

Az endoplazmás retikulum stressz válasz UPR-PERK ágának rendszerszintű vizsgálata

Doktori tézisek

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. Vásárhelyi Barna, D.Sc., egyetemi tanár

Tagok: Dr. Cserző Miklós, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Dr. Jemnitz Katalin, Ph.D., tudományos munkatárs

Budapest
2021

1. BEVEZETÉS

A fehérjék az endoplazmás retikulumban (ER-ben) érik el a működésükhöz szükséges hajtogatottságukat és konformációjukat, emiatt ez az organelum az egyik fő szabályozója a celluláris proteosztázisnak. A túlzottan megnőtt fehérjeszekréció vagy az ER fehérje folding hibái az ER lumenjében nem-, vagy hibásan feltekeredett fehérjék felhalmozódásához vezetnek, amelyet ER stressznek nevezünk. ER stressz során a sejtes homeosztázis helyreállításának egyik legfontosabb mechanizmusa az önemésztő autofágia. Az eukarióta sejt az autofágiával a fehérjék és az abnormális fehérje aggregátumok, továbbá a felesleges vagy sérült organelumok bekebelezésével azok eltávolítását és újrafelhasználását hajtja végre. Ezzel az autofágia eltávolítja a celluláris stressz faktorokat, elősegíti a sejtek stresszhez való alkalmazkodását, és növeli azok életképességét. A túlzott mértékű ER stressz azonban képes aktiválni a programozott sejthalál-folyamatot, az apoptózist. Az apoptózis enzimek által szabályozva távolítja el azokat a sejteket, amelyek veszélyt jelenthetnek a számára. Az ER stressz indukálása kiválthat tehát autofágiát és apoptózist is. Az autofágia már enyhe, alacsony-szintű ER stressz során is aktiválódik, hogy helyreállítsa a sejt homeosztázisát. Ezzel szemben az apoptózis a túlzott, már nem-tolerálható mértékű ER stressz esetén, irreverzibilis módon aktiválódik.

Az ER stressz serkenti az UPR (Unfolded Protein Response), másnéven „sejlt fehérje válasz” jelátviteli útvonal-hálózat működését. Az UPR feladata többek között az, hogy biztosítsa a fehérje folding pontosságát, fenntartsa az ER funkciókat, szembe szálljon az ER stressz káros hatásaival. Emellett az UPR képes az önemésztő autofágia indukálásával helyreállítani az ER homeosztázisát, vagy ha ez nem lehetséges, aktiválni az apoptotikus sejthalált. Az UPR-t három ER-ben elhelyezkedő transzmembrán fehérje irányítja, az IRE1 (inositol-requiring enzyme 1), a PERK (Protein Kinase R-like ER kinase), és az ATF6 (Activating transcription factor 6). Normál, stresszmentes körülmények között ezeket az ER stressz szenzorokat inaktív állapotban tartja a hozzájuk kapcsolódó ER chaperon fehérje, a BiP (binding immunoglobulin protein), amely stressz során felszabadulva a kötésből képessé teszi azokat az aktiválódásra. Az IRE1 és az ATF6 útvonala leginkább az UPR célgének transzkripcióját segíti elő, míg a PERK-ág működése emellett a fehérje transzláció általános gátlásához is vezet. Kutatásaink az IRE1 és a PERK útvonalra fókuszáltak.

Az ER stressz során aktiválódó IRE1 RNáz aktivitásával nem-konvencionális splicing-ot végez az XBP1 (X-box binding protein) mRNS-ében. Az így létrejött aktív XBP1s számos gén

transzkripcióját irányítva enyhíti az ER stresszt és megőrzi a sejt homeosztázisát. Az XBP1s autofágiát indukál az anti-apoptotikus, és emellett autofágiát serkentő Beclin-1 expressziójának szabályozásával. Ezen felül, az XBP1s-nek hatása lehet az sejthalálra is: egy tanulmányban az XBP1s tartós overexpressziója már apoptózishoz vezetett. Az IRE1 útvonal másik fontos szubsztátja a JNK kináz (c-Jun N terminal kinase), amelyet az aktív IRE1 a TRAF2-vel és ASK1-gyel közösen képes aktiválni. A JNK pro-apoptotikus gének (például BID, BIM) serkentésével és anti-apoptotikus gének (például BCL-2, BCL-XL, MCL-1) gátlásával főként a késői ER stressz válasz apoptózist aktiváló tagjaként ismert. Emellett a JNK, autofágiás gének expressziójának serkentésével (például ATF5, ATG7, LC3 és Beclin-1), illetve a BCL-2 foszforilálás által a Beclin-1 felszabadításával képes az autofágia aktiválására is.

Az UPR másik ága, a PERK aktív formája foszforilálja a translációs iniciációs faktor eIF2 α -t. A foszforilált eIF2 α csökkenti a globális fehérjeszintézist, limitálva az újonnan szintetizálandó fehérjék ER-be való belépését. A foszforilált eIF2 α emellett lehetővé teszi az olyan specifikus mRNS-ek szelektív translációját, amilyen az ATF4 transzkripció faktor mRNS-e is. Az ATF4 a célgénjei expressziójának szabályozásával irányítja a sejt élet és halál közötti döntését stressz során. Az ATF4 többek között transzkripciósan serkenti a CHOP és GADD34 fehérjék génjeit is. A CHOP egyik legfontosabb funkciója, hogy transzkripció faktoroként serkenti az apoptotikus jelátvitelt. Emellett szerepet játszik aminosav éhezés, ER stressz, vírusfertőzés, és hipoxia által indukált autofágiában is. A CHOP önállóan, és az ATF4-gyel heterodimerizálódva is képes különböző autofágiás gének transzkripció serkentésére. Egy tanulmányban rövid ideig tartó leucin éhezés hatására a CHOP az autofágiás géneket promóterükhöz kötődve serkenti, magas stressz esetén azonban működése átkapcsol: limitálja az autofágiás gének aktivitását, miközben az apoptózist serkenti. A CHOP tehát molekuláris kapcsolóként is funkcionálhat az autofágia és az apoptózis között. Az ATF4 mellett a CHOP is serkenti promóterén keresztül a GADD34-et, amely egy negatív visszacsatolásban az eIF2 α defoszforilálásával helyreállítja a translációt. ER stressz és éhezés esetén a GADD34 az mTOR gátlásával serkenti az autofágiát, emellett a GADD34 apoptózis-indukáló hatását is kimutatták.

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 az apoptózis folyamataira.

Bizonyos tanulmányok szerint az IRE1 és a PERK útvonal működése nem teljesen független egymástól. Tartós ER stressz során, az IRE1 gátlása esetén, a PERK útvonal célgénjei (ATF4, CHOP) csökkent aktivitást mutattak. Ez alapján az IRE1 serkenti a PERK útvonal apoptózis induktorát, a CHOP-ot. Egy másik tanulmányban az IRE1 ág gátlásával drasztikusan csökkent a sejtek életképessége, és indukálódott az apoptózis, tehát az IRE1-ről feltételezhető, hogy erősebb hatással lehet a sejtek túlélésére és az autofágiára. Ezt megerősíti az is, hogy az aktív IRE1 humán sejtvonalakban citoprotektív volt, továbbá a szelektív, tartósan aktív IRE1 nem váltott ki sejthalált. Ezzel szemben a PERK jelátvittele krónikus ER stressz esetén sejthalálhoz vezetett. Ez arra enged következtetni, hogy az UPR hálózat az ágai közötti kapcsolatokkal finomhangolhatja a stresszre adott választ. Emellett képes lehet arra is, hogy egyik ágának gátlása esetén kompenzálja a kiesést, míg a másik útvonalán aktiválódhat. Véleményünk szerint az IRE1 és a PERK ág fontos szerepet tölt be ebben a folyamatban, így érdemesnek tartjuk jobban megvizsgálni a két útvonal aktivitását, elemeik megfigyelésével. Ezáltal a szerepüket, dinamikai működésüket és kapcsolatukat jobban megérthetjük.

A PERK útvonal az egyik legintenzívebben tanulmányozott UPR ág, több eleme is hatással van az ER stresszválaszra az autofágia és az apoptózis folyamatok indukációjával. Mivel az egyes elemek közötti kapcsolatok is befolyásolhatják a stresszre adott választ, érdemes megvizsgálni, hogy a PERK útvonalon belül milyen kapcsolatok lehetnek még jelen, amelyeknek ER stressz során jelentősége lehet. Korábbi publikációk szerint a GADD34 különféle gátlásai aminosav-éhezés, és ER stressz során is negatívan hatott a CHOP és az ATF4 fehérje és/vagy mRNS szintjére. Ez arra utal, hogy a GADD34 az eIF2 α defoszforilálás mellett ezekre is képes lehet valamilyen módon visszahatni a PERK útvonalon. Az ATF4 által aktiválódó CHOP is pozitívan hat a GADD34 jelátvitelére. CHOP-kiütött MEF sejtekben TM kezelés hatására sokkal gyengébben aktiválódott a GADD34, máshol pedig arról számolnak be, hogy az CHOP az ATF4-gyel közösen még hatékonyabb GADD34 serkentésre képes. 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, míg máshol CHOP-null hepatocitákban 24 órás tunicamycin kezelés alacsonyabb ATF4 aktivációt, és ennél hosszabb kezelés változatlan ATF4 fehérje aktiválódást okoz. A különféle eredmények miatt, érdemesnek tartjuk tisztázni a CHOP esetleges hatását az ATF4-re, illetve jobban megvizsgálni az ATF4, a CHOP és a GADD34 közötti kapcsolatokat.

2. CÉLKITŰZÉS

Munkánk során szeretnénk minőségi leírást adni arról a szabályozási hálózatról, amely a sejtek ER stressz hatására bekövetkező élet-és-halál közti döntését irányítja. 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 válaszát?
- 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

Kísérleteinkhez a rendszerbiológia megközelítését használtuk fel. Eszerint egyidejűleg alkalmaztuk az elméleti és a molekuláris biológiai technikákat a sejtes stresszválasz mechanizmus dinamikai működésének megértéséhez.

Modell rendszerként humán hepatocita karcinóma (HepG2), és humán embrionális vesetubulus (HEK293T) sejtvonalakat használtunk, amelyeket ER stresszorokkal (thapsigargin: TG, tunicamycin: TM, dithiothreitol: DTT) kezeltünk. A PERK és CHOP gének csökkentését az RNS interferencia elvén működő siRNS-ek transzfektálásával végeztük. A GADD34 gátlása a guanabenz inhibitorral történt.

A kezelések után a sejtek életképességét Cell Titer Blue reagens és Luna automata sejtszámláló segítségével vizsgáltuk. A Cell Titer Blue reagens szubsztrátját, a resazurint az élő sejtek resorufin-ná redukálják. A resazurin-resorufin átalakulás eltérő elnyelési maximumuk alapján spektrofotométerben abszorbanciát mérve detektálható.

Az általunk vizsgált fehérjék aktivitásainak változását western blot technikával figyeltük meg. A sejtekből RIPA pufferrel fehérjét izoláltunk, majd a fehérjéket méret szerint SDS-PAGE technikával elválasztottuk egymástól. Az elválasztott fehérjéket ezután a poliakrilamid gélről PVDF membránra transzferáltuk nedves transzfer segítségével. A membránt a blokkolást követően a jelölendő fehérjékre specifikus elsődleges antitestekkel egy éjszakán keresztül, majd az azokra specifikus másodlagos antitestekkel 1 órán át inkubáltuk. Az autofágia detektálásra az LC3-II formájának növekedését, az Ulk-555-P növekedését, illetve a p62 fehérje csökkenését követtük nyomon. Az apoptózis vizsgálatára a PARP hasadását és a prokaspáz-3 csökkenését figyeltük meg. Fehérje-szinten nyomon követtük még az IRE-1 útvonalon a JNK szubsztátját, a c-Jun foszforilálódását, a PERK útvonalon pedig a PERK, eIF2 α -P, ATF4, GADD34 és CHOP aktivitásokat. A minták közti egyelő fehérjemennyiség a GAPDH háztartási gén antitestjével volt leellenőrizve. A detektálás kemilumineszcens elven működő

reagens hozzáadásával, fényérzékeny filmen, sötét szobában történt. 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 (Ulk-555-T, eIF2 α -T, c-Jun-T) lettek normalizálva.

Az apoptózis aktiválódását a western blot mellett az Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 Assay fluoreszcens apoptózis próba segítségével is leellenőriztük. Az Apo-ONE® apoptózis próba Z-DEVD-R110 kaszpáz szubsztrátja 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 PERK, CHOP, ATF4, és GADD34 gének mennyiségi vizsgálatát valósídejű PCR-rel, míg az XBP1 gén aktivitásának megfigyelését hagyományos PCR módszerrel végeztük. Ehhez a kezelt sejtekből TRIzol-kloroform extrakcióval totál RNS-t izoláltunk, majd az mRNS-eket reverz transzkripcióval cDNS-sé írtuk át. A hagyományos PCR során az XBP1-et a Thermo Scientific™ (2X) PCR Master Mix és termoblokkos PCR készülék segítségével amplifikáltuk. Az XBP1 PCR termékek XBP1s és XBP1u formáit 3%-os agaróz gélen választottuk el, és UV fény használatával detektáltuk a Gel-Doc XR+ gél dokumentációs berendezés segítségével. A PERK, CHOP, ATF4, és GADD34 gének mennyiségi vizsgálatára elvégzett valósídejű PCR esetén housekeeping gén a GAPDH volt. A valósídejű PCR reakció és detektálása PowerUp SYBR Green Master Mix és QuantStudio 12K Flex System használatával történt.

Minden kísérletet három párhuzamos mérésben végeztünk el. A diagramokon ábrázolt eredmények is minimum három párhuzamos kísérlet átlagai, ahol a hibasáv az tapasztalati szórás (SD) mértéket jelöli. A szignifikanciát egytényezős variancia-analízissel (ANOVA) vizsgáltuk meg. Az eltérés $p < 0,05$, illetve $p < 0,01$ esetén volt statisztikailag szignifikáns.

Ahhoz, hogy jobban megvizsgáljuk a jelátviteli hálózat dinamikai viselkedését, számítógépes szimulációkkal elméleti analízist is végeztünk. A biológiai szabályozási hálózatok egy-egy komponensének változását a biokémiai reakciókinetikán alapuló közönséges differenciálegyenletekkel (ODE) írtuk le, melyek paraméterei a molekuláris biológiai kísérletek alapján lettek meghatározva. A nem-lineáris differenciálegyenletek megoldása megadja a relatív fehérjekoncentrációk/fehérjeaktivitások változását az időben, ezért ezek időbeli ábrázolásával az aktivitásváltozás görbét kaptuk meg. Az egyenletek megoldását az XPP-AUT szoftver segítségével oldottuk meg.

4. EREDMÉNYEK

Az autofágia és az apoptózis kapcsolata ER stressz során

Kísérleteink kiindulási pontjául szolgáló tanulmányunkban 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 különbözőképpen 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. 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.*

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. Megfigyeltük, hogy a két folyamat nem lehet egyszerre aktív: *egy dupla negatív visszacsatolási hurkot állapítottunk meg az autofágia és az apoptózis induktorok között* a stresszválasz hálózatban. Ez a dupla-negatív visszacsatolási hurok biztosítja azt, hogy az autofágia induktorok tranziens aktiválódását az apoptózis induktorok kapcsoló-szerű aktiválódása kövesse, amennyiben az ER stressz-szint eléri a 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. A következőkben ezeket a lehetséges extra szabályozási hurkokat tanulmányoztuk.

Az IRE1 és a PERK útvonal 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 útvonal hogyan veszik ki részüket a sejt élet-és-halál közti döntéséből. Modell

organizmusként áttértünk a HEK293T sejtvonagra, amelyben thapsigargin és tunicamycin stresszorokkal indukáltunk ER stresszt.

Más publikációkhoz hasonlóan, mi is megfigyeltük a sejtek életképességének növekedését, amikor az ER stresszt PERK csendesítéssel kombináltuk. Emellett a PERK siRNS-transzfektált sejtekben, magas szintű ER stressz esetén az autofágia tovább maradt aktív, és az apoptózis ennek megfelelően később aktiválódik. ***Tehát az autofágiás túlélés aktivitásának ideje meghosszabbodott a PERK útvonal hiányában.***

A nem csendesített sejtekben magas szintű ER stressz esetén megfigyelhető volt -az autofágia inaktiválódását követően- mind a PERK, mind az IRE1 útvonalak apoptózis induktorainak (CHOP, JNK) kapcsolószerű aktiválódása. Ez megerősíti az autofágia és az apoptózis közti, korábban is megfigyelt dupla-negatív visszacsatolási hurok jelenlétét. A PERK-csendesített sejtekben a PERK és az IRE1 útvonal apoptózis induktora (CHOP, JNK) is csupán egy tranziens aktivációt mutatott. Ez tanúsítja azt, hogy a stresszválasz mechanizmus nem, vagy csak jóval lassabb kinetikával kapcsolja be az apoptózist a PERK útvonal hiányakor, és ***a PERK hatással van az IRE1 útvonalra is. Az apoptózis induktorok tranziens aktiválódása azt sugallja, hogy a PERK esszenciális a programozott sejthalál szabályozásában tartósan magas ER stressz esetén.*** Kísérleteink alapján két kritériuma van annak, hogy az autofágiából apoptózisba való átkapcsolás megtörténjen: a stressz szintnek el kell érnie egy kritikus küszöbértéket, és a PERK útvonalnak aktívnak kell lennie.

Szerettük volna számítógépes szimulációkkal is megvizsgálni, hogy a PERK és az IRE1 milyen mértékben járul hozzá a sejt élet-és-halál közötti döntéséhez ER stressz során. Ezért modellünkbe beépítettük a PERK és az IRE1 ágakat képviselő ER stressz szenzorokat. Amellett, hogy a PERK és az IRE1 ágak is képesek serkenteni az autofágia és az apoptózis induktorokat, azt gondoljuk, hogy az induktorokra való hatásuk intenzitása különböző. Mivel az IRE1 ág gátlása gyorsítja az apoptózist, és csökkenti a sejtek életképességét, modellünkben sokkal intenzívebb IRE1-hatást feltételezünk az autofágia induktoron, mint az apoptózisén. A PERK csendesítés ER stresszel kombinálva késleltette az apoptózist, ezért a PERK hatása erősebbnek látszik az apoptózis induktorokon, mint az autofágia induktorokon. Egy tanulmányban az IRE1 pozitívan hat a PERK apoptózis induktorára, míg kísérleteink bizonyítják a PERK pozitív hatását az IRE1 útvonalon ER stressz során. Modellünkbe ezeket beépítve, egy pozitív visszacsatolási hurok jött létre a PERK és az IRE1 útvonalak között.

A szabályozási hálózatunk képes volt megmagyarázni a PERK, vagy az IRE1 ág hiánya esetén is az autofágia és az apoptózis közötti döntésben bekövetkezett módosulásokat. Eredményeink alapján az IRE1 és a PERK ág jelenléte is esszenciális az ER stresszválaszban. *A két ág közösen biztosítja az autofágia-függő túlélés megfelelő aktivitását, és tartós ER stressz esetén az apoptózisba való átkapcsolását is szabályozza.* Az apoptózis indukció visszafordíthatatlansága biztosítja azt, hogyha egyszer a sejt apoptózist indukál, az sose fordul vissza az azt megelőző autofágiás túlélés felé. Modellünk szerint az IRE1 vagy a PERK gátlása is okozhatja az apoptózis induktor reverzibilis indukcióját ER stressz során, ami fontos változást okoz a szabályozásban. A hálózat nem tudja többé garantálni az apoptózis egyirányúságát. Emiatt *egy pozitív visszacsatolási hurkot javasolunk az UPR ezen ágai között, ami esszenciális az apoptózis indukció visszafordíthatatlan működésének kialakításában.*

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

Az IRE1 és a PERK útvonal vizsgálatát követően felmerült a kérdés, hogy vajon jelen lehetnek-e az útvonalakon belül is még nem ismert pozitív visszacsatolási hurkok, robusztusabbá téve az irreverzibilis átkapcsolást ER stressz során. Ezért megvizsgáltuk, hogy az egyik legintenzívebben kutatott UPR ág, a PERK útvonal kulcselemei (ATF4, GADD34 és CHOP), dinamikai működésükkel hogyan alakítják ki az ER stresszre adott választ.

Korábban kimutatták, hogy a CHOP-nak pozitív hatása van a GADD34-re, és olyan eredmények is születtek, ahol a GADD34 gátlásának negatív hatása van a CHOP aktiválódásra celluláris stressz során. Az még azonban nem ismert, hogy a GADD34 direkt vagy indirekt módon segíti-e elő a CHOP jelátvitelét ER stressz esetén. Ennek vizsgálatára, a magas szintű ER stresszt kombináltuk a GADD34-nek vagy a CHOP-nak a gátlásával. Ezután mRNS és fehérje szinten is megfigyeltük az ATF4, a GADD34, és a CHOP aktivitásokat.

A GADD34-gátlás és a TG-kezelés kombinálása szignifikánsan csökkentette a CHOP-ot mind mRNS, mind fehérje szinten. Ez 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, amely arra utal, hogy *a GADD34 pozitívan hat a CHOP-ra, de indirekt módon teszi ezt, az ATF4-en keresztül.* 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

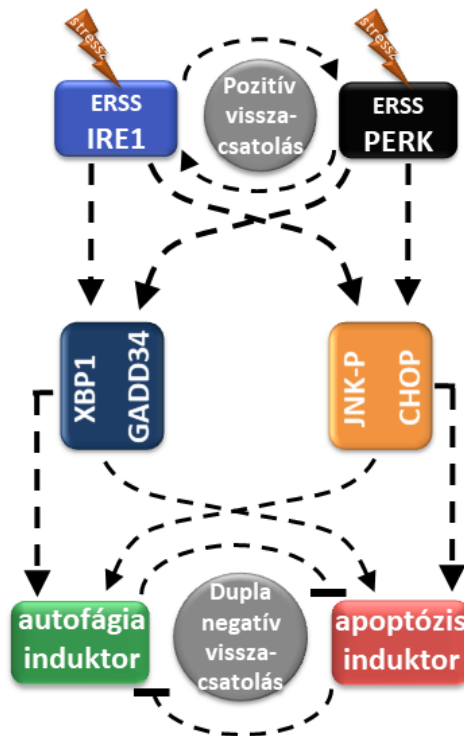
alacsonyabb volt, de ez a kezelési kombináció az ATF4 fehérje szintjét nem befolyásolta. Ha csak egy sima, indirekt pozitív visszacsatolási hurok lenne a GADD34 és a CHOP között az ATF4-en keresztül, az ATF4 mennyiségének is csökkennie kéne, hasonlóan a GADD34-gátláskor megfigyeltekhez. Az elméleti analízisünk szerint ez a fenotípus csak akkor megfigyelhető, amikor jelen vannak extra visszacsatolási hurkok is a rendszerben. Számítógépes szimulációval igazoltuk, hogy ez csak úgy történhet meg, ha a GADD34 ATF4-re való pozitív hatása mellett, a CHOP gátolja az ATF4-et. Ezzel **egy extra pozitív ($ATF4 \rightarrow GADD34 \rightarrow ATF4$) és egy extra negatív ($ATF4 \rightarrow CHOP \dashv ATF4$) visszacsatolási hurok jön létre a PERK útvonalban.** A CHOP-gátlás esetén megfigyelt alacsonyabb GADD34 szint a $CHOP \rightarrow GADD34$ kapcsolat hiányával magyarázható. Bár az ATF4 felszabadul a CHOP-függő gátlás alól, a GADD34 kisebb mennyisége miatt nincs szignifikáns változás az ATF4 szintjében. Ezeket a kapcsolatokat a jövőben szükséges lenne 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. Egy korábbi, hasonló kapcsolati vizsgálat alapján szerintünk **az általunk megfigyelt negatív visszacsatolási hurok ($ATF4 \rightarrow CHOP \dashv ATF4$) esetén a CHOP gátló hatása érvényesülhet az ATF4 hiperaktiválódásának megelőzésében magas szintű ER stressz esetén.** 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 -, hogy van-e bármilyen direkt kapcsolat a GADD34-ATF4 vagy CHOP-GADD34 között. A kísérletek még további vizsgálatot igényelnek, de egyelőre nem találtunk direkt kapcsolatot a fent említett molekulák között. **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 az irodalom alapján lehet kapcsolatuk az ATF4-gyel és/vagy CHOP-pal is.

További matematikai modellek a rendszer leírására

A sejt élet-és-halál közötti döntés dinamikai viselkedésének általános leírására, további számítógépes szimulációkkal vizsgáltuk az autofágia és az apoptózis induktorok közötti, és azokat szabályozó ER stressz szenzorok közti keresztkapcsolatok jelentőségét ER stressz során. A gerinceseket felépítő sejtek szabályozási hálózatai – a sejtfelepítésük komplexitása miatt – igénylik a robosztus karakterisztikákat. Emiatt az említett számos visszacsatolási hurkoknak jelen kell lenniük a különböző ER stressz szinteken. Korábban kimutattuk, hogy a fő 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. Irodalmi adatok 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.*** Érdekes módon, ***hasonló tulajdonságokat találtak az IRE1 útvonal kulcselemei, az XBP1 és a JNK-P között is.*** Bár az XBP1s főleg autofágia induktor, és a JNK-P döntően az apoptózis indukcióban fontos, mindketten képesek pozitívan szabályozni a másik stresszválasz mechanizmust is (1. ábra).

Az irodalomban talált 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. Ezek alapján szerintünk pozitív visszacsatolási hurok nemcsak az UPR ágai között lehet jelen, hanem azok megfigyelhetők az UPR ágakon belül is, az ER stressz szenzorok 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.*** 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. 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.



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

Az ER stressznek szerepe van számos humán megbetegedésben, mint például a neurodegeneratív betegségek, elhízás, diabétesz vagy autoimmun betegségek. Emiatt több szempontból is fontos orvosi jelentősége van az ER stressz-indukálta autofágia és apoptózis közötti döntés vizsgálatának. Az eredményeink alapján egy UPR ág megfelelő gátlása megváltoztatja a szabályozási hálózatot, például meghosszabbíthatja a túlélést, vagy felgyorsíthatja a sejthalál mechanizmusát. Ezeknek az információknak a későbbiekben fontos jelentősége lehet, bizonyos ER-stressz-függő betegségek orvosi kezeléseinek kidolgozásában is. Szükség lehet például olyan molekulákra, amelyek specifikusan gátolják vagy aktiválják az egyes UPR ágakat/elemeket, és ezzel terápiás hatást fejtenek ki különféle betegségekben. Az UPR ágak aktiválása egyedi patofiziológiai folyamatokat befolyásolhatnak, hathatnak sejt specifikus, vagy akár betegség specifikus módon is. Egy ilyen kutatás során, az elméleti biológiai vizsgálatokkal csökkenthetőek a kísérleti költségek. Ez segíthet az autofágiát és az apoptózist szabályozó újabb gyógyszerhatóanyagok felfedezésében is, amikkel javítható lehetne az ER stresszel kapcsolatos betegségekben szenvedő emberek életszínvonala és élettartama.

5. 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. Ez alapján 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 alapján az IRE1 pozitívan hat a PERK jelátvitelére, míg kísérleteink alapján 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 $ATF4 \rightarrow CHOP \rightarrow ATF4$ „enyhe” negatív visszacsatolási hurok abban segít, hogy az ATF4 hiperaktiválódását meggátolja. A PERK útvonalon belüli pozitív és negatív visszacsatolási hurkoknak tehát nélkülözhetetlen 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.

6. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

A dolgozat témájához kapcsolódó publikációk jegyzéke:

Holczer M¹, **Márton M**¹, 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)