (77-80). Az ATF4 és kötőpartnerei a DNS szekvenciák ún. cAMP válasz elemeihez (CRE: cAMP responsive element) vagy a C/EBP-ATF (CARE: C/EBP-ATF Response Element) válasz elemeihez kötődve szabályozzák a célgénjeik expresszióját (78, 79). Az ATF4 célgénjei expressziójának szabályozásával irányítja a sejt élet és halál közötti döntését stressz során.

A sejt anabolikus és katabolikus folyamatai közti egyensúly szabályozásával képes indirekt módon a sejt életképességét befolyásolni. Aminosav transzporterek, metabolikus enzimek, redox homeosztázisért felelős enzimek és ER chaperonok expresszióját indukálva hozzájárul a sejt életképességének növeléséhez, a sejt túléléséhez (81, 82). Az ATF4 aktiválja a GADD34-et, amely egy negatív visszacsatolásban az eIF2 α defoszforilálásával helyreállítja a translációt. Ez a folyamat segíthet a sejt homeosztázisának visszaállításában, ugyanakkor erős ER stressz esetén ez növelheti a sejt fehérjeterhelését, amely az ER stressz felerősítésével apoptózishoz is vezethet (83). Az ATF4 több módon is képes a sejt homeosztázisát az autofágia irányába is eltolni. Ilyen például aminosav-éhezés esetén a REDD1 fehérje expresszió serkentése, amely TSC1/TSC2-függő módon legátolja az mTORC1-et, ami az autofágia aktiválásához vezet (84). Hipoxia esetén az LC3, míg ER stressz és aminosav éhezés hatására az ATG16L1,

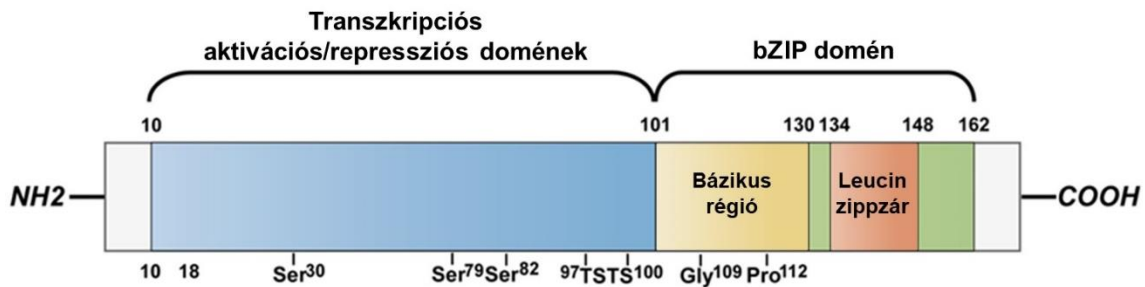
az LC3, az ATG12, az ATG3, a Beclin-1 és a GABARAPI2 autofágiás gének transzkripciós expresszióját serkenti azok promóterén keresztül (85, 86). Érdekes módon az Nbr1, az ATG7 és a p62 autofágiás géneket az ATF4 a CHOP-pal közösen, valószínűleg heterodimerben serkenti (86). Emellett az ATF4 transzaktiválja a CHOP transzkripciós faktort, amely számos módon képes az apoptotikus jelátvitelt elindítani (ld. CHOP fejezet). Vannak azonban olyan eredmények is, amelyek szerint az ATF4 a CHOP-tól független módon is kiválthat apoptózist, amely nem várt módon, erősen aktiválódott a CHOP kiütött sejtekben (87). Az ATF4 aktiválódás végkimenetele tehát a stressz erősségétől függően különböző eredményekhez vezethet.

1.5.2.3. CHOP

A CHOP (C/EBP homologous protein) másnéven GADD153 (growth arrest and DNA damage-inducible protein 153) vagy DDIT3 (DNA damage-inducible transcript 3 protein) fehérje a C/EBP (CCAAT/enhancer-binding protein) fehérjecsald egyik tagja, amelyet a DDIT3 (DNA damage-inducible transcript 3) gén kódol. A 29 kDa méretű fehérjét 169 aminosav alkotja. Transzkripciós faktorként számos gént szabályoz, azok promóterében jelenlévő CAAT-box motívumhoz kapcsolódva (88). A CHOP egy celluláris stressz-szenzor molekula: normál körülmények között nagyon kis mennyiségben van jelen a citoplazmában, míg különböző fiziológia változások és celluláris stressz esetén indukálódik, nagymértékben expresszálódik, és a citoplazmából a nukleuszba kerül. A CHOP-ot többek között ER stressz, tápanyaghiány, DNS károsodás, sejtnövekedés gátlás, és hipoxia indukálhatja (89, 90). A CHOP expressziója stresszfolyamatok során leginkább transzkripciós szinten szabályozott. Ez a promóterében lévő ERSE (ER stress response element), CARE (C/EBP-ATF response element) és AARE (amino acid response element) szekvenciák segítségével történik, melyeket például az ATF4, az ATF6 és az XBP1 képesek serkenteni (91-93).

A fehérje N-terminálisán transzkripciós aktivációs/repressziós doménekből és egy C-terminális bázikus leucin-cipzár (bZIP) DNS-kötő doménből áll (94) (8. ábra). Az N-terminális régió doménjein több különböző foszforilációs hely található, melyeken keresztül szabályozható a CHOP. Például az AMPK α 1 és a SPOP (speckle-type POZ protein) ezen a régión foszforilálva serkenti a CHOP proteozomális degradációját (95,

96), illetve a p38 MAPK (p38 mitogen-activation protein kinase) is foszforilációval tudja itt serkenteni a CHOP transzaktivációs és apoptotikus működését (97).

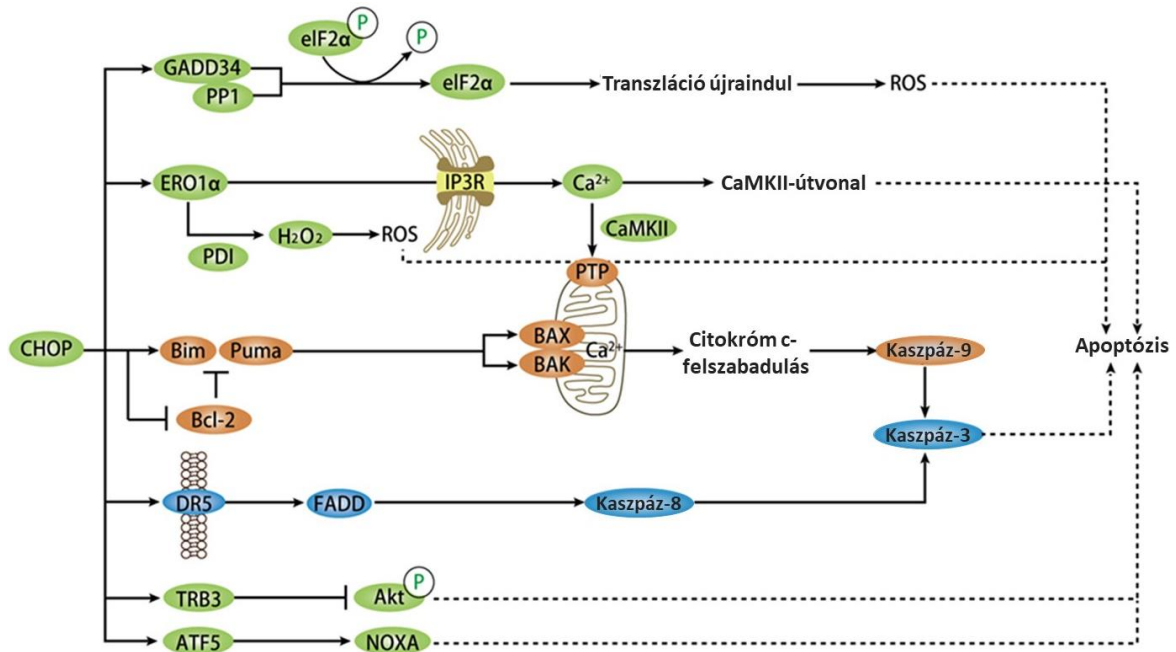


8. ábra: A CHOP fehérje szerkezete, doménjei.

A CHOP fehérje N-terminális transzkripciós aktivációs/repressziós doménjén a CHOP serkentéséért vagy gátlásáért felelős foszforilációs helyek találhatóak. A C-terminálison elhelyezkedő bZIP domén egy bázikus régióból és a szekvencia-specifikus DNS kötésért felelős leucin zippzár régióból áll (94).

A CHOP magasan konzervált bZIP doménjében a leucin cippzár régió a szekvencia specifikus DNS-kötés kialakításáért felel. A domén bázikus régiójának szerepe van a CHOP heterodimerizációjában más C/EBP fehérjékkel, illetve a CREB/ATF (activating transcription factor) fehérjecsald tagjaival (98, 99). A C/EBP transzkripciós faktorok a CHOP-pal heterodimerben más gének expresszióját tudják a CHOP-pal közösen serkenteni, mint amire önmagukban képesek (99).

A CHOP egyik legfontosabb funkciója, hogy transzkripciós faktorként serkenti az apoptotikus jelátvitelt: az intrinsic és az extrinsic apoptotikus útvonalakon is képes szabályozni (94) (9. ábra). Deléciós mutáns analízisek szerint a CHOP bZIP doménje szükséges az apoptózis aktiválásához (100, 101). Bár a CHOP számos útvonalon keresztül serkenti az apoptózist, bizonyos eredmények szerint az apoptózis teljes aktiválásához szükséges a CHOP ATF4-gyel való kooperációja is (102). A CHOP az intrinsic apoptotikus útvonalon hatva transzkripciós faktorként aktivátor és represszor hatást is kifejt. Számos pro-apoptotikus és anti-apoptotikus gén expresszióját szabályozza ER stressz során: például, képes gátolni az anti-apoptotikus BCL-2, BCL-XL, MCL-1 expressziót és serkenteni a pro-apoptotikus BIM-et, amely a BAK és Bax megnövekedett expressziójához vezet (103). A CHOP az apoptózis extrinsic útvonalát is szabályozza: tüdődaganatos és neuronális sejtekben (GCN5) kimutatták, hogy a CHOP kölcsönhatásba kerül a foszforilált JUN transzkripciós faktoral, és vele komplexet alkotva szabályozza promóterükön keresztül a DR4 és a DR5 halál-receptorok expresszióját (104). Emellett a CHOP a DR5 gén 5'-régiójához kapcsolódva is képes serkenteni a DR5 expressziót (105).



9. ábra: A CHOP számos jelátviteli útvonalra hatva indukál apoptotikus sejthalált. A CHOP képes az intrinsic és az extrinsic apoptotikus útvonalak működését is elősegíteni. Emellett más módon is okozhat apoptózist, ilyen lehet például a GADD34, az ERO1 α , a TRB3, vagy az ATF5 serkentése (94).

A CHOP a főbb apoptotikus útvonalakon kívül, más szabályozó elemekre való hatásával is serkentheti a programozott sejthalált. Például, stressz esetén a CHOP serkenti az ERO1 α gén expresszióját, amely működése ROS termelést indukál, a túlzott ROS keletkezés pedig apoptózishoz vezet (106). Emellett a CHOP, promóterén keresztül serkenti a GADD34-et, amely egyesülve a PP1 (phosphatase 1 protein) foszfatázzal defoszforilálja az eIF2 α -t, ezzel visszaállítva a transzlációt. Amennyiben a fehérjeszintézis növekedését a proteosztázis nem állítja helyre, a GADD34 serkentés további hibás fehérje-aggregátumok keletkezéséhez és ROS termeléshez vezet, amely elősegíti az apoptózist (107, 108).

A CHOP az apoptózis aktiválás mellett szerepet játszik aminosav éhezétség, ER stressz, vírus fertőzés, és hipoxia által indukált autofágiában is (94). Egy tanulmány szerint MEF (mouse embryonic fibroblast) sejtekben az aminosav éhezétség és ER stressz során a CHOP az ATF4-gyel heterodimerizálódva a p62, Nbr1, ATG7 autofágiás gének promóteréhez képes kötődni, míg önállóan az ATG10, GABARAP, ATG5-öt tudja ugyanilyen módon transzkripciósan serkenteni (86). Egy másik tanulmányban szintén MEF sejtekben, rövid ideig tartó leucin éhezétség hatására a CHOP az ATG6, az ATG7,

az ATG10, a Gabarap, az Nrb1 és a p62 autofágiás géneket promóterükhöz kötődve serkenti, miközben még nem kötődik az apoptotikus génekhez. Azonban az idő múlásával a CHOP működése átkapcsol: magas stressz esetén limitálhatja az autofágiás gének aktivitását, gátolja az autofágiás fluxust és az LC3 konverzióját, miközben a BIM és a PUMA apoptotikus gének transzkripcióját, így az apoptózist serkenti. A CHOP tehát molekuláris kapcsolóként is funkcionálhat az autofágia és apoptózis között (109). Más publikációk arról számolnak be, hogy a CHOP ER stressz során modulálja az autofagoszómák keletkezését, és az LC3-II aktiválódásra is pozitív hatással van (110, 111).

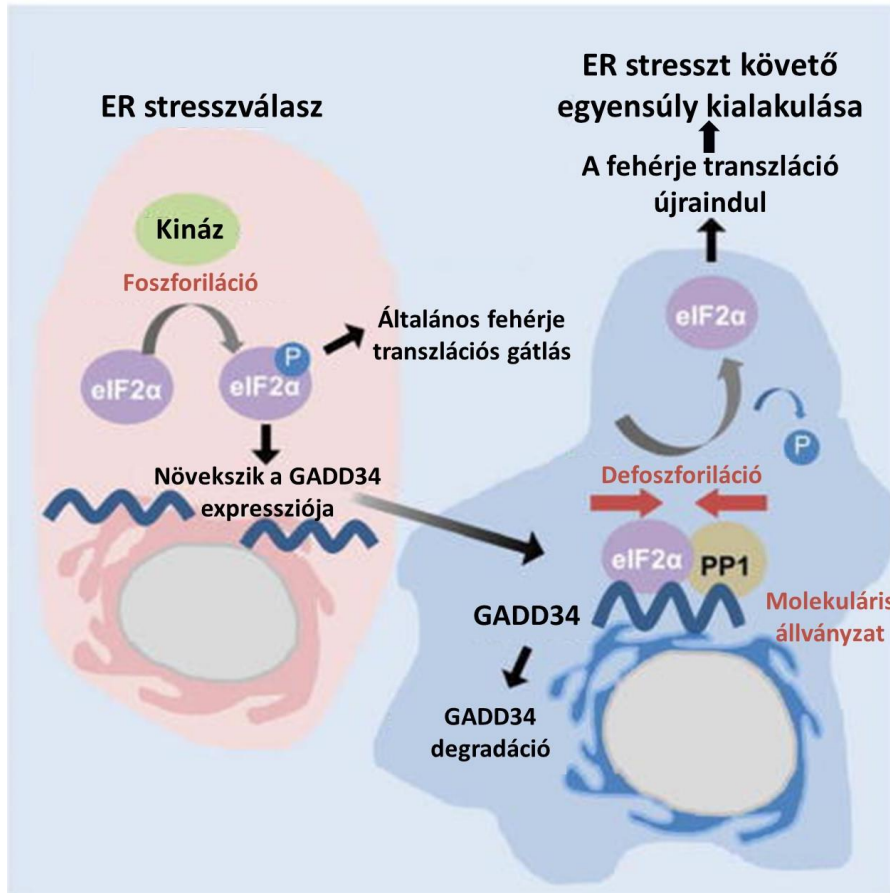
1.5.2.4. GADD34

Az emlősökben két eIF2 α foszfatázt ismerünk, melyek defoszforilálni tudják a foszforilált eIF2 α -t. Az egyik a CReP-PP1 (CReP/ Ppp1r15b: constitutive repressor of eIF2 α phosphorylation) holoenzim, amely folyamatosan expresszálódik, és leginkább az alap eIF2 α foszforilációt szabályozza, hogy biztosítsa ezzel a folyamatos fehérjeszintézist stressz hiányában. A másik foszfatáz a GADD34-PP1 holoenzim, amely celluláris stressz hatások esetén szünteti meg az eIF2 α foszforilációt (112). Azonban egy tanulmány szerint, stresszes körülmények esetén a GADD34 működését annak hiányakor a CReP is kiegészítheti (113).

A GADD34 (vagy Ppp1r15a) fehérje a GADD-géncsalád (growth arrest and DNA damage (GADD)-inducible) egyik tagja, amely az emberi szervezetben 674 aminosavból áll (114). Expresszióját többek között DNS károsodás, tápanyaghiány, endoplazmás retikulum stressz és más celluláris stresszfolyamatok indukálhatják (82, 115). ER stressz vagy aminosavhiány során a GADD34 C terminálisán kapcsolódva a PP1 foszfatáz katalitikus alegységéhez, azzal GADD34-PP1 komplexet alkot (10. ábra). A GADD34 a PP1-gyel komplexben holoenzimet képezve defoszforilálja a celluláris stresszfolyamatok során, a szerin 51-en foszforilálódott eIF2 α -t, így enyhíti a translációs gátlást, elősegítve a sejt energiaforrásainak megőrzését (82, 116).

A GADD34 fehérje nehezen meghatározható háromdimenziós szerkezete alapján az IDP (intrinsically disordered/unstructured protein) fehérjecsaládba tartozik (112). Az IDP fehérjék közös tulajdonsága, hogy nem képesek spontán módon stabil, meghatározott háromdimenziós sutruktúrát felvenni, hanem dinamikusan változhat a szerkezetük. Ez a

rendezetlen szerkezet előnyös lehet abban, hogy a jelátvitel során különböző partnereket, különböző térszerkezetben képesek megkötni (117). Ez magyarázatot ad a GADD34 rövid féléletidejére is, amely kevesebb mint egy óra, és lebontása proteaszomális módon történik (118, 119).



10. ábra GADD34-PP1 komplex működése, és az eIF2 α defoszforiláció hatása. ER stressz során az eIF2 α foszforiláció hatására megnőtt mennyiségű GADD34 fehérje képes a PP1-et megkötvén GADD34-PP1 komplexet alkotni. A GADD34 másik kötőhelyén az eIF2 α -t is megköti, és a GADD34-PP1 komplex defoszforilálja az eIF2 α -t (112).

A humán GADD34 a sejtben képes ingázni az ER és a citoszol között, egyenlő módon van jelen a sejt ezen két területén. Emellett a GADD34 jelenlétét igazolták még a mitokondrium membránban és Golgi készülékben is, membránhoz kötött formában. A GADD34 fehérje N-terminálisán egy ER-kötő amfipatikus hélixből, közepén négy központi PEST-ismétlődésből és C-terminálisán a PP1-kötő doménből áll (11. ábra). Az N-terminálisán jelenlévő amfipatikus hélix szabályozza az ER membránnal és a mitokondrium membránnal való kapcsolódását, illetve az ER-kapcsoltsága növeli proteaszomális lebontását is (119). A GADD34 PP1-kötő doménjén a KVRF-(Lizin,

Valin, Arginin, Fenil-alanin) és $\Phi\Phi$ -motívumok biztosítják a PP1 specifikus és szoros kötését, a PP1 hidrofób KVRF-kötőzsebével, illetve a PP1 78-as tirozinjaival való π -halmazó interakción keresztül (112). A PEST-szekvenciák olyan részletek a fehérjén, amely gazdag prolinban (P), glutaminsavban (E), szerinben (S) és threoninban (T), és általában a fehérjék lebomlása serkenthető velük (120). A GADD34-en található PEST-szekvenciák azonban nincsenek hatással annak stabilitására, viszont ezek alakítják ki a független kötőhelyet az eIF2 α számára. A GADD34 tehát mind a PP1-et mind az eIF2 α -t meg tudja kötni, így katalizálva az eIF2 α defoszforilációját (112).



11. ábra: GADD34 fehérje szerkezete, doménjei.

A GADD34 fő részei: az N-terminálison egy ER-kötő amfipatikus hélix, közepén négy központi PEST-ismétlődés és a C-terminálison egy PP1-kötő domén. A fehérje 674 aminosavból áll (112).

A GADD34 stressz során számos fehérjéhez kötődve szabályozza a jelátvitelt. Fontos szerepe van olyan folyamatokban, mint a sejtnövekedés gátlás, DNS károsodás esetén a sejtciklus gátlás, az autofágia, és az apoptózis (121-124). ER stressz és éhezés esetén több publikáció megerősíti azt, hogy a GADD34 az mTOR gátlásán keresztül képes az autofágia serkentésére (123-125). Emellett korábbi publikációkban a GADD34 apoptózis-indukáló hatását is kimutatták. Például, GADD34-overexpresszáló sejtekben ionizáló sugárzást követően szignifikánsan megnőtt az apoptózis, normál sejtekhez képest a kezelést követően, és a tanulmány arra következtet, hogy a GADD34 apoptózis aktiváló hatását az amino-terminális része segítségével fejt ki (126). Egy másik esetben olyan egerekben, amelyek csak katalitikusan inaktivált GADD34-et képesek termelni, veséjükbe injektált TM kezelés hatására kevésbé indukálódott apoptózis, mint a normál egerekben (107). Emellett újabb eredmények szerint májtumorsejtekben a GADD34 az MCL-1 pro-apoptotikus fehérje proteozomális lebontásának gátlásával segíti elő az apoptózist, míg egerek traumás agyi sérülését követő ER stressz és oxidatív stressz hatására a GADD34 a TRAF6-tal kapcsolódva az Akt-gátlásán keresztül serkenti az

apoptotikus sejthalált (127, 128). Ezek alapján, a PERK útvonal GADD34 elemének is hatása van mind az autofágiás, mind az apoptotikus folyamatokra.

1.5.3. ATF6 jelátvittele

Az ATF6 egy egymenetes II típusú transzmembrán fehérje, amely normál körülmények között az ER-ben helyezkedik el. Citoszolikus doménje egy bZIP transzkripciós faktort kódol, amely ER stressz során felszabadul (129). A nem megfelelően hajtogatódott fehérjék ER-ben való felhalmozódása miatt az ATF6 a Golgiba kerül és ott az SP1 és az SP2 proteázok hasítással alakítják át. Ez a folyamat az ATF6 citoszolikus doménjének felszabadulásához vezet (130), amely ebben a formában a nukleuszba kerülve, az XBP1-gyel együtt serkenti a CHOP és más olyan gének expresszióját, amelyek szerepet játszanak az ER méretének, fehérje-folding kapacitásának és az ERAD-nak szabályozásában is (131).

Az ATF6 inkább a túlélési folyamatokért felelős, például a CEBP/B-vel heterodimerizálódva képes elősegíteni az autofágiát, a DAPK1 (death-associated kinase 1) promóterének serkentésével, ami a Beclin-1 foszforilációhoz és az autofagoszómák keletkezéséhez vezet (132). Emellett az ATF6 a CHOP serkentésén keresztül hosszan tartó ER stressz esetén elősegítheti az apoptózist is (133).

1.6. Kapcsolatok az UPR elemei között

1.6.1. Kapcsolatok az UPR útvonalak között

Az előbbieket alapján, az UPR útvonal mindkét ága, a PERK és az IRE1 is fontos szabályozó szerepet tölt be ER stressz esetén az autofágia, és az apoptózis indukcióban, tehát esszenciálisak a sejt élet és halál közti döntési mechanizmus során. Emiatt érdemes megvizsgálni a két UPR ág közti keresztkapcsolatokat, és ezek hatását az autofágia és apoptózis folyamatokra.

Bizonyos tanulmányok már vizsgálták az IRE1 és PERK útvonal közötti kapcsolatokat, és ezek alapján a két jelátviteli ág működése nem teljesen független egymástól. Egy publikáció szerint tartós ER stressz során, az IRE1 gátlása esetén a PERK útvonal célgénjei (ATF4, CHOP, HSPA5) csökkent aktivitást mutattak. Ez alapján az IRE1 serkenti a PERK útvonal apoptózis induktorát, a CHOP-ot. Emellett ebben a

tanulmányban bizonyították még, hogy a PERK és az IRE1 pozitívan hat az autofágiás receptor gének (p62, Nbr1 és Nix) működésére is (134).

Érdekes megfigyelés még, hogy az UPR ágak külön-külön mért aktivitásának időtartama nagymértékben meghatározhatja a stresszre adott választ. Például az IRE1 (és ATF6) ágról megfigyelték, hogy visszafordíthatatlan, letális mértékű ER stressz esetén aktivitása lecsengett, miközben a PERK útvonal aktív maradt, és aktivitása ebben az esetben apoptózishoz vezetett (135). Egy másik tanulmányban az IRE1 ág gátlásával drasztikusan lecsökken a sejtek életképessége, apoptotikus sejthalál indukcióval (136), tehát az IRE1-ről feltételezhető, hogy erősebb hatással lehet a sejtek túlélésére és az autofágiára. Ezt megerősíti az is, hogy az aktív IRE1-nek RNáz aktivitása miatt, izogén humán sejtvonalakban citoprotektív szerepe volt, emellett a szelektíven, tartósan aktív IRE1 nem váltott ki sejthalált. Ezzel szemben a PERK jelátvittele ugyanilyen hosszú, krónikus ER stressz esetén sejthalálhoz vezetett (137).

Az UPR tehát egy olyan dinamikus hálózat, amely ágai közötti kapcsolatokkal finomhangolhatja a stresszre adott választ, miközben az UPR aktivitásának időtartama szintén meghatározhatja az ágak működését. Emellett képes lehet arra is, hogy egyik ágának gátlása esetén a másik útvonalán aktiválódhat, hogy kompenzálja a kiesést. Véleményünk szerint az IRE1 és PERK ágak fontos szerepet töltenek be ebben a folyamatban, mivel mindkét útvonalnak vannak elemei az autofágia és az apoptózis folyamatainak szabályozására. Emiatt érdemesnek tartjuk jobban megvizsgálni a két útvonal aktivitását, elemeik megfigyelésével, hogy szerepüket, dinamikai működésüket és kapcsolatukat jobban megértsük.

1.6.2. Molekuláris kapcsolatok a PERK útvonal elemei között

A PERK útvonal az egyik legintenzívebben tanulmányozott UPR ág, több eleme is képes befolyásolni az ER stresszválaszt az autofágia és az apoptózis folyamatainak szabályozásával. Mivel az egyes elemek közötti kapcsolatok is befolyásolhatják a stresszre adott választ, most bemutatjuk, hogy a PERK útvonalon belül milyen kapcsolatok ismertek, amelyeknek ER stressz során jelentősége lehet.

Az ER stressz során aktív PERK által foszforilált eIF2 α elősegíti az ATF4 transzlációját, amely ATF4 transzkripciósan serkenti a CHOP és a GADD34 fehérjéket is (83, 138). Egy

tanulmány szerint az ATF4 aktivitás kinetikája is befolyásolja a stresszválaszt: lassabb, fokozatosan aktiválódó kinetikával hozzájárul a sejt életképességéhez, míg az ATF4 gyorsabb és intenzívebb aktiválódása sejthalált okozhat (136).

A GADD34-ről már a korábbiakban ismertettük, hogy a PP1-gyel együtt defoszforilálja az eIF2 α -t (113). Emellett a GADD34 inaktiválása, kiütése, csendesítése vagy GADD34-inhibitorral való gátlása aminosav-éhezés, és ER stressz során is negatívan hatott a CHOP és az ATF4 fehérje és/vagy mRNS szintjére (82, 139-142) is, amely arra utal, hogy a GADD34 az eIF2 α defoszforilálás mellett ezekre is képes lehet valamilyen módon visszahatni ezen az útvonalon. Egy másik tanulmány szerint a GADD34 aktiválódása gátolt volt a tunicamycin-kezelt, és CHOP-kiütött sejtekben, míg a GADD34 gátlása negatívan hatott a CHOP aktiválódására celluláris stressz során (126).

Az ATF4 által aktiválódó CHOP pozitívan hat a GADD34 jelátvitelére: CHOP-kiütött MEF sejtekben TM kezelés hatására sokkal gyengébben aktiválódott a GADD34 (107). Egy másik tanulmány arról számol be, hogy az CHOP az ATF4-gyel közösen még hatékonyabb GADD34 serkentésre képes: MEF sejtekben az ATF4 és a CHOP közös overexpressziója sokkal nagyobb mértékben növeli a GADD34 mRNS aktivitását, mint csak az ATF4, vagy csak a CHOP overexpresszió esetén (102). A CHOP kiütésének, vagy gátlásának ATF4-re gyakorolt hatása nem annyira egyértelmű az irodalomban. Például, CHOP kiütött MEF sejtekben leucin-éhezés hatására nem változik az ATF4 fehérje mennyisége (143), míg CHOP-null hepatocitákban 24 órás tunicamycin kezelés alacsonyabb ATF4 aktivációt, és ennél hosszabb kezelés változatlan ATF4 fehérje aktiválódást okoz (144). Más publikációk a CHOP-hiányos egerekben ER stressz során alacsonyabb ATF4 mRNS szintekről (145), vagy CHOP KO MEF sejtekben, alacsonyabb ATF4 fehérje aktiválódásról számoltak be (146). A különféle eredmények miatt, érdemesnek tartjuk tisztázni a CHOP esetleges hatását az ATF4-re, illetve jobban megvizsgálni az ATF4, CHOP és GADD34 közötti kapcsolatokat.

2. CÉLKITŰZÉSEK

ER stressz esetén a sejtekben egy fontos döntéshozó folyamat történik, amelyet az UPR útvonalai irányítanak. Az UPR az autofágia indukálásával hozzájárul a sejt túléléséhez, azonban a tartós, visszafordíthatatlan ER stressz során apoptotikus sejthalált indukál. Az autofágia és az apoptózis szabályozásának már számos eleme ismert. Az azonban még mindig nem egyértelmű, hogy az UPR ágak pontosan hogyan alakítják a sejt azon döntését, hogy adott mértékű ER stressz melyik stresszválaszt aktiválja majd. Ezért munkánk során szeretnénk jobban megérteni az UPR szabályozási hálózat működését, és annak minőségi leírást adni ER stressz során, felfedve a még nem ismert mechanizmusokat. Kiemelt hangsúlyt helyezünk a PERK és az IRE1 útvonalak vizsgálatára és a köztük lévő kapcsolatokra. PhD kutatásom során az alábbi célokat tűztük ki:

- I. Az első lépés a korábban már HepG2 sejtvonalon vizsgált ER stressz szintek újbóli beállítása, a könnyebben transzfektálható HEK293T sejtvonalra. Tunicamycin és thapsigargin stresszorokkal olyan kezelési koncentrációkat és időket keresünk, ahol a tranziens autofágia aktiválódást követően az apoptotikus sejthalál aktiválódása is vizsgálható. A beállítást követően a következő kérdésekre keressük a választ:
 - Milyen hatással van a PERK útvonal gátlása magas szintű ER stressz esetén a sejtek életképességére, az autofágia és az apoptózis folyamatokra és az IRE1 útvonalra?
 - Milyen kapcsolatok vannak jelen a PERK és az IRE1 útvonalak között és ezek hogyan alakítják ki magas szintű ER stressz esetén a sejt stresszre adott választát?
- II. A következőkben arra vagyunk kíváncsiak, hogy az UPR egy útvonala, a PERK hogyan valósítja meg azt, hogy inkább az autofágia vagy inkább az apoptózis induktorra hat erősebben. Ennek vizsgálata során a következő kérdések merültek fel:
 - Megfigyelhető-e az UPR ágak közötti működéshez hasonló szabályozási kinetika az egyes útvonalakon belül is?
 - Milyen kinetikával aktiválódnak mRNS és fehérje szinten a PERK kulcselemei (ATF4, CHOP, GADD34) alacsony és magas szintű ER stressz esetén?

- Hogyan változik magas szintű ER stressz során a kulcselemek aktiválódási kinetikája az egyes elemek gátlása esetén?
- Vannak-e még nem ismert kapcsolatok, visszacsatolási hurkok a PERK útvonal kulcselemei között, és ezek hogyan befolyásolják az ER stressz döntési mechanizmusát?

III. A továbbiakban elméleti biológiai eszközökkel történő vizsgálatokat terveztünk kivitelezni, a sejt élet-és-halál közötti döntésének tanulmányozására ER stressz során. Ezekre a kérdésekre kerestük a választ:

- Mi az ER stressz szenzorok közötti visszacsatolási hurkok szerepe az autofágia és apoptózis folyamatok szabályozásában?
- Hogyan tudjuk ezt az elméleti biológia eszközeivel modellezni, és ez alapján milyen következtetésekhez juthatunk?
- A GADD34 és a CHOP fehérjék kiütése hogyan hat a stresszválasz mechanizmusára?
- Hogyan használhatjuk a modellünket egy predikciós vizsgálatra, előre megjósolva egy kísérlet kimenetelét?

3. MÓDSZEREK

3.1. Sejtvonal és kezelések

Kísérleteinkhez modell rendszerként humán hepatocita karcinóma (*HepG2*), és humán embrionális vesetubulus sejtvonalat használtunk (*HEK293T*, *ATCC*, *CRL-3216*), amelyet DMEM tápfolyadékban tenyésztettünk (*Life Technologies*, *Carlsbad*, *CA*, *USA*, *41965039*), kiegészítve 10% magzati borjú szérummal (*Fetal Bovine Serum*, *Life Technologies*, *10500064*) és 1% antibiotikum-antimikotikum oldattal (*Gibco™ Antibiotic-antimycotic 100X*, *Life Technologies*, *15240062*, amely törzsoldat 10 000 egység/ml penicillint, 10 000 µg/ml streptomycint, és 25 µg/ml of *Gibco Amphotericin B-t* tartalmaz). A sejtek passzálása a tápfolyadék eltávolítását, majd 1x-es steril PBS-oldattal (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, pH=7,4) való mosást követően tripszines emésztéssel történt (*Trypsin-EDTA (0.25%)*, *phenol red*, *Gibco™*), mivel mind a HEK293T, mind a HepG2 felülethez tapadó sejtvonalak. A tripszines emésztés után másik steril szövettényésztő edénybe továbbvéve, friss tápfolyadékban kihígítottuk a sejteket. A sejtek a tenyésztésükhöz és kezeléshez használt steril edényekben, szövettényő inkubátorban voltak fenntartva 37 °C-on, 95% levegő és 5% CO₂ gázösszetételben.

A sejtek kezelését a következő kereskedelmi fogalomban kapható anyagokkal végeztük: thapsigargin (*Sigma-Aldrich*, *St. Louis*, *MO*, *USA*, *T9033*), tunicamycin (*Sigma-Aldrich*, *T7765*), és guanabenz (*Sigma-Aldrich*, *G110*). A fehérje vagy RNS izolálás céljából végzett kezelések előtt a sejteket mindig 6 lyukú lemezekben, legalább 20 órán keresztül növesztettük, hogy letapadjanak, majd megkezeltük őket a megfelelő stresszorokkal. A thapsigargin kezelés 0,1 és 10 µM koncentrációkban, a tunicamycin kezelés 1 és 100 µM koncentrációkban, a guanabenz előkezelés pedig 50 µM végkoncentrációban történt.

3.2. Életképességi vizsgálat: Cell Titer Blue Assay

A sejtek életképességét a Cell Titer Blue (*Promega*, *G8080*) reagens segítségével vizsgáltuk. A sejteket 96 lyukú sejttényésztő mikrolemezekben (100-100 µl térfogatban) tenyésztettük a letapadáshoz szükséges körülbelül 20 órán keresztül, majd elvégeztük a kezeléseket a különböző stresszorokkal. A kezelés lejárta után 2 órán keresztül inkubáltuk

a sejteket (20-20 μ l) resazurin-oldattal. A resazurin-resorufin átalakulás mértékét abszorbancia-méréssel detektáltuk 570 nm hullámhosszon, 600 nm referencia hullámhosszon. A reagensben lévő szubsztrátot, a resazurint az élő sejtek resorufin-ná redukálják. Az átalakult szubsztrát elnyelési maximuma eltérő, így spektrofotométerben abszorbanciát mérve detektálható ez a különbség. Negatív kontrollként 100 μ l üres médium + 20 μ l reagens elegyét alkalmaztuk, a méréseket négy biológiai párhuzamossal végeztük.

3.3. Sejtszámolás

A kezelések lejárta, és tripszin segítségével történő szuszpendálást követően a sejtek relatív mennyiségét automata sejtszámlálóval lemértük (*LUNA Automated Cell Counter, Logos Biosystems*). A sejtszámlálás a sejtek tripánkék oldattal (0.4% *trypan blue, Logos Biosystems*) való megfestése után történt, amelyhez a sejtsuszpenziót 1:1 arányban kevertük tripánkék oldattal.

3.4. Apoptózis assay: Apo-ONE® kaszpáz 3/7 próba

A kaszpáz3- és kaszpáz-7 aktivitásokat az Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 Assay (*Promega, G7790*) fluoreszcens apoptózis próba segítségével határoztuk meg. A HEK293T sejteket fluoreszcencia mérésre alkalmas fekete színű, és átlátszó aljú 96-lyukú sejtenyészítő mikrolemezekben tenyésztettük a 3.2 fejezethez hasonlóan, 20 órán keresztül. A megfelelő kezeléseket követően a sejteket tartalmazó médiumhoz azzal 1:1 térfogati arányban Apo-ONE® reagenst adtunk. Ezután 300 rpm-en, 30 másodpercig tartó óvatos rázatást követően a mikrolemezeket szobahőmérsékleten inkubáltunk 3 órán keresztül, majd CLARIOstar® Plus Microplate Reader használatával 487 nm excitációs és 535 nm emissziós hullámhosszokon mértük le a fluoreszcenciát (az „enhanced dynamic range” opció használatával). Az assay során a Z-DEVD-R110 kaszpáz szubsztrát a kaszpáz-3 és kaszpáz-7 által hasítódik apoptózis esetén, és ekkor fluoreszcens termék, a Rhodamine 110 keletkezik. A minták fluoreszcencia intenzitása egyenesen arányos a kaszpáz 3/7 enzimaktivitásokkal. A mérést három párhuzamos méréssel végeztük. A minták fluoreszcens intenzitásából kivontuk a vak minták fluoreszcens intenzitásának átlagát, ezt leosztva a kontrol minták fluoreszcencia átlagával megkaptuk

a relatív fluoreszcencia értékeket. Ezeket átlagolva az Excel táblázatban ábráztuk a relatív kaszpázaktivitás értékeket.

3.5. Nátrium-dodecil szulfát gélelektroforézis (SDS-PAGE) és western blot analízis

A sejtekből 1x-es PBS-sel történő mosást követően RIPA pufferben (*összetétel: 20 mM Tris, 135 mM NaCl, 10 v/v% glicerin, 1 v/v% NP40, 1 v/v% proteázgátló, pH 6.8*) teljes fehérjét izoláltunk. A sejtizátumok fehérjekoncentrációját Pierce BCA Protein Assay (*Thermo Scientific, 23225*) használatával állapítottuk meg, a reakció lezajlását követően az abszorbanciát 562 nm hullámhosszon Thermo Scientific multititer platereader használatával detektáltuk. A minták előkészítése, denaturálása a minták 5x-ös mintaelőkészítő pufferrel (*összetétele: 0,05 w/v % brómfenolkék, 50 v/v% glicerin, 25 mM Tris-HCl; 10 w/v% SDS, 6,67 v/v% 2-merkaptoetanol, pH 6,8*) való hígítással történt, amelyet 95 °C-on, 10 perces inkubáció követett.

A fehérjeminták minimum 20 µg-ját 10 illetve 15%-os SDS-poliakrilamid géleken választottuk el SE250 Mighty Small II Mini Vertical Protein Electrophoresis Unit (*Hofer*) futtatókészülék segítségével. A fehérjéket ezután TE22 Mighty Small Transfer Tank (*Hofer*) transzfer készülékben 0,45 µM pórusátmérőjű PVDF membránokra (*Millipore*) transzferáltuk.

A CHOP detektálása esetén a transzfert követően a PVDF membránt glutáraldehid oldattal (*Glutaraldehyde solution Sigma-Aldrich, G5882*) kezeltük a következő módon: a membrán gyors 1x-es PBS oldatos mosását követően a PBS-ben 0,15 v%-osra hígított glutáraldehid oldattal a membránt sötét dobozba rakva inkubáltuk 10-15 percig, majd háromszor 5 perc 1x-es PBS-es mosást követően a blokkolástól kezdve folytattuk a western blot következő lépéseit. A glutáraldehides kezeléssel a kisméretű és nagyon savas karakterű CHOP fehérjét keresztkötésekkel a membránhoz fixáltuk, ezzel megelőzve annak membránról való lediffundálását a tej oldatban való inkubációs lépések során (147).

A membránok blokkolása 5% w/v-os zsímentes tej-oldatban (*összetétel: 2 g zsírszegény tejpör, 40 ml TBS Tween oldatban feloldva; TBS Tween oldat: 950 ml desztillált víz, 50 ml 20X TBS, 850 µl Tween-20*), 1 w/v%-os BSA-oldatban (*összetétel: 0,1 g BSA, 10 ml*

TBS-Tween oldatban feloldva), vagy zselatin oldatban (összetétel: 15 ml 1 M Trisz (pH 7,5), 7,6 g NaCl, 2 ml 0,5 M EDTA, 1 g zselatin, 1 ml Triton X, 200 µl NaN₃, 980 ml desztillált vízben feloldva) történt.

1. táblázat: A western blot során használt elsődleges antitestek.

A táblázat tartalmazza az elsődleges antitestek elnevezését, funkcióját, a használt másodlagos antitest típusát, a blokkoló és inkubáló oldatokat, és az elsődleges antitestek gyártóját katalógusszámmal.

Funkció	Antitest	Koncentráció	Másodlagos antitest	Blokkoló és inkubáló oldat	Antitest gyártó és katalógusszám
autofágia marker	MAP-LC3β (=LC3)	1:750	anti-mouse	tej	SantaCruz, sc-376404
	<i>p62</i>	1:1000	anti-rabbit	tej	Cell Signaling, 5114S
apoptózis marker	PARP	1:1000	anti-rabbit	tej	Cell Signaling, 9542S
	Caspase-3	1:250	anti-mouse	tej	SantaCruz, sc-7272
PERK útvonal markere	PERK	1:1000	anti-rabbit	tej	Cell Signaling, 3192S
	P-eIF2α (Ser51)	1:750	anti-rabbit	zselatin	Cell Signaling, 9721L
	eIF2α	1:750	anti-rabbit	tej	Cell Signaling, 9722S9
	ATF4	1:1600	anti-rabbit	tej	Proteintech, 10835-1-AP
	GADD34	1:1600	anti-rabbit		Proteintech, 10449-1-AP
	CHOP/GADD153	1:250	anti-rabbit	zselatin	SantaCruz, sc-7351 vagy
		1:1600	anti-rabbit	tej	Proteintech, 15204-1-AP
	ATF4	1:250	anti-rabbit	tej	Poteintech, 10835-1-AP
IRE1 útvonal markere	P-c-Jun	1:250	anti-rabbit	zselatin	Cell Signaling, 9261S
	c-Jun	1:250	anti-rabbit	tej	Cell Signaling, 9165S
Háztartási gén	GAPDH	1:8000	anti-mouse	tej	Santa Cruz, 6C5

A membránokat az elsődleges antitestekkel egy éjszakán keresztül 4 °C-on inkubáltuk. Az elsődleges antitestek 1 w/v% tej-oldattal, 1 w/v % BSA-oldattal vagy zselatin-oldattal lettek hígítva, antitesttől függően 1:250-1:8000 arányban. Az antitestek pontos használatát az 1. táblázat írja le. A minták közti egyelő fehérjemennyiség a GAPDH háztartási gén antitestjével volt leellenőrizve.

A detektálás a HRP-konjugált másodlagos antitestek (*SantaCruz, sc-2020, and Cell Signaling, 7074S, 7076S*) kapcsolását, és a megfelelő mosási lépéseket követően, kemilumineszcens elven működő reagens hozzáadásával (*Thermo Scientific SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate kit*), fényérzékeny filmen, sötét szobában történt.

3.6. RNS interferencia/géncsendesítés

Bizonyos gének (PERK, CHOP) mennyiségének csökkentését az RNS interferencia elvén működő siRNS-ekkel végeztük. Az siRNS transzfektálása Lipofectamine RNAi Max transzfekciós reagens (*Invitrogen, Carlsbad, CA, USA*), antibiotikum-mentes, szérum-redukált tápfolyadék (*GIBCO™ Opti-MEM I (GlutaMAX™-I) Reduced-Serum Medium liquid, Invitrogen*) és 20 pmol/ml siRNS koncentrációban történt. A siPERK oligonukleotidok (*Eurofins Genomics*) szekvenciája: 5'-GUGACGAAAUGGAACAAGA(dTdT)-3', míg a CHOP siRNS-ek előre tervezett siRNS-mixből álltak (*DDIT3-Silencer Pre-Designed siRNA, Ambion, AM16708*), amely szekvenciáját a gyártó nem közölte. A csendesítés előtt 24 órával 6 lyukú lemezekon mintánként 200 000 db sejtet tenyésztettünk, majd a siRNS-Lipofectamine™ RNAiMAX komplex hozzáadása után, 24 órán át inkubáltuk a transzfekciós reagenssel a sejteket. A kezeléseket ezt követően végeztük.

3.7. RNS izolálás, reverz transzkripció PCR és real-time PCR

A kezelt sejtekből totál RNS-t TRIzol-kloroform extrakcióval (148) izoláltunk (*TRIzol RNA isolation reagent, Invitrogen; Kloroform 102445, Merck Millipore*). Ezután az RNS épségének vizsgálata agaróz gélen való futtatással történt, majd a nukleinsav-koncentráció meghatározását NanoDrop2000 UV calculator segítségével végeztük. Végül az mRNS-eket reverz transzkripcióval cDNS-sé írtuk át a SuperScriptIII First-Strand Synthesis System (*18080051, Invitrogen*) reverz traszkripció kit segítségével.

Az XBP1 és a GAPDH gének PCR termékeinek amplifikálása hagyományos PCR-rel történt, *Thermo Scientific™ (2X) PCR Master Mix (amelynek tartalma 0,05 U/liter Taq DNA polymeráz, reakciópuffer, 4 mM MgCl₂, 0.4 mM dNTP)* és saját tervezésű primerek használatával. A primerek tervezése az Ensemble (<https://www.ensembl.org/index.html>), az NCBI primer blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) adatbázisok és az az IDT Oligo analizer 3.1 segítségével történt. Használat előtt a primerek ellenőrzését és a betapadási hőmérséklet beállítását gradiens PCR-rel végeztük. A felhasznált primerszekvenciákat és azok betapadási hőmérsékletét az 2. táblázat tartalmazza. A PCR termociklusa a következő volt: 95 °C 10 perc (1x), (95 °C 30 másodperc, primer betapadási hőmérséklet 45 másodperc, 72 °C 30 másodperc) (40x), 95 °C 5 perc (1x), 55 °C 1 perc, 97 °C 30 másodperc (1x).

2. táblázat: A tervezett primerek adatai.

A táblázat tartalmazza primerszekvenciákat, a betapadási hőmérsékleteket és az amplifikált PCR termékek méretét.

gén neve	PCR termék		betapadási hőmérséklet (°C)
	mérete (bp)	primer szekvenciák	
XBP1	XBP1u: 441	Fw: 5' -CCTTGTTAGTTGAGAACCAGG - 3'	57
	XBP1s: 415	Rev: 5' - GGGCTTGGTATATATGTGG - 3'	
PERK	130	Fw: 5'-AAAGCAGTGGGATTTGGATG-3'	58
		Rev:5'-TCTTGGTCCCCTGGAAGAG-3'	
GADD34	109	Fw: 5'-GACCTGTGATCGCTTCTGG-3'	60,2
		Rev: 5'-TAGCCTGATGGGGTGCTT-3'	
CHOP	95	Fw: 5' - CAGAGCTGGAACCTGAGGAG - 3'	58,2
		Rev: 5' - TGGATCAGTCTGGAAAAGCA - 3'	
ATF4	159	Fw: 5' - CTCATGGGTTCTCCAGCGAC-3'	58
		Rev: 5' - GGGCATCCAAGTCGAACTCC-3'	
GAPDH	70	Fw:5'-TGCACCACCAACTGCTTAGC-3'	58
		Rev: 5'-GGCATGGACTGTGGTCATGAG-3'	

Az XBP1 és GAPDH PCR termékeket 3% és 2% sűrűségű agaróz géleken választottuk el, majd UV fény alatt detektáltuk, a Gel-Doc XR+ gél dokumentációs berendezés segítségével. A GAPDH a cDNS minták közti esetleges koncentráció-különbségek, a cDNS minőségének ellenőrzésére szolgált, az XBP1 kiértékeléshez nem volt felhasználva.

A PERK, CHOP, ATF4, és GADD34 gének mennyiségi vizsgálatára real-time PCR-t végeztünk. A housekeeping gén a GAPDH volt minden gén vizsgálata esetén. A PCR reakció és detektálása PowerUp SYBR Green Master Mix (*Thermo Fisher Scientific*, A25742) és QuantStudio 12K Flex System (*Thermo Fisher Scientific*) használatával történt. A qPCR-hez felhasznált primerek szekvenciáit az 2. táblázat tartalmazza. A valósidejű PCR termociklusai a következők: 95 °C 10 perc (1x), 95 °C 15 másodperc, 60 °C 1 perc (40x), 95 °C 15 másodperc, 60 °C 1 perc, 97 °C 15 másodperc (1x).

3.8. A matematikai modellezés és a rendszerbiológiai megközelítés

A szabályozó hálózatokat egy sor nemlineáris differenciálegyenletbe fordítottuk le és a dinamikus rendszerbiológia eszközeivel vizsgáltuk. Ennek elve, hogy a biológiai szabályozási hálózatok közönséges differenciálegyenletekkel leírhatók, amelyek segítségével jellemezhetjük a hálózatban az egyes szabályozó elemek koncentrációjának vagy aktivitásának időbeli változásait. Egy komponens változásának sebességét a biokémiai reakciókinetikán alapuló közönséges differenciálegyenlet (ODE) írja le (lásd az alábbi egyenletet).

$$dX_a/dt = k_s + k_{act}*(X_T - X_a) - (k_d + k_{in})*X_a$$

Ahol:

X_a : az aktív X komponens koncentrációja

X_T : az X komponens teljes koncentrációja

k_s : az X komponens szintézisének sebességi állandója

k_{act} : az X_a komponens aktivációjának sebességi állandója

k_d : az X komponens degradációjának sebességi állandója

k_{in} : az X_a komponens inaktivációjának sebességi állandója

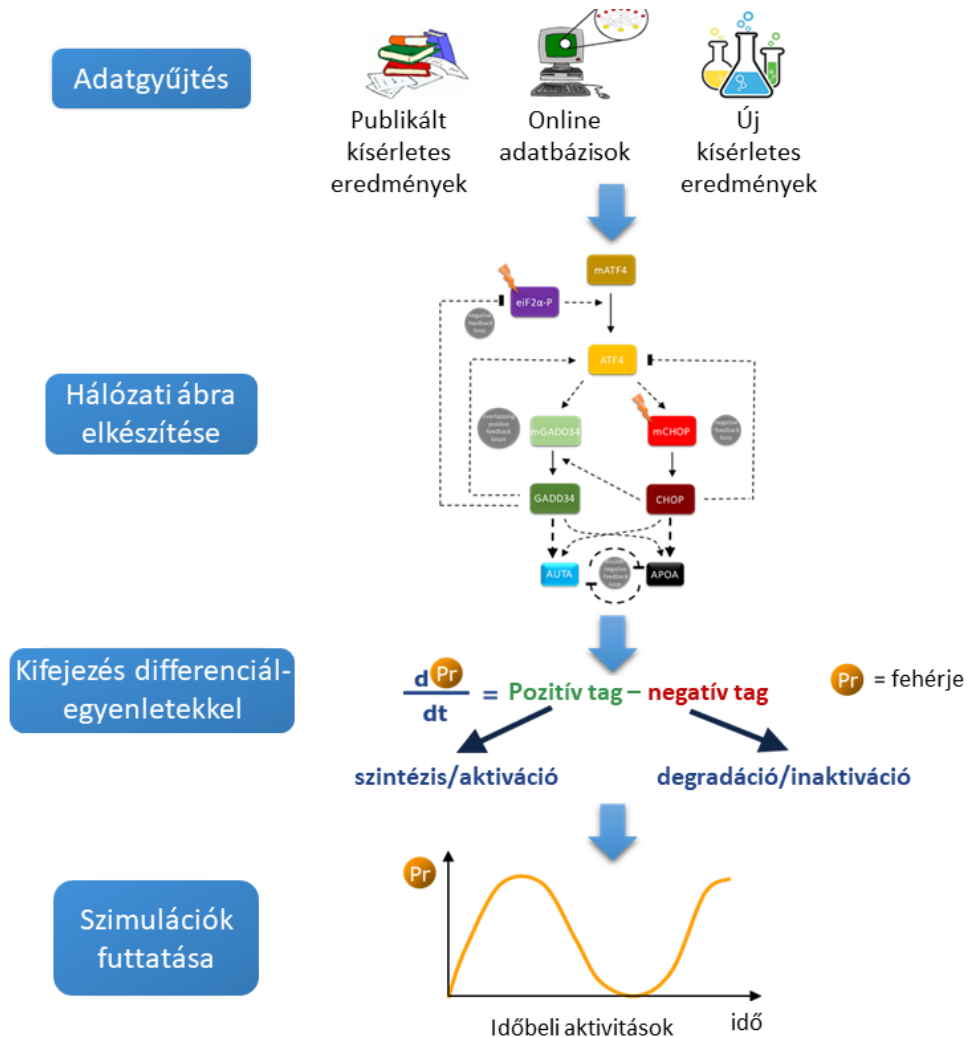
A biokémiai reakciókban részt vevő komponensek az alább bemutatott differenciálegyenletekkel jellemezhetőek (149, 150). Egy szabályozóelemet leíró általános differenciálegyenlet két részből áll: egy pozitív (képződési) és egy negatív (lebontási/felhasználási) tagból. A sejtes fehérje-fehérje szabályozási hálózatok esetén a képződési tag jelentheti a fehérjék vagy a gének szintézisét (például transzkripció, transláció) és/vagy az aktiválódásukat (például poszt-transzlációs módosítások). Emellett, a negatív tag bevitelével jelölhetjük a fehérjék lebontását és/vagy inaktiválódását. A szintézisek, és a degradációs reakciók általában tömeghatás kinetikával, míg a fehérje aktivitások a tömeghatás kinetika mellett Michaelis-Menten kinetikával is leírhatók (151-153).

A nem-lineáris differenciálegyenletek megoldása megadja a relatív fehérjekoncentrációk/fehérjeaktivitások változását az időben, ezért ezek időbeli ábrázolásával az aktivitásváltozás görbét kapjuk meg. Emellett, a közönséges differenciálegyenletek segítségével megadhatjuk a bejövő-kimenő kapcsolatokat ábrázoló jel-válasz görbéket (ún. egyparáméteres bifurkációs diagramokat) (150, 151, 154). A bejövő jel egy olyan jel erősség, amelynek változása megadja a szabályozó rendszer viselkedését az egyensúlyi állapot esetén. Ennek segítségével rögzíthetők a rendszer viselkedésének minőségi változásai. Amikor például a jelerősség egy alacsony értékről egy magas értékre ugrik, a rendszer viselkedése hirtelen, nem folytonos módon változhat meg. Azt a pontot, ahol a rendszerben ilyen minőségi változás következik be, bifurkációs pontnak nevezzük (150).

A modellben a paraméter értékek és a kezdeti feltételek úgy lettek megválasztva, hogy megfelelően szemléltessék az összes lehetséges minőségi viselkedést, amelyet a hálózat mutathat (ld. Mellékletek). A sebességi állandók (k) mértékegysége perc^{-1} , a Michaelis állandók (J) pedig dimenzió nélküliek. A fehérje szintek/aktivitások önkényes egységekben lettek megadva.

A dinamikus szimulációkat az XPPAUT program segítségével végeztük, amely ingyenesen elérhető a következő honlapról:

<http://www.math.pitt.edu/~bard/xpp/xpp.html>. Az 1-4. Mellékletek a disszertáció összes XPP kódját tartalmazzák, fejezetenként lebontva.



12. ábra: Sematikus ábra a rendszerbiológiai megközelítés egyes lépéseiről.

A rendszerbiológiai megközelítés az elméleti és a molekuláris biológiai technikák egyidejű alkalmazását jelenti. Adatgyűjtés után létrehozunk egy hálózati ábrát, amelyet differenciálegyenletekkel kifejezünk, majd a modelleket a különböző elemek működésének szimulációjára használjuk fel.

A rendszerbiológiai megközelítés azt jelenti, hogy egyidejűleg használjuk az elméleti és a molekuláris biológiai technikákat a sejtes stresszválasz mechanizmus dinamikai működésének megértéséhez (12. ábra). A kísérleti eredmények elkészítése mellett a bemutatott matematikai modellel való megközelítéssel próbáljuk megmagyarázni a szabályozási hálózat jellemző tulajdonságait. Emellett, a szakirodalom és online adatbázisok segítségével, már létező kísérleti eredményeket is felhasználunk. Ezután az adatok segítségével létrehozunk egy statikus hálózati ábrát, amelyet

differenciálegyenletekkel jellemzünk, hogy rögzítsük a rendszer dinamikáját. A modelleket ezek után a különböző elemek hatásának szimulációjára használjuk fel.

3.9. Statisztika

A western blot-os eredmények az ImageJ szoftver segítségével lettek kiértékelve. A relatív denzitás értékek a megfelelő GAPDH referencia fehérje, vagy a foszforilált fehérjék totál formáinak denzitásához (eIF2 α -T, c-Jun-T) lettek normalizálva. Minden kísérletet három párhuzamos mérésben végeztünk el. A diagramok eredményei is minimum három párhuzamos kísérlet átlagai, ahol a hibaszórást az tapasztalati szórást (SD) mértéket jelöli. A szignifikanciát egytényezős variancia-analízissel (ANOVA) vizsgáltuk meg. A statisztikailag szignifikáns eltéréseket csillagokkal jelöltük, ahol * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, illetve ns: nem szignifikáns.

4. EREDMÉNYEK

4.1. Az autofágia és apoptózis kapcsolatának vizsgálata ER stressz során

A kutatócsoportunk már korábban megvizsgálta a sejtek döntési mechanizmusának alapjait ER stressz esetén. Ilyen esetekben a sejtek azt mérlegelik, hogy számukra az ER stressz még kiküszöbölhető-e, vagy már helyrehozhatatlan károkat okozott (31). A sejteknek ezt az élet-és-halál közötti döntési mechanizmusát a szabályozási hálózat komplikált fehérje-fehérje kölcsönhatásai hozzák létre, amelynek pontos működése még feltérképezésre vár. Ennek a folyamatnak megismerésébe a tudományos diákköri munkám során kapcsolódtam be, amelynek eredménye egy tudományos publikáció lett (31). Mivel a további kutatásaimnak ez a tanulmány az alapja, ezért szeretném ennek a legfontosabb eredményeit nagyvonalakban ismertetni.

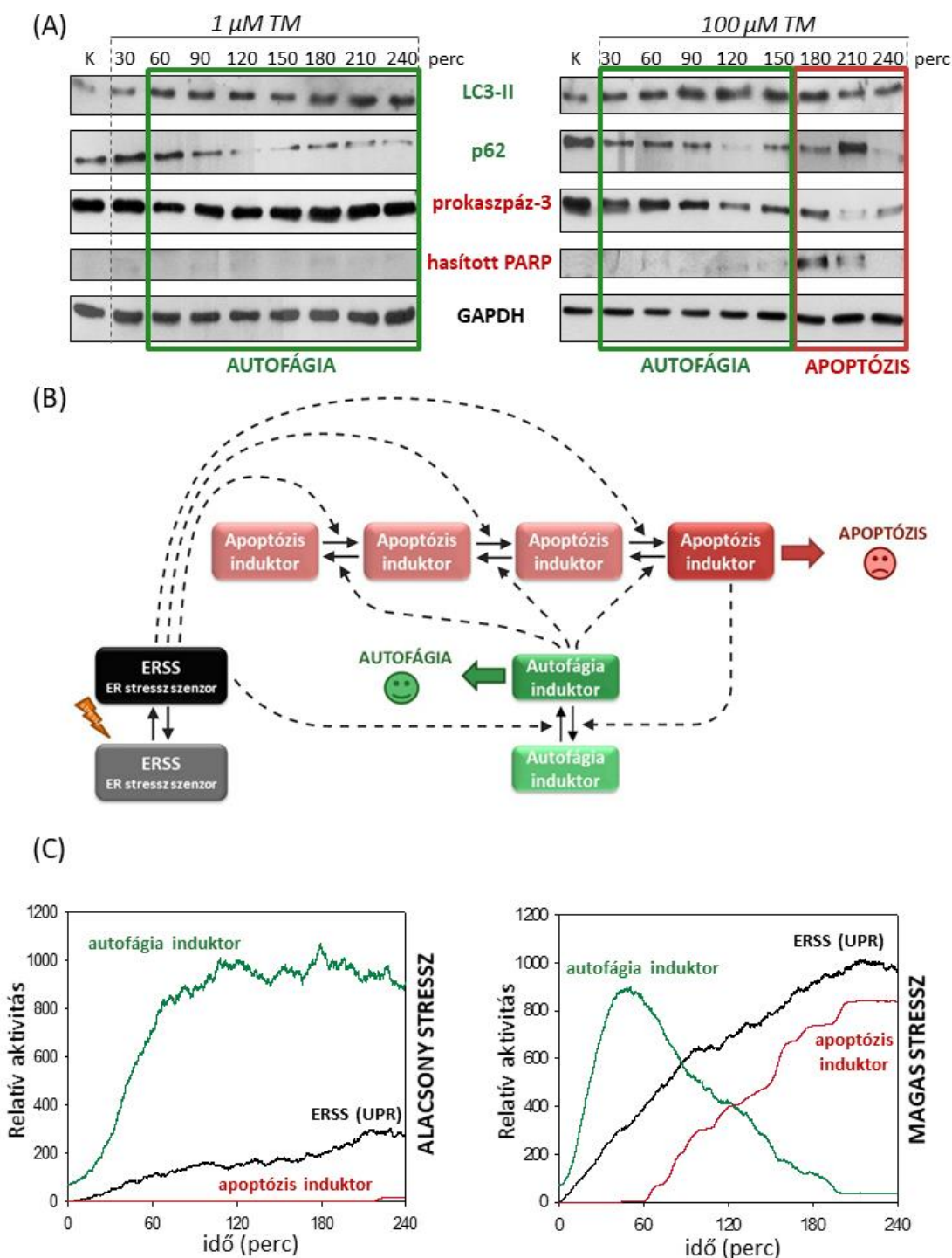
A kísérleteket HepG2 sejteken végeztük, különféle ER stresszorokkal (úgy mint tunicamycin, thapsigargin, dithiothreitol). A tunicamycin (TM) egy olyan természetes antibiotikum, amely az ER-ben a glikoproteinek N-kapcsolt glikozilációját gátolva károsítja a fehérjeérés folyamatát, ezzel ER stresszt okoz (155). A thapsigargin (TG) blokkolja az ER kalcium-pumpáit, a szarko/endoplazmatikus Ca^{2+} -ATP-ázokat (SERCA), és így kiüríti az ER-ből a kalciumot, míg a citoszolban emelkedett Ca^{2+} -szintet okoz (156). Ezzel a thapsigargin ER stresszt okoz, és így az autofágia és apoptózis folyamatok indukálására is alkalmas (157, 158). A dithiothreitol (DTT) egy erős redukáló ágens, emiatt szintén alkalmas az ER stressz generálására, mivel az ER lumenben tönkreteszi az oxidatív fehérje foldingot (159). Mivel mindhárom esetben hasonló eredményeket kaptunk, így most csak a tunicamycin-nel történt kezelések eredményeit mutatom be.

A kísérletek során, a kezelési koncentrációk és idők megfelelő megválasztásával, beállítottunk egy ún. „alacsony” (vagy más néven tolerálható) és egy ún. „magas” (vagy más néven nem tolerálható) ER stressz szintet. Alacsony szintű ER stressz – a magas szintű ER stresszel ellentétben – még nem hat negatívan a sejtek életképességére. TM esetében ezek a koncentrációk 1 és 100 μ M-ok voltak, majd időben követtük a sejtek stresszre adott válaszát. A HepG2 sejteket 30 percenként kezeltük 240 percig, majd a

sejtekből fehérje izolálást követően az autofágia és az apoptózis indukcióját a markereik segítségével, western blot-tal vizsgáltuk meg (13.A ábra). Az autofágia detektálásra az LC3-II formájának növekedését, illetve a p62 fehérje csökkenését követtük nyomon. Az LC3-II az autofagoszómák membránjához kötődve fontos szerepet játszik azok növekedésében és érésében, ami miatt az LC3-II szintjének növekedése autofágia jelenlétére utal (160). A p62 egy szelektív autofágia szubsztrát és cargo receptor, amely hozzákapcsolódik a lebontandó komponensekhez és mind az ubikvitin, mind az LC3 fehérjéhez való kapcsolódási képessége miatt az autofagoszóma felé tudja irányítani azokat, ahol ezekkel a komponensekkel együtt lebontódik (161). Emiatt a p62 fehérje csökkenése autofágiát jelez.

Ezek mellett, az apoptózis vizsgálatára a PARP hasadását és a prokaspáz-3 csökkenését követtük nyomon. Az apoptózis esetén az egyik legfontosabb effektor kaspáz előalakja, a prokaspáz-3 proteolitikus hasítással alakul aktív kaspáz-3 fehérjévé (162). A prokaspáz-3 csökkenése emiatt az apoptotikus jelátvitel bekapcsolására utaló jel. A PARP a sejtmagban található poli-ADP-ribóz-polimeráz, amelynek legfontosabb feladata a DNS hibajavítás, amit az egyszálú DNS törések esetén a bázis-kivágásos hibajavítási útvonal indukálásával segít elő (163). Apoptózis esetén a kaspázok, leginkább a kaspáz-3 és a kaspáz-7, proteolitikus hasítást végeznek a PARP-on, és a 116 kDa méretű fehérjét 85 és 24 kDa-os fragmensekre vágják szét (164). A két fragmens közül mi a 85 kDa méretű hasított forma megjelenését követtük nyomon.

Az alacsony, tolerálható ER stressz szint csak az autofágiát aktiválja, ezt jól szemlélteti az 1 μ M tunicamycin kezelésnél az LC3-II időben folyamatosan erősödő, és a p62 először erősödő (indukálódik), majd csökkenő (lebomlik az autofagoszómában) szintje (13.A, bal oldali ábra). Megfigyeltük, hogy magas, nem tolerálható stressz szint esetén az apoptózis folyamatot mindig megelőzi az autofágia: az LC3-II mennyisége növekedik, majd 210 percnél lecsökken. Ezzel párhuzamosan a PARP hasadás 180 perc körül megjelenik, miközben a prokaspáz-3 szintje csökkenni kezd (13.A jobb oldali ábra).



13. ábra: A sejtek alacsony és magas szintű ER stresszre adott válasza.

(A) Alacsony ($1 \mu\text{M}$) és magas ($100 \mu\text{M}$) koncentrációjú TM kezelésre aktiválódó autofágia (LC3-II és p62), és apoptózis (prokaspáz-3 és PARP) markerek vizsgálata western blot-tal. (B) Hálózati ábra az autofágia, az apoptózis és az ER stressz szenzorok kapcsolatáról. Az autofágia induktort, az apoptózis induktort és az ER stressz szenzort zöld, piros és fekete színű alakzatok ábrázolják. Az elemek aktív formái sötétebb színűek, míg a világosabb színekkel az inaktív formák lettek jelölve. A folytonos vonalak a biokémiai reakciókat jelölik, míg a szaggatottak az egyes elemek egymásra való hatásait mutatják be. (C) A sejt populáció alapvető viselkedésének, az autofágia és apoptózis aktiválódásának vizsgálata 50 egymástól független szimuláció átlagaként a különböző ER stresszorokkal történő kísérletek (31) alapján.

Bebizonyítottuk, hogy minden esetben ER stressz során először az autofágia indukálódik, de létezik egy olyan autofágia-függő stressz küszöbérték, amely meghaladását követően aktiválódik az apoptózis, miközben az autofágia kikapcsol (13. ábra). Ezt a küszöbértéket megvizsgáltuk autofágia aktivátorokkal és inhibitorokkal is, illetve a folyamatok reverzibilitását stresszor-kimosási kísérletekkel is ellenőriztük (helyhiány miatt erről a disszertációban nincs ábra, de a tanulmányunkban megtalálható (31)). Az eredmények alapján kijelenthetjük, hogy az autofágia és az apoptózis egymást kizárják, egyszerre soha sincsenek jelen a sejtben, tehát amint az apoptózis irreverzibilisen aktiválódik az autofágia azonnal kikapcsol.

Ezt a folyamatot a kísérleti eredményeink alapján, számítógépes szimulációkkal is megvizsgáltuk. A szabályozási hálózat egy egyszerű sztochasztikus modelljét fejlesztettük ki a sejt élet-és-halál közti döntésének dinamikai leírására ER stressz esetén (13.B ábra). Az ER stresszválaszban résztvevő, általunk vizsgált fő komponenseket az egyszerűség kedvéért három fő gyűjtőfogalomként jelöltük, ER stressz szenzorként (ERSS), autofágia és apoptózis induktorokként nevezve el őket. Az ERSS komponens az összes ER stresszt érzékelő szabályozó-elemet tartalmazza, az autofágia induktor (Auta/Auti) az ER stresszválasz autofágiát indukáló molekuláit, míg az apoptózis induktor (Apoa/Apoi) az ER stresszválasz apoptózist indukáló elemeit jelöli. Az ERSS elősegíti mind az autofágia, mind az apoptózis induktor aktiválódását ER stressz során. Mindhárom komponensnek van egy aktív (Auta, Apoa) és egy inaktív (Aut, Apoi) formája (a modell kódját részletesen az 1. Melléklet tartalmazza). Ahhoz, hogy figyelembe vegyük azt, hogy az autofágia aktiválódása megelőzi az apoptózis indukcióját ER stressz során, a modellünkben az apoptózis indukciójához egy aktivációs kaszkádot feltételeztünk (13.B ábra). Ez azt jelenti, hogy az egyszerű modellünkbe az apoptózis induktornak négy formáját vittük be. Mind a négy apoptózis induktor lehet aktív vagy inaktív állapotban, de egyedül a kaszkád negyedik tagja képes az apoptózist indukálni. Emellett az autofágia és apoptózis induktor közötti dupla negatív visszacsatolás egymást kölcsönösen kizáró kapcsolatot hoz létre. A modellben a stressz (S) az ER stressz szintjét jelenti, amely értékének növelésével alacsony és magas stressz szinteket tudunk megkülönböztetni. Az $S=0$ érték a fiziológiai, stressz-mentes állapotot jelöli.

A szimulációkkal először egy sejt viselkedését követtük nyomon mind alacsony, mind magas ER stressz esetén, majd a szimulációkat 50-szer lefuttatva modelleztük a sejtpopuláció viselkedését. A 13.C ábrán az 50-50 időbeni szimuláció átlaga látható, amelyből a bal oldali bemutatja, hogy az alacsony koncentrációjú ER stresszor (TM) jelenlétében az autofágia induktorok átlagos aktivitása 30 perc után fokozatosan nőtt. Érdekes módon, magas szintű ER stressz esetén az autofágia induktor tranziens csúcsát követően az apoptózis induktor gyors, de fokozatos bekapcsolása történt (13.C ábra, jobboldal). Mivel a sejtpopulációs szimulációk 50 sztochasztikus szimuláció átlagával mutatják be az egyes sejtek viselkedését, ezért az apoptózis induktor aktivációja egy lépcsőzetes folyamatként lett ábrázolva. Ez azt jelenti, hogy minden sejt máskor éri el azt a küszöbértéket az ER stressznek, amikor az apoptotikus folyamatok irreverzibilisen bekapcsolak. Ez az aktivációs kinetika azt is sugallja, hogy az apoptózis induktor a különböző stressz szintektől függően egy kapcsolásszerű karakterisztikát követ, és aktiválódása attól függ, hogy a stressz mértéke elér-e egy kritikus küszöbértéket (165).

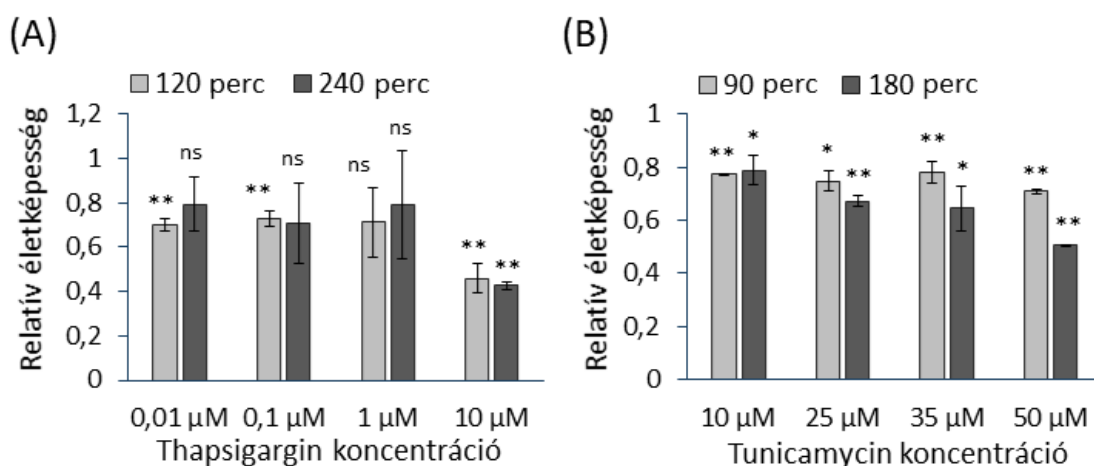
A fentebb leírt modell egy kiindulási állapotot szolgáltatott, a majd későbbi számítógépes szimulációinkhoz is.

4.2. Kapcsolatok az UPR PERK és IRE1 útvonalai között

A korábbiakban vizsgált, élet-és-halál közötti döntési folyamatnak összetettsége miatt ezek a kísérletek további kutatási irányok, és tudományos kérdések megválaszolására sarkalltak, amelyekre PhD munkám során kerestük a választ. Ennek következő lépése annak megfigyelése volt, hogy az autofágia és apoptózis folyamatokat szabályozó két UPR ág, a PERK és az IRE1 útvonalak közötti kapcsolatok hogyan alakítják ki a sejt stresszre adott válaszát. A bevezetésben már említettük, hogy tartós ER stressz során az IRE1 gátlása csökkentette a PERK útvonal elemeinek aktivitását, tehát az IRE1 úgy tűnik, pozitívan hat a PERK útvonalra (134). Az azonban nem volt egyértelmű, hogy a PERK útvonal pontosan milyen hatással lehet az IRE1-re. Célunk a következőkben ennek a kapcsolatnak a vizsgálata volt magas szintű ER stressz során, amelyet PERK siRNS-sel való csendesítéssel kombinálva vizsgáltunk meg.

Bár az autofágia és az apoptózis folyamatok vizsgálatát HepG2 sejtvonalon kezdtük el, azonban a továbbiakban a könnyű transzfektálhatósága miatt áttértünk a HEK293T

sejtvonalra. A HEK293T sejtvonalon, ellenőrzésképpen szintén megfigyeltük a különböző ER stresszorokkal indukálható autofágia és apoptózis folyamatok aktivitásának meghatározott sorrendjét. A TM és TG kezelési időket és koncentrációkat életképességi vizsgálatok segítségével választottuk ki (14. ábra). A stresszorok a sejtek életképességére gyakorolt hatását több kezelési időben végzett, különböző kezelési koncentrációival vizsgáltuk. Az előző eredmények alapján a cél a körülbelül 50%-os sejt életképesség csökkenés elérése volt. A TG kezelések 0,01; 0,1; 1 és 10 μM koncentrációkban, 2 és 4 órán keresztül történtek (14.A ábra). Hasonlóak az eredmények a 2 és 4 órás TG kezeléseknél, ahol a legmagasabb koncentrációnál drasztikus életképesség csökkenést tapasztaltunk. A TM-et 1,5 és 3 óráig adtuk a sejtekhez, 10, 25, 35 és 50 μM koncentrációkban (14.B ábra). A 3 óráig tartó, 35 μM TM kezelés során tapasztaltunk 50%-os körüli életképesség csökkenést. Ez alapján a következőkben TG esetén 10 μM koncentráció és 2 órás kezelési idő, míg TM esetén 35 μM , 3 órás kezelés lett kiválasztva, és a továbbiakban alkalmazva.



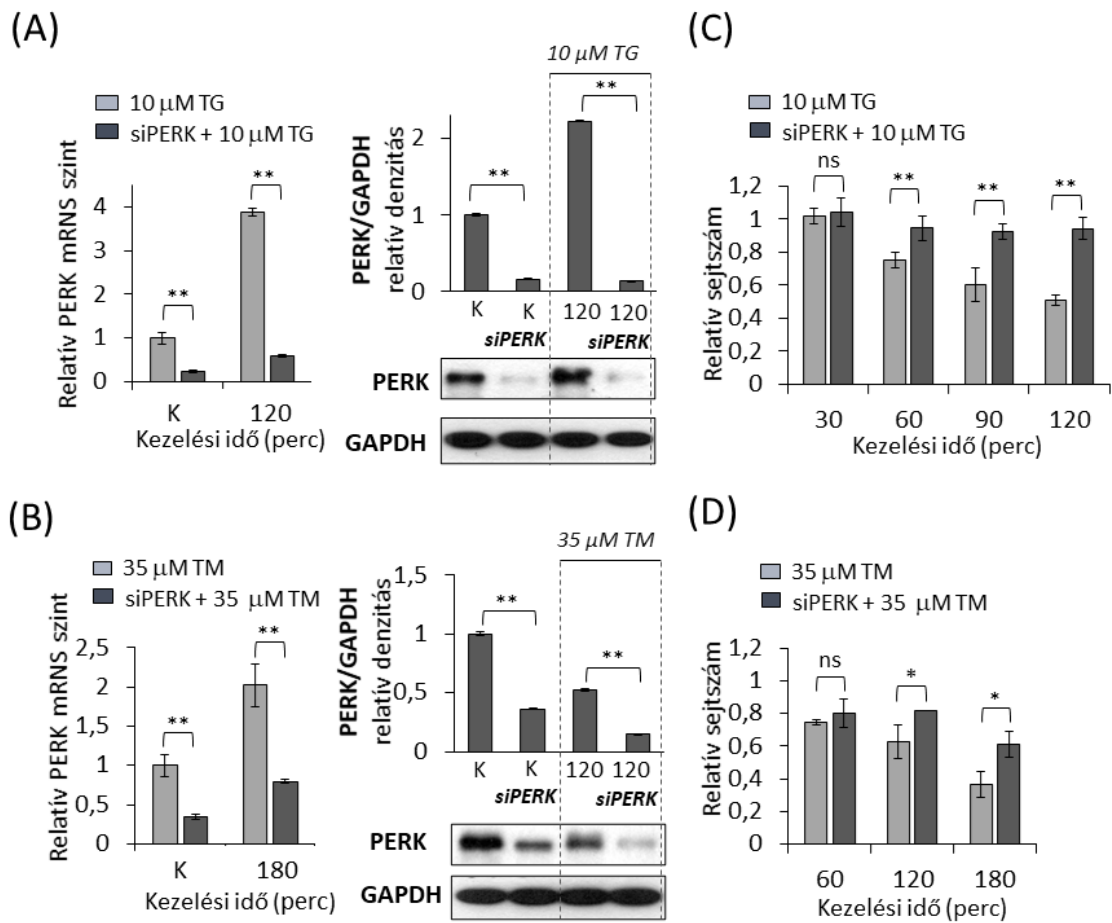
14. ábra: Az ER stresszorok kezelési koncentrációjának kiválasztása a sejtek életképessége alapján.

A sejtpopuláció kontrollhoz viszonyított relatív életképességének ábrázolása (A) thapsigargin és (B) tunicamycin kezelése után. A különböző kezelési időkből és koncentrációkban kezelt sejtek életképessége Cell Titer Blue assay-jel volt vizsgálva. A hibaszórások a tapasztalati szórás (SD) jellemzők. A statisztikát csillagokkal jelöltük, ahol a * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ a szignifikáns eltérést, ns: nem szignifikáns eltérést jelentenek.

4.2.1. A PERK csendesítés növeli a sejtek életképességét ER stressz során

Mielőtt megvizsgáltuk volna a PERK csendesítés hatását a sejtek életképességére vonatkozóan, leellenőriztük a PERK csendesítését a PERK mRNS szintjeinek valós idejű PCR vizsgálatával. Mind a TM, mind a TG kezelés során megfigyeltük a PERK siRNS transzfekció hatásaként erősen legátolt PERK mRNS szinteket, amelyek legfeljebb $\approx 25\%$ -ai voltak a csendesítés nélküli kezelés mRNS szintjeinek (15.A és 15.B ábra). A PERK csendesítés hatását az mRNS szintek mellett a PERK fehérje szintjének követésével is ellenőriztük (15.A, 15.B, 17.A, és 17.B ábra). A 17.A ábra western blot-jain megfigyelhető a PERK „shift” is: a PERK aktivitáskor történő autofoszforiláció eredményeként, az aktív PERK kicsit nagyobb méretnél látható a foszforiláció miatt. Emellett a PERK fehérje mennyisége minden csendesített TG és TM kezelés esetén szignifikánsan lecsökkent, megerősítve a csendesítés sikerességét.

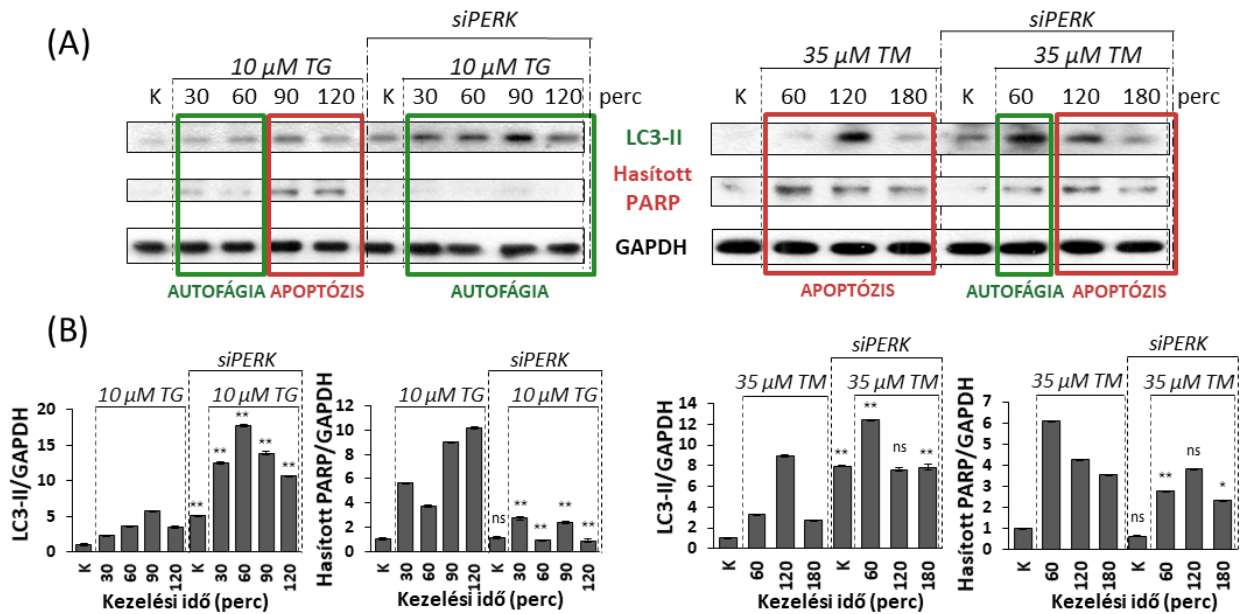
A következőkben, az élő sejtek számának megállapításával, a PERK csendesítés sejt életképességre gyakorolt hatását vizsgáltuk ER stressz során (15.C és 15.D ábra). A HEK293T sejtek PERK siRNS-sel történő transzfekciója után $10 \mu\text{M}$ TG (15.C. ábra) vagy $35 \mu\text{M}$ TM (15.D. ábra) stresszor koncentrációkban lettek kezelve a sejtek, TG kezelésnél 30 percenként 2 óráig, TM esetén 60 percenként 3 óráig. A kezeléseket követően tripánkék festéssel, automata sejtszámláló segítségével megállapítottuk az élő sejtek számát, amelyet relatív értéként ábrázoltunk. Az élő sejtszám a csendesített sejtekben szignifikánsan magasabb volt a nem csendesítettekhez képest. Mindkét kezelés esetén a kezelési idők végén a nem transzfektált sejtek $\approx 40\%$ -a élte túl a kezelést, míg a PERK siRNS-sel transzfektált sejtek több mint 60% -a maradt életben az ER stresszt követően. Ez alapján a PERK csendesítése szignifikánsan növelte a sejtek életképességét ER stressz során, ami a PERK közvetlen életképességre gyakorolt hatására utal.



15. ábra: A PERK csendesítés növeli a sejtek életképességét tartós ER stressz esetén. A PERK mRNS (qPCR) és fehérje szintek (western blot) változása (A) 10 μ M TG és (B) 35 μ M TM kezelések során. Az élő sejtek mennyiségének meghatározása (C) 10 μ M TG és (D) 35 μ M TM kezelések után. A hibaszávok a tapasztalati szórást (SD) jellemzik. A statisztikát csillagokkal jelöltük, ahol a * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ a szignifikáns eltérést, ns: nem szignifikáns eltérést jelentenek.

4.2.2. A PERK csendesítés ER stressz során meghosszabbítja az autofágia-függő túlélést és késlelteti az apoptotikus sejthalált

A PERK útvonalról már jól ismert, hogy fontos szerepe van a globális fehérjeszintézis szabályozásában az ER stresszválasz során. Azonban az nem egyértelmű, hogy magas ER stressz esetén vajon az autofágiás túlélést segíti-e jobban elő, vagy az apoptózis aktiválásában van-e nagyobb szerepe. Ennek kiderítésére western blot segítségével megvizsgáltuk a gyakran használt autofágia (LC3-II) és apoptózis (hasított PARP) markerek aktiválódását, a siPERK transzfekcióra nézve, TG és TM kezelést követően (14.A ábra).



16. ábra: A PERK csendesítés késlelteti az apoptózist TG és TM kezelések során.
 (A) Western blot eredmények az autofágia (LC3-II) és az apoptózis (hasított PARP) markerekről, a 10 μM TG (baloldal) és a 35 μM TM kezelés (jobboldal) után, PERK csendesítéssel és anélkül. A GAPDH-t housekeeping géneként alkalmaztuk.
 (B) A 10 μM TG (baloldal) és a 35 μM TM (jobboldal) kezelés western blot-jainak denzitometriai adatai. A hibaszalagok a tapasztalati szórás (SD) jellemzik. A statisztikát csillagokkal jelöltük, ahol a * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ a szignifikáns eltérést, ns: nem szignifikáns eltérést jelentenek.

A nem transzfektált sejtek esetén az LC3-II transziens növekedést mutat, TG esetén 30 perc (16.A és 16.B baloldali ábra), TM kezelésnél 60 perc után (16.A és 16.B jobboldali ábra), ami az autofágia transziens aktivitására utal, magas szintű ER stressz esetén. Ezt a transziens autofágiát mindig az apoptózis aktiválódása követi, amelyet a PARP hasadás szemléltet a TG kezelésnél 90, a TM kezelésnél 60 perctől kezdődően (16.A ábra). Ezzel szemben a PERK csendesítés időben elnyúlt autofágiás mechanizmushoz vezetett. Ezt az LC3-II magas szintje szemlélteti az ER stresszorral való kezelés során, miközben a PARP hasadás később következik be, mint a nem transzfektált sejteknél (16.A, és 16.B ábrák). Mivel a PARP hasadást az effektorként működő kaszpáz-3 végzi, ezek az adatok megerősítik a sejthalál késleltetését a PERK csendesítéskor ER stressz esetén. Hasonló eredményeket tapasztaltunk a TG és a TM kezeléskor is, ezért általános lehet ennek a fenotípusnak a megjelenése ER stressz során. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy HEK293T sejtek PERK siRNS transzfekciója szignifikánsan növelte a sejtek túlélését, a

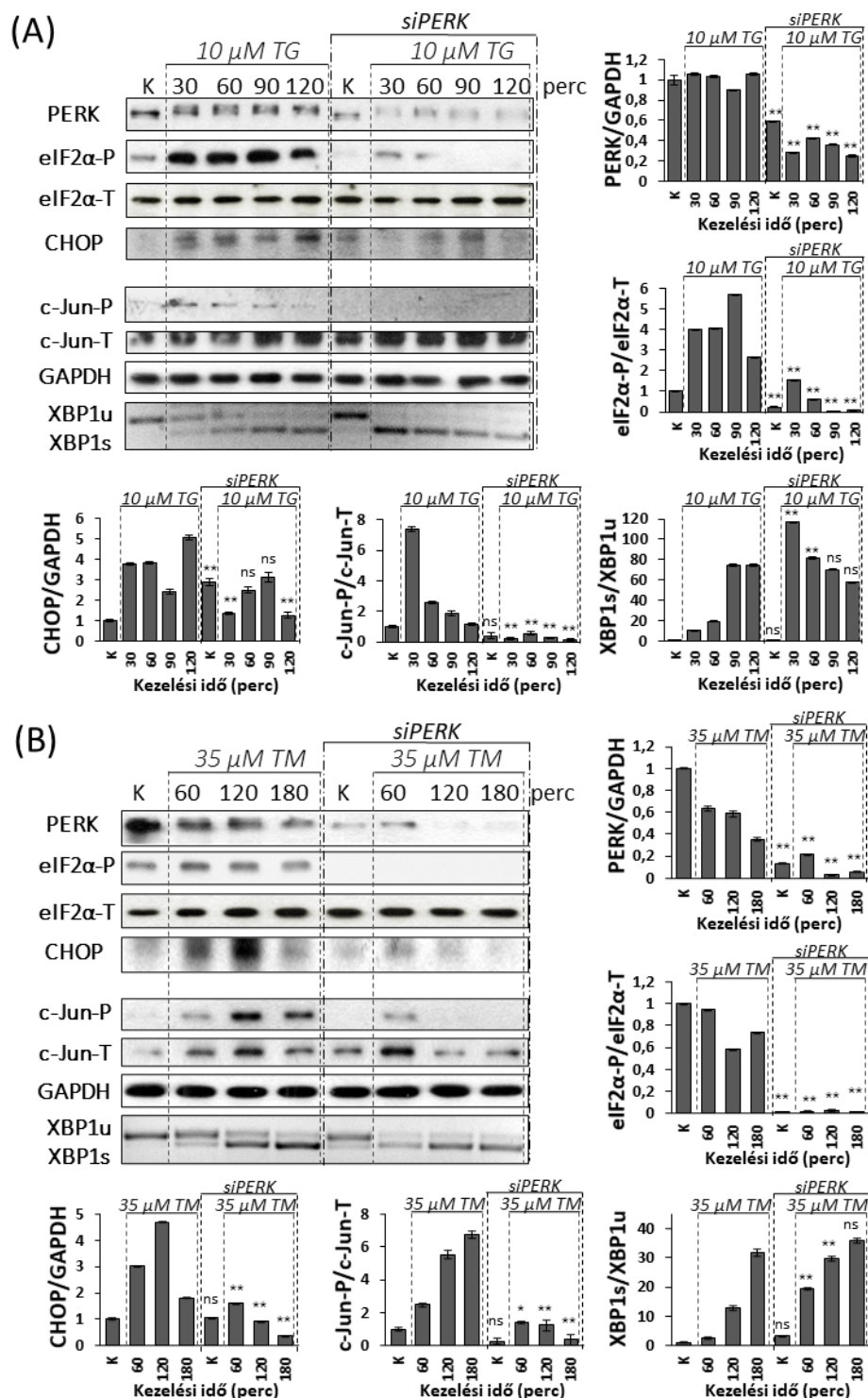
meghosszabbított autofágiás folyamatokkal, és késleltette az apoptotikus sejthalált, magas szintű ER stressz esetén.

4.2.3. A PERK pozitív hatást gyakorol az IRE1 apoptózis induktorára

A következőkben megvizsgáltuk a lehetséges szabályozási kapcsolatokat az UPR PERK és IRE1 ágai között, a sejt élet-és-halál közötti döntésének aspektusában ER stressz esetén. Ehhez a PERK (P-eIF2 α , CHOP) és az IRE1 útvonal kulcselemeit (XBP-1 és JNK) követtük nyomon.

A PERK útvonalon a P-eIF2 α -t és az apoptózis induktor CHOP-ot western blot-tal figyeltük meg (17.A és 17.B. ábra). A TG és a TM kezelés hatására megfigyelhető az eIF2 α foszforiláció nem csendesített sejtekben, míg a PERK csendesítés hatására a foszforiláció eltűnik, megerősítve a PERK csendesítés sikerességét. A CHOP a nem transzfektált sejtekben erős stressz hatására a TG kezelésnél már a 30 perc után erősen aktív, mely aktivitása fennmarad a kezelés végéig (17.A ábra). Nem csendesített sejtekben TM hatására 60 perces kezelést követően a CHOP erősen aktiválódott (17.B ábra). Ezzel szemben a CHOP a PERK csendesítés hatására a TG és TM kezelés esetén is csak egy enyhe, tranziens aktivitást mutat.

Az IRE1 útvonalon a JNK aktivitás követésére közvetlen szubsztrátját, a 63-as szerinen foszforilált c-Jun-t detektáltuk (P-c-Jun). ER stressz esetén az aktív JNK szerin-63 és szerin-73 aminosavakon foszforilálva aktiválja c-Jun fehérjét (56). Az XBP1 splicingot reverz transzkripció PCR-rel követtük nyomon. A nem transzfektált HEK293T sejtekben az XBP1 splicing (XBP1s) már 30 perces TG kezelés után megfigyelhető volt, amikor az LC3-II szintén megjelent (17.A ábra). Ez az eredmény megerősíti az aktív XBP1s fontos szerepét az autofágia-függő túlélésben. Eközben a c-Jun foszforilációja a 90 perces kezelési időnél megfigyelhető, ami megerősíti a JNK esszenciális szerepét a sejt öngyilkossági mechanizmusában erős/tartós ER stressz esetén (17.A ábra).



17. ábra: A PERK csendesítés hatással van az IRE1 apoptózis induktorára TG és TM kezelések során.

Western blot analízis a PERK útvonal (PERK, eIF2 α , CHOP) és az IRE-1 útvonal (c-Jun) elemeiről, és az XBP1 RT-PCR agaróz gélképe a 10 μ M TG (A) és a 35 μ M TM kezelés (B) után, PERK csendesítéssel és anélkül. Az (A) és (B) diagramok a western blot-tok és RT PCR-ek denzitometrált adatai. A hibásávok a tapasztalati szórást (SD) jellemzik. A statisztikát csillagokkal jelöltük, ahol a * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ a szignifikáns eltérést, ns: nem szignifikáns eltérést jelentenek.

Érdekes módon az XBP1 splicing nagyjából egyenértékű volt a PERK csendesített sejtekben, miközben a P-c-Jun csupán enyhe módon aktiválódott. Hasonlóan a TG kezeléshez, a TM-kezelt sejtekben is az autofágiával párhuzamosan aktív az XBP1s, függetlenül attól, hogy PERK siRNS-transzfektált-e a sejt vonal (17.B ábra). Bár a TM hozzáadása drasztikus módon növeli a c-Jun foszforilációt 2 órán belül, a PERK csendesítés nagymértékben gátolta a c-Jun foszforilációt erős ER stressz során. Bár a PERK útvonal működésének hiánya ER stressz esetén az XBP1 splicingra nem volt igazán hatással, az IRE1 útvonal apoptózis induktorának aktivitása, a JNK (a c-Jun foszforilációja alapján) csupán tranzienzen aktiválódott a PERK csendesítés hatására. Csupán egy mérsékelt c-Jun foszforiláció volt megfigyelhető, ami a PERK útvonal esszenciális szerepére utal az IRE1 függő sejthalál útvonal elősegítésében a sejt élet-és-halál közötti döntésekor magas szintű ER stressz során (17.B ábra).

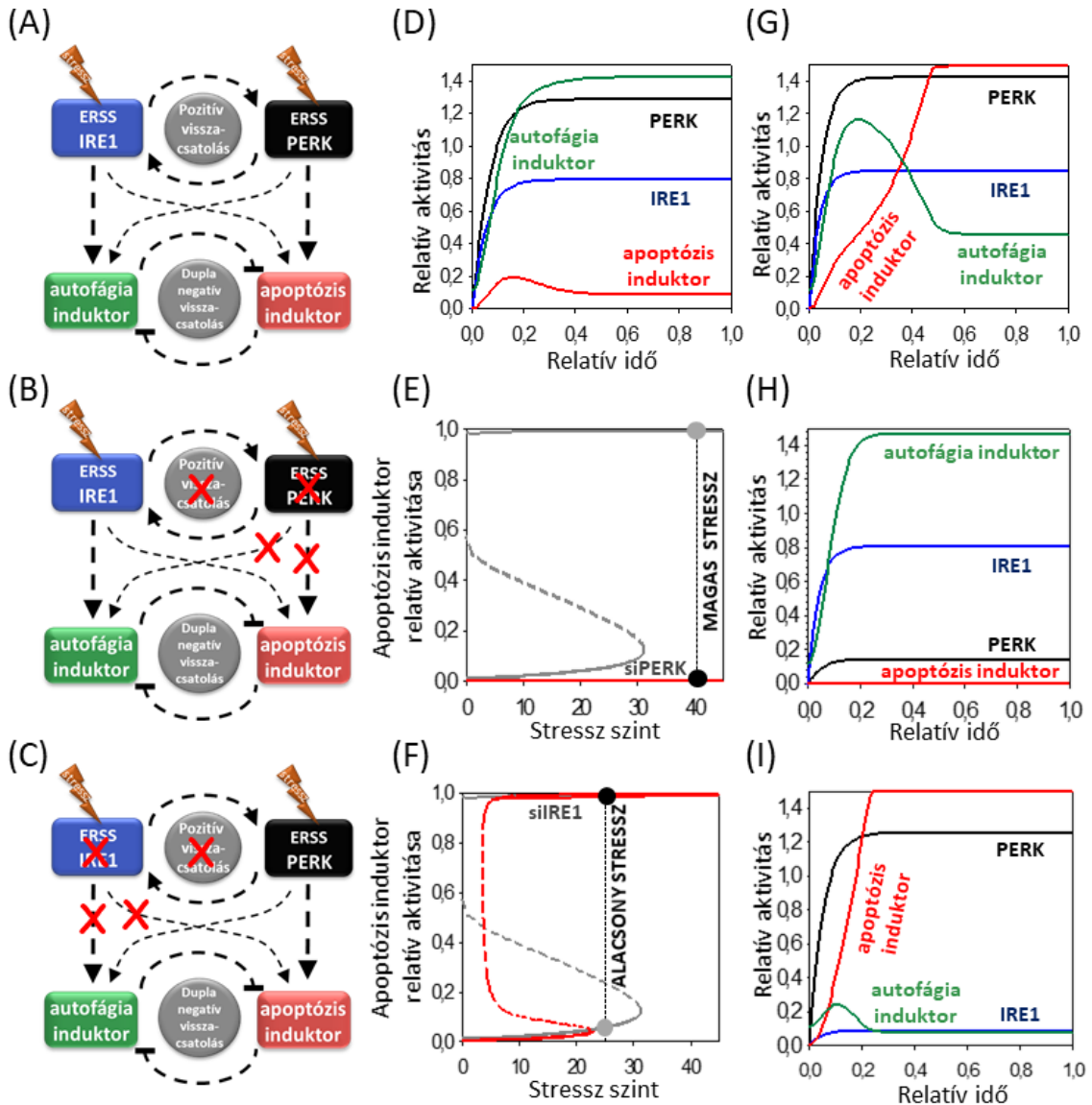
Érdekesnek tűnik, hogy a JNK aktivitás a CHOP-éhoz hasonló volt: PERK csendesítés nélkül, magas stressz esetén mindkettő erősen aktiválódott, míg a PERK csendesítés hatására a JNK aktivitás is lecsökkent a CHOP aktivitása mellett. Nem csendesített sejtekben, magas ER stressz esetén ez megerősíti, hogy mindkettőnek fontos szerepe van az apoptózis indukciójában, mivel aktivitásuk az apoptózis kapcsolószerű kinetikáját követi. A PERK csendesítés hatására lecsökkenő JNK aktivitás alapján pedig megállapíthatjuk, hogy a PERK útvonal hatással van az IRE1 útvonal apoptózisért felelős elemének, a JNK-nak az aktiválására ER stressz esetén.

4.2.4. Pozitív visszacsatolási hurok jelenlétének megállapítása az IRE1 és PERK ágak között matematikai modell segítségével

Ahhoz, hogy megvizsgáljuk a továbbiakban az IRE1 és a PERK további szerepét, számítógépes szimulációkkal egy elméleti analízist végeztünk. A korábbi, autofágia és apoptózis kapcsolatát tanulmányozó matematikai modellben már megvizsgáltuk, hogy a sejt milyen módon hozza meg döntését az autofágia-függő túlélés és az apoptotikus sejthalál között, és az autofágia és az apoptózis induktorai között egy dupla negatív visszacsatolás jelenlétét is megerősítettük (31). Ehhez hasonlóan, a jelenlegi modellünk esetén is feltételeztük a dupla negatív visszacsatolást az autofágia és apoptózis folyamatok között, amelyet itt is az úgynevezett autofágia és apoptózis induktorok szabályoznak. Az „Apoa” elem ebben a modellben is a stresszválasz mechanizmus összes

apoptózis induktorát jelenti, míg az „Auta” elem a stresszválasz mechanizmus autofágia induktorait foglalja magában. Az új kísérletes eredmények alapján továbbfejlesztettük a korábbi egyszerű modellünket: itt már nem egy ER stressz szenzor molekula irányítja a folyamatot, hanem bevittünk a modellbe két ER stressz-indukálta ER stressz szenzort is, amelyek az UPR PERK és IRE1 ágait szimbolizálják (18.A ábra). A BiP-et a modell nem tartalmazza, mivel az egyszerűsítés kedvéért azt feltételezzük, hogy az ER stresszorok direkt módon indukálják a PERK és a IRE1 ER stressz szenzorokat. A „stressz” (S) elem itt is a modell ER stressz szintjét jelenti. A továbbfejlesztett modell kódjait a 2. Melléklet tartalmazza.

A korábbiakban leírtam, hogy mindkét úvonalnak vannak inkább apoptózisért felelős (CHOP, JNK) (56-58, 102-104), illetve inkább az autofágiát erősítő ágai (GADD34, XBP-1) (52, 53, 123-125), bár érdekes módon minden elem képes valamilyen módon hatni az autofágia és az apoptózis aktiválására is (52, 61-63, 86, 126). Mivel már kísérletesen leírták, hogy az IRE1 útvonal gátlása lecsökkenti a sejt életképességét, azt feltételezhetjük, hogy az IRE1 sokkal erősebben hat az autofágia induktorra, mint az apoptózisra (134, 137). Eredményeink megerősítették, hogy a PERK csendesítése növeli a sejt életképességét, emiatt feltételezhető, hogy a PERK-függő aktiváció sokkal intenzívebb hatással van az apoptózis induktorra, mint az autofágia induktorára. Az IRE1 és PERK ágak autofágia és apoptózis induktorokkal való kapcsolatait és azok erősségét érzékeltettük a kapcsolati ábra vékony és vastag nyilaival (18.A ábra). Korábban Deegan és társai bebizonyították, hogy az IRE1 serkenti a PERK útvonalat (134). A mi eredményeink alapján a PERK szintén pozitív hatást gyakorol az IRE1-re, ezzel egy pozitív visszacsatolási hurkot generálva a két ER stressz szenzor között a szabályozási hálózatban (18.A ábra).



18. ábra: A visszacsatolási hurkok szerepe a sejt élet és halál közti döntésének irreverzibilitásában.

Kapcsolati ábra a hálózat elemeiről (A) normál esetben, illetve (B) a PERK hiányában vagy (C) az IRE1 hiánya esetén.

(D) Az ER stressz szenzor PERK, az ER stressz szenzor IRE1, az autofágia és apoptózis induktorok időbeli viselkedésének ábrázolása számítógépes szimulációkkal alacsony szintű ER stressz esetén. Az apoptózis induktor jel-válasz görbéje (piros görbe) növekvő ER stressz esetén, (E) PERK-csendesített vagy (F) IRE1-csendesített sejtekben. A fekete pontok az egyensúlyi állapotot jelölik alacsony és magas stressz során, a folytonos vonalak a stabil állapotot, míg a szaggatott vonalak az instabil állapotot jelentik. Instabil állapot: az induktorok viselkedését kifejező differenciálegyenletek alapján a jel-válasz görbén a stabil ki-, illetve bekapcsolt állapot összekötőt görbék, amelyek biológiailag nem értelmezhetők, csak matematikailag. A szürke görbe az eredeti jel-válasz görbét jelöli, míg a szürke pontok az eredeti egyensúlyi állapotokat alacsony és magas ER stressz során. Az ER stressz szenzor PERK, az ER stressz szenzor IRE1, az autofágia és az apoptózis induktorok időbeli viselkedésének ábrázolása számítógépes szimulációkkal (G) magas szintű ER stressz esetén, illetve (H) PERK-csendesítés + magas ER stressz vagy (I) IRE1-csendesítés + magas ER stressz kombinálása során.

Bár a kapcsolati ábránkat kibővítettük az új, pozitív visszacsatolási hurok jelenlétével, ez nem változtatta meg az sejt élet-és-halál közötti döntését ER stressz során. A modellünk tehát továbbra is megerősíti, hogy alacsony stressz szint esetén az ER stressz szenzorok (például PERK és IRE1) csak az az autofágia induktort aktiválják (18.D ábra), míg magas szintű ER stressz esetén a stressz küszöbérték elérése az apoptózis induktor kapcsolásszerű aktiválódásához vezet, mialatt az autofágia kikapcsol (18.G ábra).

4.2.5. Az autofágia és apoptózis induktorok IRE1 és PERK útvonalak általi módosult működése meghatározza a sejt élet-és-halál közti döntését

Azért, hogy feltérképezzük az IRE1 és a PERK útvonalak közti pozitív visszacsatolás jelentőségét a sejtek stresszválasz mechanizmusában, mindkét stressz szenzor működését külön-külön lecsökkentettük a modellen belül. Először a PERK teljes mennyiségét csökkentettük le 10%-ra, ezzel imitálva a PERK csendesítést a sejtekben (18.B ábra). A kísérleti eredmények azt mutatták, hogy a PERK csendesítés késleltette az apoptotikus sejthalált ER stressz esetén. A PERK hiánya lecsökkenti annak erős pozitív hatását az apoptózis induktorra, miközben az autofágia induktorra gyakorolt gyengébb pozitív hatása is eltűnik (18.B ábra). Ebben az esetben az apoptózis induktor aktivációs küszöbe a jel-válasz görbén eltolódik jobbra (18.E ábra). Tehát az ER stressznek egy sokkal magasabb stressz szintet kell elérnie ahhoz, hogy bekapcsolja a sejthalál-hurkot, és emiatt késlelteti a sejthalált. A számítógépes szimuláció azt mutatja, hogy az aktív IRE1 egyedül is képes az autofágiát serkenteni, emiatt a túlélőmechanizmus működőképes marad, azonban az apoptózis nem kapcsol be (18.H ábra).

Amikor az IRE1 szintjét csökkentettük le 10%-ra, egy érdekes dinamikai viselkedést figyelhettünk meg a jel-válasz görbén (18.C ábra). Mivel az IRE1 sokkal erősebb az autofágia induktoron, mint az apoptózison, az apoptózis aktivációs küszöbértéke balra tolódik a görbén (18.F ábra). Eszerint, amikor csak a PERK útvonal aktív, egy alacsonyabb szintű ER stressz is elég lehet arra, hogy bekapcsolja az apoptotikus sejthalált. A modellünk megerősítette azt a mások által bizonyított korábbi kísérletes eredményt, hogy az IRE1 gátlása korábbi sejthalált okozhat (166). Amikor az IRE1 legátlődik, az autofágiás túlélésnek rövidebb idejű aktivitása lehet, ami miatt a rövid, tranzienst autofágiás periódust az apoptózis induktorok gyors aktivitása követi tartósan

magas ER stressz esetén (18.I ábra). A legnagyobb különbség tehát a korábbi egyszerűbb modellünk, és a jelenlegi továbbfejlesztett verzió között az apoptózis induktor viselkedésének további finomítása. Az apoptózis induktor kikapcsolási pontja az új modellünk alapján negatív tartományba került, amely biztosítja a kísérletek során is megfigyelt irreverzibilis működést: aktiválódása után már nem képes inaktiválódni.

Akár az UPR PERK ága, akár az IRE1 útvonal inaktiválódik, ez mindenképpen megsemmisíti a köztük lévő pozitív visszacsatolási hurkot. A modellünk azt is jól szemlélteti, hogy a pozitív visszacsatolási hurok hiányának veszélyes következményei lehetnek. A küszöbérték, amely az apoptózis induktor kikapcsolt állapotban tartásáért felelős, eltolódhat pozitív irányban a jel-válasz görbén (18.E ábra). Emiatt az öngyilkossági hurok irreverzibilis, egyirányú működése nincs biztosítva ER stressz során. A modellünk megerősíti, a már kísérletesen igazolt a PERK-függő IRE1 szabályozást, és kiemeli ennek döntő szerepét a szabályozási hálózat dinamikai működésében magas szintű ER stressz esetén.

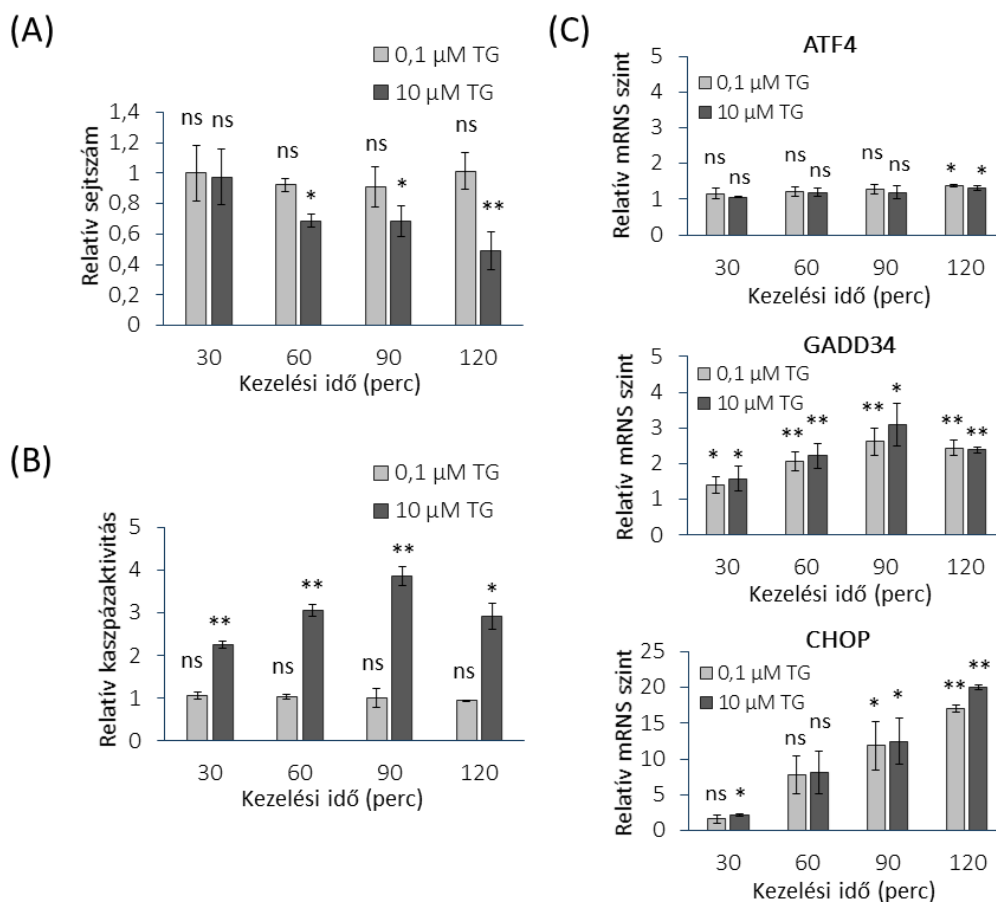
4.3. A PERK útvonalon belüli, molekuláris kapcsolatok hatása

4.3.1. Az ATF4 és célgénjeinek aktivációja a két különböző ER stressz szinten

A korábbiakban kiderült, hogy a PERK útvonalnak döntő szerepe van ER stressz során, az apoptózis induktorra való pozitív hatásával. A következőkben arra voltunk kíváncsiak, hogy ezt a viselkedést a PERK útvonal elemei közötti kapcsolatok által hogyan valósítja meg. Emiatt az UPR jelátviteli hálózat egyik ágában, a PERK útvonalon belüli kapcsolatokat is megvizsgáljuk. A korábbiakban az ER stressz indukálását TG-nal és TM-nel végeztük, de mivel a sejteknek mindkét stresszorzattal indukált ER stresszre adott válasza nagyon hasonló volt, a továbbiakban csupán TG-nal folytattuk a kísérleteket, HEK293T sejtvonalon.

Először megvizsgáltuk a relatív sejtszámokat és a kaszpáz aktivitást a korábbiakban már definiált alacsony és magas ER stressz szinteken (19.A és 19.B ábrák). A TG kezeléseket az eddigiekhez hasonlóan fél óránként végeztük, egészen 2 óráig. Alacsony ER stressz esetén még 2 óra után sem csökkent szignifikánsan az élő sejtek száma. Ezzel szemben a 10 μ M-os TG kezelésnél már 60 perc után szignifikáns sejtszámcsökkenést tapasztaltunk,

és a kezelés végére, 2 óra után a sejtszám ≈ 50 %-kal csökkent a kontrollhoz képest (19.A ábra). Ezzel párhuzamosan, az ApoOne assay használata során intenzív kaszpázaktivitás volt detektálható a 10 μM -os TG kezelésnél, már a 60 perces kezelési időtől kezdve a kezelés végéig. Az alacsony koncentrációjú TG kezelésnél nem volt megfigyelhető kaszpázaktivitás növekedés (19.B ábra). Megerősítve a korábbiakat, ez arra utal, hogy a magas koncentrációjú TG kezelésnél a sejtszámcsökkenést az apoptotikus sejthalál okozza.



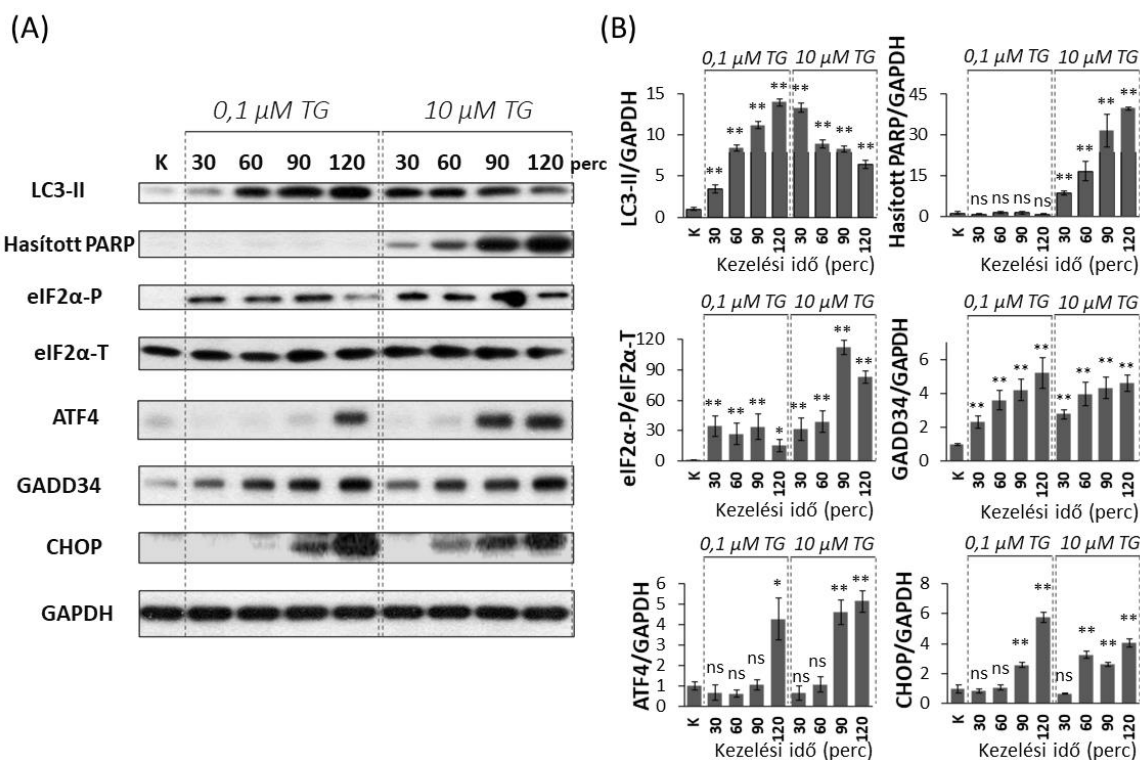
19. ábra: Alacsony és magas szintű ER stressz hatása a sejtszámra, kaszpázaktivításra és a PERK útvonal kulcselemeinek mRNA szintjére.

(A) Relatív sejtszámok és (B) relatív kaszpáz 3-, és kaszpáz-7 aktivitások időbeli követése alacsony (0,1 μM TG) és magas szintű (10 μM TG) ER stressz során. (C) A PERK útvonal ATF4, GADD34 és CHOP kulcselemeinek mRNA-szintű vizsgálata (qPCR) alacsony (0,1 μM TG) és magas szintű (10 μM TG) ER stressz során.

A hibasávok a tapasztalati szórást (SD) jellemzik. A statisztikát csillagokkal jelöltük, ahol a * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ a szignifikáns eltérést, ns: nem szignifikáns eltérést jelentenek.

A következő lépésben megvizsgáltuk a PERK útvonal kulcselemeinek (eIF2 α , ATF4, GADD34, CHOP) aktivitását, mind mRNA és mind fehérje szinteken, alacsony és magas szintű ER stressz esetén. A 0,1 μM és 10 μM TG kezeléseket itt is félóránként végeztük

2 óráig, ezt követően a sejtekből fehérje és mRNS izolálás, majd reverz-transzkripció után western blot-tal és valós-idejű PCR-rel követtük nyomon a fehérje- és génaktivitásokat (19.C, 20.A, 20.B ábra). Bár a stresszre adott válasz végkimenetele az autofágia és az apoptózis szempontjából a két különböző ER stressz szinten más volt, ez a különbség nem volt sem mRNS, sem fehérje szinteken megfigyelhető. Az ATF4 mRNS szinteken nem látható növekedés semelyik stressz szinten sem, míg a GADD34 mRNS szintek körülbelül kétszeresére nőttek az alacsony és a magas koncentrációjú TG kezelés esetén is. Ráadásul a CHOP mRNS szintekben alacsony és magas stressz esetén is egy nagymértékű növekedést láthattunk, ami már az egy órás kezelésnél is szignifikáns volt a kontrollhoz képest (19.C ábra).



20. ábra: Az autofágia, apoptózis folyamatok és a PERK-útvonal kulcselemeinek fehérje szintű aktivitása alacsony és magas szintű ER stressz esetén.

(A) Az autofágia (LC3-II) és apoptózis (PARP) marker, illetve a PERK útvonal kulcselemeinek (eIF2 α , ATF4, GADD34, CHOP) vizsgálata western blot-tal alacsony (0,1 μ M TG), és magas szintű ER stressz (10 μ M TG) esetén. (B) A western blot-tok denzitometrált adatai. A hibasávok a tapasztalati szórást (SD) jellemzik. A statisztikát csillagokkal jelöltük, ahol a * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ a szignifikáns eltérést, ns: nem szignifikáns eltérést jelentenek.

Az ER stresszválasz mechanizmusának PERK útvonalon való további vizsgálata érdekében, az alacsony, még tolerálható és a magas, nem-tolerálható ER stressz szinten is nyomon követtük a kezelési idők növekedése mentén az eIF2 α foszforiláltságának

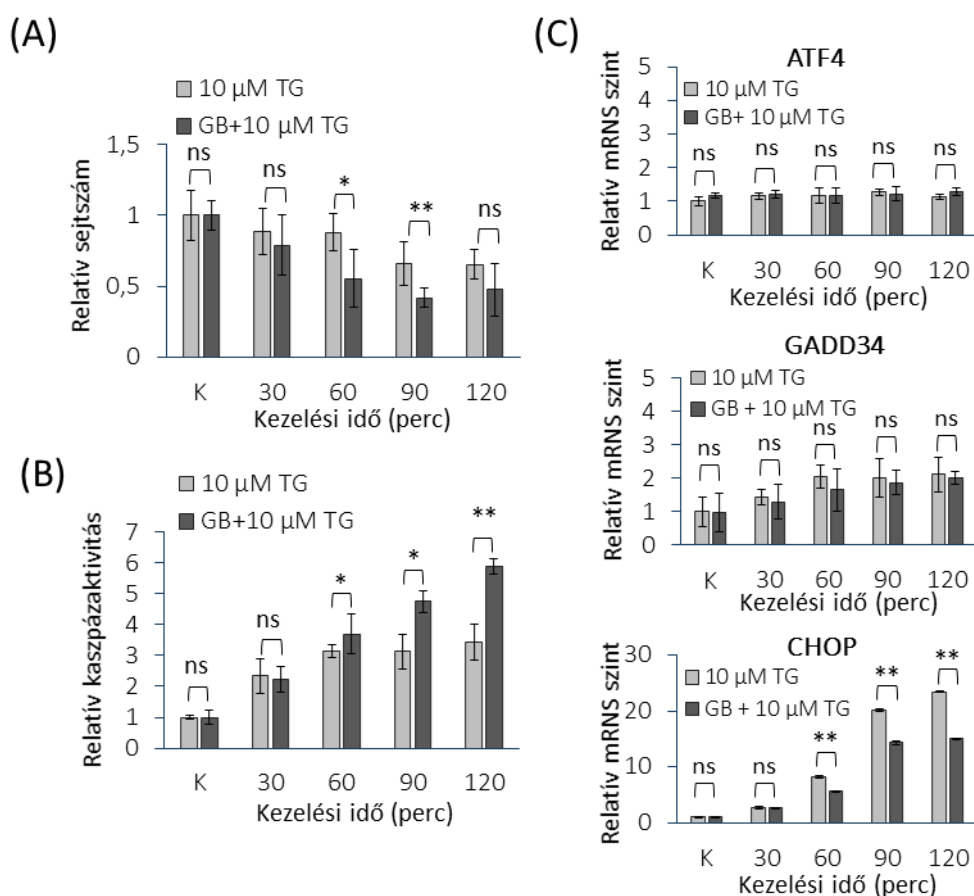
változását (20.A, 20.B ábra). Míg az eIF2 α tranziens módon foszforilálódott alacsony stressz szinten, a magas koncentrációjú TG kezelésnél a foszforiláció szignifikánsan magas maradt a kontrollhoz képest, a 2 órás kezelési idő esetén is. Mindkét stressz szinten aktiválódott az ATF4, a GADD34 és a CHOP fehérje, emellett az ATF4 és CHOP aktiválódás magas stressz esetén már korábban megtörtént (20.A, 20.B ábra).

A PERK útvonal elemei mellett még nyomon követtünk egy autofágia (LC3-II) és egy apoptózis marker (PARP) aktivitását is. Itt is megerősítettük a korábbi, HepG2 sejteken már megfigyelt eredményeinket: alacsony ER stressz esetén (0,1 μ M TG) csak az autofágia aktív (LC3-II növekedés), míg magas szintű ER stressz (10 μ M TG) a tranziens autofágiát követően aktiválja az apoptózist (PARP hasadás) (20.A ábra).

4.3.2. A GADD34 gátlása negatívan hat az ATF4-re és a CHOP-ra is ER stressz során

Ahhoz, hogy a továbbiakban megvizsgáljuk az ATF4, a GADD34 és a CHOP szerepét az ER stresszválasz mechanizmusában, a magas szintű ER stresszt GADD34 gátlással kombináltuk. Ehhez elsőként előkezeltük a HEK293T sejteket 1 órán keresztül 50 μ M guanabenz inhibitorral. A guanabenz (GB) egy olyan α 2-adrenerg receptor agonista, amely a GADD34-PP1 komplexhez kapcsolódva gátolja a GADD34-et annak eIF2 α defoszforiláló hatásában. A guanabenz a GADD34-hez hasonló CREP-re nem hat, emiatt szelektív gátlószere a GADD34-nek (167).

A GB kezelést 30 percenként 2 órán keresztül 10 μ M TG kezelés követte, amelyek után a sejtszámok (21.A ábra) és kaszpázaktivitások (21.B ábra) mérése történt. A GB előkezelés hatására a relatív sejtszámban egy enyhe, bár nem szignifikáns csökkenés volt megfigyelhető a 10 μ M TG kezelések idejének végére, a nem előkezelt mintákhoz képest (21.A ábra). A relatív sejtszámok enyhe csökkenésével párhuzamosan detektáltunk egy kisebb növekedést a kaszpázaktivitásban is a 90 és 120 perces 10 μ M TG kezelést követően (21.B ábra). Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a GADD34 inhibitornak negatív hatása van az ER stresszválasz mechanizmusára.

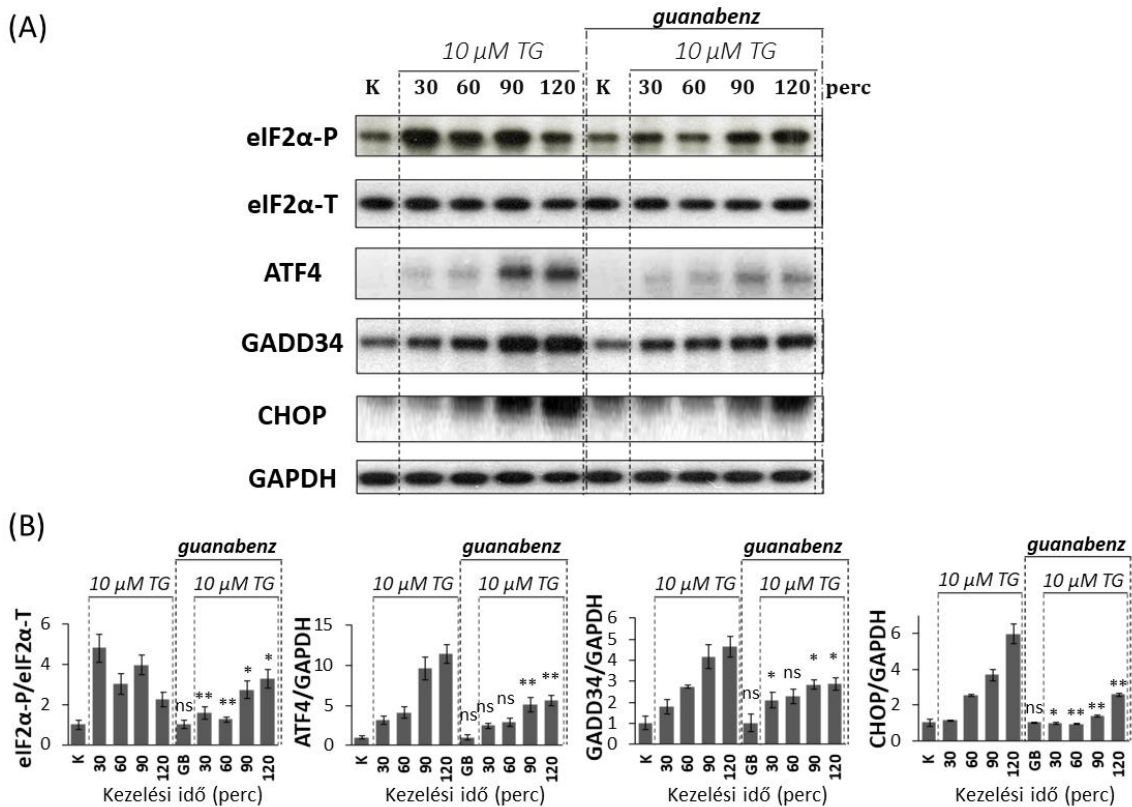


21. ábra: A GADD34 gátlásának hatása a sejtszámra, kaspázaktivításra és a PERK útvonal kulcselemeinek mRNA szintjére magas szintű ER stressz esetén.

A) Relatív sejtszámok és (B) relatív kaspáz 3-, és kaspáz-7 aktivitások időbeli követése magas szintű ER stressz során (10 μM TG, 2 óra), GADD34-inhibitorral (50 μM GB, 1 óra) előkezeléssel, vagy anélkül. (C) A PERK útvonal ATF4, GADD34 és CHOP kulcselemeinek mRNA-szintű vizsgálata (qPCR) ER stressz során (10 μM TG, 2 óra), GADD34-inhibitorral (50 μM GB, 1 óra) előkezelve, vagy anélkül. A hibásávok a tapasztalati szórást (SD) jellemzik. A statisztikát csillagokkal jelöltük, ahol a * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ a szignifikáns eltérést, ns: nem szignifikáns eltérést jelentenek.

Ezután nyomon követtük az ATF4-et, és annak célgénjeit, a GADD34-et és a CHOP-ot fehérje és mRNA szinten, a GB előkezeléssel kombinált és az előkezelés nélküli 10 μM TG kezelések során (21.C, 22.A, 22.B ábra). Magas szintű ER stressz hatására az eIF2α foszforiláció tranziens módon történt meg, 120 percnél enyhült a foszforiláció mértéke. A GB előkezelés esetén a 10 μM-os TG kezelések során a GADD34 eIF2α defoszforiláló hatása kevésbé érvényesült: a P-eIF2α még a kétórás kezelésnél is növekedő tendenciát mutatott. A GADD34 gátlása nem változtatta meg az ATF4 és a GADD34 mRNA expresszióját, bár a GADD34 fehérje szinteken egy enyhe csökkenés volt megfigyelhető a nem GB-előkezelte sejtekhez képest. Érdekes módon az ATF4 fehérje egy jelentős

csökkenést mutatott a western blot analízis során, amely arra utal, hogy a GADD34-nek pozitív hatása lehet az ATF4 fehérje szintjére. Ráadásul a GB előkezelés hatására CHOP esetében mind az mRNS, mind a fehérje szintekben egy szignifikánsan alacsonyabb aktivitás volt detektálható, amely szerint az aktív GADD34-nek lehet valamilyen pozitív hatása a CHOP-ra is. Mivel az ATF4 fehérje szintje is változik, így az eredmények alapján feltételezhető, hogy magas szintű ER stressz során a GADD34-nek pozitív hatása van a saját aktivációjára is az ATF4-nek és a CHOP-nak a serkentésén keresztül.



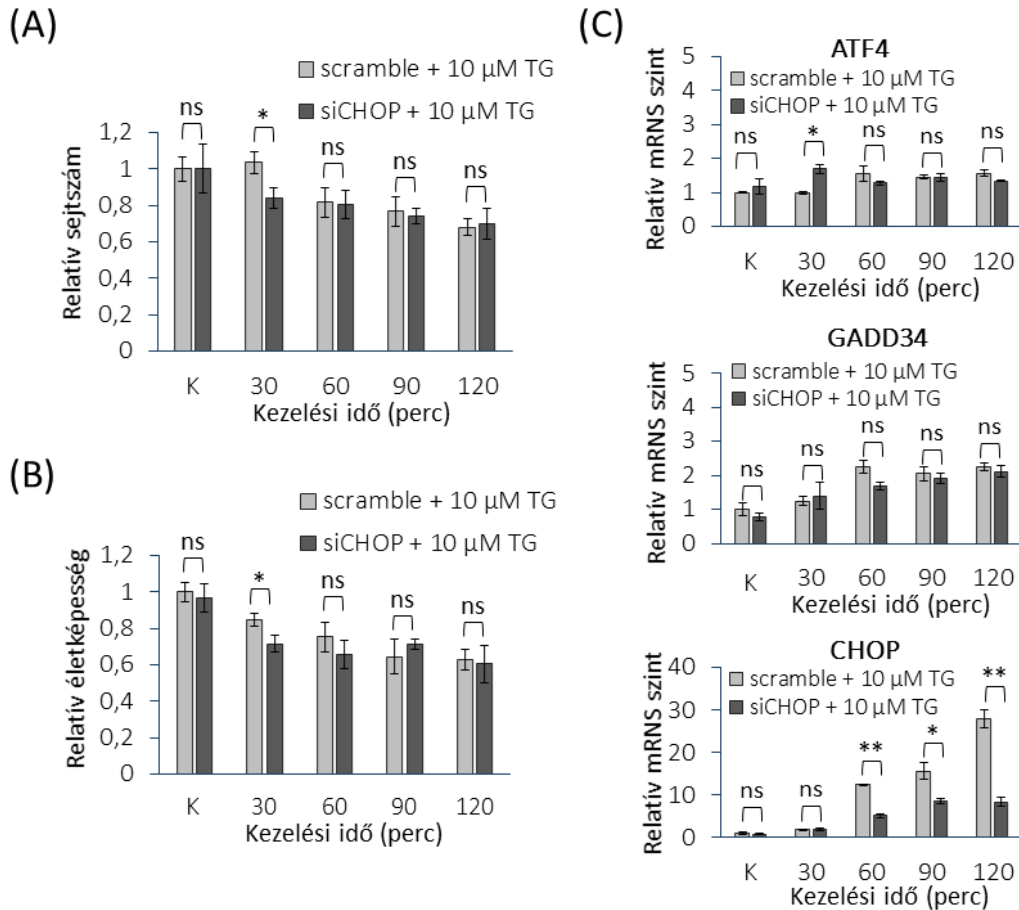
22. ábra: A GADD34 gátlásának hatása a PERK útvonal kulcselemeinek fehérje szintjeire magas szintű ER stressz esetén.

(A) A PERK útvonal (*eIF2α*, *ATF4*, *GADD34*, *CHOP*) kulcselemeinek vizsgálata western blot-tal, *GADD34*-inhibitoros előkezelést ($50 \mu\text{M}$ GB, 1 óra) követő, vagy előkezelés nélküli magas szintű ER stressz ($10 \mu\text{M}$ TG) esetén. (B) A western blot-tok denzitometrált adatai. A hibásávok a tapasztalati szórást (SD) jellemzik. A statisztikát csillagokkal jelöltük, ahol a * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ a szignifikáns eltérést, ns: nem szignifikáns eltérést jelentenek.

4.3.3. Az CHOP csendesítés ER stressz esetén nincs hatással az ATF4 aktiválódásra

Ahhoz, hogy felfedjük a CHOP szerepét az ER stresszválaszban, tanulmányoztuk a CHOP csendesítés magas ER stresszre való hatását is. A CHOP-ot siRNS-sel

csendesítettük HEK293T sejtekben, majd ezt 10 μ M TG-kezeléssel kombináltuk, és követtük a kulcsmolekulákat (GADD34, ATF4, CHOP) fehérje és mRNS szinteken is (23.C, 24.A, és 24.B ábra).

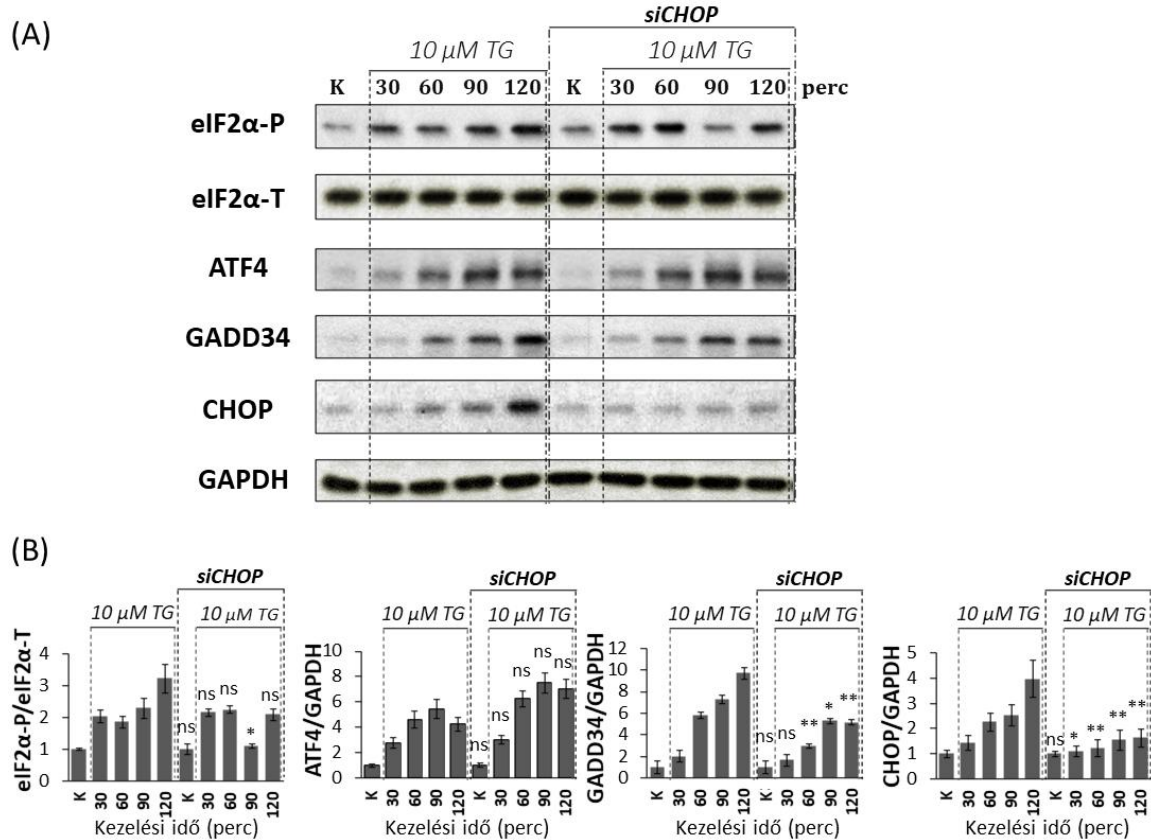


23. ábra: A CHOP csendesítésének hatása magas szintű ER stressz során a sejtszámra, a sejt életképességre és a PERK útvonal kulcselemeinek mRNS szintjére.

A) Relatív sejtszámok és (B) relatív életképesség időbeli követése magas szintű ER stressz során (10 μ M TG), CHOP-csendesítéssel (siCHOP), vagy anélkül (scramble). (C) A PERK útvonal ATF4, GADD34 és CHOP kulcselemeinek mRNS-szintű vizsgálata (qPCR) magas szintű ER stressz során (10 μ M TG), CHOP-csendesítéssel (siCHOP), vagy anélkül (scramble). A hibaszávok a tapasztalati szórást (SD) jellemzik. A statisztikát csillagokkal jelöltük, ahol a * p < 0,05; ** p < 0,01 a szignifikáns eltérést, ns: nem szignifikáns eltérést jelentenek.

Megvizsgáltuk a CHOP csendesítés relatív sejtszámokra és a sejtek életképességére való hatását a 10 μ M-os TG kezeléseket követően (23.A és 23.B ábra). Az eredmények azt mutatják, hogy sem az élő sejtek számában, sem a sejtek életképességében nem volt szignifikáns változás megfigyelhető a CHOP csendesítés következményeként. Eszerint az esetleges pozitív hatása a CHOP csendesítésnek ilyen rövid idejű stressz periódusban még valószínűleg nem mérhető.

Ahhoz, hogy megfigyeljük a stresszválasz mechanizmusát, ebben az esetben is nyomon követtük az eIF2 α foszforilációját western blot-tal (24.A és 24.B ábra).



24. ábra: A CHOP csendesítés hatása magas szintű ER stressz esetén a PERK útvonal kulcselemeire fehérje szinten.

(A) A PERK útvonal (eIF2 α , ATF4, GADD34, CHOP) kulcselemeinek vizsgálata western blot-tal, CHOP-csenedítés esetén (siCHOP), vagy anélkül (scramble) magas szintű ER stressz (10 μ M TG) esetén. (B) A western blot-tok denzitometrált adatai. A hibaszávok a tapasztalati szórás (SD) jellemzik. A statisztikát csillagokkal jelöltük, ahol a * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ a szignifikáns eltérést, ns: nem szignifikáns eltérést jelentenek.

Az eIF2 α foszforilációja a korábbiakhoz hasonlóan megfigyelhető volt a 10 μ M TG kezelés során, és emellett a CHOP csenedítéssel kombinált kezelés esetén is. A CHOP csenedítés PERK útvonalra való hatását tanulmányozva a CHOP mRNS és fehérje szintek vizsgálata mellett, az ATF4 és GADD34 aktiválódását is nyomon követtük mRNS és fehérje szinteken a 10 μ M-os TG kezelés során (23.C, 24.A és 24.B ábra). Bár a GADD34-re mRNS szinten nem volt hatása a csenedítésnek, a GADD34 fehérje mennyisége szignifikánsan csökkent a CHOP-csenedített sejtekben a 10 μ M TG kezelések során. Ez azt sugallja, hogy a CHOP valóban pozitívan hat a GADD34-re, de ezt csupán annak fehérje szintjén lehetett detektálni. Érdekes módon a CHOP csenedítés

és a magas ER stressz kombinációja során az ATF4 expressziója sem mRNS, sem fehérje szinten nem mutatott változást.

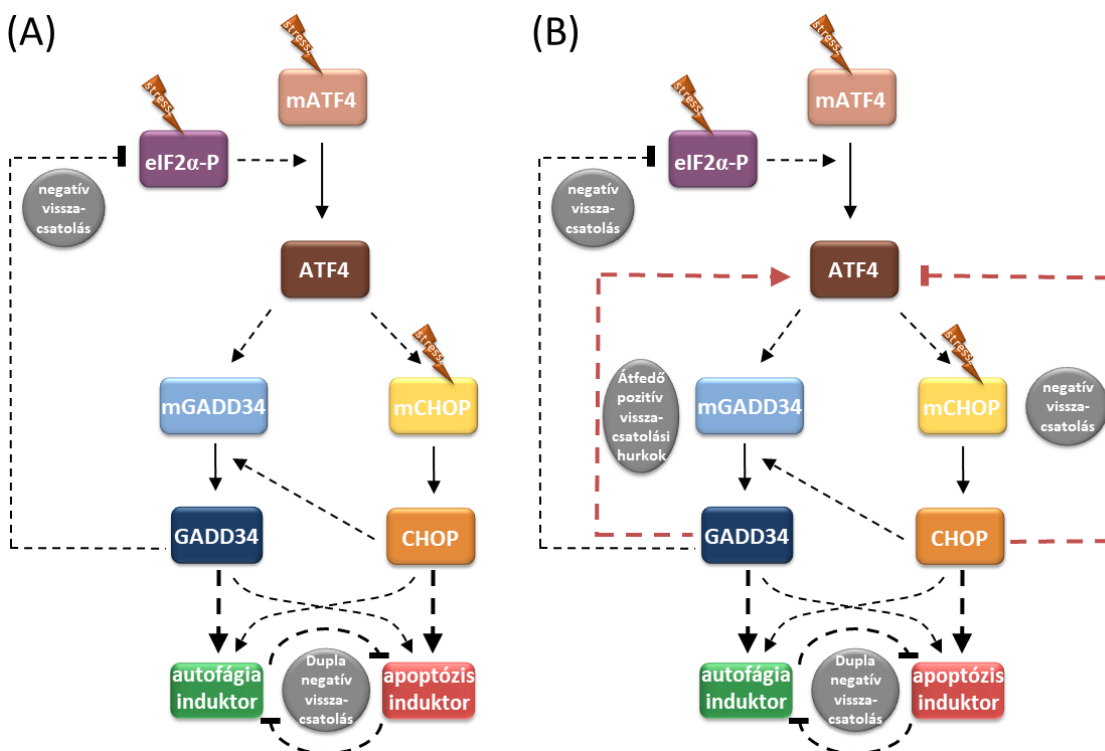
Ezek az eredmények megerősítik a CHOP pozitív hatását a GADD34-re, míg az ATF4-re nem volt semmiféle hatása a CHOP csendesítésének magas szintű ER stressz során.

4.3.4. Az ER stresszválasz megfelelő működéséhez további visszacsatolási hurkok szükségesek az ATF4 és annak célgénjei között

Eredményeink megerősítik a CHOP pozitív hatását a GADD34-re, és bizonyítják, hogy a GADD34 is serkentő hatással van a CHOP-ra (közvetve az ATF4-en keresztül), ami egy extra pozitív visszacsatolási hurok jelenlétét feltételezi a szabályozási rendszerben (25. ábra). Azonban, ha csupán ezek a plusz kapcsolatok állnak fent a már ismert ATF4-CHOP-GADD34 kapcsolatokon (83, 102, 107, 126, 138) kívül, a GADD34-gátlása és a CHOP gátlása is ugyanolyan hatást kellene eredményezzen ER stressz során. Felmerül a kérdés, hogy vajon milyen módon alakulhat ki az, hogy más-más eredménye van az ER stresszválasz mechanizmusára a CHOP és a GADD34 gátlásának, milyen esetleges plusz kapcsolatok eredményezhetik ezt a választ.

Ahhoz, hogy ezt az ellentmondást megvizsgáljuk és feloldjuk, rendszerbiológiai eszközökhöz nyúltunk. Először is egy kapcsolati ábrán szemléltettük a kisméretű, vizsgálandó szabályozó hálózatot, hogy a már ismert, abban biztosan jelenlévő kapcsolatokat, visszacsatolásokat látva fókuszálhassunk az UPR PERK ágának kulcselemeire (25.A ábra). A kapcsolati ábra elemeit a következőkben ismertetjük. ER stressz esetén az eIF2 α foszforilálódik. Emellett a növekvő ER stressz indukálja az ATF4 mRNS szintézisét is (mATF4), az eIF2 α -P pedig elősegíti az ATF4 transzlációját. Ezek a kapcsolatok teszik lehetővé azt, hogy az ER stressz mind transzkripciósan, mind transzlációsan indukálja az ATF4-et. Az aktív ATF4, transzkripció faktoraként serkenti a GADD34 és a CHOP transzkripcióját (mGADD34, mCHOP), így a GADD34 és a CHOP fehérjék mRNS szintjük növekedésének megfelelően aktiválódnak ER stressz során. A CHOP emellett a növekedő ER stressz hatására is egyre erősebben aktiválódik. Ennek az oka, hogy a CHOP serkentése, promóterén keresztül nem csak a PERK útvonalon történhet, tehát más útvonalak is aktiválhatják, mint például az ATF6 vagy az XBP1 (91-

93). Korábbi tanulmányban már leírták, hogy a CHOP-nak pozitív hatása van a GADD34-re, ezzel egy összefüggő előreccsatolások hurkot hozva létre a hálózatban (25.A ábra).

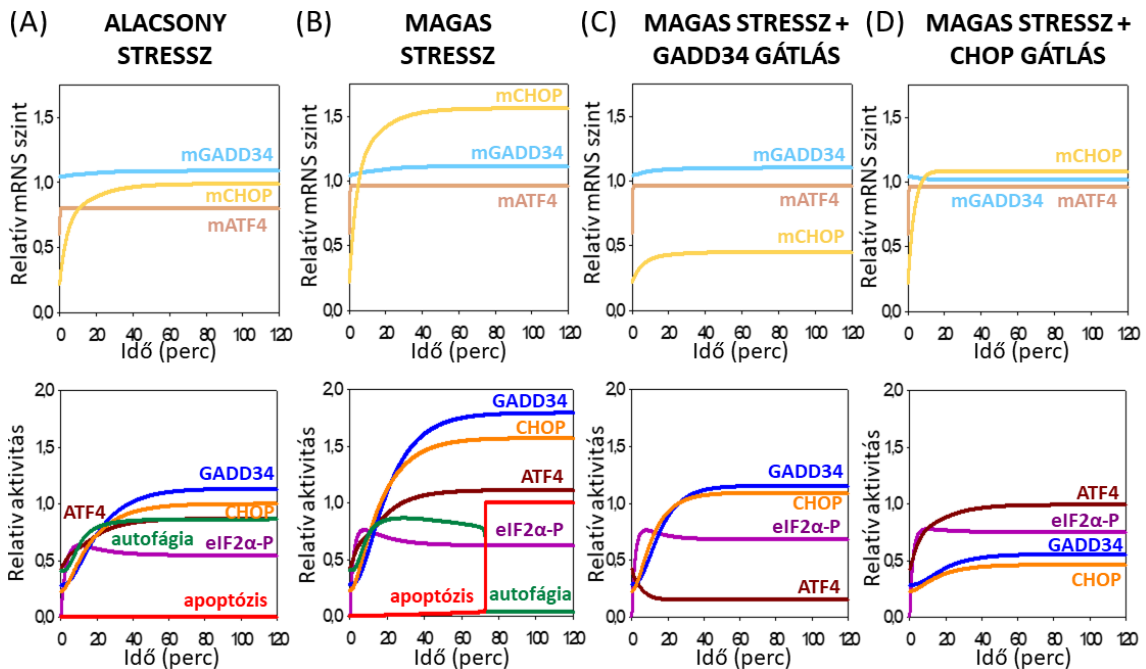


25. ábra: A PERK útvonal kulcselemei közötti (A) már ismert és újabb (B) kapcsolatok. A jelátviteli útvonalban az általunk vizsgált hipotetikus kapcsolatok narancssárga vonalakkal vannak jelölve, míg a már korábban megerősített kapcsolatokat fekete vonalak jelölik.

Ezen szabályozási kapcsolatok alapján egy egyszerű matematikai modellt hoztunk létre, és a kísérletes eredményeinket (alacsony és magas szintű ER stressz, illetve a magas szintű stressz kombinálása GADD34 és CHOP gátlásokkal) számítógépes szimulációk segítségével ellenőriztük le (26. ábra). Ebben a modellben is szerepel az autofágia induktor (Auta) és az apoptózis induktor (Apoa) elem, amelyek az aktív autofágia, illetve apoptózis aktivátor molekulák összeségét jelentik. Amikor tehát az Auta vagy Apoa aktív, azt feltételezzük, hogy az autofágia, illetve apoptózis folyamat aktív. A BiP itt sincs jelölve, a modellünk szerint az ER stresszor direkt módon indukálja az mATF4, eIF2 α -P, és mCHOP elemeket. Az ER stressz (S) értékek változtatásával itt is megkülönböztetünk egy alacsony szintű ER stressz szintet, ahol csak az autofágia aktív, és egy magas szintű, már nem tolerálható ER stressz szintet, ami elősegíti az apoptózist.

Mivel ezzel az egyszerű modellel nem tudtuk reprodukálni a kísérletes eredményeket, új kapcsolatok beépítésével igyekeztünk ezt orvosolni (25.B ábra). A modell összes kódját

a 3. Melléklet tartalmazza. Első körben beépítettük a GADD34 pozitív hatását az ATF4-re, ami így közvetve generált egy pozitív visszacsatolási hurkot a rendszerben a GADD34 és a CHOP között. Mivel ez még nem volt elegendő a kísérleteink reprodukálására, ezért felvetettük, vajon milyen lehetne a kulcselemek stresszre adott válasza, ha a CHOP is hatással lenne az ATF4-re, méghozzá gátolná azt. Pontosabban: annak hatását vizsgáltuk meg, amikor a GADD34 serkenti az ATF4 fehérje szintézisét, míg a CHOP-nak negatív hatása van ugyanerre az ATF4 a transzkripciós faktorra (25.B ábra). Ezzel egy pozitív és egy negatív visszacsatolási hurkot is létrehoztunk a szabályozásban (25.B ábra narancs színű új szaggatott vonalak). Ahhoz, hogy elméletben megvizsgáljuk ezeknek a hurkoknak a szerepét ER stressz során, a relatív mRNS és fehérje szintek időbeli változását is ábrázoltuk (26. ábra).



26. ábra: Számítógépes szimuláció a PERK útvonal által szabályozott ER stresszválasz mechanizmusról.

(A-D, felső sor) Az mRNS szintek (ATF4, CHOP, GADD34) és (A-D, alsó sor) a fehérje aktivitások (eIF2 α -P, ATF4, CHOP and GADD34) időbeli viselkedése számítógépes szimulációval vizsgálva, (A) alacsony (0,1 μ M TG) és (B) magas szintű ER stressz (10 μ M TG) esetén, és a magas stressz (C) GADD34-inhibitor (guanabenz) és (D) CHOP gátlással (siCHOP) való kombinációja során.

Alacsony vagy magas ER stressz szintek esetén a CHOP egy szignifikáns aktiválódást mutatott mRNS szinten (26.A és 26.B ábra felső sor). A kísérletes eredményeinknek megfelelően, mindhárom kulcsfehérjének volt egy aktiválódási csúcsa, amelyet az autofágia indukciója követett (26.A ábra, alsó sor). Azonban magas ER stressz esetén a

CHOP képes volt bekapcsolni az apoptotikus sejthalált, miközben az önemésztési autofágiás folyamatok gyorsan legátlódtak (26.B ábra, alsó sor).

Az újonnan beépített visszacsatolási hurkok jelenétében a GADD34 gátlás magas ER stresszel kombinálva érdekes fenotípust hozott létre a szabályozási hálózatban (26.C ábra). Mivel a GADD34 inaktívvá válik a GB kezelés hatására, a továbbiakban nem tudja serkenteni az ATF4-et, ami miatt a CHOP mRNS szinten alacsonyabbá válik, továbbá mindhárom kulcseleme a PERK útvonalnak (ATF4, GADD34, CHOP) szignifikánsan csökken fehérje szinten.

Kísérleteinknek megfelelően, létrehoztunk egy másik érdekes fenotípust, amikor a magas szintű ER stresszt CHOP csendesítéssel kombináltuk (26.D ábra). A CHOP hiányában az ATF4 szintje nem változik, bár a GADD34 és a CHOP szignifikánsan csökken fehérje szinten. Mivel a CHOP-nak negatív hatása van az ATF4-re, a CHOP hiányában az ATF4 erősebb aktivitást is mutathatna. Azonban a CHOP csendesítése megszünteti a CHOP → GADD34 kapcsolatot is a szabályozási hálózatban, ami miatt a GADD34 nem tudja elősegíteni az ATF4 hiperaktiválódását. A CHOP hiánya eltünteti a hatását a pozitív és a negatív visszacsatolási hurkoknak, amely ahhoz vezet, hogy az ATF4 sem mRNS szinten, sem fehérje szinten nem változik szignifikáns módon.

Ez az elméleti vizsgálat megerősítette tehát a pozitív visszacsatolási hurok jelenlétét az ATF4 és GADD34 között, és a negatív visszacsatolási hurkot az ATF4 és CHOP között ER stressz esetén.

4.4. További elméleti vizsgálatok az élet-és-halál közötti folyamat tanulmányozására ER stressz esetén

Elméleti módszerekkel készített modelljeink nemcsak a kísérletes eredményeink alátámasztására szolgálhatnak, hanem segítségükkel általánosabb képet kaphatunk a sejtszintű élet-és-halál közötti döntési folyamat dinamikai viselkedéséről különböző stressz folyamatok során. Ezáltal megjósolhatjuk a további kísérleteink irányát, amellyel csökkenthetők a kísérletek költségei, és növelhető azok hatékonysága. Ennek érdekében egy olyan általános modellt dolgoztunk ki az ER stressz-függő élet-és-halál közötti döntési mechanizmusra, amely jól leírja az autofágia és az apoptózis folyamatok közötti keresztkapcsolatok dinamikai viselkedését és azok jelentőségét ER stressz esetén.

4.4.1. A matematikai modell felépítése

Ahhoz, hogy az autofágia és az apoptózis szabályozásának dinamikai viselkedését megérthessük és arról egy általános képet kaphassunk ER stressz esetén, egy egyszerű matematikai modellt dolgoztunk ki. Mivel az UPR egy nagyon komplex hálózat, ami több bonyolult, szerteágazó útvonalat tartalmaz, egyszerűsítés végett, nem építettük be egyenként az összes hozzá tartozó molekulát. Ehelyett csupán azokra a kulcselemekre fókuszáltunk, amelyeknek fontos szerepe van a stresszválasz mechanizmus meghatározásában. A modellünk egy eleme emiatt itt is több mint egy molekulát jelenthet: például az autofágia/apoptózis induktorok (Auta/Apoa) az összes autofágiát/apoptózist indukáló, aktív molekulát jelentik.

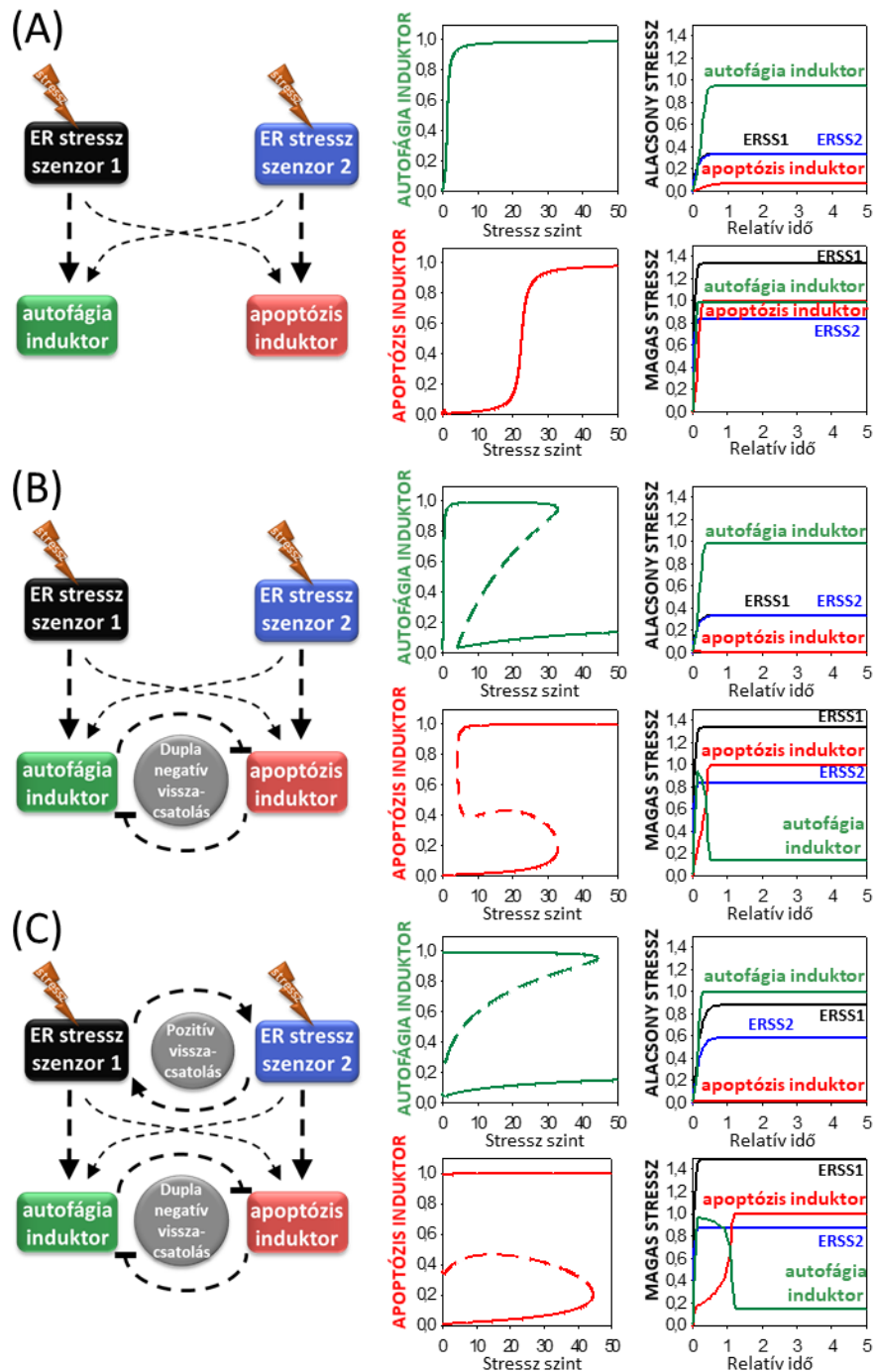
Bár az UPR-nek három jól meghatározott szabályozó útvonala van, az egyszerűség kedvéért mi itt két ER stressz szenzort jelöltünk meg, amelyeket ERSS1 és ERSS2-nek nevezünk. Ezek utalhatnak a három UPR útvonalból bármelyik kettőre. A harmadik útvonalra nincs szükségünk a szabályozó hálózat dinamikai vizsgálata során. Azt feltételezzük, hogy mindkét stressz szenzor képes az autofágia és az apoptózis indukálására, de különböző mértékben hatnak erre a két stresszválaszra. Biológiailag ez azt jelenti, hogy ezek a szenzor molekulák egymástól különböző útvonalakat képesek indukálni. Hipotézisünkben az ERSS1, ERSS2, autofágia és apoptózis induktorokhoz azok a komponensek tartoznak, amelyek esszenciálisak az ER stressz válasz mechanizmusnak, az autofágiának és az apoptózisnak stressz-függő aktiválásához a sejtekben. A BiP-et ez a modell sem tartalmazza, mivel a modellben azt feltételezzük, hogy az ER stresszorok direkt módon indukálják az ERSS1 és ERSS2 stressz szenzorokat. Ahhoz, hogy a rendszer dinamikai működését megismerjük, nem vettük figyelembe egyesével az UPR hálózat összes molekuláját, hanem inkább az ER stressz szenzorok autofágia és apoptózis induktorokra való hatására fókuszáltunk.

A következőkben lépésről lépésre építjük be a szabályozási hurkokat a modellünkbe, így vizsgáljuk meg azok szerepét és funkcióját a rendszer dinamikai viselkedésében, és ezáltal alaposabban megismerhetjük az ER stresszválaszát a sejteknek. Eredményeinket jel-válasz görbéken ábrázoltuk, ahol a jel minden esetben a növekvő stressz szint volt a sejtekben, illetve a számítógépes szimulációkkal a szabályozási rendszer időbeli viselkedését is vizsgáltuk.

4.4.2. A rendszerszintű visszacsatolási hurkok biztosítják a szabályozási hálózat robosztusságát ER stressz során

Először is megvizsgáltuk azt a lehetőséget, amikor nincsen semmiféle kapcsolat az ERSS1 és ERSS2 szenzorok között, és az autofágia és az apoptózis induktorok közé sem építettünk be visszacsatolási hurkot (27.A ábra, baloldal). A szabályozási hálózat dinamikai viselkedését olyan jel-válasz görbékkel írtuk le, ahol az autofágia és az apoptózis induktorok aktivitását ábrázoltuk a celluláris stressz függvényében (27.A ábra, középső oszlop). Fiziológiai körülmények között (amikor a stressz értéke: 0) sem az autofágia, sem az apoptózis nem detektálható, azonban az ER stressz növekedése függvényében mindkét mechanizmus egy szigmoid aktivációs kinetikát mutat. A korábbi eredményeink (31) azonban azt sugallják, hogy az autofágia-függő túlélés már alacsony ER stressz esetén is gyorsan aktiválódik, miközben az apoptózis inaktív marad (27.A ábra, jobb oldali oszlop). Bizonyított, hogy az autofágia időben megelőzi az apoptotikus sejthalált magas szintű ER stressz esetén, ami ebben az esetben csak minimális mértékben valósul meg (27.A ábra, jobb oldali oszlop). Ugyanakkor, mindkét mechanizmus egyszerre aktív magas szintű ER stressz esetén, ami nem egyezik a valósággal, mivel az autofágia-függő folyamatnak ki kell kapcsolnia, amikor már az apoptózis aktiválódott a sejtben (31).

Emiatt a kapcsolati ábránkat kibővítettük az autofágia és az apoptózis induktorok közötti dupla negatív visszacsatolással (27.B ábra, baloldal). Ebben az esetben a dupla-negatív visszacsatolás egy ön-erősítő kapcsolatot hoz létre a két mechanizmus között. Az autofágia és az apoptózis aktivációja és inaktivációja is egy olyan nem folytonos változást generál az induktorok aktivitásában, ahol a sejtes válasz hirtelen változik meg, mintegy kapcsolószerűen módosul egy jól definiált ER stressz küszöbérték esetén (27.B ábra, középső oszlop, lásd, ahol a két folytonos vonalat szaggatott vonalak kötik össze). Ez a viselkedés esszenciális a két teljesen különböző állapot pontos elkülönítéséhez. A „kapcsoló” egyik állapotában, amikor a stressz szint tolerálható, az autofágia aktív és legátolja a sejthalált (27.B ábra, középső és jobboldali oszlop). A másik állapotban, amikor az ER stressz szintje nem tolerálható mértéket ér el, az apoptózis kapcsol be, miközben az autofágia inaktiválódik (27.B ábra, középső és jobboldali oszlop).



27. ábra: A rendszerszintű visszacsatolási hurkok szerepe a szabályozási hálózat robusztusságában ER stressz esetén.

A kapcsolati ábrák (bal oszlop), az autofágia és apoptózis induktorok jel-válasz görbéi (középső oszlop), és az induktorok, és ER stressz szenzorok időbeli viselkedése alacsony és magas ER stressz során (jobb oszlop). Három eset vizsgálata: (A) nincs kapcsolat sem az ER stressz szenzorok, sem az autofágia és apoptózis induktorok között; (B) az autofágia és apoptózis induktorok közötti dupla negatív visszacsatolás esete és (C) a dupla negatív visszacsatolás mellett a két ER stressz szenzor közötti pozitív visszacsatolási hurok jelenléte. A folytonos vonalak a stabil állapotot, míg a szaggatott vonalak az instabil állapotot jelentik. Instabil állapot: az induktorok viselkedését kifejező differenciálegyenletek alapján a jel-válasz görbén a stabil ki-, illetve bekapcsolt állapotot összekötő görbék, amelyek csak matematikailag értelmezhetőek.

Azonban ez az egyszerű modell a dupla-negatív visszacsatolással sem elég pontos, mert nem biztosítja az apoptózis irreverzibilis viselkedését ER stressz esetén, nevezetesen a stressz hirtelen megszűnése nem eredményezheti az apoptózis kikapcsolását. Az apoptózis indukció ugyanis egy bizonyítottan irreverzibilis folyamat, emiatt a modellünket szükséges volt még tovább bővíteni.

Ahhoz, hogy nem tolerálható ER stressz esetén az apoptózist egyirányú módon indukáljuk, és közben az autofágia kikapcsoljon, egy pozitív visszacsatolási hurkot építettünk be a két ER stressz szenzor közé (27.C ábra, baloldal). Ennek hatására, amikor az ER stressz-szint eléri a kritikus küszöbértéket, az apoptózis induktor hirtelen aktiválódása már irreverzibilissé válik, és ezzel párhuzamosan, az autofágia induktor is kikapcsol. Tehát az ER stressz szenzorok közötti extra pozitív visszacsatolási hurok beépítése a szabályozási hálózatba - az autofágia és az apoptózis induktorok közötti dupla negatív visszacsatolási hurokkal együtt - már biztosítja a stresszválasz mechanizmus egyirányú, nem visszafordítható, kapcsoló-szerű viselkedését (27.C ábra, középső és jobboldali oszlop). Ezek az eredmények teljes mértékben megegyeznek az általunk kísérletesen is igazolt ER-stressz válasz mechanizmussal, nevezetesen, hogy alacsony stressz esetén csak autofágia aktiválódik, míg magas stressznél irreverzibilis módon bekapcsol az apoptózis (13.A és 20. ábrák).

4.4.3. A PERK útvonal elemei közötti pozitív kapcsolat hatása a sejtek túlélésére ER stressz során

A matematikai analízisünk azt sugallja, hogy a szabályozó molekulák között jelenlévő dupla negatív és pozitív visszacsatolási hurkok biztosítják a sejt élet-és-halál közötti stressz-válasz mechanizmus megfelelő megvalósulását. Ennek segítségével különböző mutáns fenotípusokat vizsgáltunk ER stressz esetén, ezzel feltárva a szabályozási hálózat biológiai jelentőségét is.

Első körben bebizonyítottuk a pozitív visszacsatolási hurok jelenlétét a PERK és az IRE1 között ER stressz esetén (32), de emellett nem zártuk ki annak a lehetőségét sem, hogy más pozitív visszacsatolási hurkok is létezhetnek az UPR hálózatában, az adott útvonalakon belül. Így jutottunk el oda, hogy a PERK útvonalon belül a CHOP és a GADD34 közötti kapcsolatokat vizsgáltuk mind kísérletes, mind elméleti úton (ld. korábban: 21-26. ábrák). A CHOP-nak esszenciális szerepe van az apoptózis

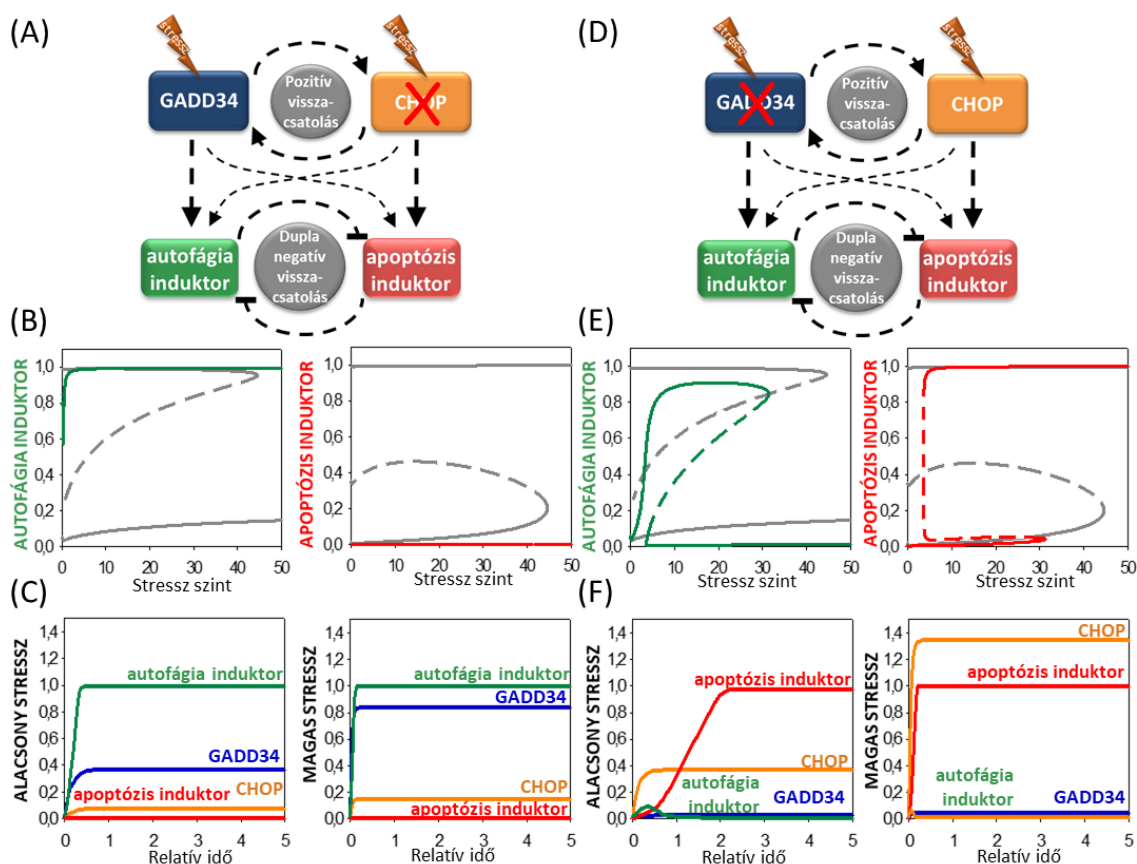
indukciójában (88), de vannak eredmények arra vonatkozóan is, hogy a CHOP számos autofágiás gén aktivitását képes serkenteni korai ER stressz esetén (109). A GADD34 az mTOR gátlásával serkenti az autofágiát (124), azonban túlzott mennyiségű GADD34 apoptotikus sejthalált is indukálhat (126). Marciniak és társai tanulmányában a CHOP-kiütött sejtekben gyengült a GADD34 aktiválódása TM-kezelés esetén (107), és ezt mi is megerősítettük, saját kísérleteinkkel TG-kezelés során (24.A és 24.B ábra). Emellett a GADD34 gátlás is negatívan hat a CHOP aktiválódásra celluláris stressz esetén (22. ábra). Ezek az eredmények azt sugallják, hogy direkt vagy indirekt módon jelen van egy pozitív visszacsatolási hurok a GADD34 és CHOP elemek között is. A megemlített kísérletes adatok alapján egy pozitív visszacsatolási hurkot javasoltunk a CHOP és a GADD34 fehérjék között (28. ábra). Az egyszerű modellünk alapján a GADD34-nek erősebb a hatása az autofágia indukciójára, míg a CHOP drasztikusabb hatást gyakorol az apoptózisra. Célunk az volt, hogy megvizsgáljuk ennek a kapcsolatnak a szerepét a szabályozási hálózat által megfelelően irányított élet-és-halál közötti döntésben, vagyis elméleti úton vizsgáljuk, hogy a két fehérje, hogyan hat az autofágia és az apoptózis indukciójára.

4.4.4. A GADD34 és CHOP hiányának hatása a szabályozásra, predikció a GADD34 és CHOP overexpresszióra

Az általunk kísérletes módon igazolt fenotípusokkal tovább teszteltük az így felépített modellünk helyességét. Ahhoz, hogy ezekben az esetekben is megvizsgáljuk a hálózat dinamikai viselkedését az élet-és-halál közötti döntési folyamatokra, számítógépes szimulációkkal külön-külön tanulmányoztuk a CHOP és a GADD34 hiányának lehetséges hatását tartós és magas ER stressz esetén is (28.A ábra).

A CHOP hiányában az apoptózis indukció küszöbértéke jobbra tolódik, ami azt jelenti, hogy az apoptózis nem tud bekapcsolni, viszont az autofágia magas szintű ER stressz esetén is aktív (28.B és 28.C ábra). A kísérletes eredmények alapján a CHOP-kiütött sejtek életképessége drasztikusan megnő (76), mivel a sejtek nem tudnak apoptózist indukálni. Bár a GADD34-nek van valamennyi pozitív hatása az apoptózis induktorra nézve, de mivel az autofágián való hatása sokkal erősebb, és az autofágia és apoptózis induktorok közt jelen van egy dupla negatív visszacsatolás, ezek így együtt aktívan tartják

az autofágiát nem tolerálható stressz esetén, ha a CHOP hiányzik a rendszerből (28.B és 28.C ábra).



28. ábra: A CHOP vagy a GADD34 hiányának hatása az ER stresszválasz mechanizmusra. A CHOP hiányának vizsgálata: (A) kapcsolati ábra, (B) az autofágia és apoptózis induktorok jel-válasz görbéi és (C) az induktorok, illetve a GADD34 és CHOP ER stressz szenzorok időbeli viselkedése alacsony és magas ER stressz során. A GADD34 hiányának vizsgálata: (D) kapcsolati ábra, (E) az autofágia és apoptózis induktorok jel-válasz görbéi és (F) az induktorok, illetve a GADD34 és CHOP ER stressz szenzorok időbeli viselkedése alacsony és magas ER stressz során. A stabil állapotot folytonos vonalakkal, az instabil állapotot szaggatott vonalakkal jelöltük. A szürke vonalak az eredeti (nem hiányos) jel-válasz görbéket ábrázolják. Instabil állapot: az induktorok viselkedését kifejező differenciálegyenletek alapján a jel-válasz görbén a stabil ki-, illetve bekapcsolt állapotot összekötött görbék, amelyek biológiailag nem értelmezhetők, csak matematikailag. A szürke vonalak az eredeti (nem kiűtött) jel-válasz görbéket ábrázolják.

Amennyiben a GADD34 hiányzik a rendszerből (amit a mi esetünkben a korábbiakban GB kezeléssel inaktíváltunk), mind az apoptózis induktor aktivációs, mind az autofágia induktor inaktívációs küszöbértéke balra tolódik, ami már alacsonyabb szintű ER stressz esetén is az apoptózis indukciójához, illetve az autofágia inaktíválásához vezet (28.D, 28.E, és 28.F ábra). A GADD34 nélkül az autofágia induktor nem elég erős, és a CHOP

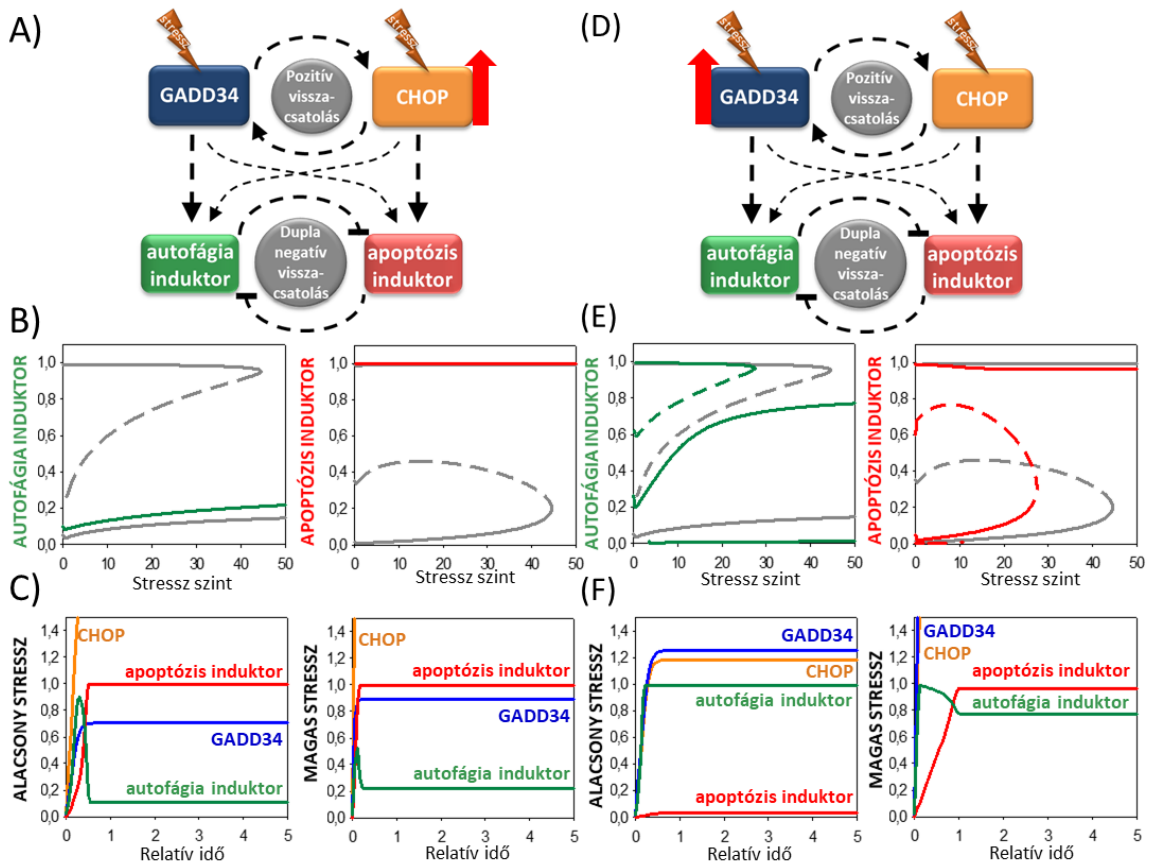
könnyen hiperaktiválhatja a sejthalál folyamatot, akár alacsony szintű ER stressz esetén is.

A dinamikai analízisünk tehát megerősítette, hogy a CHOP és GADD34 ER stressz szenzorok egyensúlya esszenciális a sejt élet-és-halál közötti döntésében ER stressz során. Ez részben összevág a korábbi kísérletes eredményeinkkel, amikor tranziens, magas szintű ER stresszt GADD34 gátlással, illetve CHOP csendesítéssel vizsgáltuk (21-24. ábra). Úgy tűnik, hogy az autofágia pontos aktiválódását a GADD34 szabályozza már rövid ideig tartó, magas szintű ER stressz esetén, ezért ezek az eredmények azt sugallják, hogy a GADD34-nek kulcsszerepe lehet a sejt túlélése és sejthalál közti átkapcsolásban.

Miután modellünkkel a korábbi kísérletes eredményeinket is megerősítettük, a hálózat dinamikai viselkedésének további vizsgálata céljából, szeretnénk volna predikciós vizsgálatokkal is tesztelni azt. Emiatt ezt a modellt felhasználtuk a CHOP és GADD34 overexpressziók lehetséges hatásának analizésére magas szintű ER stressz esetén (29. ábra).

Egy tanulmányban a CHOP overexpressziója ér-simaizom-sejtekben szignifikánsan csökkentette a sejtek életképességét és apoptózist okozott (168). Mivel a jel-válasz görbe apoptózis induktora balra tolódik, hogyha a CHOP túltermelődik a sejtekben, az apoptózis indukció küszöbértéke alacsonyabb szintű ER stresszhez vezet (29.A, 29.B ábra). Tehát ekkor az apoptózis már akár alacsonyabb ER stressz esetén is bekapcsol, míg az autofágia inaktív marad (29.B és 29.C ábra).

A GADD34 overexpresszió az apoptózis induktor aktivációs/autofágia induktor inaktivációs küszöbértékét tolja el egy alacsonyabb stressz szintre, ami alapján feltételezhető egy drasztikus sejt életképesség-csökkenés (29.D és 29.E ábra). Habár a CHOP és a GADD34 közti pozitív visszacsatolás miatt a nagymértékű GADD34 szint a sejtben extrém pozitív hatást gyakorol az autofágia indukcióra, a GADD34 a sejthalált is serkenti, a CHOP mechanizmusa által. Emellett a GADD34-nek van még egy direkt pozitív hatása az apoptózis induktoron. Emiatt az autofágiának ebben az esetben nincs esélye az apoptózissal szemben, és a sejtek már alacsonyabb szintű stressz esetén apoptotizálnak (29.D, 29.E, 29.F. ábra).



29. ábra: A CHOP vagy a GADD34 overexpresszió hatása az ER stresszválasz mechanizmusra. A CHOP overexpresszió vizsgálata: (A) kapcsolati ábra, (B) az autofágia és apoptózis induktorok jel-válasz görbéi és (C) az induktorok, illetve a GADD34 és CHOP ER stressz szenzorok időbeli viselkedése alacsony és magas ER stressz során. A GADD34 overexpresszió vizsgálata: (D) kapcsolati ábra, (E) az autofágia és apoptózis induktorok jel-válasz görbéi és (F) az induktorok, illetve a GADD34 és CHOP ER stressz szenzorok időbeli viselkedése alacsony és magas ER stressz során. A stabil állapotot folytonos vonalakkal, az instabil állapotot szaggatott vonalakkal jelöltük. Instabil állapot: az induktorok viselkedését kifejező differenciálegyenletek alapján a jel-válasz görbén a stabil ki-, illetve bekapcsolt állapotot összekötő görbék, amelyek biológiailag nem értelmezhetők, csak matematikailag. A szürke vonalak az eredeti (nem overexpresszált) jel-válasz görbéket ábrázolják.

Ezekkel a predikciós vizsgálatokkal jól szemléltettük, hogyan lehet a rendszerbiológia eszközeivel megjósolni a kísérletes eredmények irányát és kimenetelét. Az overexpressziós szimulációk eredményeit természetesen a továbbiakban szükséges kísérletesen is megerősíteni.

5. MEGBESZÉLÉS

5.1. Az autofágia és apoptózis kapcsolata ER stressz során

A szervezet megfelelő felépítéséhez és működéséhez a sejt egyik legfontosabb feladatai közé tartozik az élet-és-halál közötti döntéshozatal. A hibás fehérjék különböző ER stressz hatások miatti felhalmozódása az ER-ben a selejt fehérje válasz (UPR) aktiválódásához vezet. Az UPR három ágának fő szerepe az, hogy az autofágiás önemésztés segítségével csökkentse a károsodásokat és visszavezesse a rendszert a korábbi, vagy egy új egyensúlyi állapotba, míg ha ez nem lehetséges, túlzott stressz esetén aktiválja a programozott sejthalált (169).

Kísérleteink kiindulási pontjául szolgáló tanulmányunk során az autofágia-függő túlélés és az apoptotikus sejthalál közötti kapcsolat dinamikáját vizsgáltuk meg különféle ER stresszorokkal (mint TG, TM, és DTT), HepG2 sejteken. Bár az ER stresszorok különböző mechanizmusokkal bontják meg az ER egyensúlyát, a sejtek élet-és-halál közötti döntésének szabályozó mechanizmusa ugyanolyan módon valósul meg. Ezt alátámasztja, hogy hasonló eredményeket mutatott mindhárom ER stresszorral végzett kísérletsorunk. Korábban már mások is megfigyelték, hogy magas szintű ER stressz esetén az autofágia-függő túlélést apoptotikus sejthalál követi (170). Ezt a mi kísérleteink is megerősítették, azzal kiegészítve, hogy alacsony szintű ER stressz mindig csak autofágiát indukál, majd magas stressz esetén a tranziens autofágia lecsengése után aktiválódik az apoptózis (13. ábra).

Mind molekuláris biológiai módszerekkel, mind elméleti biológiai eszközökkel megállapítottuk, hogy ER stressz esetén az autofágia mindig megelőzi az apoptózist, és a sejthalál mechanizmus irreverzibilis módon, kapcsoló-szerű kinetikával aktiválódik. Ez a kapcsoló-szerű aktiválódás a stressz szintjének egy úgynevezett küszöbértékéhez köthető (13. ábra). Megfigyeltük, hogy a két folyamat (autofágia, apoptózis) nem lehet egyszerre aktív, ami a két mechanizmus közötti kölcsönös antagonizmus jelenlétét feltételezi. Emiatt egy dupla negatív visszacsatolási hurkot állapítottunk meg az autofágia és az apoptózis induktorok között a stresszválasz hálózatban (6. ábra, 13. ábra). Az antagonizmust az autofágia és az apoptózis közti dupla-negatív visszacsatolási hurok biztosítja. Ez teszi lehetővé, hogy az autofágia induktorok tranziens aktiválódását az

apoptózis induktorok kapcsolószerű aktiválódása kövesse, amennyiben az ER stressz szint elér egy kritikus küszöbértéket.

Feltételezzük, hogy az autofágiát és az apoptózist szabályozó hálózatban a különböző autofágia és apoptózis induktorokat irányító extra kapcsolatok esszenciálisak lehetnek a folyamat irreverzibilitásában. Emiatt, a következőkben ezeket a lehetséges plusz szabályozási hurkokat szeretnénk volna megvizsgálni.

5.2. Az IRE1 és a PERK útvonalak vizsgálata és szerepe a sejt élet-és-halál közötti döntésében ER stressz esetén

A kutatásunk következő lépésében az UPR PERK ágára fókuszáltunk, és arra, hogy az IRE1 és a PERK útvonalak hogyan veszik ki részüket a sejt élet-és-halál közti döntéséből. Emiatt a korábbiakhoz hasonlóan, elméleti és molekuláris biológiai technikákat egyesítve, megvizsgáltuk ennek a szabályozó hálózatnak a viselkedését magas szintű ER stressz során. A kísérletek kivitelezésekor áttértünk a HEK293T sejtvonagra, amelyen thapsigargin és tunicamycin stresszorokkal indukáltunk ER stresszt.

Korábban, mások által publikált adatokhoz hasonlóan (171, 172), mi is megfigyeltük a sejtek életképességének növekedését, amikor az ER stresszt PERK csendesítéssel kombináltuk (15. ábra). Emellett a kísérleti eredmények megerősítik, hogy a PERK siRNS-transzfektált sejtekben, magas szintű ER stressz esetén, az autofágia tovább marad aktív, és az apoptózis ennek megfelelően később aktiválódik (16. ábra). Tehát az autofágiás túlélés aktivitásának ideje meghosszabbodott a PERK útvonal hiányában.

A nem PERK-csendesített sejtekben, mindkét stresszorral indukált magas szintű ER stressz esetén, megfigyelhető volt mind a PERK, mind az IRE1 útvonalak apoptózis induktorainak (CHOP, JNK) kapcsolószerű aktiválódása, az autofágia inaktiválódását követően. Ez megerősíti az autofágia és az apoptózis folyamatok közötti, a már korábban is megfigyelt dupla-negatív visszacsatolási hurok jelenlétét. A PERK-indukált apoptózis induktor (CHOP) kapcsolószerű aktiválódása a PERK csendesítés hatására csupán egy tranziens aktivációt mutatott. Ez tanúsítja, hogy a stresszválasz mechanizmus nem, vagy csak sokkal lassabb kinetikával kapcsolja be az apoptózist a PERK útvonal hiányakor (16.A, B ábra). Ráadásul a PERK-csendesített sejtekben az IRE1 útvonal apoptózis induktorának (JNK) aktivitása is tranzienssé vált, ami alapján a PERK hatással van az

IRE1 útvonalra is (17.A, B ábra). Az apoptózis induktorok tranzienst aktiválódása azt sugallja, hogy a PERK esszenciális a programozott sejthalál szabályozásában tartósan magas ER stressz esetén. Kísérletes adataink igazolták, hogy két kritériumnak kell megfelelni ahhoz, hogy az autofágiából való átkapcsolás apoptózisba megtörténjen: a stressz szintnek el kell érnie egy kritikus küszöbértéket, és a PERK útvonalnak aktívnak kell lennie.

Ahhoz, hogy számítógépes szimulációkkal is megvizsgáljuk, hogy a PERK és az IRE1 milyen mértékben járul hozzá a sejt élet-és-halál közötti döntéséhez ER stressz során, kettő, a PERK és az IRE1 ágakat képviselő ER stressz szenzort építettünk be modellünkbe. Jól ismert adat, hogy a PERK és az IRE1 ágak is képesek serkenteni az autofágia és az apoptózis induktorokat, de mi azt gondoljuk, hogy az induktorokra való hatásuk intenzitása különböző. Mivel az IRE1 ág gátlása drasztikusan gyorsítja az apoptózist, és így csökkenti a sejtek életképességét (136), modellünkben sokkal intenzívebb IRE1-hatást feltételezünk az autofágia induktoron, mint az apoptózisán (18. ábra). Azonban, mivel bizonyítottuk, hogy a PERK csendesítés ER stresszel kombinálva késleltette az apoptózist, a PERK hatása erősebbnek látszik az apoptózis induktorokon, mint az autofágia induktorokon (18.A ábra). Deegan és társai korábban bizonyították, hogy a PERK apoptózis induktora gyengül az IRE1 gátlásakor (134). Eredményeinkben bemutattuk, hogy a PERK csendesítése csökkentette a JNK aktivitását (17. ábra, P-c-Jun), ami bizonyítja a PERK pozitív hatását az IRE1 útvonalon ER stressz során. Beépítve ezeket a kapcsolatokat a modellünkbe, egy pozitív visszacsatolási hurok jött létre a PERK és az IRE1 útvonalak között (18.A ábra).

A stresszválasz mechanizmusról készített egyszerű modellünk képes megmagyarázni mind a PERK, mind az IRE1 ágak hiányában, az autofágia és apoptózis közötti döntésben bekövetkezett módosulásokat. Mivel a PERK-nek szignifikáns hatása van az apoptózis induktoron, a PERK csendesítése jobbra, egy magasabb stressz-értékre tolta el a jelválasz görbe apoptózist aktiváló küszöbértékét, amely késleltetett sejthalálhoz vezet (18.E, H ábra.). A PERK ezen hatását két különböző ER stresszszóval is megerősítettük (15., 16. és 17. ábra). Azonban, egy publikációban az IRE1 gátlása korai apoptózishoz vezetett tartós ER stressz során (136). Mivel az IRE1-nek kifejezetten pozitív hatása van az autofágia induktoron, a modellünkön látszik, hogy az autofágia és az apoptózis

induktorok közti dupla negatív visszacsatolás is gyengült az IRE1 hiányában (18.C ábra). A gyengébb autofágia induktor nem tudja fenntartani az apoptózis induktor inaktív állapotát, ami miatt a sejthalál gyorsabban aktiválódik és küszöbértéke egy alacsonyabb stressz szintre kerül (18.F és 18.I ábra). Az eredményeink alapján mind az IRE1 és mind a PERK ágak jelenléte esszenciális az ER stresszválaszban. Az autofágia-függő túlélés megfelelő aktivitását a két ág közösen biztosítja, annak apoptózisba való átkapcsolását is szabályozva, tartós ER stressz esetén.

Az elméleti vizsgálatunk feltételezi, hogy az IRE1 és a PERK hiányának más-más hatása van a sejt élet és halál közti döntésében ER stresszre válaszul, az apoptózis induktor küszöbértékének különböző irányba való eltolódásával. Az irreverzibilis apoptózis indukciót ez akár reverzibilissé is teheti, tartós ER stressz során. Az apoptózis indukció visszafordíthatatlansága biztosítja azt, hogyha egyszer a sejt apoptózist indukál, az sose fordul vissza az azt megelőző autofágiás túlélés felé, még ha a stresszort ki is mossák a sejtől (31). A hálózat eme irreverzibilitása esszenciális, hogy elkerülje a meghibásodott sejtek proliferációját (165). Modellünk azt javasolja, hogy az IRE1 vagy a PERK gátlása is okozhatja az apoptózis induktor reverzibilis indukcióját ER stressz során, ami egy szignifikáns módosulást hoz létre a szabályozó rendszerben. A hálózat nem tudja többé garantálni az apoptózis irreverzibilitását. Emiatt egy pozitív visszacsatolási hurkot javasolunk az UPR ezen ágai között, amely döntő fontosságú abban, hogy létrehozza az apoptózis indukciójának kritikus, visszaút-nélküli működését a sejt élet-és-halál közötti döntéshozatala során.

5.3. Molekuláris kapcsolatok a PERK útvonalon belül: az ATF4 és célgénjei közötti új visszacsatolási hurkok szerepe

Az UPR IRE1 és PERK útvonalának vizsgálatát követően felmerült a kérdés, hogy vajon jelen lehetnek-e az útvonalakon belül is még nem ismert, extra pozitív visszacsatolási hurkok, amelyek még robosztusabbá teszik az irreverzibilis átkapcsolást ER stressz esetén. Emiatt szerettük volna megvizsgálni a következőkben, hogy az egyik legintenzívebben kutatott UPR ágnak, a PERK útvonalnak a kulcselemei, az ATF4, a GADD34 és a CHOP, dinamikai működésükkel hogyan alakítják ki az ER stresszre adott választ.

Korábban kimutatták, hogy a CHOP-nak pozitív hatása van a GADD34-re (107), és vannak eredmények arra is, hogy a GADD34 gátlása negatívan hat a CHOP aktiválódásra celluláris stressz során (82, 139-142). Az még azonban nem ismert, hogy a GADD34 direkt vagy indirekt módon segíti elő a CHOP jelátvitelét ER stressz esetén. Ahhoz, hogy ezt megvizsgáljuk, a magas szintű, thapsigarginnal indukált ER stresszt kombináltuk a GADD34-nek vagy a CHOP-nak a gátlásával (guanabenz és CHOP siRNS által), miközben mRNS és fehérje szinten is megvizsgáltuk az ATF4, a GADD34, és a CHOP aktivitásokat (21.C, 22., 23.C, 24. ábra). A kísérleteket itt is a HEK293T sejteken végeztük.

A GADD34-gátlás és a TG-kezelés kombinálása szignifikánsan csökkentette a CHOP-ot mind mRNS, mind fehérje szinten (21.C és 22. ábra), amely megerősíti, hogy a GADD34-nek pozitív hatása van a CHOP-ra. Emellett az ATF4 fehérje szintje is szignifikánsan csökkent a guanabenz-zel kombinált kezelés során (22. ábra), amely arra utal, hogy a GADD34 pozitívan hathat a CHOP-ra, de indirekt módon teszi ezt, az ATF4-en keresztül. Bár minden részlet még nem ismert, de ez megerősíti, hogy a PERK útvonalon belül is jelen van egy pozitív visszacsatolási hurok ER stressz során.

Érdekes eredményt mutatott a CHOP siRNS-sel történő csendesítése ER stressz indukcióval kombinálva. A GADD34 fehérje szintje alacsonyabb volt, de ebben az esetben az ATF4 fehérje szintjét nem befolyásolta ez a kezelési kombináció (24. ábra). Ha csak egy sima, indirekt pozitív visszacsatolási hurok lenne a GADD34 és a CHOP között az ATF4-en keresztül, az ATF4 mennyiségének is csökkennie kéne, hasonlóan a GADD34-gátláskor megfigyelt eredményhez. Az elméleti analízisünk jól szemlélteti, hogy ez a fenotípus (23., 24. ábra) csak akkor megfigyelhető, amennyiben jelen vannak extra visszacsatolási hurkok is a rendszerben (27.B ábra). Elméleti úton bizonyítottuk, hogy ez csak úgy képzelhető el, amennyiben a GADD34 ATF4-re való pozitív hatása mellett, a CHOP gátolja az ATF4-et, amivel egy extra pozitív ($ATF4 \rightarrow GADD34 \rightarrow ATF4$) és egy extra negatív ($ATF4 \rightarrow CHOP \dashv ATF4$) visszacsatolási hurok jön létre a szabályozási hálózatban. Amikor a CHOP gátlődik ER stressz során, a GADD34 alacsonyabb szintje a $CHOP \rightarrow GADD34$ kapcsolat hiányával magyarázható. Bár az ATF4 felszabadul a CHOP-függő gátlás alól, a GADD34 alacsonyabb szintje miatt nincs szignifikáns változás az ATF4 szintjében (25, 26. ábra). Ezeket a visszacsatolási

hurkokat, a matematikai modell mellett, érdemes lenne a jövőben kísérletesen is megerősíteni.

Felmerül a kérdés, hogy mi lehet a pontos szerepe a szabályozási hálózatban az ATF4 \rightarrow CHOP \dashv ATF4 negatív visszacsatolási huroknak. Amikor egy célmolekula negatívan visszahat az induktorára, az mindig csillapító hatást jelent a jelátviteli útvonalára. Laborunkban már volt egy hasonló kapcsolati vizsgálatra példa, témavezetőm Dr. Kapuy Orsolya és Dr. Korcsmáros Tamás kollaborációs vizsgálatában, mely során az NRF2 az ő AMPK aktivátorára vonatkozó negatív hatásának (173, 174) szerepét vizsgálva bizonyította, hogy ennek a negatív visszacsatolásnak az autofágia hiperaktiválódásának megelőzésében lehet esszenciális szerepe a két molekula által (175). Ezen az ötleten elindulva azt feltételezzük, hogy az általunk vizsgált negatív visszacsatolási hurok (ATF4 \rightarrow CHOP \dashv ATF4) esetén a CHOP gátló hatása érvényesülhet az ATF4 hiperaktiválódásának megelőzésében magas szintű ER stressz esetén. A döntéshozó folyamat során az autofágia és az apoptózis pontos egyensúlya függhet a GADD34 és a CHOP által szabályozott visszacsatolási hurkok finomhangolásától. A pozitív és a negatív visszacsatolási hurkok összehangolt működése biztosítja a stressz-szinttől függő kapcsolat-szerű karakterisztikát, amelyben elképzelésünk szerint mind a GADD34, mind a CHOP esszenciális szereppel bírnak.

A vizsgálataink során ellenőriztük még TurboID módszerrel - amely segítségével molekulák egymáshoz való közelségét lehet megállapítani (176) -, hogy van-e bármilyen direkt kapcsolat a GADD34-ATF4 vagy CHOP-GADD34 között. A kísérletek még további vizsgálatot igényelnek és mivel nem én végeztem el őket, ezért nem tüntettem fel őket az „Eredmények” között, de érdekesnek tartom megemlíteni, hogy egyelőre nem találtunk direkt kapcsolatot a fent említett molekulák között. A TurboID módszer segítségével 118 biotinilált fehérjét találtunk, amelyek a Gene Ontology analízis szerint (<http://geneontology.org/>) kapcsolódnak az UPR válasz, autofágia vagy apoptózis folyamatokhoz, és GADD34-hez való távolságuk megváltozik (megnő vagy lecsökken) ER stressz hatására. Mivel ezek között nem volt jelen az ATF4 vagy a CHOP, nagyon valószínűtlen, hogy a GADD34 direkt módon hatna ezekre, illetve fordítva. Ez megerősíti, hogy indirekt módon, más molekulák hatása által valósulnak meg a megfigyelt extra pozitív és negatív visszacsatolási hurkok, amelyeknek felderítésére a

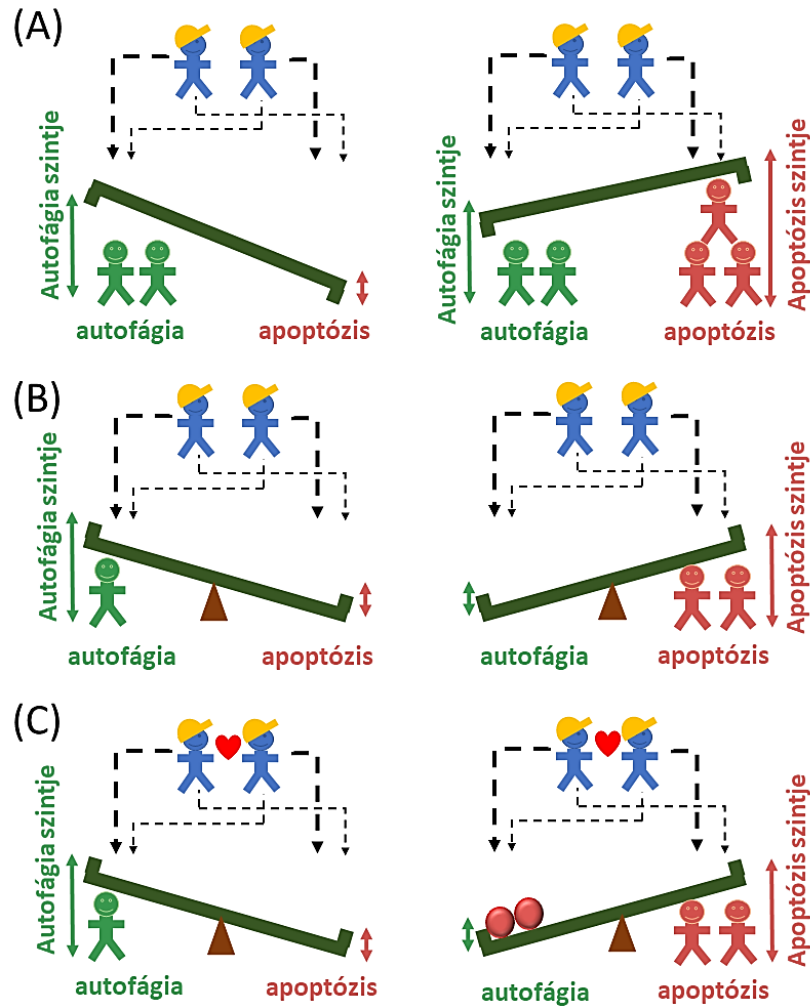
jövőben szükség lesz még további kísérletekre. Ennek során azok közül a molekulák közül szeretnénk a jövőben válogatni, amelyek a TurboID módszer alapján közelebb kerülnek ER stressz hatására a vizsgált GADD34-hez, és lehet kapcsolatuk az ATF4-gyel és/vagy CHOP-pal is az irodalom alapján.

5.4. További matematikai modellek a rendszer leírására

A sejt élet-és-halál közötti döntési folyamat dinamikai viselkedésének általános leírására, további számítógépes szimulációkkal vizsgáltuk az autofágia és az apoptózis induktorok közötti, és azokat szabályozó ER stressz szenzor molekulák közti keresztkapcsolatok jelentőségét ER stressz során.

Egy egyszerű hasonlattal élve szeretnénk összegezni a visszacsatolási hurkok fontosságát (30. ábra). Ebben az esetben a rendszert egy olyan munkafolyamathoz hasonlítjuk, ahol a munkavezetők a stressz-szenzorok, a munkások pedig az induktorok, akik a munkafolyamat során egy padot mozgatva emelik az autofágia és az apoptózis szintjét a sejtben. A munkavezetők közötti kapcsolat (= visszacsatolási hurkok) hiányában, a munkavezetők csak a munkásokkal kommunikálnak, utasítva őket a pad adott oldalának fel-le mozgatására, a körülményektől függően (30.A ábra). Ekkor a piros vagy zöld munkások száma határozza meg az autofágia vagy apoptózis aktívabb állapotát, mindenesetre mindkettő jelen van a sejtben. A munkaórák leteltével, a munkások hazamennek, és az általuk irányított autofágia és apoptózis is, mindenféle következmény nélkül kikapcsol (vagyis a pad visszakerül az eredeti, vízszintes helyzetébe).

Amennyiben azt feltételezzük, hogy a piros és a zöld munkások ellenségei egymásnak, egy dupla negatív visszacsatolási hurok jelenlétét szemléltethetjük közöttük. Ekkor a pad egy libikókává alakul (30.B ábra). Ebben az esetben, még ha a zöld és a piros munkások mennyisége meg is nőne (például amikor az autofágia és apoptózis is aktív), kölcsönösen kizárják egymást. Amikor a munkavezetőknek ebédideje van (például amikor az ER stressz állapota megszűnik), a libikókának egyszerre mindkét vége a magasban maradhat (vagy az autofágia, vagy az apoptózis). Annak függvényében, hogy melyik oldalon dolgoznak serényebben a munkások, bármikor átbillenhet a libikóka (= reverzibilis kapcsoló).



30. ábra: Sematikus ábra a stressz-válasz mechanizmusról és annak különböző kimeneteleiről. A rendszert egy munkafolyamathoz hasonlítjuk, ahol a munkavezetők a stressz-szenzorok, a munkások pedig az induktorok. Három esetet különítettünk meg: (A) nincs kapcsolat sem a munkavezetők, sem a munkások között, (B) a piros és zöld munkások egymás ellenfelei, és (C) a munkavezetők között pozitív a kapcsolat, miközben a piros és zöld munkások egymás ellenfelei.

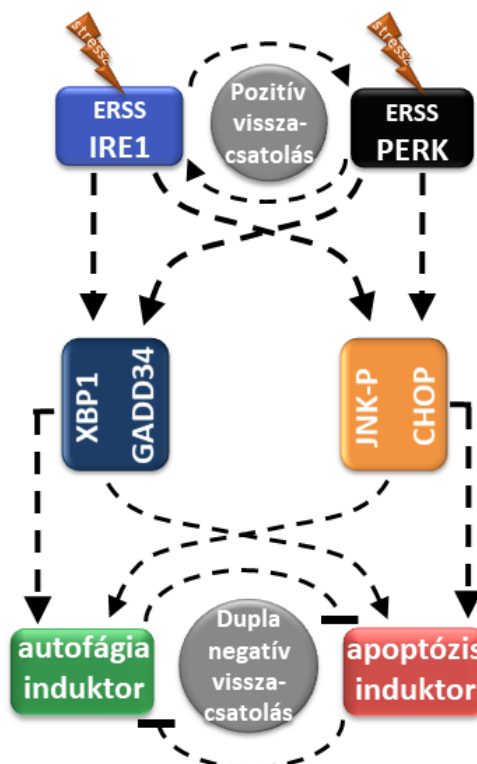
Amennyiben a munkavezetők között kölcsönösen pozitív a kapcsolat, akkor segítik egymás munkáját (30.C ábra). Ebben az esetben, amikor a piros munkások győznek a zöldek felett, ráadásként le is gurítják a piros labdákat a libikóka másik oldalára, stabilizálva a helyzetüket. Így a piros munkások a művezetők ebédideje esetén irreverzibilisen beállították a libikókát, és az általuk irányított folyamatot, az apoptózist. Ezzel a hasonlat jól szemlélteti azt, hogy a kapcsoló-szerűen aktiválódó apoptózis irreverzibilis működése számos visszacsatolási hurok segítségével valósulhat meg nem tolerálható ER stressz során.

A gerinceseket felépítő sejtek szabályozási hálózatai – a sejtfelepítésük komplexitása miatt – igénylik a robosztus karakterisztikákat. Ennek okán az említett számos

visszacsatolási hurkoknak jelen kell lenniük a különböző ER stressz szinteken. Korábban kimutattuk, hogy a fő ER transzmembrán jelátalakító molekulák (PERK és IRE1) különböző erősséggel képesek elősegíteni az autofágia és az apoptózis induktorok működését, és egy pozitív visszacsatolási hurok jelenlétét javasoltuk közöttük (32). A kísérletes és szimulációs eredményeink alapján ez a kapcsolat valóban megfigyelhető a két UPR ág között (17., 18., 31. ábra).

Az irodalomban talált kísérletes eredmények alapján, egy egyszerű matematikai modell segítségével szeretnénk volna bemutatni, hogy ezek a visszacsatolási hurkok milyen módon vannak jelen az UPR PERK ágának elemei között. Ez alapján mind a GADD34 és mind a CHOP képes az autofágia és az apoptózis induktorokat különböző erősséggel serkenteni, és egy pozitív visszacsatolási hurok is jelen van közöttük (28. ábra). Érdekes módon, hasonló tulajdonságokat találtak az IRE1 útvonal kulcselemei, az XBP1 és a JNK-P között is. Bár az XBP1s főleg autofágia induktor (177), és a JNK-P döntően az apoptózis indukcióban fontos (56), mindketten képesek pozitívan szabályozni a másik stresszválasz mechanizmust is (52, 61).

Néhány adat szerint a JNK-nak pozitív hatása van az XBP1-re (178), de az XBP1 → JNK-P kapcsolatot direkt módon még nem bizonyították. Érdekes módon, mind a tartós XBP1 aktivitás, mind az XBP1 hiánya képes sejthalált okozni (52). Ezek az eredmények azt sugallják, hogy az XBP1-nek hasonló szabályozási szerepe lehet az IRE1-ágon belül, mint amilyen kulcsszerepe van a GADD34-nek a PERK útvonalon belül (31. ábra). Az említett kísérletes eredmények szerintünk afelé mutatnak, hogy pozitív visszacsatolási hurok nem csak az UPR ágai között lehet jelen, hanem azok megfigyelhetők az UPR ágakon belül is, az ER stressz szenzorok fő kulcselemei között. Feltételezzük, hogy mind a GADD34-CHOP, és mind az XBP1-JNK-P pozitív visszacsatolási hurkok esszenciálisak lehetnek abban, hogy nem tolerálható ER stresszre válaszul, egy robosztus stresszválasz mechanizmust generáljanak. Itt említeném meg, hogy az UPR harmadik ágának az ATF6-útvonalnak szintén lehetnek az ATF6 által irányított olyan kulcsmolekulái, amelyek a többi ágakhoz kapcsolódva hasonló módon szabályozza az ER stresszválaszt. Azt feltételezzük, hogy ezek a kapcsolatok segíthetnek a szabályozási hálózat robosztus élet-és-halál közötti döntésének kialakításában. Azonban ezeknek a kapcsolatoknak bizonyítása a jövőben további kísérletes vizsgálatokat igényelnek.



31. ábra: Az UPR ágak közötti és azokon belüli szabályozási kapcsolatok hatása az ER stresszválaszra.

A vizsgált szabályozó hálózat (UPR) az ágak közötti és az ágakon belüli kapcsolatok segítségével, több szinten is irányítja az élet-és-halál közötti döntést.

Eredményeink megerősítik, hogy az élet-és-halál közötti döntés a szabályozó hálózat számos szintjén irányítva van. Ez a komplex szabályozó hálózat garantálja az autofágiás túlélés és az apoptotikus sejthalál közötti pontos döntéshozatalt ER stressz esetén.

Az abnormális ER stressznek szerepe van számos humán megbetegedésben, mint például a neurodegeneratív betegségek (például Alzheimer kór, Parkinson kór, Huntington kór), elhízás, diabétesz vagy autoimmun betegségek (65). Emiatt több szempontból is fontos orvosi jelentősége van az ER stressz-indukálta autofágia és apoptózis közötti döntés vizsgálatának. Az eredményeink azt mutatják, hogy egy UPR ág megfelelő csendesítése megváltoztatja a szabályozási hálózatot, például meghosszabbíthatja a túlélést, vagy felgyorsíthatja a sejthalál mechanizmusát. Ezeknek az információknak emiatt a későbbiekben fontos jelentősége lehet, bizonyos ER-stressz-függő betegségek orvosi kezeléseinek kidolgozásában is. Szükség lehet például olyan kisméretű molekulákra, amelyek specifikusan gátolják vagy aktiválják az egyes UPR ágakat/elemeket, és ezzel terápiás hatást fejtenek ki különféle betegségekben. A különböző UPR ágak aktiválása

egyedi patofiziológiai folyamatokra lehetnek hatással, sejt specifikus, vagy akár betegség specifikus módon is hatva. Például a PERK gátlása csillapítja a neurodegenerációt, de szintén okozhat diabéteszt a pankreász β -sejtek hibás működése miatt (179, 180). Az IRE1 gátlása elnyomhatja a háromszorosan negatív mellrákot, de okozhat viszont végbéldaganatot (181, 182). Fontos tehát a szövet és betegség specifikus terápia, és az erre alkalmas újabb molekulák kifejlesztése a jövőben.

Munkacsoportunk terve, hogy a közeljövőben rendszerbiológiai eszközökkel olyan specifikus célmolekulákat keres az IBD (gyulladásos bélbetegségek) gyomor-bélrendszer krónikus bélbetegségének kezelésére, amelyek autofágia-függő módon képesek fokozni a sejtek túlélését, és így meghosszabbíthatják az IBD-ben szenvedők életét. Egy ilyen irányú kutatás során is, a hálózat dinamikai működésének az elméleti biológiai módszerekkel történő vizsgálatakor csökkenthetőek a kísérleti költségek, ami segíthet az autofágia és az apoptózis folyamatokat szabályozó újabb szintetikus és természetes eredetű gyógyszerhatóanyagok felfedezésében is, amikkel javítható lehetne az IBD és más ER stresszel kapcsolatos betegségekben szenvedő emberek életszínvonala és élettartama.

6. KÖVETKEZTETÉSEK

Kutatásom az ER stresszválasz autofágia és apoptózis folyamatait irányító UPR működésére fókuszáltak. Ennek során molekuláris és elméleti biológiai módszerekkel megvizsgáltuk, hogy az UPR PERK és IRE1 ágai között jelenlévő és a PERK útvonalon belüli kapcsolatok pontosan milyen hatással vannak ER stressz során a sejt élet-és-halál közötti döntésére. Eredményeink alapján a következő megállapításokat tettük:

1. A PERK csendesítés során a sejtek életképessége megnövekedett, és a stresszválasz időben kitolódott: az apoptózis aktiválódása később történt meg. Eszerint a PERK-nek fontosabb hatása van az apoptózis aktiválására, míg az autofágiát kevésbé aktiválja. Emellett a PERK csendesítés hatására magas szintű ER stressz során gyengébben aktiválódott az IRE1 apoptózisért felelős eleme, a JNK. Ez alapján a PERK pozitív hatással van a JNK jelátvitelére ER stressz során.
2. Az irodalmi adatok azt mutatják, hogy az IRE1 pozitívan hat a PERK jelátvitelére, míg kísérleteink során bizonyítottuk, hogy a PERK is pozitívan hat az IRE1 útvonalra. Emiatt az UPR PERK és IRE1 ágai között egy pozitív visszacsatolási hurok jelenlétét javasoltuk, amelynek jelentőségét számítógépes szimulációkkal vizsgáltuk tovább. Eredményeink arra utalnak, hogy ennek a javasolt pozitív visszacsatolási huroknak jelenléte biztosíthatja az ER stresszválasz során az apoptotikus sejthalál bekapcsolásának irreverzibilitását.
3. Kísérletesen megvizsgáltuk a PERK útvonal kulcselemeinek (ATF4, CHOP és GADD34) kapcsolatát, amely során a GADD34, illetve a CHOP elemek gátlását is kombináltuk magas szintű ER stresszel. A kísérletek eredményei alapján elméleti módszerekkel vizsgáltuk meg, hogy eredményeink az ATF4, CHOP és GADD34 szabályozási háromszögben milyen kapcsolatok jelenlétével jöhetnek létre. A számítógépes szimulációk azt igazolták, hogy a GADD34 egy pozitív visszacsatolási hurokkal serkenti az ATF4 jelátvitelét, miközben a CHOP egy negatív visszacsatolással hatást fejt ki az ATF4-re. Ráadásul, a $GADD34 \rightarrow ATF4$, és a $CHOP \rightarrow GADD34$ pozitív kapcsolatok kialakítanak egy indirekt, pozitív visszacsatolási hurkot a GADD34 és CHOP elemek között.

4. Az új visszacsatolási hurkok vizsgálata során arra a következtetésre jutottunk, hogy az $ATF4 \rightarrow CHOP \dashv ATF4$ „enyhe” negatív visszacsatolási hurok abban segít, hogy az ATF4 hiperaktiválódását meggátolja. A PERK útvonalon belüli pozitív és negatív visszacsatolási hurkoknak tehát fontos szerepe van az apoptózis induktor kapcsolószerű működésének finomhangolásában, amiben a GADD34 és a CHOP elemek fontos szereppel bírnak. Ezek a szabályozási hurkok elképzelésünk szerint jelen lehetnek az UPR többi ágának jelátvitelében is, például az IRE1 XBP1-JNK elemei között is.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

Az eukarióta sejtek fehérje egyensúlyában fontos szerepet játszik az endoplazmatikus retikulum (ER). A hibás fehérjék felhalmozódása ER stresszhez vezet, amely a „sejt fehérje válasz” (UPR) három ágát, az IRE1-et, a PERK-et és az ATF6-ot aktiválja. Az UPR fő feladata a sejt túlélésének elősegítése az autofágiával, míg nem tolerálható ER stressz esetén apoptotikus sejthalált indukál. Az autofágia és az apoptózis aktiválódási kinetikája pontosan szabályozott: egy tranizens autofágia indukció mindig megelőzi az apoptózist, és a két folyamat kölcsönösen kizárja egymást. Célunk az volt, hogy molekuláris és elméleti biológiai módszerekkel is megvizsgáljuk az UPR elemek szerepét az autofágia-apoptózis szabályozási hálózat működésére vonatkozóan, különböző ER stressz szinteken. Szerettük volna megfigyelni, hogy az UPR ágak (például IRE1 és PERK) közötti kapcsolatok, és az UPR egy ágán belüli kulcselemek kapcsolatai (a PERK útvonal tagjaira fókuszálva) hogyan alakítják ki az ER stresszválasz mechanizmust.

Az UPR minden ága képes az autofágia és az apoptózis indukálására, azonban különböző erősséggel hatnak ezek induktoraira. A PERK csendesítése meghosszabbította az autofágia-függő túlélést, késleltette az apoptózist, és gátolta az IRE1 apoptózis induktorát. Ez alapján a PERK-nek erősebb hatása van az apoptózisra. Számítógépes szimulációk segítségével arra következtettünk, hogy az IRE1 és a PERK ágak közötti, javasolt pozitív visszacsatolási hurok biztosíthatja az apoptózis irreverzibilis működését nem tolerálható ER stressz esetén. Tanulmányoztuk még a PERK útvonal kulcselemei, az ATF4, a CHOP és a GADD34 közötti szabályozási hurkok jelenlétét és szerepét ER-stressz során. A GADD34 vagy a CHOP gátlása kísérletesen eltérő eredményhez vezetett magas szintű ER-stressz során, amelynek okát számítógépes szimulációkkal vizsgáltuk. Ezek alapján a PERK útvonalon belül új visszacsatolási hurkokat javasoltunk: a GADD34 pozitív hatását az ATF4 működésére, az ATF4 CHOP általi gátlását, és a GADD34 és CHOP közötti indirekt pozitív visszacsatolást. Az új kapcsolatok szerepet játszhatnak az ATF4 hiperaktiválódás megakadályozásában, ezzel finomhangolva az ER stresszválasz mechanizmust. Eredményeink rámutatnak, hogy az UPR elemek visszacsatolási hurkai döntő szereppel bírnak az ER stresszválasz megfelelő karakterisztikájában.

Mivel az ER stressz számos betegségben meghatározó szerepet játszik, az UPR jelátviteli útvonalak működésének vizsgálata a jövőben fontos orvosi jelentőséggel bírhat.

8. SUMMARY

Protein homeostasis of eukaryotic cells is maintained by the endoplasmic reticulum (ER). Accumulation of unfolded proteins leads to ER stress which activates three branches of unfolded protein response (UPR) regulated by IRE1, PERK and ATF6. The main function of UPR is to promote cell survival by autophagy, while in case of irreversible ER stress UPR induces apoptosis. The order of autophagy and apoptosis induction is strictly regulated: autophagy always precedes apoptosis, and they mutually exclude each other. Using both molecular and theoretical biological techniques, our goal was to investigate the role of different UPR elements in the operation of the autophagy-apoptosis regulatory networks during various levels of ER stress. Our goal was to examine how ER stress response is regulated by either connection between branches of UPR (i.e. IRE1 and PERK), or between the crucial elements inside one arm of UPR (i.e. PERK).

We confirm that each arm of UPR can induce autophagy and apoptosis, but with different strength on their inducers. Silencing PERK extended autophagy-dependent survival, delayed apoptosis and down-regulated the apoptosis inducer element of IRE1 supposing that PERK has a stronger effect on apoptosis. Besides, we suggested a positive feedback loop between IRE1 and PERK, and this connection was examined by computer simulations. Our model claimed that this positive feedback loop guarantees the irreversible switch-like characteristic of apoptosis induction during excessive level of ER stress. In addition, we investigated the role of ER stress-dependent feedback loops inside the PERK branch by focusing on its crucial elements, called ATF4, CHOP and GADD34. Since inhibition of either GADD34 or CHOP led to different results during high level of ER stress, we used computer simulations to explain our experimental results. We suggested new feedback loops inside the PERK pathway: an extra positive feedback loop between GADD34 and ATF4, a negative feedback loop between CHOP and ATF4 and an indirect positive feedback loop between GADD34 and CHOP. These new connections might prevent the hyper-activation of ATF4 and help the fine-tuning of the ER stress response mechanism. Our results suggest that the feedback loops of UPR elements are crucial to achieve adequate characteristics of ER stress response. Since ER stress is tightly connected to various diseases, studying the characteristics of signalling pathways of UPR might have medical importance in the future.

9. IRODALOMJEGYZÉK

1. Martínez G, Khatiwada S, Costa-Mattioli M, Hetz C. (2018) ER Proteostasis Control of Neuronal Physiology and Synaptic Function. *Trends Neurosci*, 41: 610-624.
2. Benham AM. (2012) Protein secretion and the endoplasmic reticulum. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 4: a012872.
3. Hetz C, Chevet E, Oakes SA. (2015) Proteostasis control by the unfolded protein response. *Nature Cell Biology*, 17: 829-838.
4. Smith M, Wilkinson S. (2017) ER homeostasis and autophagy. *Essays Biochem*, 61: 625-635.
5. Bhardwaj M, Leli NM, Koumenis C, Amaravadi RK. (2020) Regulation of autophagy by canonical and non-canonical ER stress responses. *Seminars in Cancer Biology*, 66: 116-128.
6. Peker N, Gozuacik D. (2020) Autophagy as a Cellular Stress Response Mechanism in the Nervous System. *Journal of Molecular Biology*, 432: 2560-2588.
7. Marinković M, Šprung M, Buljubašić M, Novak I. (2018) Autophagy Modulation in Cancer: Current Knowledge on Action and Therapy. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018: 8023821.
8. Yang Q, Wang R, Zhu L. (2019) Chaperone-Mediated Autophagy. *Adv Exp Med Biol*, 1206: 435-452.
9. Li W-w, Li J, Bao J-k. (2012) Microautophagy: lesser-known self-eating. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69: 1125-1136.
10. Nakatogawa H, Mochida K. (2015) Reticulophagy and nucleophagy: New findings and unsolved issues. *Autophagy*, 11: 2377-2378.
11. Villanueva Paz M, Cotán D, Garrido-Maraver J, Cordero MD, Oropesa-Ávila M, de La Mata M, Delgado Pavón A, de Laveria I, Alcocer-Gómez E, Sánchez-Alcázar JA. (2016) Targeting autophagy and mitophagy for mitochondrial diseases treatment. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 20: 487-500.
12. Mao K, Klionsky DJ. (2017) Xenophagy: A battlefield between host and microbe, and a possible avenue for cancer treatment. *Autophagy*, 13: 223-224.

13. Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan KL. (2011) AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol*, 13: 132-U171.
14. Hansen M, Rubinsztein DC, Walker DW. (2018) Autophagy as a promoter of longevity: insights from model organisms. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19: 579-593.
15. Chan EY. (2009) mTORC1 Phosphorylates the ULK1-mAtg13-FIP200 Autophagy Regulatory Complex. *Science Signaling*, 2: pe51-pe51.
16. Itakura E, Kishi C, Inoue K, Mizushima N. (2008) Beclin 1 Forms Two Distinct Phosphatidylinositol 3-Kinase Complexes with Mammalian Atg14 and UVRAG. *Molecular Biology of the Cell*, 19: 5360-5372.
17. Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, Kominami E, Ohsumi Y, Yoshimori T. (2000) LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *The EMBO Journal*, 19: 5720-5728.
18. Mizushima N. (2020) The ATG conjugation systems in autophagy. *Current Opinion in Cell Biology*, 63: 1-10.
19. Kabeya Y, Mizushima N, Yamamoto A, Oshitani-Okamoto S, Ohsumi Y, Yoshimori T. (2004) LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation. *Journal of Cell Science*, 117: 2805-2812.
20. Birgisdottir Å B, Lamark T, Johansen T. (2013) The LIR motif - crucial for selective autophagy. *J Cell Sci*, 126: 3237-3247.
21. Lőrincz P, Juhász G. (2020) Autophagosome-Lysosome Fusion. *J Mol Biol*, 432: 2462-2482.
22. Abou-Ghali M, Stiban J. (2015) Regulation of ceramide channel formation and disassembly: Insights on the initiation of apoptosis. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 22: 760-772.
23. Xu X, Lai Y, Hua ZC. (2019) Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials. *Biosci Rep*, 39.
24. Hu SJ, Jiang SS, Zhang J, Luo D, Yu B, Yang LY, Zhong HH, Yang MW, Liu LY, Hong FF, Yang SL. (2019) Effects of apoptosis on liver aging. *World J Clin Cases*, 7: 691-704.

25. Elmore S. (2007) Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*, 35: 495-516.
26. Stoka V, Turk V, Bredesen DE. (2006) Differential regulation of the intrinsic pathway of apoptosis in brain and liver during ageing. *FEBS Lett*, 580: 3739-3745.
27. Brunelle JK, Letai A. (2009) Control of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2 family. *J Cell Sci*, 122: 437-441.
28. Czaja MJ. (2002) Induction and regulation of hepatocyte apoptosis by oxidative stress. *Antioxid Redox Signal*, 4: 759-767.
29. Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ. (2014) Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiol Rev*, 94: 909-950.
30. Hu S-J, Jiang S-S, Zhang J, Luo D, Yu B, Yang L-Y, Zhong H-H, Yang M-W, Liu L-Y, Hong F-F, Yang S-L. (2019) Effects of apoptosis on liver aging. *World journal of clinical cases*, 7: 691-704.
31. Holczer M, Marton M, Kurucz A, Banhegyi G, Kapuy O. (2015) A Comprehensive Systems Biological Study of Autophagy-Apoptosis Crosstalk during Endoplasmic Reticulum Stress. *Biomed Res Int*, 2015: 319589.
32. Marton M, Kurucz A, Lizak B, Margittai E, Banhegyi G, Kapuy O. (2017) A Systems Biological View of Life-and-Death Decision with Respect to Endoplasmic Reticulum Stress-The Role of PERK Pathway. *Int J Mol Sci*, 18.
33. Yu Q, Yang S, Li Z, Zhu Y, Li Z, Zhang J, Li C, Feng F, Wang W, Zhang Q. (2021) The relationship between endoplasmic reticulum stress and autophagy in apoptosis of BEAS-2B cells induced by cigarette smoke condensate. *Toxicology Research*, 10: 18-28.
34. Hetz C, Saxena S. (2017) ER stress and the unfolded protein response in neurodegeneration. *Nat Rev Neurol*, 13: 477-491.
35. González-Quiroz M, Blondel A, Sagredo A, Hetz C, Chevet E, Pedoux R. (2020) When Endoplasmic Reticulum Proteostasis Meets the DNA Damage Response. *Trends Cell Biol*, 30: 881-891.
36. Oakes SA, Papa FR. (2015) The Role of Endoplasmic Reticulum Stress in Human Pathology. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 10: 173-194.

37. Shen J, Chen X, Hendershot L, Prywes R. (2002) ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals. *Dev Cell*, 3: 99-111.
38. Bertolotti A, Zhang Y, Hendershot LM, Harding HP, Ron D. (2000) Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nature Cell Biology*, 2: 326-332.
39. Rao RV, Hermel E, Castro-Obregon S, del Rio G, Ellerby LM, Ellerby HM, Bredesen DE. (2001) Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. Mechanism of caspase activation. *J Biol Chem*, 276: 33869-33874.
40. Maurel M, Chevet E, Tavernier J, Gerlo S. (2014) Getting RIDD of RNA: IRE1 in cell fate regulation. *Trends in Biochemical Sciences*, 39: 245-254.
41. Almanza A, Carlesso A, Chintha C, Creedican S, Doultinos D, Leuzzi B, Luis A, McCarthy N, Montibeller L, More S, Papaioannou A, Püschel F, Sassano ML, Skoko J, Agostinis P, de Belleruche J, Eriksson LA, Fulda S, Gorman AM, Healy S, Kozlov A, Muñoz-Pinedo C, Rehm M, Chevet E, Samali A. (2019) Endoplasmic reticulum stress signalling - from basic mechanisms to clinical applications. *Febs j*, 286: 241-278.
42. Yoshida H, Matsui T, Yamamoto A, Okada T, Mori K. (2001) XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell*, 107: 881-891.
43. Nagashima Y, Mishiba K-i, Suzuki E, Shimada Y, Iwata Y, Koizumi N. (2011) Arabidopsis IRE1 catalyses unconventional splicing of bZIP60 mRNA to produce the active transcription factor. *Scientific Reports*, 1: 29.
44. Yoshida H, Oku M, Suzuki M, Mori K. (2006) pXBP1(U) encoded in XBP1 pre-mRNA negatively regulates unfolded protein response activator pXBP1(S) in mammalian ER stress response. *J Cell Biol*, 172: 565-575.
45. Travers KJ, Patil CK, Wodicka L, Lockhart DJ, Weissman JS, Walter P. (2000) Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell*, 101: 249-258.
46. Iwakoshi NN, Lee AH, Glimcher LH. (2003) The X-box binding protein-1 transcription factor is required for plasma cell differentiation and the unfolded protein response. *Immunol Rev*, 194: 29-38.

47. Ono SJ, Liou HC, Davidon R, Strominger JL, Glimcher LH. (1991) Human X-box-binding protein 1 is required for the transcription of a subset of human class II major histocompatibility genes and forms a heterodimer with c-fos. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88: 4309-4312.
48. Ding L, Yan J, Zhu J, Zhong H, Lu Q, Wang Z, Huang C, Ye Q. (2003) Ligand-independent activation of estrogen receptor alpha by XBP-1. *Nucleic Acids Res*, 31: 5266-5274.
49. Zhou Y, Lee J, Reno CM, Sun C, Park SW, Chung J, Lee J, Fisher SJ, White MF, Biddinger SB, Ozcan U. (2011) Regulation of glucose homeostasis through a XBP-1-FoxO1 interaction. *Nat Med*, 17: 356-365.
50. Reinke AW, Baek J, Ashenberg O, Keating AE. (2013) Networks of bZIP protein-protein interactions diversified over a billion years of evolution. *Science*, 340: 730-734.
51. Yamamoto K, Yoshida H, Kokame K, Kaufman RJ, Mori K. (2004) Differential contributions of ATF6 and XBP1 to the activation of endoplasmic reticulum stress-responsive cis-acting elements ERSE, UPRE and ERSE-II. *J Biochem*, 136: 343-350.
52. Tian P-G, Jiang Z-X, Li J-H, Zhou Z, Zhang Q-H. (2015) Spliced XBP1 promotes macrophage survival and autophagy by interacting with Beclin-1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 463: 518-523.
53. Margariti A, Li H, Chen T, Martin D, Vizcay-Barrena G, Alam S, Karamariti E, Xiao Q, Zampetaki A, Zhang Z, Wang W, Jiang Z, Gao C, Ma B, Chen YG, Cockerill G, Hu Y, Xu Q, Zeng L. (2013) XBP1 mRNA splicing triggers an autophagic response in endothelial cells through BECLIN-1 transcriptional activation. *J Biol Chem*, 288: 859-872.
54. Vidal RL, Hetz C. (2013) Unspliced XBP1 controls autophagy through FoxO1. *Cell Res*, 23: 463-464.
55. Urano F, Wang X, Bertolotti A, Zhang Y, Chung P, Harding HP, Ron D. (2000) Coupling of Stress in the ER to Activation of JNK Protein Kinases by Transmembrane Protein Kinase IRE1. *Science*, 287: 664-666.
56. Dhanasekaran DN, Reddy EP. (2017) JNK-signaling: A multiplexing hub in programmed cell death. *Genes Cancer*, 8: 682-694.

57. Turjanski AG, Vaqué JP, Gutkind JS. (2007) MAP kinases and the control of nuclear events. *Oncogene*, 26: 3240-3253.
58. Fan M, Chambers TC. (2001) Role of mitogen-activated protein kinases in the response of tumor cells to chemotherapy. *Drug Resist Updat*, 4: 253-267.
59. Tsuruta F, Sunayama J, Mori Y, Hattori S, Shimizu S, Tsujimoto Y, Yoshioka K, Masuyama N, Gotoh Y. (2004) JNK promotes Bax translocation to mitochondria through phosphorylation of 14-3-3 proteins. *Embo j*, 23: 1889-1899.
60. Donovan N, Becker EB, Konishi Y, Bonni A. (2002) JNK phosphorylation and activation of BAD couples the stress-activated signaling pathway to the cell death machinery. *J Biol Chem*, 277: 40944-40949.
61. Xu P, Das M, Reilly J, Davis RJ. (2011) JNK regulates FoxO-dependent autophagy in neurons. *Genes Dev*, 25: 310-322.
62. Zhou YY, Li Y, Jiang WQ, Zhou LF. (2015) MAPK/JNK signalling: a potential autophagy regulation pathway. *Biosci Rep*, 35.
63. Sui X, Kong N, Ye L, Han W, Zhou J, Zhang Q, He C, Pan H. (2014) p38 and JNK MAPK pathways control the balance of apoptosis and autophagy in response to chemotherapeutic agents. *Cancer Lett*, 344: 174-179.
64. Patingre S, Bauvy C, Carpentier S, Levade T, Levine B, Codogno P. (2009) Role of JNK1-dependent Bcl-2 phosphorylation in ceramide-induced macroautophagy. *J Biol Chem*, 284: 2719-2728.
65. Hetz C, Zhang K, Kaufman RJ. (2020) Mechanisms, regulation and functions of the unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 21: 421-438.
66. Taniuchi S, Miyake M, Tsugawa K, Oyadomari M, Oyadomari S. (2016) Integrated stress response of vertebrates is regulated by four eIF2 α kinases. *Scientific Reports*, 6.
67. Kapp LD, Lorsch JR. (2004) GTP-dependent recognition of the methionine moiety on initiator tRNA by translation factor eIF2. *J Mol Biol*, 335: 923-936.
68. Sudhakar A, Ramachandran A, Ghosh S, Hasnain SE, Kaufman RJ, Ramaiah KVA. (2000) Phosphorylation of Serine 51 in Initiation Factor 2 α (eIF2 α) Promotes Complex Formation between eIF2 α (P) and eIF2B and Causes Inhibition in the Guanine Nucleotide Exchange Activity of eIF2B. *Biochemistry*, 39: 12929-12938.

69. Jennings MD, Kershaw CJ, Adomavicius T, Pavitt GD. Fail-safe control of translation initiation by dissociation of eIF2 α phosphorylated ternary complexes. In: *eLife* Vol. 6, 2017.
70. Liu Y, Wang M, Cheng A, Yang Q, Wu Y, Jia R, Liu M, Zhu D, Chen S, Zhang S, Zhao XX, Huang J, Mao S, Ou X, Gao Q, Wang Y, Xu Z, Chen Z, Zhu L, Luo Q, Liu Y, Yu Y, Zhang L, Tian B, Pan L, Rehman MU, Chen X. (2020) The role of host eIF2 α in viral infection. *Virol J*, 17: 112.
71. Dever TE. (2002) Gene-specific regulation by general translation factors. *Cell*, 108: 545-556.
72. Wortel IMN, van der Meer LT, Kilberg MS, van Leeuwen FN. (2017) Surviving Stress: Modulation of ATF4-Mediated Stress Responses in Normal and Malignant Cells. *Trends Endocrinol Metab*, 28: 794-806.
73. Liu Y, Wang M, Cheng A, Yang Q, Wu Y, Jia R, Liu M, Zhu D, Chen S, Zhang S, Zhao X-X, Huang J, Mao S, Ou X, Gao Q, Wang Y, Xu Z, Chen Z, Zhu L, Luo Q, Liu Y, Yu Y, Zhang L, Tian B, Pan L, Rehman MU, Chen X. (2020) The role of host eIF2 α in viral infection. *Virology Journal*, 17: 112.
74. Vattem KM, Wek RC. (2004) Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101: 11269-11274.
75. Ameri K, Harris AL. (2008) Activating transcription factor 4. *Int J Biochem Cell Biol*, 40: 14-21.
76. Zinszner H, Kuroda M, Wang X, Batchvarova N, Lightfoot RT, Remotti H, Stevens JL, Ron D. (1998) CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes Dev*, 12: 982-995.
77. Huggins CJ, Mayekar MK, Martin N, Saylor KL, Gonit M, Jailwala P, Kasoji M, Haines DC, Quiñones OA, Johnson PF. (2015) C/EBP γ Is a Critical Regulator of Cellular Stress Response Networks through Heterodimerization with ATF4. *Mol Cell Biol*, 36: 693-713.
78. PubMed: 1631061 Hai T, Curran T. (1991) Cross-family dimerization of transcription factors Fos/Jun and ATF/CREB alters DNA binding specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88: 3720-3724.

79. Vallejo M, Ron D, Miller CP, Habener JF. (1993) C/ATF, a member of the activating transcription factor family of DNA-binding proteins, dimerizes with CAAT/enhancer-binding proteins and directs their binding to cAMP response elements. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90: 4679-4683.
80. Chevray PM, Nathans D. (1992) Protein interaction cloning in yeast: identification of mammalian proteins that react with the leucine zipper of Jun. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89: 5789-5793.
81. Harding HP, Zhang Y, Zeng H, Novoa I, Lu PD, Calton M, Sadri N, Yun C, Popko B, Paules R, Stojdl DF, Bell JC, Hettmann T, Leiden JM, Ron D. (2003) An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol Cell*, 11: 619-633.
82. Novoa I, Zhang Y, Zeng H, Jungreis R, Harding HP, Ron D. (2003) Stress-induced gene expression requires programmed recovery from translational repression. *Embo j*, 22: 1180-1187.
83. Brush MH, Weiser DC, Shenolikar S. (2003) Growth arrest and DNA damage-inducible protein GADD34 targets protein phosphatase 1 α to the endoplasmic reticulum and promotes dephosphorylation of the α subunit of eukaryotic translation initiation factor 2. *Molecular and Cellular Biology*, 23: 1292-1303.
84. Xu D, Dai W, Kutzler L, Lacko HA, Jefferson LS, Dennis MD, Kimball SR. (2020) ATF4-Mediated Upregulation of REDD1 and Sestrin2 Suppresses mTORC1 Activity during Prolonged Leucine Deprivation. *J Nutr*, 150: 1022-1030.
85. Rouschop KM, van den Beucken T, Dubois L, Niessen H, Bussink J, Savelkoul K, Keulers T, Mujcic H, Landuyt W, Voncken JW, Lambin P, van der Kogel AJ, Koritzinsky M, Wouters BG. (2010) The unfolded protein response protects human tumor cells during hypoxia through regulation of the autophagy genes MAP1LC3B and ATG5. *J Clin Invest*, 120: 127-141.
86. B'Chir W, Maurin AC, Carraro V, Averous J, Jousse C, Muranishi Y, Parry L, Stepien G, Fafournoux P, Bruhat A. (2013) The eIF2 α /ATF4 pathway is essential for stress-induced autophagy gene expression. *Nucleic Acids Res*, 41: 7683-7699.

87. Huang H, Hua X, Liu N, Li X, Liu S, Chen X, Zhao C, Lan X, Yang C, Dou QP, Liu J. (2014) Anacardic acid induces cell apoptosis associated with induction of ATF4-dependent endoplasmic reticulum stress. *Toxicol Lett*, 228: 170-178.
88. Hu H, Tian M, Ding C, Yu S. (2018) The C/EBP Homologous Protein (CHOP) Transcription Factor Functions in Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Apoptosis and Microbial Infection. *Front Immunol*, 9: 3083.
89. Luethy JD, Holbrook NJ. (1992) Activation of the gadd153 promoter by genotoxic agents: a rapid and specific response to DNA damage. *Cancer Res*, 52: 5-10.
90. Bruhat A, Jousse C, Wang XZ, Ron D, Ferrara M, Fafournoux P. (1997) Amino acid limitation induces expression of CHOP, a CCAAT/enhancer binding protein-related gene, at both transcriptional and post-transcriptional levels. *J Biol Chem*, 272: 17588-17593.
91. Chérasse Y, Maurin A-C, Chaveroux C, Jousse C, Carraro V, Parry L, Deval C, Chambon C, Fafournoux P, Bruhat A. (2007) The p300/CBP-associated factor (PCAF) is a cofactor of ATF4 for amino acid-regulated transcription of CHOP. *Nucleic Acids Research*, 35: 5954-5965.
92. Yoshida H, Okada T, Haze K, Yanagi H, Yura T, Negishi M, Mori K. (2000) ATF6 Activated by Proteolysis Binds in the Presence of NF-Y (CBF) Directly to the *cis*-Acting Element Responsible for the Mammalian Unfolded Protein Response. *Molecular and Cellular Biology*, 20: 6755-6767.
93. Ma Y, Brewer JW, Diehl JA, Hendershot LM. (2002) Two distinct stress signaling pathways converge upon the CHOP promoter during the mammalian unfolded protein response. *J Mol Biol*, 318: 1351-1365.
94. Yang Y, Liu L, Naik I, Braunstein Z, Zhong J, Ren B. (2017) Transcription Factor C/EBP Homologous Protein in Health and Diseases. *Frontiers in Immunology*, 8.
95. Dai X, Ding Y, Liu Z, Zhang W, Zou M-H. (2016) Phosphorylation of CHOP (C/EBP Homologous Protein) by the AMP-Activated Protein Kinase Alpha 1 in Macrophages Promotes CHOP Degradation and Reduces Injury-Induced Neointimal Disruption In Vivo. *Circulation Research*, 119: 1089-1100.
96. Zhang P, Gao K, Tang Y, Jin X, An J, Yu H, Wang H, Zhang Y, Wang D, Huang H, Yu L, Wang C. (2014) Destruction of DDIT3/CHOP Protein by Wild-Type

- SPOP but Not Prostate Cancer-Associated Mutants. *Human Mutation*, 35: 1142-1151.
97. Wang X, Ron D. (1996) Stress-Induced Phosphorylation and Activation of the Transcription Factor CHOP (GADD153) by p38 MAP Kinase. *Science*, 272: 1347-1349.
 98. Tsukada J, Yoshida Y, Kominato Y, Auron PE. (2011) The CCAAT/enhancer (C/EBP) family of basic-leucine zipper (bZIP) transcription factors is a multifaceted highly-regulated system for gene regulation. *Cytokine*, 54: 6-19.
 99. Ubeda M, Wang XZ, Zinszner H, Wu I, Habener JF, Ron D. (1996) Stress-induced binding of the transcriptional factor CHOP to a novel DNA control element. *Molecular and Cellular Biology*, 16: 1479-1489.
 100. Matsumoto M, Minami M, Takeda K, Sakao Y, Akira S. (1996) Ectopic expression of CHOP (GADD153) induces apoptosis in M1 myeloblastic leukemia cells. *FEBS Letters*, 395: 143-147.
 101. Maytin EV, Ubeda M, Lin JC, Habener JF. (2001) Stress-Inducible Transcription Factor CHOP/gadd153 Induces Apoptosis in Mammalian Cells via p38 Kinase-Dependent and -Independent Mechanisms. *Experimental Cell Research*, 267: 193-204.
 102. Han J, Back SH, Hur J, Lin YH, Gildersleeve R, Shan J, Yuan CL, Krokowski D, Wang S, Hatzoglou M, Kilberg MS, Sartor MA, Kaufman RJ. (2013) ER-stress-induced transcriptional regulation increases protein synthesis leading to cell death. *Nat Cell Biol*, 15: 481-490.
 103. Puthalakath H, O'Reilly LA, Gunn P, Lee L, Kelly PN, Huntington ND, Hughes PD, Michalak EM, McKimm-Breschkin J, Motoyama N, Gotoh T, Akira S, Bouillet P, Strasser A. (2007) ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim. *Cell*, 129: 1337-1349.
 104. Li T, Su L, Lei Y, Liu X, Zhang Y, Liu X. (2015) DDIT3 and KAT2A Proteins Regulate TNFRSF10A and TNFRSF10B Expression in Endoplasmic Reticulum Stress-mediated Apoptosis in Human Lung Cancer Cells. *J Biol Chem*, 290: 11108-11118.
 105. Chen P, Hu T, Liang Y, Li P, Chen X, Zhang J, Ma Y, Hao Q, Wang J, Zhang P, Zhang Y, Zhao H, Yang S, Yu J, Jeong LS, Qi H, Yang M, Hoffman RM, Dong

- Z, Jia L. (2016) Neddylation Inhibition Activates the Extrinsic Apoptosis Pathway through ATF4–CHOP–DR5 Axis in Human Esophageal Cancer Cells. *Clinical Cancer Research*, 22: 4145-4157.
106. Ramming T, Okumura M, Kanemura S, Baday S, Birk J, Moes S, Spiess M, Jenö P, Bernèche S, Inaba K, Appenzeller-Herzog C. (2015) A PDI-catalyzed thiol–disulfide switch regulates the production of hydrogen peroxide by human Ero1. *Free Radical Biology and Medicine*, 83: 361-372.
107. Marciniak SJ, Yun CY, Oyadomari S, Novoa I, Zhang Y, Jungreis R, Nagata K, Harding HP, Ron D. (2004) CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. *Genes Dev*, 18: 3066-3077.
108. Liu CL, He YY, Li X, Li RJ, He KL, Wang LL. (2014) Inhibition of serine/threonine protein phosphatase PP1 protects cardiomyocytes from tunicamycin-induced apoptosis and I/R through the upregulation of p-eIF2alpha. *Int J Mol Med*, 33: 499-506.
109. B'Chir W, Chaveroux C, Carraro V, Averous J, Maurin AC, Jousse C, Muranishi Y, Parry L, Fafournoux P, Bruhat A. (2014) Dual role for CHOP in the crosstalk between autophagy and apoptosis to determine cell fate in response to amino acid deprivation. *Cell Signal*, 26: 1385-1391.
110. Shimodaira Y, Takahashi S, Kinouchi Y, Endo K, Shiga H, Kakuta Y, Kuroha M, Shimosegawa T. (2014) Modulation of endoplasmic reticulum (ER) stress-induced autophagy by C/EBP homologous protein (CHOP) and inositol-requiring enzyme 1 α (IRE1 α) in human colon cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 445: 524-533.
111. Tang ZH, Chen X, Wang ZY, Chai K, Wang YF, Xu XH, Wang XW, Lu JH, Wang YT, Chen XP, Lu JJ. (2016) Induction of C/EBP homologous protein-mediated apoptosis and autophagy by licochalcone A in non-small cell lung cancer cells. *Sci Rep*, 6: 26241.
112. Choy MS, Yusoff P, Lee IC, Newton JC, Goh CW, Page R, Shenolikar S, Peti W. (2015) Structural and Functional Analysis of the GADD34:PP1 eIF2 α Phosphatase. *Cell Rep*, 11: 1885-1891.
113. Reid DW, Tay AS, Sundaram JR, Lee IC, Chen Q, George SE, Nicchitta CV, Shenolikar S. (2016) Complementary Roles of GADD34- and CReP-Containing

- Eukaryotic Initiation Factor 2 α Phosphatases during the Unfolded Protein Response. *Mol Cell Biol*, 36: 1868-1880.
114. Hollander MC, Zhan Q, Bae I, Fornace AJ, Jr. (1997) Mammalian GADD34, an apoptosis- and DNA damage-inducible gene. *J Biol Chem*, 272: 13731-13737.
 115. Fornace AJ, Jr., Nebert DW, Hollander MC, Luethy JD, Papathanasiou M, Fargnoli J, Holbrook NJ. (1989) Mammalian genes coordinately regulated by growth arrest signals and DNA-damaging agents. *Mol Cell Biol*, 9: 4196-4203.
 116. Novoa I, Zeng H, Harding HP, Ron D. (2001) Feedback inhibition of the unfolded protein response by GADD34-mediated dephosphorylation of eIF2 α . *J Cell Biol*, 153: 1011-1022.
 117. Wright PE, Dyson HJ. (2015) Intrinsically disordered proteins in cellular signalling and regulation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 16: 18-29.
 118. Brush MH, Shenolikar S. (2008) Control of cellular GADD34 levels by the 26S proteasome. *Mol Cell Biol*, 28: 6989-7000.
 119. Zhou W, Brush MH, Choy MS, Shenolikar S. (2011) Association with endoplasmic reticulum promotes proteasomal degradation of GADD34 protein. *J Biol Chem*, 286: 21687-21696.
 120. Sarfraz M, Afzal A, Khattak S, Saddozai UAK, Li H-M, Zhang Q-Q, Madni A, Haleem KS, Duan S-F, Wu D-D, Ji S-P, Ji X-Y. (2021) Multifaceted behavior of PEST sequence enriched nuclear proteins in cancer biology and role in gene therapy. *Journal of Cellular Physiology*, 236: 1658-1676.
 121. Hollander MC, Poola-Kella S, Fornace AJ, Jr. (2003) Gadd34 functional domains involved in growth suppression and apoptosis. *Oncogene*, 22: 3827-3832.
 122. Minami K, Inoue H, Terashita T, Kawakami T, Watanabe R, Haneda M, Isobe K, Okabe H, Chano T. (2007) GADD34 induces p21 expression and cellular senescence. *Oncol Rep*, 17: 1481-1485.
 123. Uddin MN, Ito S, Nishio N, Suganya T, Isobe K. (2011) Gadd34 induces autophagy through the suppression of the mTOR pathway during starvation. *Biochem Biophys Res Commun*, 407: 692-698.
 124. Holczer M, Bánhegyi G, Kapuy O. (2016) GADD34 Keeps the mTOR Pathway Inactivated in Endoplasmic Reticulum Stress Related Autophagy. *PLoS One*, 11: e0168359.

125. Gambardella G, Staiano L, Moretti MN, De Cegli R, Fagnocchi L, Di Tullio G, Polletti S, Braccia C, Armirotti A, Zippo A, Ballabio A, De Matteis MA, di Bernardo D. (2020) GADD34 is a modulator of autophagy during starvation. *Sci Adv*, 6.
126. Adler HT, Chinery R, Wu DY, Kussick SJ, Payne JM, Fornace AJ, Jr., Tkachuk DC. (1999) Leukemic HRX fusion proteins inhibit GADD34-induced apoptosis and associate with the GADD34 and hSNF5/INI1 proteins. *Mol Cell Biol*, 19: 7050-7060.
127. Song P, Yang S, Hua H, Zhang H, Kong Q, Wang J, Luo T, Jiang Y. (2019) The regulatory protein GADD34 inhibits TRAIL-induced apoptosis via TRAF6/ERK-dependent stabilization of myeloid cell leukemia 1 in liver cancer cells. *J Biol Chem*, 294: 5945-5955.
128. Farook JM, Shields J, Tawfik A, Markand S, Sen T, Smith SB, Brann D, Dhandapani KM, Sen N. (2013) GADD34 induces cell death through inactivation of Akt following traumatic brain injury. *Cell Death & Disease*, 4: e754-e754.
129. Shen J, Chen X, Hendershot L, Prywes R. (2002) ER Stress Regulation of ATF6 Localization by Dissociation of BiP/GRP78 Binding and Unmasking of Golgi Localization Signals. *Developmental Cell*, 3: 99-111.
130. Hetz C, Papa FR. (2018) The Unfolded Protein Response and Cell Fate Control. *Molecular Cell*, 69: 169-181.
131. Sharma RB, Darko C, Alonso LC. (2020) Intersection of the ATF6 and XBP1 ER stress pathways in mouse islet cells. *Journal of Biological Chemistry*, 295: 14164-14177.
132. Gade P, Ramachandran G, Maachani UB, Rizzo MA, Okada T, Prywes R, Cross AS, Mori K, Kalvakolanu DV. (2012) An IFN- γ -stimulated ATF6-C/EBP- β -signaling pathway critical for the expression of Death Associated Protein Kinase 1 and induction of autophagy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109: 10316-10321.
133. Yoshida H, Okada T, Haze K, Yanagi H, Yura T, Negishi M, Mori K. (2000) ATF6 activated by proteolysis binds in the presence of NF-Y (CBF) directly to the cis-acting element responsible for the mammalian unfolded protein response. *Mol Cell Biol*, 20: 6755-6767.

134. Deegan S, Koryga I, Glynn SA, Gupta S, Gorman AM, Samali A. (2015) A close connection between the PERK and IRE arms of the UPR and the transcriptional regulation of autophagy. *Biochem Biophys Res Commun*, 456: 305-311.
135. Lin JH, Li H, Yasumura D, Cohen HR, Zhang C, Panning B, Shokat KM, Lavail MM, Walter P. (2007) IRE1 signaling affects cell fate during the unfolded protein response. *Science*, 318: 944-949.
136. Walter F, Schmid J, Düssmann H, Concannon CG, Prehn JH. (2015) Imaging of single cell responses to ER stress indicates that the relative dynamics of IRE1/XBP1 and PERK/ATF4 signalling rather than a switch between signalling branches determine cell survival. *Cell Death Differ*, 22: 1502-1516.
137. Lin JH, Li H, Zhang Y, Ron D, Walter P. (2009) Divergent effects of PERK and IRE1 signaling on cell viability. *PLoS One*, 4: e4170.
138. Averous J, Bruhat A, Jousse C, Carraro V, Thiel G, Fafournoux P. (2004) Induction of CHOP expression by amino acid limitation requires both ATF4 expression and ATF2 phosphorylation. *J Biol Chem*, 279: 5288-5297.
139. Kojima E, Takeuchi A, Haneda M, Yagi A, Hasegawa T, Yamaki K, Takeda K, Akira S, Shimokata K, Isobe K. (2003) The function of GADD34 is a recovery from a shutoff of protein synthesis induced by ER stress: elucidation by GADD34-deficient mice. *Faseb j*, 17: 1573-1575.
140. Ohri SS, Mullins A, Hetman M, Whittemore SR. (2014) Inhibition of GADD34, the stress-inducible regulatory subunit of the endoplasmic reticulum stress response, does not enhance functional recovery after spinal cord injury. *PLoS One*, 9: e109703.
141. Sundaram JR, Wu Y, Lee IC, George SE, Hota M, Ghosh S, Kesavapany S, Ahmed M, Tan EK, Shenolikar S. (2019) PromISR-6, a Guanabenz Analogue, Improves Cellular Survival in an Experimental Model of Huntington's Disease. *ACS Chem Neurosci*, 10: 3575-3589.
142. Tsaytler P, Harding HP, Ron D, Bertolotti A. (2011) Selective Inhibition of a Regulatory Subunit of Protein Phosphatase 1 Restores Proteostasis. *Science*, 332: 91-94.

143. B'Chir W, Maurin AC, Carraro V, Averous J, Jousse C, Muranishi Y, Parry L, Stepien G, Fafournoux P, Bruhat A. (2013) The eIF2 α /ATF4 pathway is essential for stress-induced autophagy gene expression. *Nucleic Acids Res*, 41: 7683-7699.
144. Borkham-Kamphorst E, Haas U, Van de Leur E, Trevanich A, Weiskirchen R. (2020) Chronic Carbon Tetrachloride Applications Induced Hepatocyte Apoptosis in Lipocalin 2 Null Mice Through Endoplasmic Reticulum Stress and Unfolded Protein Response. *Int J Mol Sci*, 21.
145. Endo M, Oyadomari S, Suga M, Mori M, Gotoh T. (2005) The ER stress pathway involving CHOP is activated in the lungs of LPS-treated mice. *J Biochem*, 138: 501-507.
146. Hiramatsu N, Messah C, Han J, LaVail MM, Kaufman RJ, Lin JH. (2014) Translational and posttranslational regulation of XIAP by eIF2 α and ATF4 promotes ER stress-induced cell death during the unfolded protein response. *Mol Biol Cell*, 25: 1411-1420.
147. Turpin J, Frumence E, El Safadi D, Meilhac O, Krejbich-Trotot P, Viranaïcken W. (2020) Improvement of immunodetection of the transcription factor C/EBP homologous protein by western blot. *Analytical Biochemistry*, 601: 113775.
148. Zhang K, Kaufman RJ. (2006) Protein folding in the endoplasmic reticulum and the unfolded protein response. *Handb Exp Pharmacol*: 69-91.
149. Tyson JJ, Chen K, Novak B. (2001) Network dynamics and cell physiology. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2: 908-916.
150. Ottino JM, Shinbrot T. (1995) Nonlinear dynamics and chaos (with applications to physics, biology chemistry, and engineering). By S. H. Strogatz, Addison-Wesley, Reading, MA, 1994, 498pp., \$51.95 (hard cover). *AICHE Journal*, 41: 1831-1832.
151. Tyson JJ, Chen KC, Novak B. (2003) Sniffers, buzzers, toggles and blinkers: dynamics of regulatory and signaling pathways in the cell. *Curr Opin Cell Biol*, 15: 221-231.
152. Wedler FC. (1976) Enzyme kinetics: Behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems. Author: Irwin H. Segal (University of California, Davis). Published by Wiley-Interscience, New York, 1975. Price:

- \$24.50. No. of pages: 957. *International Journal of Chemical Kinetics*, 8: 159-159.
153. Goldbeter A, Koshland DE, Jr. (1981) An amplified sensitivity arising from covalent modification in biological systems. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78: 6840-6844.
154. Kaplan D GL. *Understanding Nonlinear Dynamics*. In. New York: Springer-Verlag, 1995.
155. Malhi H, Kaufman RJ. (2011) Endoplasmic reticulum stress in liver disease. *J Hepatol*, 54: 795-809.
156. Lytton J, Westlin M, Hanley MR. (1991) Thapsigargin inhibits the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca-ATPase family of calcium pumps. *Journal of Biological Chemistry*, 266: 17067-17071.
157. Wang C, Li T, Tang S, Zhao D, Zhang C, Zhang S, Deng S, Zhou Y, Xiao X. (2016) Thapsigargin induces apoptosis when autophagy is inhibited in HepG2 cells and both processes are regulated by ROS-dependent pathway. *Environ Toxicol Pharmacol*, 41: 167-179.
158. Guo J, Ren R, Sun K, Yao X, Lin J, Wang G, Guo Z, Xu T, Guo F. (2020) PERK controls bone homeostasis through the regulation of osteoclast differentiation and function. *Cell Death Dis*, 11: 847.
159. Osowski CM, Urano F. (2011) Measuring ER stress and the unfolded protein response using mammalian tissue culture system. *Methods Enzymol*, 490: 71-92.
160. Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, Abedin MJ, Abeliovich H, Acevedo Arozena A, Adachi H, Adams CM, et al. (2016) Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy*, 12: 1-222.
161. Ichimura Y, Komatsu M. (2010) Selective degradation of p62 by autophagy. *Semin Immunopathol*, 32: 431-436.
162. Jänicke RU, Sprengart ML, Wati MR, Porter AG. (1998) Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. *J Biol Chem*, 273: 9357-9360.
163. Cetin B, Wabl CA, Gumusay O. (2020) The DNA damaging revolution. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 156: 103117.

164. Los M, Mozoluk M, Ferrari D, Stepczynska A, Stroh C, Renz A, Herceg Z, Wang ZQ, Schulze-Osthoff K. (2002) Activation and caspase-mediated inhibition of PARP: a molecular switch between fibroblast necrosis and apoptosis in death receptor signaling. *Mol Biol Cell*, 13: 978-988.
165. Kapuy O, Vinod PK, Mandl J, Bánhegyi G. (2013) A cellular stress-directed bistable switch controls the crosstalk between autophagy and apoptosis. *Mol Biosyst*, 9: 296-306.
166. Fung TS, Liao Y, Liu DX. (2014) The Endoplasmic Reticulum Stress Sensor IRE1 α Protects Cells from Apoptosis Induced by the Coronavirus Infectious Bronchitis Virus. *Journal of Virology*, 88: 12752-12764.
167. Carrara M, Sigurdardottir A, Bertolotti A. (2017) Decoding the selectivity of eIF2 α holophosphatases and PPP1R15A inhibitors. *Nature Structural & Molecular Biology*, 24: 708-716.
168. Igase M, Okura T, Nakamura M, Takata Y, Kitami Y, Hiwada K. (2001) Role of GADD153 (growth arrest- and DNA damage-inducible gene 153) in vascular smooth muscle cell apoptosis. *Clin Sci (Lond)*, 100: 275-281.
169. Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A, Kroemer G. (2007) Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8: 741-752.
170. Ogata M, Hino S, Saito A, Morikawa K, Kondo S, Kanemoto S, Murakami T, Taniguchi M, Tanii I, Yoshinaga K, Shiosaka S, Hammarback JA, Urano F, Imaizumi K. (2006) Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress. *Mol Cell Biol*, 26: 9220-9231.
171. Cao J, Dai DL, Yao L, Yu HH, Ning B, Zhang Q, Chen J, Cheng WH, Shen W, Yang ZX. (2012) Saturated fatty acid induction of endoplasmic reticulum stress and apoptosis in human liver cells via the PERK/ATF4/CHOP signaling pathway. *Mol Cell Biochem*, 364: 115-129.
172. Zhang R, Piao MJ, Kim KC, Kim AD, Choi JY, Choi J, Hyun JW. (2012) Endoplasmic reticulum stress signaling is involved in silver nanoparticles-induced apoptosis. *Int J Biochem Cell Biol*, 44: 224-232.

173. Kapuy O, Papp D, Vellai T, Bánhegyi G, Korcsmáros T. (2018) Systems-Level Feedbacks of NRF2 Controlling Autophagy upon Oxidative Stress Response. *Antioxidants (Basel)*, 7.
174. Kosztelnik M, Kurucz A, Papp D, Jones E, Sigmond T, Barna J, Traka MH, Lorincz T, Szarka A, Banhegyi G, Vellai T, Korcsmaros T, Kapuy O. (2019) Suppression of AMPK/aak-2 by NRF2/SKN-1 down-regulates autophagy during prolonged oxidative stress. *Faseb j*, 33: 2372-2387.
175. Kapuy O, Holczer M, Márton M, Korcsmáros T. (2021) Autophagy-dependent survival is controlled with a unique regulatory network upon various cellular stress events. *Cell Death Dis*, 12: 309.
176. May DG, Scott KL, Campos AR, Roux KJ. (2020) Comparative Application of BioID and TurboID for Protein-Proximity Biotinylation. *Cells*, 9: 1070.
177. Kishino A, Hayashi K, Hidai C, Masuda T, Nomura Y, Oshima T. (2017) XBP1-FoxO1 interaction regulates ER stress-induced autophagy in auditory cells. *Sci Rep*, 7: 4442.
178. Zhou C, Martinez E, Di Marcantonio D, Solanki-Patel N, Aghayev T, Peri S, Ferraro F, Skorski T, Scholl C, Fröhling S, Balachandran S, Wiest DL, Sykes SM. (2017) JUN is a key transcriptional regulator of the unfolded protein response in acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 31: 1196-1205.
179. Hughes D, Mallucci GR. (2019) The unfolded protein response in neurodegenerative disorders - therapeutic modulation of the PERK pathway. *Febs j*, 286: 342-355.
180. Axten JM, Romeril SP, Shu A, Ralph J, Medina JR, Feng Y, Li WH, Grant SW, Heerding DA, Minthorn E, Mencken T, Gaul N, Goetz A, Stanley T, Hassell AM, Gampe RT, Atkins C, Kumar R. (2013) Discovery of GSK2656157: An Optimized PERK Inhibitor Selected for Preclinical Development. *ACS Med Chem Lett*, 4: 964-968.
181. Chen X, Iliopoulos D, Zhang Q, Tang Q, Greenblatt MB, Hatziapostolou M, Lim E, Tam WL, Ni M, Chen Y, Mai J, Shen H, Hu DZ, Adoro S, Hu B, Song M, Tan C, Landis MD, Ferrari M, Shin SJ, Brown M, Chang JC, Liu XS, Glimcher LH. (2014) XBP1 promotes triple-negative breast cancer by controlling the HIF1 α pathway. *Nature*, 508: 103-107.

182. Spaan CN, Smit WL, van Lidth de Jeude JF, Meijer BJ, Muncan V, van den Brink GR, Heijmans J. (2019) Expression of UPR effector proteins ATF6 and XBP1 reduce colorectal cancer cell proliferation and stemness by activating PERK signaling. *Cell Death & Disease*, 10: 490.

10. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

A dolgozat témájához kapcsolódó publikációk jegyzéke:

Holczer M¹, Márton M¹, Kurucz A, Bánhegyi G, Kapuy O: *A Comprehensive Systems Biological Study of Autophagy-Apoptosis Crosstalk during Endoplasmic Reticulum Stress*. 2015, Biomed Research International, 2015:319589, doi: 10.1155/2015/319589. IF: 2,134

Márton M, Kurucz A, Lizák B, Margittai É, Bánhegyi G, Kapuy O: *A Systems Biological View of Life-and-Death Decision with Respect to Endoplasmic Reticulum Stress-The Role of PERK Pathway*. 2017, Int J Mol Sci., 18(1). pii: E58. doi: 10.3390/ijms18010058. IF: 3,687

Kapuy O, Márton M, Bánhegyi G, Vinod PK: *Multiple system-level feedback loops control life-and-death decisions in endoplasmic reticulum stress*. 2020, FEBS Letters, 594(6):1112-1123. doi: 10.1002/1873-3468.13689. Epub 2019 Dec 11. PMID: 31769869. IF: 4,124

A dolgozat témájához nem kapcsolódó publikációk jegyzéke:

Márton M, Tihanyi N, Bánhegyi G, Gyulavári P, Kapuy O: *NRF2-regulated cell cycle arrest at early stage of oxidative stress response mechanism*. PLoS One. 2018 Nov 28;13(11):e0207949. doi: 10.1371/journal.pone.0207949. eCollection 2018. IF: 2,776

Kapuy O, Holczer M, Márton M, Korcsmáros T: *Autophagy-dependent survival is controlled with a unique regulatory network upon various cellular stress events* PMID: 33758166 PMCID: Cell Death Dis. 2021 Mar 23;12(4):309. doi: 10.1038/s41419-021-03599-7. PMID:33758166.

IF: 8,469 (várható IF érték)

(¹Megosztott első szerzőség)

11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Mészáros-Kapuy Orsolyának, hogy szakértelmével támogatott PhD kutatásom során. Köszönöm, hogy elméleti tanácsokkal látott el és gyakorlati útmutatást is adott mind a PhD kutatásom kísérleti része, mind a disszertáció írás során.

Köszönöm Dr. Bánhegyi Gábor professzor úrnak, az Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Patobiokémiai Intézet egykori vezetőjének, amiért lehetővé tette, hogy kutatásaimat Intézetében és munkacsoportjában elkezdhessem. Hálás vagyok, hogy kutatásaim során mindvégig támogatott, emlékének köszönettel adózom.

Köszönöm az Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Patobiokémiai Intézet, illetve a Molekuláris Biológiai Tanszék jelenlegi és korábbi vezetőinek, Dr. Csala Miklós és Dr. Mandl József professzor uraknak és Dr. Keszler Gergelynek, amiért lehetővé tették, hogy intézetükben, majd tanszékükön végezhessem a PhD kutatási munkámat.

Köszönöm az ER-redox munkacsoport minden tagjának, Dr. Holczer Mariann-nak, Dr. Gyöngyösi Norbertnek és Dr. Lizák Beátának segítségüket és támogatásukat, és a közös munkát kutatásaim során.

Köszönöm a Semmelweis Egyetem Molekuláris Biológiai Tanszék összes dolgozójának a kísérletek kivitelezése során nyújtott segítségét.

Végül köszönettel tartozom családomnak, páromnak és barátaimnak, mert doktori tanulmányaim során mindvégig számíthattam megértésükre és támogatásukra.

12. MELLÉKLETEK JEGYZÉKE

1. Melléklet: „Az autofágia és apoptózis kapcsolatának vizsgálata ER stressz során” (4.1.) fejezetben bemutatott modell kódja
2. Melléklet: „Pozitív visszacsatolási hurok jelenlétének megállapítása az IRE1 és PERK ágak között matematikai modell segítségével” (4.2.4.) fejezetben bemutatott modell kódja
 - a) Aktivitások időbeli ábrázolásának kódja
 - b) Jel-válasz görbék kódja
3. Melléklet: „A ER stresszválasz megfelelő működéséhez újabb visszacsatolási hurkok szükségesek az ATF4 és annak célgénjei között” (4.3.4.) fejezetben bemutatott modellek kódjai
 - a) Aktivitások időbeli ábrázolásának kódja, amikor a GADD34-ATF4 pozitív és a CHOP-ATF4 negatív visszacsatolási hurkok nincsenek jelen
 - b) Aktivitások időbeli ábrázolásának kódja, amikor a GADD34-ATF4 pozitív és a CHOP-ATF4 negatív visszacsatolási hurkok jelen vannak
4. Melléklet: „További elméleti vizsgálatok az élet-és-halál közötti folyamat tanulmányozására ER stressz esetén” (4.4.) fejezetben bemutatott modellek kódja és leírása
 - a) Az autofágia induktor jel-válasz görbe szimulációjának kódja
 - b) Az apoptózis induktor jel-válasz görbe szimulációjának kódja
 - c) Az aktivitások időbeli ábrázolásának kódja az ER stressz függő élet és halál közötti döntés során
 - d) A számítógépes analízis paramétereinek beállítása, abban az esetben, amikor sem az ER stressz szenzorok, sem az autofágia és apoptózis induktorok között nincs megfigyelhető kapcsolat
 - e) A számítógépes analízis paramétereinek beállítása, abban az esetben, amikor az ER stressz szenzorok között nincs megfigyelhető kapcsolat, de van egy negatív visszacsatolási hurok az autofágia és apoptózis induktorok közt

- f) A számítógépes analízis paramétereinek beállítása, abban az esetben, amikor az ER stressz szenzorok között egy pozitív visszacsatolási hurok, és az autofágia és apoptózis induktorok közt egy negatív visszacsatolási hurok van jelen

1. Melléklet

„Az autofágia és apoptózis kapcsolatának vizsgálata ER stressz során” (4.1.) fejezetben bemutatott modell kódja:

3. táblázat: A modell elemek leírása

<i>komponensek leírása</i>	
ERSS	az ER stressz szenzor aktív formája
ERSST	a teljes ER stressz szenzor (teljes mennyiség?)
Auta	az autofágia induktor aktív formája
Auti	az autofágia induktor inaktív formája
Autt	a teljes autofágia induktor
Apoa	az apoptózis induktor egy inaktív formája
Apoa2	az apoptózis induktor egy inaktív formája
Apoa3	az apoptózis induktor egy inaktív formája
Apoa4	az apoptózis induktor aktív formája
Apot	a teljes apoptózis induktor
S	stressz

4. táblázat: A modell állandók leírása

<i>állandók leírása</i>	
kaers'	az ERSS stressz-függő aktivációs állandója
kaers''	az ERSS apoptózis induktor-függő aktiválódásának állandója
kiers	az ERSS háttér inaktivációs állandója
kaap'	az apoptózis induktor ERSS-függő aktivációs állandója
kiap	apoptózis induktor háttér inaktivációs állandója
kiap'	az apoptózis induktor autofágia induktor-függő inaktivációs állandója

kaau	az autofágia induktor háttér aktivációs állandója
kaau'	az autofágia induktor ERSS-függő aktivációs állandója
kiau	az autofágia induktor háttér inaktivációs állandója
kiau'	az autofágia induktor apoptózis induktor-függő inaktivációs állandója

5. táblázat: A modell biokémiai reakcióinak leírása

<i>biokémiai reakciók</i>	
ERSS aktiválódás	$kaers' * S + kaers'' * Apo4$
ERSS inaktiválódás	$kiers$
AUTA aktiválódás	$kaau + kaau' * ERSS$
AUTA inaktiválódás	$kiau + kiau' * Apo4$
APOA aktiválódás	$kaap * ERSS$
APOA inaktiválódás	$kiap + kiap' * Auta$

A sztochasztikus szimuláció XPP kódja:

```
# ez a verzió megváltoztatja a zajszintet minden egyes
reakciófolyamatban
init S0=5, S=0, ERSS=0.04, AUTA=71.11, APOA2=0.16, APOA3=0, APOA4=0,
TIME=0

# normál eloszlású véletlenszerű számok létrehozása
wiener wers
wiener wauta
wiener wapoa2
wiener wapoa3
wiener wapoa4

S0' = 0
S' = lev*(V*S0 - S)

ERSS' = (kaers'/V*S + kaers''/V*Apo4)*(V*ERSST-ERSS) - kiers*ERSS +
eers*wers*sqrt(ERSS)

Auta' = (kaau + kaau'/V*ERSS)*(V*Autt-Auta) - (kiau +
kiau'/V*Apo4)*Auta + eauta*wauta*sqrt(Auta)
Auti = V*Autt - Auta
```

```

Vaapo = kaap'/V*ERSS
Viapo = kiap + kiap'/V*Auta

Apoa1 = V*Apot - Apoa4 - Apoa2 - Apoa3
Apoa2' = Viapo*Apoa3 - Vaapo*Apoa2 + Vaapo*Apoa - Viapo*Apoa2
Apoa3' = Viapo*Apoa4 - Vaapo*Apoa3 + Vaapo*Apoa2 - Viapo*Apoa3
Apoa4' = Vaapo*Apoa3 - Viapo*Apoa4 + eapoa4*wapoa4*sqrt(Apoa4)

time' = 1
global +1 {time-depriv} {S0=0}

p V=1000, lev=0.5, depriv=500
p kaers'=0.001, kaers''=0.1, kiers=0.001, ERSST=1
p Apot=1, kaap'=1.5, kiap=0.05, kiap'=5
p Autt=1, kaau=0.0001, kaau'=0.5, kiau=0.001, kiau'=15p eers=1,
eauta=1, eapoa2=0, eapoa3=0, eapoa4=0

done

```

2. Melléklet

„Pozitív visszacsatolási hurok jelenlétének vizsgálata/megállapítása az IRE1 és PERK ágak között matematikai modell segítségével” (4.2.4.) fejezetben bemutatott modell kódja:

a) Aktivitások időbeli ábrázolásának kódja:

```
# az ER stressz-függő élet és halál közötti döntés kiváltása az XPP-
Aut programmal

# kiindulási állapotok az ER stressz-függő élet és halál közötti
döntés kiváltására
init PERK = 0, IRE1 = 0, Apoa = 0, Auta = 0.075

# differenciálegyenletek

# A PERK az UPR PERK ágát ábrázolja
PERK' = (kaperk'*STRESS + kaperk''*IRE1)*(PERKT-PERK) - kiperk*PERK

# Az IRE1 az UPR IRE1 ágát ábrázolja
IRE1' = (kairel'*STRESS + kairel''*PERK)*(IRE1T-IRE1) - kiirel*IRE1

# Az Apoa a stresszválasz mechanizmus apoptózis induktorait (pl. CHOP,
JNK-P) ábrázolja
Apoa' = (kaap + kaap'*PERK + kaap''*IRE1)*(Apot-Apoa)/(Jap + Apot-Apoa)
- (kiap + kiap'*Auta)*Apoa/(Jap + Apoa)

# Az Auta a stresszválasz mechanizmus autofágia induktorait ábrázolja
Auta' = (kaau + kaau'*PERK + kaau''*IRE1)*(Autt-Auta)/(Jau + Autt-Auta)
- (kiauu + kiauu'*Apoa)*Auta/(Jau + Autt)

# paraméterek

# alacsony szintű ER stressz kiváltása: stress = 25

# magas szintű ER stressz kiváltása: stress = 40

# PERK csendesítés kiváltása: PERKT = 0.2,
IRE1-gátlás kiváltása: IRE1T = 0.1

p stress = 0
p kaperk' = 0.3, kaperk'' = 7.5, kiperk = 7.5, PERKT = 2
p kairel' = 0.5, kairel'' = 5, kiirel = 5, IRE1T = 1
p Apot = 1, Jap = 0.01, kaap = 0, kaap' = 7.5, kaap'' = 0.3, kaap''' =
0, kiap = 2, kiap' = 10
```

```

p Autt = 1, Jau = 0.5, kaau = 0.2, kaau' = 2, kaau'' = 20, kiau = 1,
kiau' = 30

#numerics
@ TOTAL = 1, METH = stiff, XLO = 0, XHI = 1, YLO = 0, YHI = 1, BOUND =
100
done

```

b) Jel-válasz görbék kódja:

```

# az XPP-Aut programban létrehozott jel-válasz görbék modellje az ER
stressz-függő élet és halál közötti döntés során

# kiindulási állapotok az ER stressz-függő élet és halál közötti
döntés kiváltására
init Apoa = 0, STRESS = 0

# differenciálegyenletek

# Az Apoa a stresszválasz mechanizmus apoptózis induktorait (pl. CHOP,
JNK-P) ábrázolja
Apoa' = (kaap + kaap'*PERK + kaap''*IRE1)*(Apot-Apoa)/(Jap + Apot-Apoa)
-
(kiap + kiap'*Auta)*Apoa/(Jap + Apoa)

# A STRESS az ER stressz intenzitást ábrázolja
STRESS' = 0

# steady state-állapot függvényei

# A PERK az UPR PERK ágát ábrázolja
PERK = (kaperk'*STRESS + kaperk''*IRE1)*PERKT/(kaperk'*STRESS +
kaperk''*IRE1 + kiperk)

# Az IRE1 az UPR IRE1 ágát ábrázolja
IRE1 = (kaire1'*STRESS + kaire1''*PERK)*IRE1T/(kaire1'*STRESS +
kaire1''*PERK + kiire1)

# Az Auta a stresszválasz mechanizmus autofágia induktorait ábrázolja
Auta = Autt*GK(kaau + kaau'*PERK + kaau''*IRE1, kiau +
kiau'*Apoa, Jau, Jau)

# 'Goldbeter-Koshand' függvény (GK)
GB(arg1, arg2, arg3, arg4) = arg2-arg1+arg2*arg3+arg1*arg4
GK(arg1, arg2, arg3, arg4) = 2*arg1*arg4/(GB(arg1, arg2, arg3, arg4) +
sqrt(GB(arg1, arg2, arg3, arg4)^2-4*(arg2-arg1)*arg1*arg4))

```

```
# paraméterek
# alacsony szintű ER stressz kiváltása: stress = 25
# magas szintű ER stressz kiváltása: stress = 40
# PERK-csendesítés kiváltása: PERKT = 0.2, IRE-1 gátlás kiváltása:
IRE1T = 0.1
p stress = 0
p kaperk' = 0.3, kaperk" = 7.5, kiperk = 7.5, PERKT = 2
p kairel' = 0.5, kairel" = 5, kiirel = 5, IRE1T = 1
p Apot = 1, Jap = 0.01, kaap = 0, kaap' = 7.5, kaap" = 0.3, kaap''' =
0, kiap = 2, kiap' = 10
p Autt = 1, Jau = 0.5, kaau = 0.2, kaau' = 2, kaau" = 20, kiau = 1,
kiau' = 30

done
```

3. Melléklet

„A ER stresszválasz megfelelő működéséhez újabb visszacsatolási hurkok szükségesek az ATF4 és annak célgénjei között” (4.3.4.) fejezetben bemutatott modellek kódjai:

- a) Aktivitások időbeli ábrázolásának kódja, amikor a GADD34-ATF4 pozitív és a CHOP-ATF4 negatív visszacsatolási hurkok nincsenek jelen:

```
# az ER stresszválasz mechanizmus szimulációjának modellje XPP-AUT
programmal
# az aktivitások időbeli ábrázolásának kódja, amikor a GADD34-ATF4
pozitív és a CHOP-ATF4 negatív visszacsatolási hurkok nincsenek jelen

# kiindulási állapotok
eif2aP=0.0099,      mATF4=0.6000,      ATF4=0.4251,      mGadd34=1.0425,
Gadd34=0.2818, mCHOP=2156, CHOP=0.2265, AUTA=0.4017, APOA=0.0012

# differenciálegyenletek
# az eif2aP az eif2a aktív, foszforilált formáját ábrázolja
eif2aP' = (kaeif2 + kaeif2'*S/(1+S))*(eif2aT - eif2aP) - (kieif2 +
kieif2'*Gadd34)*eif2aP

# az mATF4 az ATF4 mRNS szintjét ábrázolja a sejtben
mATF4' = ksatf + ksatf'*S/(1+S) - kdatf*mATF4

# az ATF4 az aktív ATF4 fehérjeszintet ábrázolja a sejtben
ATF4' = kssatf + kssatf'*mATF4*eif2aP - kddatf*ATF4

# az mGADD34 a GADD34 mRNS szintet ábrázolja a sejtben
mGadd34' = ksgadd + ksgadd'*ATF4 - kdgadd*mGadd34

# a GADD34 az aktív GADD34 fehérje szintet ábrázolja a sejtben
Gadd34' = kssgadd + kssgadd'*mGadd34 + kssgadd"*mGadd34*CHOP - kddgadd*
Gadd34

# az mCHOP a CHOP mRNA szintet ábrázolja a sejtben
mCHOP' = kschop*siCHOP + kschop'*ATF4*siCHOP + kschop"*S/(1+S)*siCHOP -
kdchop*mCHOP

# CHOP az aktív CHOP fehérje szintet ábrázolja a sejtben
```



```

CHOP' = ksschop + ksschop'*mCHOP - kddchop*CHOP

# az AUTA az aktív autofágia aktivátor komplex; amikor az AUTA aktív,
# azt feltételezzük, hogy az autofágia is aktív
AUTA' = (kaauta + kaauta'*Gadd34^n*GB + kaauta"*CHOP)*(1-AUTA)/(Jauta +
1 - AUTA) - (kiauta + kiauta'*APOA)*AUTA/(Jauta + AUTA)

# az APOA az aktív autofágia aktivátor komplex; amikor az APOA aktív,
# azt feltételezzük, hogy az apoptózis is aktív
APOA' = (kaapoa + kaapoa'*CHOP^m + kaapoa"*Gadd34*GB)*(1 - APOA)/(Japoa
+ 1 - APOA) - (kiapoa + kiapoa'*AUTA)*APOA/(Japoa + APOA)

# paraméterek
# alacsony stressz kiváltása: S=5
# magas stressz kiváltása: S=30
# magas stressz kiváltása guanabenz kezeléssel kombinálva: S=30, GB=0.1
# magas stressz kiváltása siCHOP csendesítéssel kombinálva: S=30,
siCHOP=0.3
p S=0, GB=1, siCHOP=1
p kaeif2=0.001, kaeif2'=0.5, kieif2=0.1, kieif2'=0.1, eif2aT=1
p ksatf=3, ksatf'=2, kdatf=5
p kssatf=0.001, kssatf'=0.15, kddatf=0.1
p ksgadd=0.5, ksgadd'=0.05, kdgadd=0.5
p kssgadd=0.01, kssgadd'=0.01, kssgadd"=0.25, kddgadd=0.25
p kschop=0.001, kschop'=0.125, kschop"=0.275, kdchop=0.25
p ksschop=0.1, ksschop'=0.1, kddchop=0.1
p kachop=0.001, kichop=0.01, kichop'=0.1, Jchop=0.01
p kaauta=0.01, kaauta'=5, kaauta"=1, kiauta=2, kiauta'=100, Jauta=0.5,
n=1
p kaapoa=0, kaapoa'=10, kaapoa"=0.01, kiapoa=0.15, kiapoa'=50,
Japoa=0.01, m=2.5

# számok
@ TOTAL=120, METH=stiff, delay=50

done

```

- b) Aktivitások időbeli ábrázolásának kódja, amikor a GADD34-ATF4 pozitív és a CHOP-ATF4 negatív visszacsatolási hurkok jelen vannak:

```

# az ER stresszválasz mechanizmus szimulációjának modellje XPP-AUT
programmal
# az aktivitások időbeli ábrázolásának kódja, amikor a GADD34-ATF4
pozitív és a CHOP-ATF4 negatív visszacsatolási hurkok jelen vannak

# kiindulási állapotok
eif2aP=0.0099, mATF4=0.6000, ATF4=0.4251, mGadd34=1.0425,
Gadd34=0.2818, mCHOP=2156, CHOP=0.2265, AUTA=0.4017, APOA=0.0012

# differenciálegyenletek
# az eif2aP az eif2a aktív, foszforilált formáját ábrázolja
eif2aP' = (kaeif2 + kaeif2'*S/(1+S))*(eif2aT - eif2aP) - (kieif2 +
kieif2'*Gadd34)*eif2aP

# az mATF4 az ATF4 mRNS szintjét ábrázolja a sejtben
mATF4' = ksatf + ksatf'*S/(1+S) - kdatf*mATF4

# az ATF4 az aktív ATF4 fehérjeszintet ábrázolja a sejtben
ATF4' = kssatf + kssatf'*mATF4*eif2aP + kssatf"*mATF4*Gadd34*GB -
(kddatf + kddatf'*CHOP)*ATF4

# az mGADD34 a GADD34 mRNS szintet ábrázolja a sejtben
mGadd34' = ksgadd + ksgadd'*ATF4 - kdgadd*mGadd34

# a GADD34 az aktív GADD34 fehérje szintet ábrázolja a sejtben
Gadd34' = kssgadd + kssgadd'*mGadd34 + kssgadd"*mGadd34*CHOP - kddgadd*
Gadd34

# az mCHOP a CHOP mRNA szintet ábrázolja a sejtben
mCHOP' = ks chop*siCHOP + ks chop'*ATF4*siCHOP + ks chop"*S/(1+S)*siCHOP -
kd chop*mCHOP

# a CHOP az aktív CHOP fehérje szintet ábrázolja a sejtben
CHOP' = kss chop + kss chop'*mCHOP - kdd chop*CHOP

# az AUTA az aktív autofágia aktivátor komplex; amikor az AUTA aktív,
azt feltételezzük, hogy az autofágia is aktív
AUTA' = (kaauta + kaauta'*Gadd34^n*GB + kaauta"*CHOP)*(1-AUTA)/(Jauta
+ 1 - AUTA) - (kiauta + kiauta'*APOA)*AUTA/(Jauta + AUTA)

```

```

# az APOA az aktív autofágia aktivátor komplex; amikor az APOA aktív,
# azt feltételezzük, hogy az apoptózis is aktív
APOA' = (kaapoa + kaapoa'*CHOP^m + kaapoa"*Gadd34*GB)*(1 - APOA)/(Japoa
+ 1 - APOA) - (kiapoa + kiapoa'*AUTA)*APOA/(Japoa + APOA)

# paraméterek
# alacsony stressz kiváltása: S=1
# magas stressz kiváltása: S=10

# magas stressz kiváltása guanabenz kezeléssel kombinálva: S=10, GB=0.1
# magas stressz kiváltása siCHOP csendesítéssel kombinálva: S=10,
siCHOP=0.3
# magas stressz kiváltása GADD34-OP-vel kombinálva: S=10, kssgadd=0.5
# magas stressz kiváltása CHOP-OP-vel kombinálva: S=10, ksschop=0.1
p S=0, GB=1, siCHOP=1
p kaeif2=0.001, kaeif2'=0.5, kieif2=0.1, kieif2'=0.1, eif2aT=1
p ksatf=3, ksatf'=2, kdatf=5
p kssatf=0.001, kssatf'=0.05, kssatf"=0.5, kddatf=0.1, kddatf'=0.45
p ksgadd=0.5, ksgadd'=0.05, kdgadd=0.5
p kssgadd=0.01, kssgadd'=0.01, kssgadd"=0.25, kddgadd=0.25
p kschop=0.001, kschop'=0.125, kschop"=0.275, kdchop=0.25
p ksschop=0.1, ksschop'=0.1, kddchop=0.1
p kachop=0.001, kichop=0.01, kichop'=0.1, Jchop=0.01
p kaauta=0.01, kaauta'=5, kaauta"=1, kiauta=2, kiauta'=100, Jauta=0.5,
n=1
p kaapoa=0, kaapoa'=10, kaapoa"=0.01, kiapoa=0.15, kiapoa'=50,
Japoa=0.01, m=2.5

# számok
@ TOTAL=120, METH=stiff, delay=50

done

```

4. Melléklet

„További elméleti vizsgálatok az élet-és-halál közötti folyamat tanulmányozására ER stressz esetén” (4.4.) fejezetben bemutatott modellek kódja és leírása:

a) Az autofágia induktor jel-válasz görbe szimulációjának kódja:

```
# az ER stressz függő élet és halál közötti döntés autofágia
induktorainak jel-válasz görbe modellje XPP-AUT programmal

# kiindulási állapotok
init Auta=0, stress=0

# differenciálegyenletek
# az Auta a stresszválasz mechanizmus autofágia induktorának aktív
formáját jelenti
Auta' = (kaau + kaau'*ERS1 + kaau"*ERS2)*(Autt-Auta)/(Jau + Autt-Auta)
- (kiau + kiau'*Apoa)*Auta/(Jau + Auta)

# a stressz az ER stressz intenzitását jelenti
stress'=0

# steady state-állapot függvényei
# ERS1 az ER stressz szenzor1-et írja le
ERS1 = (kaers1 + kaers1'*STRESS + kaers1"*ERS2)*ERS1T/(kaers1 +
kaers1'*STRESS + kaers1"*ERS2 + kiers1)

# ERS2 az ER stressz szenzor2-t írja le
ERS2 = (kaers2 + kaers2'*STRESS + kaers2"*ERS1)*ERS2T/(kaers2 +
kaers2'*STRESS + kaers2"*ERS1 + kiers2)

# ERS az ERS1 és ERS2 összesített hatását írja le ER stressz során
ERS = k1*ERS1 + k2*ERS2

# Az ApoA az ER stresszválasz mechanizmus apoptózis induktorainak aktív
formáját jelenti
Apoa = GK(kaap + kaap'*ERS1 + kaap"*ERS2,kiap + kiap'*Auta,Jap,Jap)

# 'Goldbeter-Koshand' függvény (GK)
GB(arg1,arg2,arg3,arg4) = arg2-arg1+arg2*arg3+arg1*arg4
GK(arg1,arg2,arg3,arg4) =
2*arg1*arg4/(GB(arg1,arg2,arg3,arg4)+sqrt(GB(arg1,arg2,arg3,arg4)^2-
4*(arg2-arg1)*arg1*arg4))

# paraméterek
p kaers1=1, kaers1'=0.01, kaers1"=1, kiers1=1, ERS1T=1
p kaers2=1, kaers2'=0.01, kaers2"=1, kiers2=1, ERS2T=1
p k1=1, k2=1
p Apot=1, Jap=0.01, kaap=0.01, kaap'=1, kaap"=1, kiap=0.01, kiap'=1
p Autt=1, Jau=0.01, kaau=0.01, kaau'=1, kaau"=1, kiau=0.01, kiau'=1

done
```

b) Az apoptózis induktor jel-válasz görbe szimulációjának kódja:

```

# az ER stressz függő élet és halál közötti döntés apoptózis
induktorainak jel-válasz göbe modellje XPP-AUT programmal

# kiindulási állapotok
init Apoa=0, stress=0

# differenciálegyenletek
# Az Apoa az ER stresszválasz mechanizmus apoptózis induktorainak aktív
formáját jelenti
Apoa' = (kaap + kaap'*ERS1 + kaap"*ERS2)*(Apot-Apoa)/(Jap + Apot-Apoa)
- (kiap + kiap'*Auta)*Apoa/(Jap + Apoa)

# a stress az ER stressz intenzitását jelenti
stress'=0

# steady state-állapot függvényei
# ERS1 az ER stressz szenzor1-et írja le
ERS1 = (kaers1 + kaers1'*STRESS + kaers1"*ERS2)*ERS1T/(kaers1 +
kaers1'*STRESS + kaers1"*ERS2 + kiers1)

# ERS2 az ER stressz szenzor2-t írja le
ERS2 = (kaers2 + kaers2'*STRESS + kaers2"*ERS1)*ERS2T/(kaers2 +
kaers2'*STRESS + kaers2"*ERS1 + kiers2)

# ERS az ERS1 és ERS2 összesített hatását írja le ER stressz során
ERS = k1*ERS1 + k2*ERS2

# Az Auta a stresszválasz mechanizmus autofágia induktorainak aktív
formáját ábrázolja
Auta = Autt*GK(kaau + kaau'*ERS1 + kaau"*ERS2, kiau + kiau'*Apoa, Jau, Jau)

# 'Goldbeter-Koshand' függvény (GK)
GB(arg1, arg2, arg3, arg4) = arg2 - arg1 + arg2*arg3 + arg1*arg4
GK(arg1, arg2, arg3, arg4) =
2*arg1*arg4 / (GB(arg1, arg2, arg3, arg4) + sqrt(GB(arg1, arg2, arg3, arg4)^2 -
4*(arg2 - arg1)*arg1*arg4))

# paraméterek
p kaers1=1, kaers1'=0.01, kaers1"=1, kiers1=1, ERS1T=1
p kaers2=1, kaers2'=0.01, kaers2"=1, kiers2=1, ERS2T=1
p k1=1, k2=1
p Apot=1, Jap=0.01, kaap=0.01, kaap'=1, kaap"=1, kiap=0.01, kiap'=1
p Autt=1, Jau=0.01, kaau=0.01, kaau'=1, kaau"=1, kiau=0.01, kiau'=1

done

```

c) Az aktivitások időbeli ábrázolásának kódja az ER stressz függő élet és halál közötti döntés során:

```
# az ER stressz függő élet és halál közötti döntés szimulációjának
modellje XPP-AUT programmal

# kiindulási állapotok
ERS1=0, ERS2=0, Apoa=0, Auta=0

# differenciálegyenletek
# ERS1 az ER stressz szenzor1-et írja le
ERS1' = (kaers1 + kaers1'*STRESS + kaers1"*ERS2)*(ERS1T-ERS1) -
kiers1*ERS1

# ERS2 az ER stressz szenzor2-t írja le
ERS2' = (kaers2 + kaers2'*STRESS + kaers2"*ERS1)*(ERS2T-ERS2) -
kiers2*ERS2

# Az Apoa az ER stresszválasz mechanizmus apoptózis induktorainak aktív
formáját jelenti
Apoa' = (kaap + kaap'*ERS1 + kaap"*ERS2)*(Apot-Apoa)/(Jap + Apot-Apoa)
- (kiap + kiap'*Auta)*Apoa/(Jap + Apoa)

# Az Auta a stresszválasz mechanizmus autofágia induktorainak aktív
formáját ábrázolja
Auta' = (kaau + kaau'*ERS1 + kaau"*ERS2)*(Autt-Auta)/(Jau + Autt-Auta)
- (kiau + kiau'*Apoa)*Auta/(Jau + Auta)

# steady state-állapot függvényei
# ERS az ERS1 és ERS2 összesített hatását írja le ER stressz során
ERS = k1*ERS1 + k2*ERS2

# Auti az autofágia induktor inaktív formáját jelenti
Auti = Autt - Auta

# 'Goldbeter-Koshand' függvény (GK)
GB(arg1,arg2,arg3,arg4) = arg2-arg1+arg2*arg3+arg1*arg4
GK(arg1,arg2,arg3,arg4) =
2*arg1*arg4/(GB(arg1,arg2,arg3,arg4)+sqrt(GB(arg1,arg2,arg3,arg4)^2-
4*(arg2-arg1)*arg1*arg4))

# paraméterek
p stress=0
p kaers1=1, kaers1'=0.01, kaers1"*=1, kiers1=1, ERS1T=1
p kaers2=1, kaers2'=0.01, kaers2"*=1, kiers2=1, ERS2T=1
p k1=1, k2=1
p Apot=1, Jap=0.01, kaap=0.01, kaap'=1, kaap"*=1, kiap=0.01, kiap'=1
p Autt=1, Jau=0.01, kaau=0.01, kaau'=1, kaau"*=1, kiau=0.01, kiau'=1

done
```

- d) A számítógépes analízis paramétereinek beállítása, abban az esetben, amikor sem az ER stressz szenzorok, sem az autofágia és apoptózis induktorok között nincs megfigyelhető kapcsolat:

6. táblázat: A paraméter beállítások leírása, amikor a szimulációkban sem az ERSS1 és ERSS2, sem az autofágia és apoptózis induktorok között nincs kapcsolat

<i>elnevezés</i>	<i>paraméter funkciója</i>	<i>paraméter értéke</i>
kaers1	az ERS1 háttér aktivációja	0
kaers1'	az ERS1 ER stressz-függő aktivációja	0.3
kaers1''	az ERS1 ERS2-függő aktivációja	0
kiers1	az ERS1 háttér inaktivációja	7.5
ERS1T	ERS1 teljes mennyisége	2
kaers2	ERS2 háttér aktivációja	0
kaers2'	az ERS2 ER stressz-függő aktivációja	0.5
kaers2''	az ERS2 ERS1-függő aktivációja	0
kiers2	az ERS2 háttér inaktivációja	5
ERS2T	ERS2 teljes mennyisége	1
k1	az ERS1 hatása az ER stressz indukcióra	0.5
k2	az ERS2 hatása az ER stressz indukcióra	1
Apot	az apoptózis induktor teljes mennyisége	1
Jap	az apoptózis induktor Michaelis-állandója	0.01
kaap	Apoa háttér aktivációja	0
kaap'	az Apoa ERS1-függő aktivációja	5
kaap''	az Apoa ERS2-függő aktivációja	0.3
kiap	az Apoa háttér inaktivációja	2
kiap'	az Apoa Auta-függő inaktivációja	0
Autt	az autofágia induktor teljes mennyisége	1
Jau	az autofágia induktor Michaelis-állandója	0.1
kaau	az Auta háttér aktivációja	0.2
kaau'	az Auta ERS1-függő aktivációja	2
kaau''	az Auta ERS2-függő aktivációja	20
kiau	az Auta háttér inaktivációja	3
kiau'	az Auta Apoa-függő inaktivációja	0

7. táblázat: A különböző fenotípusok szimulációja, amikor sem az ERSS1 és ERSS2, sem az autofágia és apoptózis induktorok között nincs kapcsolat

a különböző fenotípusok szimulációja az adott paraméter(ek) értéke

alacsony szintű ER stressz	stress=5
magas szintű ER stressz	stress=50

- e) A számítógépes analízis paramétereinek beállítása, abban az esetben, amikor az ER stressz szenzorok között nincs megfigyelhető kapcsolat, de van egy negatív visszacsatolási hurok az autofágia és apoptózis induktorok közt:

8. táblázat: A paraméter beállítások leírása, amikor a szimulációkban az autofágia és apoptózis induktorok között van egy negatív visszacsatolás

<i>elnevezés</i>	<i>paraméter funkciója</i>	<i>értéke</i>
kaers1	ERS1 háttér aktivációja	0
kaers1'	az ERS1 ER stressz-függő aktivációja	0.3
kaers1''	az ERS1 ERS2-függő aktivációja	0
kiers1	az ERS1 háttér inaktivációja	7.5
ERS1T	ERS1 teljes mennyisége	2
kaers2	ERS2 háttér aktivációja	0
kaers2'	az ERS2 ER stressz-függő aktivációja	0.5
kaers2''	az ERS2 ERS1-függő aktivációja	0
kiers2	az ERS2 háttér inaktivációja	5
ERS2T	ERS2 teljes mennyisége	1
k1	az ERS1 hatása az ER stressz indukcióra	0.5
k2	az ERS2 hatása az ER stressz indukcióra	1
Apot	az apoptózis induktor teljes mennyisége	1
Jap	az apoptózis induktor Michaelis-állandója	0.01
kaap	Apoa háttér aktivációja	0
kaap'	az Apoa ERS1-függő aktivációja	7.5
kaap''	az Apoa ERS2-függő aktivációja	0.3
kiap	az Apoa háttér inaktivációja	2
kiap'	az Apoa Auta-függő inaktivációja	7.5

Autt	az autofágia induktor teljes mennyisége	1
Jau	az autofágia induktor Michaelis-állandója	0.1
kaau	az Auta háttér aktivációja	0.2
kaau'	az Auta ERS1-függő aktivációja	2
kaau''	az Auta ERS2-függő aktivációja	20
kiau	az Auta háttér inaktivációja	1
kiau'	az Auta Apoa-függő inaktivációja	30

9. táblázat: a különböző fenotípusok szimulációja, mikor a szimulációkban az autofágia és apoptózis induktorok között van egy negatív visszacsatolás

a különböző fenotípusok szimulációja az adott paraméter(ek) értéke

alacsony szintű ER stressz	stress=5
magas szintű ER stressz	stress=50

- f) A számítógépes analízis paramétereinek beállítása, abban az esetben, amikor az ER stressz szenzorok között egy pozitív visszacsatolási hurok, és az autofágia és apoptózis induktorok közt egy negatív visszacsatolási hurok van jelen:

10. táblázat: A paraméter beállítások leírása, amikor a szimulációkban az ERSS1 és ERSS2 között egy pozitív visszacsatolási hurok, és az autofágia és apoptózis induktorok között egy negatív visszacsatolás van jelen

<i>elnevezés</i>	<i>paraméter funkciója</i>	<i>értéke</i>
kaers1	ERS1 háttér aktivációja	0
kaers1'	az ERS1 ER stressz-függő aktivációja	0.3
kaers1''	az ERS1 ERS2-függő aktivációja	7.5
kiers1	az ERS1 háttér inaktivációja	7.5
ERS1T	ERS1 teljes mennyisége	2
kaers2	ERS2 háttér aktivációja	0
kaers2'	az ERS2 ER stressz-függő aktivációja	0.5
kaers2''	az ERS2 ERS1-függő aktivációja	5
kiers2	az ERS2 háttér inaktivációja	5
ERS2T	ERS2 teljes mennyisége	1
k1	az ERS1 hatása az ER stressz indukcióra	0.5

k2	az ERS2 hatása az ER stressz indukcióra	1
Apot	az apoptózis induktor teljes mennyisége	1
Jap	az apoptózis induktor Michaelis-állandója	0.01
kaap	Apoa háttér aktivációja	0
kaap'	az Apoa ERS1-függő aktivációja	7.5
kaap''	az Apoa ERS2-függő aktivációja	0.3
kiap	az Apoa háttér inaktivációja	2
kiap'	az Apoa Auta-függő inaktivációja	10
Autt	az autofágia induktor teljes mennyisége	1
Jau	az autofágia induktor Michaelis-állandója	0.1
kaau	az Auta háttér aktivációja	0.2
kaau'	az Auta ERS1-függő aktivációja	2
kaau''	az Auta ERS2-függő aktivációja	20
kiau	az Auta háttér inaktivációja	1
kiau'	az Auta Apoa-függő inaktivációja	30

11. táblázat: A különböző fenotípusok szimulációja, amikor az ERSS1 és ERSS2 között egy pozitív visszacsatolási hurok, és az autofágia és apoptózis induktorok között egy negatív visszacsatolás van jelen

<i>a különböző fenotípusok szimulációja</i>	<i>az adott paraméter(ek) értéke</i>
alacsony szintű ER stressz	stress=5
magas szintű ER stressz	stress=50
CHOP hiány + magas szintű ER stressz	ERS1T=0.2, stress=50
CHOP hiperaktiváció + magas szintű ER stressz	ERS1T=4, stress=50
CHOP hiány + alacsony szintű ER stressz	ERS1T=0.2, stress=5
CHOP hiperaktiváció + alacsony szintű ER stressz	ERS1T=4, stress=5
Gadd34 hiány + magas szintű ER stressz	ERS2T=0.05, stress=50
Gadd34 hiperaktiváció + magas szintű ER stressz	ERS2T=2, stress=50
Gadd34 hiány + alacsony szintű ER stressz	ERS2T=0.05, stress=5
Gadd34 hiperaktiváció + alacsony szintű ER stressz	ERS2T=2, stress=5
Gadd34 hiperaktiváció + CHOP hiány + magas szintű ER stressz	ERS1T=0.2, ERS2T=2, stress=50