

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Borbényi-Galambos Klaudia

**A transzszulfurációs utak szerepe melanóma BRAF V600E
inhibitor terápiára kialakuló rezisztenciában**

DEBRECENI EGYETEM

LAKI KÁLMÁN DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2025

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**A transzszulfurációs utak szerepe melanóma BRAF V600E
inhibitor terápiára kialakuló rezisztenciában**

Borbényi-Galambos Klaudia

Témavezető: Prof. Dr. Nagy Péter



DEBRECENI EGYETEM

LAKI KÁLMÁN DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2025

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések.....	4
2. Bevezetés.....	7
3. Irodalmi áttekintés.....	8
3.1. Jelátviteli változások a rezisztencia kialakulása során.....	8
3.2. Anyagcsere-változások a rezisztencia kialakulása során.....	9
3.3. Az oxidatív stressz elleni védekezés jelentősége.....	11
3.4. A cisztein aminosav és a transzszulfurációs út.....	12
3.4.1. A cisztein felvétele és intracelluláris hasznosítása.....	12
3.4.2. A transzszulfurációs út működése.....	14
3.5. A hidrogén szulfid és a perszulfidáció szerepei az orvosi biológiában.....	15
3.5.1. A hidrogén-szulfid szerepe.....	15
3.5.2. A kis molekulatömegű perszulfidok szerepe.....	15
3.5.3. A fehérje perszulfidáció szerepe.....	16
3.6. A transzszulfurációs út gátlása.....	17
4. Célkitűzések.....	19
5. Anyagok és módszerek.....	20
5.1. Anyagok.....	20
5.2. Műszerek.....	20
5.3. Szoftverek.....	20
5.4. Módszerek.....	20
5.4.1. Sejtvonalak tenyésztése.....	20
5.4.2. Sejttúlélés és proliferáció.....	21
5.4.3. Western blot.....	21
5.4.4. RNS izolálás és kvantitatív polimeráz láncreakció (qPCR).....	22
5.4.5. Géncsendesítés lentivírus használatával.....	24
5.4.6. Génkiütés CRISPR/Cas9 rendszer használatával.....	24
5.4.7. Fehérje túltermelés Sleeping beauty transzpozon rendszer használatával.....	25
5.4.8. A cisztin megvonása.....	26
5.4.9. A sejtanyagcsere vizsgálata Seahorse sejtanalizátorral.....	26
5.4.10. Az <i>in vivo</i> modellek felállítása.....	26
5.4.11. A tumorok érzettségének vizsgálata.....	27
5.4.12. A betegminták immunhisztokémiás vizsgálata.....	28
5.4.13. A szulfán kén vizsgálata élősejtes mikroszkópiával.....	28
5.4.14. Az anyagcserefluxus vizsgálata stabil izotópos jelöléssel.....	29
5.4.15. Az aminosavak mérése.....	29

5.4.16.	A kis molekulatömegű kéntartalmú metabolitok mérése (LMW módszer).....	29
5.4.17.	A taurin és a hipotaurin mérése.....	32
5.4.18.	A tiolok mérése mono-bromo-bimán (MBB) alkilezőszer használatával.....	32
5.4.19.	A fehérje perszulfidáció mérése tömegspektrométer segítségével.....	33
5.4.20.	A fehérje perszulfidáció gél alapú vizsgálata.....	33
5.4.21.	A fehérje perszulfidáció vizsgálata proteomikai megközelítéssel.....	34
5.4.22.	Statisztikai módszerek.....	35
6.	Eredmények.....	36
6.1.	Az <i>in vitro</i> modell felállítása és karakterizálása.....	36
6.2.	Változások a sejtek redox rendszereiben a MAPK gátlás következtében.....	37
6.2.1.	Oxidatív stressz a MAPK gátlás hatására.....	37
6.2.2.	Enzimszintváltozások az antioxidáns védelmi rendszerben.....	39
6.3.	Anyagcsere-változások a melanómasejtekben DT kezelés hatására.....	41
6.3.1.	A DT kezelés hatása a melanómasejtek energiatermelésére.....	41
6.3.2.	A glutamin-anyagcsereben bekövetkezett változások.....	41
6.4.	A cisztein-anyagcsere átprogramozása.....	44
6.4.1.	A megemelkedett cisztinszükséglet.....	44
6.4.2.	A kéntartalmú metabolitok termelése.....	47
6.4.3.	A cisztein lebontó útvonal.....	50
6.5.	A transzszulfurációs út működésének mechanisztikus vizsgálata.....	51
6.5.1.	A kéntartalmú metabolitok egyensúlyi szintjének vizsgálata.....	51
6.5.2.	A transzszulfurációs út vizsgálata jelölt metioninnal.....	52
6.5.3.	A transzszulfurációs út vizsgálata jelölt cisztin-izotóppal.....	55
6.5.4.	A kis molekulatömegű cisztein-perszulfid termelése.....	57
6.6.	A fehérje perszulfidáció védő szerepe.....	59
6.7.	A MAPK útvonal gátlásának vizsgálata más modellrendszerekben.....	61
6.7.1.	A vemurafenib kezelés hatásának vizsgálata A375 sejtvonalban.....	61
6.7.2.	A DT kezelés hatásának vizsgálata az SK-MEL-28 sejtvonalban.....	62
6.7.3.	A DT kezelés hatásának vizsgálata <i>in vivo</i>	64
6.8.	A szulfid lebontó útvonal vizsgálata <i>in vitro</i>	67
6.9.	A perszulfidok szerepének vizsgálata ETHE1 géncsendesítés által.....	70
6.10.	A CSE szintjének vizsgálata betegmintákban.....	73
6.11.	A CSE szerepének vizsgálata a perziszter sejtek túlélésében <i>in vitro</i>	75
6.12.	A CSE gátlás célzott terápiával együttesen történő alkalmazása.....	77
6.12.1.	A CSE és MAPK gátlás hatásának vizsgálata <i>in vitro</i>	77
6.12.2.	A CSE gátlás hatásának vizsgálata terápia-naiv melanómában.....	80
6.12.3.	A CSE és a MAPK útvonal együttes gátlása <i>in vivo</i>	81

6.13. Egyéni hozzájárulás a dolgozatban bemutatott eredményekhez	84
7. Megbeszélés	85
8. Új Kísérleti eredmények tézispontokban összefoglalva.....	98
9. Összefoglalás.....	100
10. Summary	101
11. Irodalomjegyzék.....	102
12. Tárgyszavak	116
13. Köszönetnyilvánítás	117
14. Függelék.....	119

1. Rövidítések

A375-X	A375 sejtvonal eredetű xenograft
ABCG2	ATP-kötő kazetta G2 (<i>ATP-binding cassette G2</i>)
Akt	Protein kináz B
Asn	aszparagin
Asp	aszpartát
BCA	bicinkoninsav (<i>bicinchoninic acid</i>)
B-Raf	B-raf szerin/treonin-kináz
CARS2	ciszteinil-tRNS-szintetáz 2
CBS	cisztationin-béta-szintáz
CDO	cisztein-dioxigenáz
CHAPS	3-[(3-kolamido-propil)-dimetil-ammonio]1-propánszulfonát
CSA	cisztein-szulfinsav
CSAD	cisztein-szulfinsav-dekarboxiláz
CSE	cisztationin-gamma-liáz
oeCSE	cisztationin-gamma-liázt túltermelő (<i>overexpressing CSE</i>)
CTAB	cetil-trimetil-ammonium-bromid
Cth	cisztationin
CYP	citokróm P450
Cys	cisztein
Cys-SSH	cisztein-perszulfid
CySSCy	cisztin
DLST	dihidrolipoamid-szukcinil-transzferáz
DT	dabrafenib-trametinib
DTR	dabrafenib-trametinibre rezisztens
ECAR	extracelluláris savanyítási ráta (<i>extracellular acidification rate</i>)
ERK1/2	extracelluláris szignál-regulált kináz 1/2
ETHE1	perszulfid dioxigenáz (<i>ethylmalonic encephalopathy 1 protein</i>)
FAD	flavin-adenin-dinukleotid
G6PD	glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz
GAPDH	gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz
GCLC	glutamát-cisztein ligáz katalitikus egysége
γGluCys	gamma-glutamil-cisztein

Gln	glutamin
GLS	glutamináz
Glu	glutamát
GLUL	glutamin-szintetáz
GOT	aszpartát-aminotranszferáz
GPX	glutation-peroxidáz
GS	glutation-szintetáz
GSH	glutation
GSSG	oxidált glutation
GSSH	glutation-perszulfid
HBSS	Hank-féle pufferelt sóoldat
HCys	homocisztein
HEPES	4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazin-propánszulfonsav
HIF-1-alfa	hypoxia indukáló faktor 1-alfa
Hlant	homolantionin
HMW	nagy molekulatömegű (<i>high molecular weight</i>)
HPE-IAM	β -(4-hidroxifenil)-etil-jódecetamid
IAB	jódacetyl-PEG2-biotin
Lant	lantionin
LMW	kis molekulatömegű (<i>low molecular weight</i>)
MAPK	mitogén-aktivált protein kináz
MEK1/2	mitogén-aktivált protein kináz kináz 1/2 (más néven MAPK2K 1/2)
Met	metionin
MPST	merkaptopiruvát-szulfur-transzferáz
NAD	nikotinamid-adenin-dinukleotid
NADP	redukált nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát
Nrf2	<i>nuclear factor erythroid 2-related factor 2</i>
OCR	oxigénfogyasztás rátája (<i>oxygen consumption rate</i>)
OGDH	2-oxoglutarát-dehidrogenáz
PAG	D,L-propargil-glicin
PAR	poli-ADP-ribóz
PDH	piruvát-dehidrogenáz
PDTX	humán tumor-alapú xenograft (<i>patient-derived tumor xenograft</i>)

PFKFB	6-foszfofrukto-2-kináz /fruktóz-2, 6-biszfoszfátáz
PGC1-a	proliferátor-aktivált receptor gamma koaktivátor-1 alfa
PLP	piridoxál-5-foszfát
ProPerDP	<i>Protein Persulfide Detection Protocol</i>
Prx2	peroxiredoxin 2
Pyr	piruvát
Ras	Ras GTPáz
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation assay</i>
ROS	reaktív oxigén származékok
SDHA	szukcinát-dehidrogenáz A
Ser	szerin
sgCSE	CSE-hiányos (<i>single guide CSE</i>)
sgCtrl	CRISPR kontroll (<i>single guide control</i>)
SSP4	szulfán kén mérőszonda 4 (<i>Sulfane Sulfur Probe 4</i>)
SUOX	szulfít-oxidáz
SOD	szuperoxid-diszmutáz
SQOR	szulfid-kinon-oxidoreduktáz
TBST	<i>Tris-buffered saline with Tween20</i>
TRP14	tioredoxin domént tartalmazó 14 kD-os fehérje
Trx	tioredoxin
TrxR1	tioredoxin-reduktáz 1
TST	tioszulfát-szulfur-transzferáz
x _c ⁻	cisztin-glutamát antiporter
V	vemurafenib
VR	vemurafenibre rezisztens

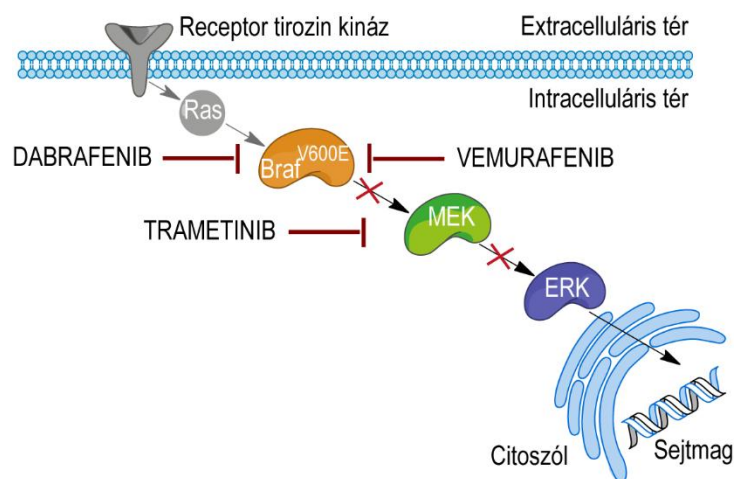
2. Bevezetés

A bőrmelanóma mai napig az egyik legagresszívabb daganattípus, mely egyre több embert, köztük a fiatalokat is érinti ¹. Bár a korai diagnózis lehetővé teszi a sebészi úton történő gyógyítást, a gyors daganatprogresszió és a távoli áttétek megjelenése jelentős mértékben rontja a túlélési esélyeket. A leggyakoribb onkogén mutációk a *BRAF*, *NRAS* és *NF1* génekben jelentkeznek ². A bőrmelanómában szenvedő betegek mintegy 50%-a hordozza a B-Raf szerin/treonin-kináz (B-Raf) V600 aktiváló mutációját, mely legnagyobb arányban V600E, illetve V600K mutáció, tehát a valin aminosav cseréje glutamátra vagy lizinre. A *BRAF* V600 aktiváló mutációk a mitogén-aktivált protein kináz (MAPK) útvonal fokozott aktivitásához, és ezáltal kontrollálatlan sejtosztódáshoz vezetnek. Mintegy 15 évvel ezelőtt került forgalomba Zelboraf márkanev alatt a vemurafenib nevű kis molekulatömegű inhibitor, mely specifikusan gátolja a mutáns B-Raf fehérjét, és ezáltal megakadályozza a *BRAF* V600 mutációt hordozó melanómasejtek burjánzását. Bár a rendkívül hatékony terápiás válasznak köszönhetően a vemurafenib terápia óriási sikert aratott, sajnos a szerzett rezisztencia néhány hónap leforgása alatt jelentkezik a legtöbb beteg esetén. Korábbi kutatások azt mutatták, hogy a vemurafenibbel kezelt melanómasejtekben a rezisztencia kialakulása során a MAPK jelátviteli útvonal következő komponense, a mitogén-aktivált protein kináz kináz (MAPK2K1/2, vagy más néven MEK1/2) veszi át a szerepet. Ezt követően új terápiás megközelítés került bevezetésre: a vemurafenib monoterápia helyett kombinált terápiát kezdtek el alkalmazni, tehát a B-Raf inhibitor mellé MEK1/2 gátlószert is adtak ³⁻⁵. Ezt követően új fejlesztések indultak mind B-Raf, mind MEK1/2 gátlószerek tekintetében a lehető legjobb terápiás válasz és legoptimálisabb mellékhatásspektrum elérése érdekében. A jelenleg elérhető, széleskörben használt B-Raf V600 gátlószerek napjainkban a vemurafenib, a dabrafenib és az encorafenib, míg a MEK1/2 gátlószerek közül a cobimetinib, a trametinib és a binimetinib terjedtek el. Bár a vemurafenib-cobimetinib, a dabrafenib-trametinib és az encorafenib-binimetinib kombinált terápiák elterjedése lényegesen megnövelte a progressziómentes túlélést ⁶, a szerzett rezisztencia kialakulása legtöbb esetben elkerülhetetlen, a betegség kiújulásához vezet ⁷⁻⁹. Az utóbbi évek kutatásai során a rezisztencia kialakulásához szükséges metabolikus átrendeződések új támadási pontjait azonosították. Az ezen útvonalak és a lehetséges támadási pontok feltárása új potenciális irányokat nyithat a meglévő terápia által kiszolgáltatottá vált melanómasejtek célzott elpusztítására és a szerzett rezisztencia megakadályozására.

3. Irodalmi áttekintés

3.1. Jelátviteli változások a rezisztencia kialakulása során

A B-Raf V600E-t és a MEK1/2-t célzó kombinált terápia a MAPK jelátviteli útvonal gátlása révén (1. ábra) megakadályozza a melanómasejtek osztódását és programozott sejthalálhoz vezet⁵. A terápia alatt álló sejtpopulációban előfordulnak olyan sejtek, melyek ellenállnak a kezelésnek, nem pusztulnak el, de nem is osztódnak, hanem nyugvó állapotban vészeli át a kezelést. Jellemző rájuk továbbá, hogy fenotípusos változásaik átmenetiek és reverzibilisek, illetve nem genetikai mechanizmusokon alapulnak. Ezeket a sejteket perziszter sejteknek nevezzük¹⁰, melyek a kezelés folyamán végül a terápiás nyomás ellenére visszanyerhetik osztódási képességüket és rezisztens státuszba léphetnek¹¹. A kiújult daganatok általában sokkal nagyobb malignitást és széleskörű terápiás rezisztenciát mutatnak, melyek kiküszöbölése új megközelítéseket igényel.



1. ábra / A napjainkban széleskörben használt B-Raf V600E gátlószerek (a dabrafenib és a vemurafenib) és a MEK1/2 gátlószerek (a trametinib) hatása a MAPK-ERK útvonal működésére. Az ábrán az általunk vizsgált inhibitorok kerültek feltüntetésre.

Az elmúlt 10 év kutatásai azt mutatják, hogy a szerzett rezisztencia kialakulása során a melanómasejtek különböző jelátviteli utak fokozott működésével ellensúlyozzák a MAPK útvonal gátlását^{8,9,12,13}. Ez egyrészt létrejöhet a MAPK útvonal újra aktiválásán keresztül. Számos közlemény jelent meg, melyek arról számolnak be, hogy a melanómasejtek a különböző receptor tirozin kinázok fokozott expressziója által szerzik vissza osztódási képességüket. Ilyenek például az epidermális növekedési faktor receptor, a vérlemezke eredetű növekedési faktor receptor-béta vagy az AXL receptor tirozin kináz¹⁴⁻¹⁷. A MEK1 gén mutációja ritka

melanómában, bizonyos esetekben azonban ez is hozzájárulhat a rezisztencia kialakulásához¹⁸. Továbbá a mutáns *BRAF* gén amplifikációja, illetve a különböző splicing variánsok létrehozása is vezethetnek a szerzett rezisztencia kialakulásához, ugyanis ezek következtében megemelkedik az aktív MEK szintje, mely az útvonal egyéb komponenseinek aktiválásán keresztül járul hozzá a fokozott sejtosztódáshoz¹⁹⁻²¹. A MAP3K8 szerin-treonin kináz szintén fontos szerepet játszik a rezisztencia kialakulásában, ugyanis képes a MEK közvetlen aktivációjára, és ezáltal a jelátviteli úton *downstream* irányban elhelyezkedő jelátviteli komponensek aktiválására²².

A MAPK útvonaltól független jelátviteli változások közül a legkiemelkedőbbek a foszfatidil-inozitol-3-kináz / protein-kináz B (PI3K/Akt) és a Wnt5-alfa/béta-katenin útvonalak. A PI3K/Akt és a MAPK útvonal szoros kapcsolatban állnak egymással, ezért a mutációt hordozó B-Raf gátlása következtében az Akt működése fokozódik, és képes a MAPK útvonalban *downstream* elhelyezkedő extracelluláris szignál-regulált kináz (ERK) aktiválására, és ezáltal a sejtosztódás stimulálására^{23,24}. Emellett a Wnt5-alfa fehérje fokozott expressziója is hozzájárulhat a szerzett rezisztencia kialakulásához, szintén az Akt aktiválásán keresztül²⁵. A melanómasejtek tehát számos különböző jelátviteli változással képesek a MAPK útvonal gátlását ellensúlyozni, és a sejtosztódást elősegítő jelátviteli utakat aktiválni.

3.2. Anyagcsere-változások a rezisztencia kialakulása során

A jelátviteli utakban bekövetkezett változások mellett az utóbbi években egyre nagyobb hangsúlyt kap a daganatos sejtekben bekövetkezett anyagcsere-változások jelentősége a rezisztencia kialakulása szempontjából^{7,26}. A daganatos sejtekre általánosságban jellemző, hogy a bioszintetikus folyamatok támogatása és a környezeti tényezőkhöz való alkalmazkodás érdekében rendkívüli flexibilitással bírnak a sejtanyagcsere tekintetében²⁷⁻³⁰. A melanómasejtek az intenzív proliferációt az aerob glikolízis fokozott működésével biztosítják, melyben a *BRAF* V600 génmutációnak központi szerep jut³¹. A B-Raf fehérje ugyanis közvetlenül hat a hypoxia indukáló faktor 1-alfa (HIF-1-alfa) és Myc működésére. A Ras, a Myc és a HIF-1-alfa számos fehérje működését fokozzák, melyek a glikolízis aktivitásának növekedéséhez vezetnek, ilyenek például a glikolízishez szükséges glükóz felvételéért felelős transzporterek, illetve a glikolízis egyik fő enzime, a laktát-dehidrogenáz³¹. Tekintettel arra, hogy a B-Raf ilyen meghatározó szerepet tölt be a sejtanyagcsere szabályozásában, nem meglepő, hogy az útvonal gátlása szerteágazó anyagcsere-változásokat vált ki. A MAPK

útvonal gátlása következtében a melanómasejtekben a glikolízis mértéke lecsökken, és az anyagcserefluxus a mitokondriális sejtlégzés és oxidatív foszforiláció felé tolódik^{32,33}.

A mitokondriális légzés fokozott működése érdekében azonban a sejteknek elektron donorra, például redukált nikotinamid-adenin-dinukleotidra (NADH), flavin-adenin-dinukleotidra (FADH₂) és redukált koenzim Q-ra van szüksége, melyet elsősorban a citromsavciklus fokozott működésével tudnak támogatni. Ebben az esetben a glikolízis során termelt piruvátot nem a laktát-dehidrogenáz hasznosítja, hanem a citromsavciklus és a glikolízis közötti összeköttetést biztosító a piruvát-dehidrogenáz (PDH), mely a piruvátot acetyl-koenzim-A-vá alakítja. Az acetyl-koenzim-A a citromsavciklusba lép, és megkezdődik az elektrontranszportlánc működéséhez szükséges redukált elektronszállító molekulák előállítása. Emellett a citromsavciklus a sejtben egy bioszintetikus csomópontként funkcionál, ugyanis komponensei kiindulási vegyületekként szolgálnak aminosavak, zsírsavak, nukleotidok, illetve a porfirinváz előállításához. A citromsavciklust azonban nem csupán a piruvát, hanem a glutamát is tudja táplálni az alfa-ketoglutaráton keresztül²⁷⁻²⁹. A sejtek a glutamátot glutaminolízisen keresztül glutaminból állítják elő a glutamináz 1 és 2 (GLS1,2) enzimeken keresztül. A sejtek az adott igényüknek megfelelően a glutamátot glutaminná tudják alakítani a glutamin-szintetáz (GLUL) enzim segítségével. Korábbi megfigyelések alapján a B-Raf V600 gátlószerekre rezisztens melanómasejtekre jellemző a glutaminfüggőség, tehát ennek az aminosavnak különösen fontos szerep jut a melanómasejtek túlélése szempontjából³⁴.

A citoszól és a mitokondrium közötti NADH/NAD⁺ egyensúly fenntartásában az aszpartát és malát egymásba történő átalakulása játszik szerepet, mely a malát-aszpartát ingát működteti. Mivel a membrán átjárhatatlan a NADH számára, a citoszólban a glikolízis által termelt NADH mitokondriumba juttatását ez az inga működteti. Az inga működése során a citoszólban az aszpartát először oxálecetsavvá alakul, miközben az alfa-ketoglutarátból glutamát lesz, majd a keletkező oxálecetsav maláttá redukálódik, miközben a citoszólikus NADH NAD⁺-dá oxidálódik. A malát belép a mitokondriumba és az elektront leadja egy oxidált NAD⁺ molekulának, miközben oxálacetáttá oxidálódik. Ezt követően az oxálacetát aszpartáttá alakul, miközben a glutamát alfa-ketoglutaráttá, és a keletkezett aszpartát a citoszólba jut, és így a ciklus bezárul. Továbbá az aszparagin és az aszpartát oda-vissza tud egymásba alakulni glutamin-glutamát átalakulás mellett. Összegezve, a glutamin, glutamát, aszparagin és aszpartát anyagcseréje szorosan kötődik a citromsavciklus és a malát-aszpartát inga működéséhez, és ezáltal az elektrontranszportlánc működtetéséhez. Ezeket az aminosavakat relatíve flexibilisen tudják a sejtek egymásba alakítani az adott igényüknek megfelelően.

A fokozott mitokondriális működés meghatározó jelentőséggel bír melanómasejtekben a B-Raf és MEK1/2 inhibitorokkal szembeni szerzett rezisztencia kialakulása során, korábbi tanulmányok alapján a mitokondriális légzési lánc gátlása a rezisztens sejtek csökkent életképességéhez vezet ^{32,33}. A fokozott sejtlégzéshez azonban szükség van a redukált elektronszállító molekulákra, tehát a citromsavciklus fokozott működésére. Mivel utóbbi szoros összeköttetésben áll számos anyagcsere-útvonallal, a B-Raf és MEK1/2 gátlása közvetlenül és közvetve széleskörű anyagcsere-változásokhoz vezet. A B-Raf gátlása révén a glikolízis mértéke lecsökken, a fokozott sejtlégzés azonban a reaktív oxigén származékok (ROS) emelkedett szintjéhez vezet, mely egy megváltozott intracelluláris redox környezet kialakulását vonja maga után.

3.3. Az oxidatív stressz elleni védekezés jelentősége

A fokozott ROS termelés következtében kialakuló oxidatív stressz során a fehérjék és a sejt DNS állománya károsul, mely mutációk kialakulásához vezethet. Az oxidatív stressz következtében létrejövő DNS törések következtében a poli-ADP-ribóz-polimeráz aktiválódik, mely poli-ADP-ribózzal (PAR) látja el a célfehérjéket, ez a PAR-iláció. A PAR-iláció számos sejtfunciót befolyásol, és az oxidatív stressz okozta sejtkárosodás mértékétől függően sejthalált indukálhat. A daganatos sejtekre a normál sejtekhez képest általánosságban a ROS megemelkedett szintje jellemző, mely elsősorban a különböző onkogéneknek, a hipoxiás környezetnek, a mitokondriális elektrontranszportlánc abnormális működésének, illetve a kemo- vagy sugárterápiának köszönhető ^{35,36}. A célzott terápiával szembeni szerzett rezisztencia kialakulása szempontjából a melanómasejtekben elsősorban a fokozott mitokondriális légzés járulhat hozzá az emelkedett ROS szintekhez ^{32,33}. Az oxidatív stressz ellensúlyozásához a sejtek antioxidáns fehérjék és molekulák arzenáljával rendelkeznek, melyek biztosítják a ROS semlegesítését és ezáltal a redox homeosztázis fenntartását a megfelelő sejtműködés megőrzése érdekében. Tehát a daganatos sejtekre nem feltétlenül jellemző a ROS emelkedett egyensúlyi szintje, hanem valójában a termelés és lebontás fluxusa emelkedik. Így a daganatos sejtek kiszolgáltatottá válnak a további oxidatív stresszel szemben, mert az adaptív antioxidáns kapacitásukat elhasználják az alapesetben is fennálló magas oxidatív terhelés közömbösítésére ³⁷⁻⁴⁰.

Az antioxidáns védelmi rendszernek számos kompartment-specifikus komponense ismert, melyek a különböző reaktív származékok közömbösítésében vesznek részt. Ilyenek például a peroxid semlegesítésében szerepet játszó kataláz, a peroxiredoxinok (Prx-ek) vagy a glutation-

peroxidázok (GPX-ek). Az oxidatív stressz elleni védekezés meghatározó elemei a tioredoxin és a glutation (GSH) rendszerek. Az oxidálódott biomolekulák redukciójáért felelős tioredoxin fehérje és a GSH kismolekula a redukáló erőt a tioredoxin-reduktázon (TrxR) és a glutation-reduktázon (GR) keresztül a redukált nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfátból (NADPH) nyerik^{37,38,41-43}. A NADPH elsődleges forrása a glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz (G6PD) fehérje működése révén a pentóz-foszfát út, mely gyakorlatilag egy „elágazása” a glikolízisnek. A sejt a redox szükségleteinek megfelelően a glikolízis és a pentóz-foszfát út közötti fluxust a 6-foszfofrukto-2-kináz 3 és 4 (PFKFB 3 és 4) fehérjéken keresztül szabályozza. Míg a PFKFB3 a bioszintézist és sejtproliferációt elősegítő glikolízist, úgy a PFKFB4 az oxidatív ágensek közömbösítéséhez és a redox homeosztázis fenntartásához szükséges pentóz-foszfát út működését fokozza⁴⁴. Amikor a daganatos sejtet stresszhatás éri, a fokozott sejtosztódás helyett a túlélés válik meghatározóvá, így az oxidatív stressz mérséklése az elsődleges szempont²⁷. Ehhez azonban szükség van a redukáló erőt biztosító NADPH fokozott előállításához, és a glikolízis mérsékléséhez. Ezen utakat szabályozó fehérjék onkológiai jelentősége az utóbbi években egyre nagyobb hangsúlyt kap a szakirodalomban. Például a PFKFB4 hiánya prosztata daganat esetén a ROS túltermeléséhez és ezáltal a tumor pusztulásához vezetett⁴⁵. Emellett a bazális emlőkarcinóma esetén csoportunk megmutatta, hogy a CBS transzszulfurációs enzim csendesítése a *PFKFB4* gén fokozott expressziójához vezet, mely szintén emelkedett oxidatív stresszre utal⁴⁶.

3.4. A cisztein aminosav és a transzszulfurációs út

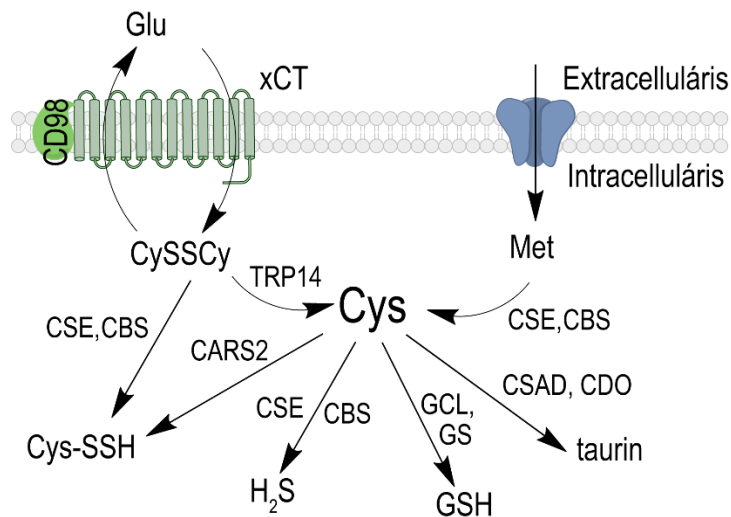
3.4.1. A cisztein felvétele és intracelluláris hasznosítása

A cisztein (Cys) aminosav kiindulási vegyületként szolgál a tiol-diszulfid homeosztázis fenntartásához szükséges redox enzimek, kofaktorok (például koenzim-A és vas-kén klaszterek) és kéntartalmú védőmolekulák, mint például a GSH, a hidrogén-szulfid (H₂S) és a perszulfidok előállításához⁴⁷. A Cys intracelluláris szintje szigorúan szabályozott a cisztein-dioxigenáz (CDO) által katalizált oxidatív lebontó útvonal által, melynek a végterméke a taurin (2. ábra)^{48,49}. A CDO expressziója rendkívül érzékeny az intracelluláris Cys szintre, egyes sejtekben a CDO szintje akár 45-szörösére tud emelkedni⁵⁰.

Mivel az extracelluláris térben a Cys elsősorban oxidált formában (cisztin, CySSCy) van jelen, a Cys felvétele is elsősorban CySSCy formájában történik, mégpedig az x_c⁻ cisztin-glutamát antiporter rendszer segítségével^{51,52} (2. ábra). A korábbi fejezetben említésre került a glutamát aminosav fontos szerepe a citromsavciklus táplálásában. Itt azonban fontos kiemelni, hogy a

sejtek a glutamátot az alfa-ketoglutarát szintézise mellett például a CySSCy felvételére, illetve Cys és glicin felhasználásával a GSH szintézisére egyaránt használják. A megemelkedett oxidatív terhelés következtében a daganatos sejteknek nagy szüksége van a Cys-re és a GSH-ra a redox homeosztázis fenntartása érdekében. A CySSCy megvonása, illetve az antiporter gátlása ugyanis egy vasfüggő sejthaláltípushoz, a ferroptózishoz vezet ⁵³. Az x_c^- antiporter alegysége az xCT/SLC7A11 számos daganattípusban túltermelődik, ezáltal alacsony túlélési rátához vezet, ezzel is jelezve a daganatok emelkedett ciszteinigényét ⁵⁴⁻⁵⁶. Az x_c^- gátlószerek daganatellenes szerként történő alkalmazása jelenleg egy fejlődő új irányzat az új terápiás szerek fejlesztése szempontjából ⁵⁴.

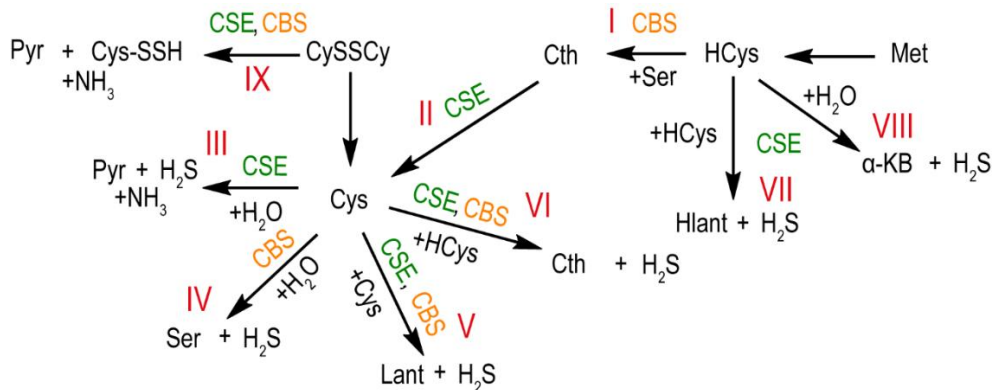
Felvételét követően a CySSCy az intracelluláris térben a tioredoxin rendszer segítségével redukálódik Cys-né, melyben a 14 kDa-os tioredoxin-szerű fehérje (TRP14, *thioredoxin-related protein 14*) fontos szerepet játszik ⁵⁷. Ezt követően a Cys-t számos útvonal hasznosítja a redox homeosztázis fenntartása érdekében (2. ábra).



2. ábra | A cisztein felvétele, előállítása és intracelluláris hasznosítási módjai. A ciszteint (Cys) a sejt cisztin (CySSCy) formájában veszi fel az CD98 és xCT alegységekből álló x_c^- antiporter segítségével glutamát (Glu) cseréje közben, majd a 14 kDa-os tioredoxin-szerű fehérjén (TRP14) keresztül a tioredoxin rendszer redukálja Cys-né. Emellett metioninból (Met) több lépésen keresztül a transzszulfurációs úton keresztül a cisztationin-béta-szintáz (CBS) és a cisztationin-gamma-liáz (CSE) fehérjék is elő tudják állítani. A ciszteint a sejt többek között hidrogén-szulfid (H₂S), glutation (GSH), taurin, illetve cisztein-perszulfid (Cys-SSH) szintézisére fordíthatja. Cisztein-perszulfid szintézise történhet a ciszteinből a ciszteinil-tRNS-szintetáz 2 (CARS2) fehérjén keresztül vagy közvetlenül cisztinból a CSE és CBS fehérjék által katalizált reakció során.

3.4.2. A transzszulfurációs út működése

Bár a Cys-t a sejt nagyrészt az extracelluláris térből veszi fel, nem tekinthető esszenciális aminosavnak, ugyanis limitált extracelluláris elérhetőség esetén a sejt elő tudja állítani szerinből és a metioninból származtatható homociszteinekből a transzszulfurációs úton keresztül. A transzszulfurációs út során két piridoxál-5-foszfát (PLP)-függő enzim a cisztationin-béta-szintáz (CBS) és a cisztationin-gamma-liáz (CSE) kanonikus működése a cisztationin (Cth) köztiterméken keresztül Cys előállításához vezet (3. ábra, I-es és II-es reakciók) ⁵⁸. Mindkét fehérje számos daganattípusban konstitutív expressziót mutat, mely jelzi, hogy a transzszulfurációs út aktivitása elengedhetetlen a tumornövekedéshez ^{46,59-62}. Ez összhangban áll azzal, hogy a tumorsejtek megemelkedett ciszteinigénnyel rendelkeznek, melyet a tumorközi tér limitált cisztinellátottsága miatt nem feltétlenül tudnak fedezni ⁶².



3. ábra / A transzszulfurációs enzimek által katalizált reakciók. A CSE és a CBS számos, bizonyos esetekben egymással átfedő funkcióval rendelkeznek. A kanonikus útvonal (I-II-es reakciók) során egymást követő reakciólépések vezetnek a cisztein (Cys) szintéziséhez. A cisztein előállításához tehát mindkét enzim együttes működésére szükség van. Átfedő funkcióik a H₂S (III-VIII-as reakciók) és a kis molekulatömegű cisztein-perszulfid (Cys-SSH) (IX-es reakció) termeléséhez vezetnek. Egyéb rövidítések: metionin (Met), szerin (Ser), piruvát (Pyr), homocisztein (HCys), cisztationin (Cth), lantionin (Lant), homolantionin (Hlant), alfa-ketobutirát (α-KB).

A kanonikus szerepükön kívül a CBS és a CSE fontos szerepet töltenek be a H₂S és a kis molekulatömegű cisztein-perszulfid (Cys-SSH) termelésében (3. ábra, III-IX. reakciók) ^{63,64}. Az említett reaktív kén származékok élettani szerepe egyre nagyobb figyelmet kap az orvosi biológiai és farmakológiai kutatásokban ^{65,66}. A CSE és/vagy a CBS megfelelő cisztinellátottság mellett a reaktív kén származékokat termelő funkciójukkal segítik a daganatos sejtek túlélését ⁶⁷.

3.5. A hidrogén szulfid és a perszulfidáció szerepei az orvosi biológiában

3.5.1 A hidrogén-szulfid szerepe

A H₂S onkológiai szerepe napjainkra széleskörűen tanulmányozott és referált ⁶⁷⁻⁷⁴. Korábban káros vegyületként tartották számon, az elmúlt húsz év kutatásai azonban rávilágítottak, hogy ez a gáz halmazállapotú jelátviteli molekula rendkívül fontos szerepet játszik a fiziológiás működés fenntartásában. Szerteágazó biológiai hatását a metallofehérjék hem csoportjával való reakcióján, a fehérjefunkció perszulfidáció általi szabályozásán, illetve a nitrogén monoxiddal történő kölcsönhatáson keresztül fejti ki ⁷⁵⁻⁷⁷. Tumorsejtek esetén a fehérjék H₂S által vezérelt perszulfidációja (tehát a tiol csoportok módosítása R-SH-ról R-SSH-ra) az egyes jelátviteli folyamatok működésének változásához vezet, mely tumortípusra jellemző módon sejtproliferációs, anyagcsere, sejthalál, illetve érképződési folyamatok változását vonja maga után ^{70,77-81}. A H₂S élettani szerepe tumortípustól, a betegség stádiumától és kontextustól függ. Melanómasejtek esetén H₂S kezelés következtében az Akt és az ERK útvonal csökkent működését tapasztalták, mely a sejtciklus elakadásához és ezáltal sejthalál útvonalak aktiválásához vezetett ^{72,82-86}.

3.5.2. A kis molekulatömegű perszulfidok szerepe

A perszulfidok (R-SSH) szoros biokémiai összeköttetésben állnak a H₂S-dal különböző reakción keresztül, melyek közül számos enzimkatalizált ⁸⁷, ezért gyakran nehéz pontosan definiálni, hogy az adott biológiai reakcióban melyikük a tapasztalt hatásért felelős molekula. A kémiai tulajdonságait tekintve a perszulfidok jobb nukleofilek mint a tiolok, továbbá a tiolokkal ellentétben elektrofilként is tudnak viselkedni, ezáltal széleskörben reagálnak más vegyületekkel ^{66,88,89}. A perszulfidok fiziológiás szerepe a sejtek oxidatív stresszel szembeni védelmében, a jelátviteli útvonalak szabályozásában és a sejtananyagcsere működésének regulálásában egyre szélesebb körben ismert ⁶⁶. Mindhárom folyamat a tumorbiológia és ezen belül a rezisztenciamechanizmusok szempontjából kulcsfontosságú.

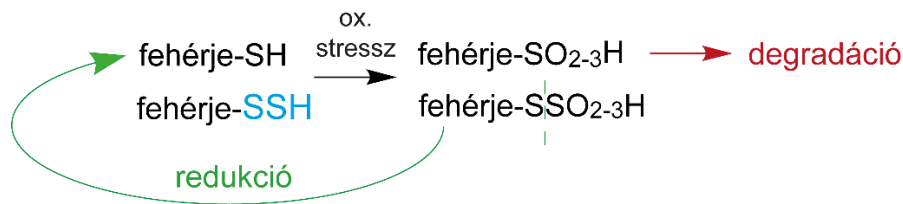
A kis molekulatömegű perszulfidok közül a legismertebbek a már említett Cys-SSH, illetve az intracelluláris környezetben magasabb koncentrációban jelenlévő glutation-perszulfid (GSSH) ^{66,90}. A kis molekulatömegű Cys-SSH keletkezhet Cys-ből a ciszteinil-tRNS-szintetáz 2 (CARS2) fehérjén keresztül ⁹¹ vagy közvetlenül CySSCy-ből a CSE és CBS fehérjék által katalizált reakció során ⁶³ (2. ábra). Intracelluláris körülmények között tehát a Cys és a CySSCy, illetve CBS esetén a homocisztein, CSE esetén pedig a cisztationin szubsztrátok „versengenek”

a két enzimért. Bár fiziológias körülmények között a Cys sokkal nagyobb koncentrációban van jelen, a CySSCy lényegesen jobb szubsztrátja a CSE-nek és a CBS-nek⁶³. Oxidatív terhelés esetén azonban az oxidált CySSCy szintje megemelkedhet, emelkedett CySSCy/Cys arány esetén pedig a Cys-SSH termelő funkció jelentősége elméletileg teret nyerhet⁹⁰.

A GSSH elsősorban a mitokondriumban H₂S-ból képződik a szulfid-kinon-oxidoreduktáz (SQOR) által, mely gyakorlatilag a szulfid lebontó útvonal első lépésének tekinthető. A szulfid lebontó útvonal fontos feladata, hogy a H₂S szintjét fiziológias tartományban tartsa, ugyanis magas koncentrációban a H₂S gátolja az elektrontranszportlánc IV-es komplexét, a citokrómc-oxidázt, így blokkolva a mitokondriális sejtlégzést⁹². Normál körülmények között azonban a H₂S az SQOR fehérjén keresztül elektronokat ad le az elektrontranszportláncnak, ezáltal fokozva a légzési lánc működését⁷⁹. A GSSH termelése azonban nem csupán a H₂S lebontása és a légzési lánc miatt fontos, hiszen fontos szerepet tölt be a redox homeosztázis fenntartásában a káros lipid szabadgyökök semlegesítésén keresztül is, ezáltal védve a sejteket a lipid peroxidáció által indukált sejthaláltól, a ferroptózistól^{93,94}.

3.5.3. A fehérje perszulfidáció szerepe

A fehérje perszulfidáció egy reverzibilis poszttranszlációs módosítása a fehérjék Cys oldalláncainak, mely a tioredoxin és a GSH rendszerek által redukálható a natív tiol formába. Bár a tudományterületen nincs egyetértés a fehérje perszulfidáció intracelluláris szabályozóival kapcsolatban, az elmúlt évek tanulmányai azt mutatják, hogy a CARS2⁹¹ és a merkaptopiruvát-szulfur-transzferáz (MPST)^{95,96} fehérjék kulcsszerepet játszanak a folyamatban. Közvetve, a H₂S és a Cys-SSH termelésén keresztül a CSE és a CBS is hozzájárulnak a fehérje perszulfidációhoz transzperszulfidációs folyamatokon keresztül. Transzperszulfidáció alatt egy reaktív perszulfid (R-SSH) és egy tiol (R'-SH) oldallánc enzim által nem katalizált szulfid csere reakcióját értjük, mely az eredetileg tiol oldalláncot tartalmazó vegyületen (R'-SH) perszulfid módosulatot eredményez (R'-SSH)⁶³. A perszulfidáció biológiai szerepe kettős, egyrészt dinamikusan képződő és lebomló poszttranszlációs módosulatról révén szabályozza a fehérjeműködést, ezáltal fontos szabályozószerepet tölt be jelátviteli útvonalak és anyagcsere-útvonalak működésében⁹⁷⁻¹⁰³. Másrészt a perszulfidáció megvédi a fehérjéket az oxidatív stressz okozta irreverzibilis oxidatív károsodástól, mely javarészt a fehérje funkcióvesztéséhez és lecseréléséhez vezet. Az oxidált perszulfidok (R-SSO₂₋₃H) ugyanis az SS-kötés mentén redukálhatóak a tioredoxin és a GSH rendszerek által, ezzel visszanyerve a natív tiol formát (4. ábra)^{98,103}.



4. **ábra** | *A fehérje perszulfidáció védő szerepe.* Oxidatív terhelés esetén a fehérje tiol oldalláncok oxidációja szulfín- és szulfonsav (-SO₂₋₃H) képződéséhez, ezáltal funkcióvesztéshez és degradációhoz vezet. A perszulfid származékok azonban az SS-kötés mentén (szaggatott vonal) redukálhatóak a natív tiol formává, ezáltal védő csoportként funkcionálnak.

3.6. A transzszulfurációs út gátlása

A transzszulfurációs útvonal két enzimjének a CBS-nek és a CSE-nek több kereskedelmi forgalomban is kapható gátlószere ismert. A jelenleg elérhető inhibitorokkal kapcsolatban azonban az a probléma, hogy sok esetben nem specifikusak kizárólag az egyik fehérjére, hanem egy bizonyos fokig mindkét fehérjét gátolják. A CBS gátlószereként legszélesebb körben az amino-oxi-ecetsavat (AOAA, *aminooxyacetic acid*) használják. Az AOAA azonban nem tekinthető szelektív CBS inhibitornak, ugyanis a CBS mellett a többi PLP-függő enzimet, köztük a CSE-t, illetve számos transzaminázt gátol, melyek fontos szerepet töltenek be a sejtek aminosav-anyagcseréjében ¹⁰⁴. Ezért bár az AOAA használata CBS inhibitor gyanánt nem szerencsés, egyelőre ez az elérhető legspecifikusabb inhibitor a CBS gátlására.

A CSE gátlására két széleskörben használt inhibitor elérhető a kereskedelmi forgalomban, az egyik a béta-ciano-alanin (BCA), a másik a D,L-propargil-glicin (PAG). A BCA reverzibilis CSE gátlószert, mely bár a PAG-hoz képest alacsonyabb IC₅₀-nel rendelkezik, 1 mM-os koncentrációban a CBS-t, az aszpartát-béta-dekarboxilázt és az alanin-amino-transzferázt is gátolja ¹⁰⁵. Ezzel szemben a PAG bár kisebb affinitással rendelkezik, sokkal szelektívebb, és a CSE-t irreverzibilisen gátolja ¹⁰⁵. Magas koncentrációban azonban a PAG is gátolja egyes transzaminázok működését, így a megfelelő koncentráció megválasztása ennél a gátlószernél is kritikus ¹⁰⁶.

Korábbi publikációkban széleskörben alkalmazták az említett inhibitorokat a H₂S termelésének gátlására különböző betegségek kontextusban, köztük daganatos megbetegedésekben ^{68,70,73,107}. Ahogy azt a korábbiakban ismertettük, a H₂S változatos fiziológiai szerepei révén a transzszulfurációs enzimek gátlása is betegségtípustól függően változatos. A legtöbb tumortípus esetén a CBS és/vagy a CSE gátlása génmódosítással, vagy gátlószerek

alkalmazásával a tumornövekedés gátlásához vezet. Ez részben a CBS és CSE kanonikus, tehát ciszteintermelő funkciójának ⁶⁰⁻⁶², részben pedig a reaktív kén származékokat termelő funkciójának tulajdonítható ^{70,71,108,109}. Ezzel összhangban a munkacsoportunk két különböző daganattípus esetén megmutatta a transzszulfurációs út fontos szerepét a tumornövekedés és az áttétképződés szempontjából. Ezek a tanulmányok arra mutattak rá, hogy transzszulfurációs út gátlása a reaktív kén származékok termelésének gátlása révén gátolja a tumornövekedést bazális emlőkarcinómában ⁴⁶, illetve az áttétképződést hasnyálmirigy duktális adenokarcinómában ⁵⁹.

Ezen tanulmányok mind arra mutatnak rá, hogy a CBS és a CSE nem csupán a Cys-t termelő funkciójuk révén, hanem a reaktív kén származékokat termelő szerepük által is rendkívüli jelentőséggel bírnak a különböző daganatos sejtek túlélése szempontjából.

4. Célkitűzések

- Irodalmi adatok alapján célul tűztük ki a B-Raf V600/MEK inhibitor terápiával szemben kialakuló szerzett rezisztencia hátterében álló anyagcsere-változások és a redox homeosztázis fenntartásában szerepet játszó fehérjék szerepének felderítését.
- További célunk az volt, hogy a rezisztencia kialakulásának hátterében álló anyagcsere-változásokat stabil izotópos jelölést alkalmazva specifikusan vizsgáljuk.
- Továbbá célul tűztük ki, hogy *in vitro* kísérletek során olyan célmolekulákat azonosítsunk, melyek szelektív gátlása jobb terápiás válaszhoz és a célzott terápiával szembeni rezisztencia kialakulásának késleltetéséhez vezet.
- Végző célunk az volt, hogy az *in vitro* kísérletek alapján ígéretesnek tűnő gyógyszerjelölt molekulákat *in vivo* körülmények között teszteljük.

5. Anyagok és módszerek

5.1. Anyagok

Amennyiben nincs külön feltüntetve, a reagenseket a Sigmától szereztük be, legalább 97%-os tisztaságban. A kromatográfias módszerekhez gradiens minőségű szerves oldószereket (Supelco) használtunk. Az oldatkészítéshez használt víz desztillációja és ultraszűrése az Androna B30 rendszerrel történt.

5.2. Műszerek

Trans-Blot Turbo System (BioRad), BioRad TransBlot Turbo blottoló rendszer, Syngene géldokumentációs rendszer, Nanodrop (Thermo), LightCycler 96 (Roche), SeqStudio (Agilent), Image XPress Pico (Molecular Devices), BioTek Epoch 2 spektrofotométer (Agilent), Seahorse XF sejtanalizátor (Agilent), Benchmark ULTRA IHC/ISH (Roche), Leica HI1220 szövetszáritó, Leica HI1210 vízfürdő, Leica HictoCore ARCADIA H szövetfeldolgozó készülék, Leica HistoCore BIOCUT mikrotóm, Olympus BX43 fénymikroszkóp, Thermo Vanquish UHPLC, Thermo Q Exactive Focus tömegspektrométer, Thermo Ultimate 3000 folydékkromatográf, Thermo LTQ-XL lineáris ioncsapda tömegspektrométer, Thermo C-Exactive Focus Orbitrap tömegspektrométer, Orbitrap Exploris 240 tömegspektrométer.

5.3. Szoftverek

Image J, Wave (Agilent), Graphpad Prism 8, Seqstudio Genetic Analyzer (Applied Biosystem), LightCycler (Roche), ImageXpress Pico analízátor szoftver (Molecular Devices), Panoramic 250 Flash III, QuPath version 0.4.1., Thermo Scientific Xcalibur (Thermo Scientific), Mascot Server 2.6.2 (Matrix Science).

5.4. Módszerek

5.4.1. Sejtvonalak tenyésztése

A dabrafenib-trametinibre rezisztens (DTR) sejtvonal előállításához a sejteket emelkedő dózisban nagyjából 3-5 hónapig kezeltük, míg elértük a 100 nM dabrafenib (MedChemExpress) és 10 nM trametinib (MedChemExpress) dózist. A vemurafenibre rezisztens (VR) sejtvonal létrehozásához a sejteket emelkedő dózisban kezeltük vemurafenibbel (MedChemExpress), míg elértük a 2 µM-os dózist. A rezisztens sejteket az inhibitorok jelenlétében tenyésztettük. A sejteket az inhibitorokkal vagy nélkülük 5% CO₂ inkubátorban 37 °C-on tenyésztettük magas

glükóztartalmú DMEM (A375 és HEK293T, Thermo) vagy RPMI (SK-MEL28, Thermo) médiumban, melyet 100 U/mL penicillinnel, 100 µg/mL sztreptomocinnel (Lonza), 2 mM L-glutaminnal (Lonza), 10% magzati szérummal (EuroClone) és amennyiben nincs külön feltüntetve, 100 nM nátrium-szelenittel egészítettünk ki.

5.4.2. Sejttúlélés és proliferáció

A sejteket 12 vagy 24 lyukú sejttenyésztő lemezekben tenyésztettük. A kezeléseket követően a sejteket HBSS (*Hank's Balanced Sodium Salts*, Lonza) pufferrel mostuk, majd 10%-os triklórecetsavban fixáltuk 4 °C-on legalább 1 órán át. Ezt követően négyszer mostuk ultratiszta vízzel, majd szulforodamin B festékkel (SRB, 0.4% 1%-os ecetsavban, Santa Cruz) festettük szobahőmérsékleten 15 percen át. A megfestett sejteket 1%-os ecetsavval mostuk négyszer. A fehérjékhez kötött SRB festéket 10 mM-os Tris oldatban oldottuk vissza. Ezt követően a mintákat hígítottuk, hogy a mért abszorbancia ne haladja meg az 1-es értéket. Az abszorbanciát spektrofotométerrel mértük 570 nm-en, a kapott eredményeket a hígítási faktorial korrigáltuk.

5.4.3. Western blot

A sejteket HBSS-sel történő mosást követően RIPA (*Radioimmunoprecipitation assay*) lízispufferben (10 mM Tris/HCl pH 7.4, 1% Nonidet P-40, 0.1% nátrium-deoxikolat, 0.1% nátrium-dodecil-szulfát, 25 mM NaCl) tártuk fel, melyet proteáz- és foszfatázinhibitorral egészítettünk ki. 15 másodperces szonikálást követően a sejttörmelékét centrifugálással választottuk el (14000g, 10 perc) 4 °C-on. A fehérjekoncentrációt BCA (*bicinchoninic acid*, Thermo) módszerrel határoztuk meg marha szérumalbumin standard sorozat használatával. Az egyforma töménységűre hígított fehérjemintákat denaturáltuk és redukáltuk 100 mM ditiotreitolt (DTT) tartalmazó Laemmli feltöltőpuffer használatával 95 °C-on 5 percig történő inkubációval. A poliakrilamid géltre 15 µg fehérjemintát vittünk fel, majd az elválasztás nátrium-dodecil-szulfát poliakrilamid gélelektroforézissel (SDS-PAGE) történt. Az elektroforézist követően a fehérjéket nitrocellulóz membránra vittük át Trans-Blot Turbo System (BioRad) használatával. Az átvitel hatékonyságát Ponceau festéssel ellenőriztük. A membránokat 5% tejport és 0.5% marha szérumalbumint tartalmazó TBST (*Tris-buffered Saline with Tween*, 0,05% Tween 20) pufferben blokkoltuk szobahőmérsékleten egy órán keresztül. Az elsődleges antitesteket 1:1000 arányban hígítottuk TBST pufferben, melyet egy éjszakán át 4 °C-on történő inkubáció követett. Ezután a membránokat háromszor 20 percig mostuk TBST-vel, majd a másodlagos antitesttel történő inkubáció következett szobahőn, 2 órán keresztül. Majd újabb háromszor 20 percig tartó mosást követően ECL (*enhanced*

chemiluminescence, BioRad) reagenssel történő 2 perces inkubációt követően a jelet a Syngene géldokumentációs rendszerével detektáltuk. A módszerhez az alábbi elsődleges antitesteket használtuk: az Akt (ab8805), a kataláz (ab52477), a CBS (ab140600), a CSE (ab189916), a DLST (ab177934), az ETHE1 (ab174302), a G6PD (ab993), a GAPDH (ab181602), a GCLC (ab53179), a GPX1 (ab108427), a GPX4 (ab125066), a GS (ab124811), a GST-pí (ab233112), az OGDH (ab137773), a PFKFB3 (ab181861), a PFKFB4 (ab137785), a SUOX (ab129094), a SOD1 (ab52950), a SOD2 (ab13533), a Trx (ab185329) és a TST (ab166625) antitesteket az Abcamtól; a CARS2 (HPA041776), az MPST (HPA001240) és az SQOR (HPA017079) antitesteket a Sigma-tól, a béta-aktin (3700S), az ERK1/2 (4695T), a MEK1/2 (8727), a PDH (3205), a foszfo-(Ser473)-Akt (9271S), a foszfo-(Thr202/Tyr204)-ERK1/2 (9101L), a foszfo-(S217/221)-MEK1/2 (9121) és az SDHA (5839) antitesteket a Cell Signalingtól; a TRP14 (MAB3504) antitestet az R&D Systemstől; a GOT1 (MA531527) és a GOT2 (PA527572) antitesteket Invitrogentől és a TrxR1 (sc-28321) antitestet Santa Cruz Biotechnology-től szereztük be. A tormaperoxidázzal konjugált anti-egér és anti-nyúl másodlagos antitesteket a DAKO-tól szereztük be. A Western blot képeket az Image J szoftverrel értékeltük. A Western blot eredmények kvantifikációja minden ábra esetén megtörtént, a kiértékelések eredménye megtalálható a Függelékben elérhető Cell Metabolism publikációban. Az „Eredmények” fejezetben kizárólag azok az eredmények lettek részletezve, melyek statisztikailag szignifikánsnak bizonyultak.

5.4.4. RNS izolálás és kvantitatív polimeráz láncreakció (qPCR)

A sejteket T75-ös flaskában növesztettük, majd a sejtek teljes RNS tartalmát TRIzol reagenssel (Thermo) izoláltuk a gyártó utasításai alapján. Az RNS koncentrációját és tisztaságát spektrofotometriásan a Nanodrop készülékkel mértük. Ezt követően 3 µg RNS minta emésztése 2 egység DNáz I (Thermo) enzimmel 30 percig 37 °C-on történő inkubációval történt. A reakciót 20 mM EDTA-val és 10 perces 70 °C-on történő inkubációval állítottuk le, majd a mintákat azonnal jégre tettük. Az RNS minták átírását nagy kapacitású cDNS átíró készlet (Thermo) segítségével a gyártó utasításai alapján végeztük. Az átírt terméket 10-szeresére hígítva használtuk templátként a valós idejű kvantitatív PCR-hoz. Az analízist Roche Lightcycler 480 készülékben (Roche) 2x qPCRBIO SyGreen Mix (PCRBiosystems) használatával a gyártó utasításai szerint végeztük. Az mRNS relatív mennyiségét a delta-CT módszer segítségével, GAPDH, béta-2-mikroglobulin (β2M) és aktin kontrollok használatával számoltuk ki. A β2M oligonukleotidot a Qiagentől szereztük be, míg a többi oligonukleotidot mi terveztük, ezek szekvenciáját a 2. táblázat tartalmazza.

Gén	Oligonukleotid szekvencia
ABCG2_fw	GCCACAGAGATCATAGAGCCT
ABCG2_rv	TCACCCCCGGAAAGTTGATG
aktin_fw	CTCACCATGGATGATGATATCGC
aktin_rv	AGGAATCCTTCTGACCCATGC
CDO1_fw	CATCCTGCACCAGCTCTTTG
CDO1_rv	CTGGTCGAACTTGGCGTACA
CSAD_fw	GGAATCTTCTGCCCTGGTGG
CSAD_rv	CAATCCGGGTAGCGCTGATA
CYP17A1_fw	TGGCTCTCTTGCTGCTTACC
CYP17A1_rv	GGTGGCCGACAATCACTGTA
CYP1B1_fw	ACGCCTTTATCCTCTCTGCG
CYP1B1_rv	GTGATAGTGGCCGGTACGTT
CYP2C19_fw	GACATCAACAACCCTCGGGAC
CYP2C19_rv	CTCTGTCCCAGCTCCAAGTA
CYP2F1_fw	GGAGTTCAACCCCGAGCAT
CYP2F1_rv	GGATGGCGGTGAGGTACAGA
GAPDH_fw	CAAATTCATGGCACCGTCAA
GAPDH_rv	CAAATGAGCCCCAGCCTTCT
GLS_fw	TGGGCAACAGTGTTAAGGGA
GLS_rv	AAGGAATGCCTTTGATCACCAC
GLS2_fw	CAGCAATGCCACATTCCAGTC
GLS2_rv	TGACCTCCACAGAACACAGC
GLUL_fw	TGGGAGCAGACAGAGCCTAT
GLUL_rv	AGGCATGACCTCGGCATTAG

1. táblázat | *A reverz transzkripció kvantitatív PCR-hoz használt forward (fw) és reverse (rv) oligonukleotidok szekvenciája.*

5.4.5. Géncsendesítés lentivírus használatával

Az perszulfid-dioxigenáz (*PDO/ETHE1*) gén stabil csendesítése (shETHE1) a MISSION shRNA Lentiviral Transduction víruspartikulák (Sigma, SHCLNV-NM_014297, ID: TRCN0000083454) használatával történt az RNS interferencia elve alapján. Egy sejtre öt víruspartikula jutott. A géncsendesített sejtekhez kontrollként a MISSION pLKO.1-puromicin üres vektor kontrollt tartalmazó víruspartikulákat használtunk (shCtrl). A fertőzött sejtpopulációból egyedi sejteket izoláltunk, melyekből új sejtpopulációkat növesztettünk fel. Az ETHE1 szintjét Western blot módszerrel ellenőriztük. Kísérleteinkhez azt a sejtpopulációt választottuk, melyben a legalacsonyabb volt az ETHE1 szintje.

5.4.6. Génkiütés CRISPR/Cas9 rendszer használatával

A CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) kísérletekhez használt plazmidokat, melyek a Cas9 és az sgRNS (*single guide RNS*) expressziójához használtunk Dr. Mazhar Adli (Northwestern Egyetem, Amerikai Egyesült Államok) szíves jóvoltából kaptuk. A 20 nukleotid hosszú sgRNS-t a Benchling online szoftver segítségével terveztük. A forward és reverz komplementer oligonukleotidokat 5'-CACC-3' és 5'-AAAC-3' túlnyúló végekkel láttuk el. Az oligonukleotidokat NEBuffer 2 (New England Biolabs) pufferben 95 °C-ra melegítettük, majd fokozatosan hűtve végeztük az anellációt. Ezt követően az anellált terméket BsmBI restrikciós endonukleáz segítségével hasítottuk, majd a ligációt követően transzformáltuk. A szekvenciákat Sanger szekvenálással ellenőriztük, melyhez a BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Thermo) készletet használtuk a gyártó utasításai szerint. Vektor kontrollként egy 20 nukleotid hosszú nem-targetáló nukleotid kontroll (*single guide*, sgCtrl) szekvenciát használtuk. Ezt követően HEK293T sejteket transzfektáltunk a felszaporított és kitisztított plazmiddal, mely tartalmazza a célszekvenciát, illetve PsPAX2 és Pmd2G segítő plazmidokkal 5:4:1 arányban FuGene6 (Promega) reagens használatával OptiMem (Gibco) médiumban. 24 és 48 órával a transzfekeciót követően a vírust tartalmazó felülúszót összegyűjtöttük és a sejteknek friss médiumot adtunk. Az összegyűjtött felülúszót 0,22 µm-es fecskendőszűrő segítségével leszűrtük és felhasználásig – 80 °C-on tároltuk. A vad típusú Cas9-t expresszáló A375 és SK-MEL-28 melanómasejteket 40-60%-os konfluencia mellett fertőztük a lentivírussal 8 µg/mL polibrén jelenlétében. 14-16 órával később a médiumot 2 µg/mL puromicint tartalmazó médiumra cseréltük és kétszer 48 órán keresztül szelektáltuk a sejteket. A szelekciót követően a sejtpopulációból egyedi sejtekből növesztett populációkat hoztunk létre. A CSE szintjét Western blot segítségével ellenőriztük, és olyan klónokat

választottunk, ahol a CSE-t még DT kezelés következtében sem tudtuk detektálni. A klónozási lépésekhez kompetens DH5 α Escherichia coli törzset használtunk. A génkiütéshez az alábbi szekvenciákat használtuk:

sgCtrl: GCCAGCGGGGATATGGTGAA, sgCSE: AGGCGCCCCTTGCTTGAACG.

A CSE génkiütéshez szükséges plazmidokat Dr. Czikora Ágnes kolléganőm állította elő.

A TRP14 hiányos HEK-293 sejt vonalat Prof. Elias Arnér (Karolinska Institutet, Svédország) laboratóriumából kaptuk a kísérletek elvégzéséhez.

5.4.7. Fehérje túltermelés Sleeping beauty transzpozon rendszer használatával

Fehérjetúltermelést a Sleeping beauty transzpozon rendszer segítségével valósítottuk meg¹¹⁰. A CSE gént a pNIC28-Bsa4/CSE plazmidból amplifikáltuk AATACCGGTATGCAGGAAAAAGACGCCTCC és CGGTGATCACTAGCTGTGACTTCCACTTGGAGG oligonukleotidok, illetve az AgeI és a BclI restriktions endonukleázok használatával. A PCR reakciót Q5 High-Fidelity DNA polimeráz (New England Biolabs) segítségével a gyártó utasításai szerint végeztük. A PCR profil a következő volt: 98 °C 30 mp, 98 °C 10 mp (denaturáció), 60 °C 30 mp (annealáció), 72 °C 45 mp (szintézis), melyet 35-ször ismételtünk, végül inkubáció 72 °C-on 2 percig. A PCR terméket 1%-os agaróz gélen választottuk el, majd NucleoSpin gél és PCR tisztító készlet segítségével a gyártó utasításai szerint tisztítottuk. SB-CAG-GFP-CAG-Puro plazmidot és a CSE PCR terméket AgeI és BclI (New England Biolabs) restriktions emésztésnek vetettük alá, majd a ragadós végekkel rendelkező termékeket 3:1 vektor:inzer arányban ligáltuk T4 DNS ligáz (New England Biolabs) segítségével 16 °C-on egy éjszakán át. A ligált plazmidot JM109/K12 kompetens E. coli törzsben szaporítottuk fel, majd a plazmidot PlasmidMidi készlet (Qiagen) segítségével izoláltuk. A CSE inzeret Sanger szekvenálással ellenőriztük, melyhez a BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing készletet (Thermo) használtuk a gyártó utasításai szerint. A CSE-t kódoló SB-CAG-CSE-CAG-Puro és a transzpozózt kódoló pCMV(CAT)T7-SB100 plazmiddal egyszerre transzfektáltuk az A375 sejteket lipofektamin reagens (Thermo) segítségével a gyártó utasításai szerint. Ezt követően a sejteket kétszer 48 órás puromicin szelekciónak (2 μ g/mL) vetettük alá. A CSE overexpresszióját Western blottal ellenőriztük. A CSE-t túltermelő A375 sejt vonalat Dr. Erdélyi Katalin hozta létre.

5.4.8. A cisztin megvonása

A cisztin- és metioninmentes DMEM médiumot (Thermo) 200 μ M metioninnal, 10% dializált magzati marhaszérummal, 100 U/ml penicilinnel, 100 μ g/ml sztreptomomicinnel (Lonza), 2 mM glutaminnal (Lonza), 1 mM nátrium-piruváttal és 100 nM nátrium-szelenittel egészítettük ki. A médiumot cisztinnel egészítettük ki a feltüntetett mennyiségekben.

5.4.9. A sejtanyagcsere vizsgálata Seahorse sejtanalizátorral

Az oxigénfogyás rátáját (OCR, *oxygen consumption rate*) és az extracelluláris savanyítás rátáját (ECAR, *extracellular acidification rate*) extracelluláris fluxus analízátorral mértük (Seahorse Instrument, Agilent). A mitokondriális sejtlegzés vizsgálatát Mito Stress Test készlettel, míg a glikolízis aktivitását Glycolysis Stress Test készlet segítségével mértük. A méréseket követően a sejteket 10%-os triklórsavban fixáltuk legalább egy órán keresztül 4 °C-on, majd ezt követően a relatív fehérjemennyiséget SRB módszerrel vizsgáltuk. Az eredmények kiértékelése az Agilent Wave szoftverével történt. Az OCR és ECAR adatokat az SRB-módszerrel mért abszorbancia értékekkel normalizáltuk.

5.4.10. Az *in vivo* modellek felállítása

A sejtvonal-alapú xenograft (A375-X) egérmodell felállításához 10^6 darab A375 sejtet oltottunk 200 μ l szérumentes DMEM médiumban 8-10 hetes NOD.CB17-Prkdcscid/NCrHsd (NOD-SCID, Inotiv Inc, Lafayette, Indiana, USA) vagy NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ (NSG, Inotiv Inc, Lafayette, Indiana, USA) egérbe. A humán tumor-alapú xenograft egérmodell (PDTX, *patient-derived tumor xenograft*) a KINETO Lab Kft ajándéka volt. A modell felállításához sebési úton frissen eltávolított *BRAF* V600E mutációt hordozó terápia-naiv melanóma betegmintát NSG egérbe oltottuk. A modell felállítását egy korábbi publikációban részletesen tárgyaltuk ¹¹¹. A PDTX kísérlethez 2*2*2 mm negyedik generációs tumorkockát NOD-SCID egerek bőre alá oltottuk. A tumorok szélességét és hosszát hetente kétszer digitális tolómérővel mértük. A tumortérfogatot az alábbi képlettel becsültük: $\text{térfogat} = (\text{szélesség})^2 * \text{hosszúság} / 2$. Amikor a tumorok mérete elérték a 200 mm³-es csoportátlagot, az egereket csoportokra osztottuk, és a kezelt csoportot négyszer 30 mg/testsúly kg dabrafenibbel (Tafinlar) és 1 mg/testsúly kg trametinibbel (Mekinist) kezeltük összesen négy alkalommal *per os*. Az A375-X esetén az egereket egymást követő négy napon (lásd 19. ábra), míg a humán tumor-alapú xenograft egereket az első, negyedik, ötödik és hatodik napon kezeltük (lásd 20. ábra). 24 órával az utolsó kezelést követően az egereket feláldoztuk, az eltávolított tumorok tömegét

digitális mérlegen lemértük, majd folyékony nitrogénben fagyasztottuk. A fagyasztott tumorszövetet homogenizáltuk Braun diszmembrátor segítségével.

A hosszútávú DT és DT + PAG kísérlet esetén $1.5 \cdot 10^6$ A375 sejtet oltottunk NSG egerek bőre alá. Amikor a tumorok elérték a 100 mm^3 -es becsült csoportátlagot, az egereket csoportokba osztottuk és megkezdtük a kezeléseket. Mindkét egércsoportot hetente ötször kezeltünk 30 mg/testsúly kg dabrafenibbel (Tafinlar) és 1 mg/testsúly kg trametinibbel (Mekinist) *per os*, összesen 37 alkalommal. A DT + PAG csoport egereit a DT kezelés mellett hetente háromszor 50 mg/testsúly kg PAG-gal hetente háromszor intraperitoneálisan kezeltük, összesen 23 alkalommal. Miután a DT csoport egereinél kialakult a szerzett rezisztencia, azaz a tumortérfogatuk meghaladta a kezelés előtti tumortérfogatot, az egereket feláldoztuk és a tumorok tömegét lemértük (lásd 30. ábra). Az egerek kezelését Dr. Garai Dorottya és Hidvégi Anita kolléganőim végezték, a tumorok eltávolítását Dr. Garai Dorottya és Dr. Erdélyi Katalin, míg a beágyazott szövetek metszését szintén Dr. Garai Dorottya kolléganőm végezte.

Engedélyek:

A KINETO Lab Kft rendelkezik az állattartáshoz (PEI/001/1715/2015), a PDTX modellhez történő mintagyűjtéshez, a kezelésükhöz, a modellfelállításhoz és a modellek használatához szükséges engedélyekkel (IV/10147-1/2020/EKU). A fagyasztva megőrzött PDTX minták szárazjégen kerültek az Országos Onkológiai Intézet állatházába, mely rendelkezik az állattartáshoz (PEI/001/1738-3/2015) és a tumor xenograft kísérletek kivitelezéséhez szükséges engedéllyel (PE/EA/1461-7/2020). Ezek az engedélyek a jelen dolgozatban részletezett kísérletek lebonyolításához szükséges feltételeknek mind megfelelnek. A szükséges etikai engedélyek a Tudományos és Kutatás-etikai Bizottság által kerültek kiállításra.

5.4.11. A tumorok erezettségének vizsgálata

Az PAG kezelés erezettségre gyakorolt hatásának vizsgálatához formalinban fixált, paraffinba ágyazott tumormintákból $2 \mu\text{m}$ -es metszeteket készítettünk. Deparaffinálást követően az antigénfeltárást pH 6,0-os citrát-pufferben (Vector Kft) végeztük 20 percen keresztül $95 \text{ }^\circ\text{C}$ -on. A feltárást követően a metszetek inkubációja 0,03%-os hidrogén-peroxidot tartalmazó TBS (*Tris buffered salts*) pufferben 10 percet át szobahőmérsékleten történt. A blokkolást szobahőmérsékleten végeztük kecske szérum használatával egy órán át. Az anti-CD34 (Abcam) elsődleges antitestet 1000-szeres hígításban 0,01%-os marha szérumalbumint tartalmazó TBS-pufferben tettük a metszetekre, majd az inkubáció egy éjszakát át $4 \text{ }^\circ\text{C}$ -on történt magas páratartalmat biztosító kamrában. Háromszor 10 perces TBS pufferrel történő mosást követően

a metszetek inkubációja a másodlagos antitesttel szobahőmérsékleten történt egy órán át, majd a metszetek festése ismételt mosási lépéseket követően a torna-peroxidáz szubsztrátjával, 3,3-diaminobenzidinnel (DAB) történt. Háttérfestésnek hematoxin festést alkalmaztunk. A megfestett metszeteket Panoramic 250 Flash III program segítségével szkenneltük (3DHitech, Budapest), 20x-os objektívet használva. Ezt követően a képeket „.tiff” kiterjesztésbe exportáltuk, majd a QuPath 0.4.1-es verziójú szoftverével dolgoztuk fel ¹¹². Először a tumorszövet került kijelölésre, a többi szövetrész és festési melléktermék kizárásra került. Ezt követően a pixelek kerültek definiálásra a DAB-csatornában 0,25-ös intenzitás határértékkal, hogy a pozitív pixeleket meghatározzuk, majd annotáltuk a legalább 50 négyzetmikrométeres pozitív területeket. Az annotált területeket analizáltuk, meghatároztuk az erezettséget százalékosan kifejezve (erezett terület/teljes tumorterület), illetve az erezettség denzitását (erek száma/teljes tumorterület). A megfestett metszetek szkennelését és a képek analízisét Dr. Cserepes Mihály kollégám végezte.

5.4.12. A betegminták immunhisztokémiás vizsgálata

A formalinban fixált, paraffinba ágyazott tumormintákat az Országos Onkológiai Intézet biobankjából Prof. Dr. Liszkay Gabriella és Dr. Tóth Erika (Országos Onkológiai Intézet) szíves hozzájárulásával gyűjtöttük. A vizsgálathoz szükséges etikai engedély a Tudományos és Kutatásetikai Bizottság által került kiállításra (IV/10441–1/2020/EKU). A 2 µm-es vastagságú metszetek deparaffinálást követően antigénfeltárást végeztünk pH 6,0-os Roche ULTRA Cell Conditioning (CC1) oldatban 20 percen át 95 °C-on. A metszeteket az anti-CSE (Abcam) elsődleges antitesttel 20 percen át 37 °C-on inkubáltuk 250-szeres hígításban 0,01%-os marha szérumalbumint tartalmazó TBS pufferben. A deparaffinálás, antigénfeltárást és festést a Benchmark ULTRA IHC/ISH (Roche) rendszer segítségével került kivitelezésre. A festést az ultraView Universal Alkaline Phosphatase Red Detection készlet (Roche) segítségével a gyártó utasításai szerint történt. Háttérfestésnek hematoxin festést alkalmaztunk. A képeket DP74-es kamerával ellátott Olympus BX43 mikroszkóppal kerültek dokumentálásra. A beágyazott tumorok metszését és festését Békné Kaplan Emese kolléganőm végezte.

5.4.13. A szulfán kén vizsgálata élősejtes mikroszkópiával

A letapadt sejteket szérummentes médiummal történő mosásokat követően 20 µM SSP4 festéket (*Sulfane Sulfur Probe 4*, Dojindo) és 0.5 mM cetil-trimetil-ammónium-bromidot (CTAB) tartalmazó szérummentes DMEM médiumban inkubáltuk 15 percig 37 °C-on, 5%-os CO₂-szintet biztosító inkubátorban. Ezt követően a sejteket háromszor mostuk kalcium- és

magnéziummentes DPBS (*Dulbecco's modified phosphate based saline*) pufferrel, majd kalcium-és magnéziummentes DPBS-ben vizualizáltuk ImageXpress Pico rendszer segítségével 37 °C-on 5%-os CO₂-szintet biztosítva.

5.4.14. Az anyagcserefluxus vizsgálata stabil izotópos jelöléssel

Az izotópos vizsgálatokhoz a cisztin megvonáshoz használt DMEM médiumot használtuk (ld. Módszerek 5.4.8-as pont), melyet nehéz metioninnal vagy nehéz cisztinnel egészítettünk ki. A metionin jelölése esetén a médiumba 200 µM L-[³⁴S]-metionint (Cambridge Isotopes) és 200 µM jelöletlen cisztint, míg a cisztin jelölése esetén 200 µM jelöletlen metionint és L-[¹³C₆, ¹⁵N₂]-cisztint (Cambridge Isotopes) tettünk. A letapadt sejteket HBSS pufferrel történő mosást követően a médium a jelölt metionint vagy cisztint tartalmazó médiumra cseréltük. A CBS aktivitásának méréséhez szerin-mentes DMEM médiumot 400 µM L-[¹³C₃, ¹⁵N]-szerinnel (Cambridge Isotopes) egészítettük ki. A sejteket 24 órán át kezeltük a nehéz szerint tartalmazó médiummal. Minden jelöléses módszer esetén a sejteket a feltüntetett inkubációs időt követően kétszer mostuk HBSS pufferrel, majd a kis molekulatömegű metabolitok meghatározását az 5.4.15-ös és 5.4.16-os pontban részletezett módszerek alapján detektáltuk.

5.4.15. Az aminosavak mérése

A sejteket mosást követően 3-[(3-kolamido-propil)-dimetil-ammonio]1-propánszulfonát (CHAPS) lízispufferben (0,1% CHAPS, 150 mM KCl, 50 mM 4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazin-étán-szulfonsav (HEPES), pH 7,4) tártuk fel 10 másodperces szonikálással. A centrifugálási lépést (14000g, 10 perc, 4 °C) követően a felülúszó fehérjetartalmát BCA módszerrel határoztuk meg. 50 µl 1 mg/ml koncentrációjú fehérjemintát az EZ:faast aminosav-analízis készlet (Phenomenex) segítségével választottuk el a gyártó utasításai szerint, majd az elválasztás és detektálás Thermo Vanquish UHPLC rendszerhez kötött Thermo Q Exactive Focus tömegspektrométerrel vagy Thermo Ultimate 3000 folyadékkromatográffal kapcsolt Thermo LTQ-XL lineáris ioncsapda tömegspektrométer segítségével történt. A mérésekhez a gyártó által javasolt m/z értékeket használtuk, kiegészítve az izotóppal jelölt verziókkal. A mért átmeneteket a 3. táblázat tartalmazza. Az előkészített mintákból történő analitikai méréseket Dr. Ditrói Tamás kollégám végezte.

5.4.16. A kis molekulatömegű kéntartalmú metabolitok mérése (LMW módszer)

Méréseink Akaike és munkatársai⁹¹ által publikált módszer alapján történt. Röviden, a letapadt sejteket kétszer mostuk HBSS pufferrel, majd 5 mM β-(4-hidroxi-fenil)-etil-jód-ecetamidot

(HPE-IAM) tartalmazó jéghideg 75%-os metanol oldatban lizáltuk. A tumormintákból történő méréshez nagyjából 10-40 mg fagyott szövetport használtunk, melyet 5 mM HPE-IAM-ot tartalmazó metanolban tártunk fel. A 10 másodperces szonikálási lépést követően az alkilezési lépés 37 °C-on 20 percig történt, melyet a felülúszó centrifugálási lépéssel történő elválasztása követett (14000g, 10 perc, 4 °C). A felülúszót 10%-os hangyasavval savanyítottuk, majd kétszeresére hígítottuk 0,1%-os hangyasavoldattal, mely tartalmazta az izotóppal jelölt ciszteinperszulfid belső standardot 10 vagy 200 nM-os koncentrációban. A sejt pelletet 1% SDS-t tartalmazó PBS (*phosphate based saline*) pufferben 10 perces szonikálási lépéssel feltártuk, majd a centrifugálással (14000g, 10 perc, 4 °C) elválasztott felülúszó fehérjetartalmát BCA-módszerrel határoztuk meg.

Az extracelluláris metabolitok méréséhez 50 µl sejteken lévő médiumot 5 mM HPE-IAM-mal alkileztük 37 °C-on 20 percig. A mintákat 10% triklórsavoldattal savanyítottuk, majd a felülúszót centrifugálással (14000g, 10 perc, 4 °C) választottuk el.

A folyadékkromatográffal kapcsolt tömegspektrometriás mérésekhez Thermo C-Exactive Focus Orbitrap tömegspektrométerrel kapcsolt Thermo Vanquish UHPLC-t használtunk. A derivatizált mintákat az alábbi két módszer segítségével mértük:

Az első módszer kivitelezése Phenomenex Kinetex C18 (50 * 2.1 mm, 2.6 µm) oszlopon 0,1%-os hangyasav-víz-oldat (A) és 0,1%-os hangyasav-metanol-oldat (B) eluensek használatával történt. A kezdeti 5% B lineárisan nőtt először 2 perc alatt 13%-ra, majd 4 perc alatt 95%-ra, ahol fél percig tartottuk, majd 0,1 perc alatt visszacsökkentettük 5% B-re és 3,4 percig tartottuk ott a következő injektálásig. Az áramlási sebesség 0,5 ml/perc volt 40 °C-on. A tömegspektrometriás detektálás pozitív ionizációs módban történt. A fragmensek létrehozásához magasabb energiájú C-csapda disszociációt (HCD, *higher-energy collisional dissociation*) használtunk a 3. táblázatban szereplő értékek szerint.

A második módszerhez Thermo Scientific Hypercarb (100 * 2,1 mm, 3 µm) oszlopot, 0,5%-os hangyasav-víz-oldatot (A) és 0,5%-os hangyasavat tartalmazó izopropanol:acetonitril 1:1 arányú elegyét (B) használtuk. Először a B-t lineárisan emeltük 0-ról 30%-ra 15 perc alatt, majd 1 perc alatt 100%-ra, ahol 5 percig tartottuk, majd 1 perc alatt 0%-ra csökkentettük, ahol 8 percig tartottuk. A hőmérséklet 40 °C-os volt, az áramlási sebesség pedig 0,2 ml/perc. A detektálás HCD használatával pozitív ionizációs módban történt, a 3. táblázatnak megfelelően. A kiértékelés során a területet a mért fehérjekoncentrációval korrigáltuk. Az előkészített mintákból történő analitikai méréseket Jurányi Eszter Petra kolléganőm végezte.

Analit	Prekurzor (m/z)	Fragmentum (m/z)
EZ:Faast módszer		
metionin	278	190
³⁴ S-metionin	280	192
cisztein	336	190
³⁴ S-cisztein	338	192
homocisztein	350	204
³⁴ S-homocisztein	352	206
cisztationin	479	230
³⁴ S-cisztationin	481	230
nehéz cisztein *	340	192
nehéz cisztationin*	483	230
cisztin	497	248
nehéz cisztin*	501	248,252
nehéz cisztin**	505	252
lantionin	465	174
nehéz lantionin *	469	174,178
nehéz lantionin **	473	178
LMW módszer (Kinetex C18)		
cisztein	299	121
cisztein-perszulfid	331	121
glutacion	485	356
glutacion-perszulfid	517	388
szulfid	389	252
LMW módszer (Hypercarb)		
cisztin	241	152
lantionin	209	120
cisztationin	223	134
oxidált glutacion	307	130
HMW módszer (Kinetex C18)		
cisztein	299	121
cisztein-perszulfid	331	121
Taurin-hipotaurin módszer (Kinetex HILIC)		
taurin	126	108
hipotaurin	109	92

2. táblázat | A tömegspektrometriás mérésekhez használt detektálási paramétereket tartalmazó táblázat. A jelölt metionininnal végzett kísérletek esetén a jelölt, nehéz ként tartalmazó analitokat ³⁴S-sel jelöltük. A nehéz nitrogént (¹⁵N) és nehéz szenet (¹³C) tartalmazó analitokat az egyszerűség kedvéért „nehéz” jelzővel illettük és a jelölés mértékét egy vagy két csillaggal jeleztük. A jelöletlen analitok könnyű szenet, nitrogént és ként tartalmaztak (¹²C, ¹⁴N és ³²S). A használt rövidítések: LMW (low molecular weight – kis molekulatömegű) és HMW (high molecular weight – nagy molekulatömegű).

5.4.17. A taurin és a hipotaurin mérése

A letapadt sejteket két HBSS pufferrel történő mosási lépést követően jéghideg 75%-os metanol oldatban tártuk fel. A xenograft tumorminták méréséhez nagyjából 10-40 mg fagyasztva porított szövetet használtunk, melyet jéghideg metanolban tártunk fel. A 10 másodperces szonikálási lépést követően a felülúszót centrifugálással választottuk el (14000 g, 10 perc, 4 °C). A felülúszót 10%-os hangyasavval savanyítottuk, majd kétszeresére hígítottuk 0,1%-os hangyasav-acetonitril oldatban. A sejt pelletet 1% SDS-t tartalmazó PBS pufferben 10 perces szonikálási lépéssel tártuk fel, majd a centrifugálással (14000g, 10 perc, 4 °C) elválasztott felülúszó fehérjetartalmát BCA-módszerrel határoztuk meg. A folyadékkromatográffal kapcsolt tömegspektrometriás mérések korábban publikált módszer¹¹³ alapján, Thermo Scientific LTQ-XL tömegspektrométerrel kapcsolt Thermo Vanquish UHPLC rendszerrel és Phenomenex Kinetex HILIC oszlopon (100 * 2,1 mm, 2,6 µm) történt. A kiértékelés során a területet a mért fehérjekoncentrációval korrigáltuk. Az előkészített mintákból történő analitikai méréseket Jurányi Eszter Petra kolléganőm végezte.

5.4.18. A tiolok mérése mono-bromo-bimán (MBB) alkilezőszer használatával

A letapadt sejteket PBS pufferrel egyszer mostuk, majd 1 mM mono-bromo-bimánt (MBB) tartalmazó pH 8,0-as PBS pufferben gyűjtöttük össze. Egy órán át 37 °C-on történő inkubáció során alkileztük és fluoreszcensen jelöltük a tiol csoportokat. A reakciót 10 µl 50%-os triklórsav hozzáadásával állítottuk le, majd kicsapódott fehérjepelletet centrifugálással választottuk el (4000g, 5 perc, szobahőmérséklet), majd 4% SDS-t tartalmazó 0.1M-os nátrium-hidroxid oldatban visszaoldottuk BCA módszerhez.

A felülúszóból a származékok detektálása fluoreszcens detektorral Thermo Ultimate 3000 HPLC rendszerrel történt. Phenomenex Kinetex XB-C180 oszlopra (150 * 3 mm, 2,6 µm) 5 µl derivatizált mintát injektáltunk, majd az elúció 0,1%-os trifluoecetsav-víz-oldattal (A) és 0,1% trifluoecetsav-acetonitril-oldattal (B) történt az alábbiak szerint: az áramlási sebességet 0.24ml/percre állítottuk, a kezdeti 15% B-t 3 perc alatt 35%-ra emeltük. 8,5 perc után tovább emeltük a B-t, még hozzá 2 perc alatt 90%-ra, majd 1 percig ott tartottuk. Ezt követően 1 perc alatt 15%-ra csökkentettük és további 2 percig ekvilibráltuk 15% B mellett a következő injektálásig.

A fluoreszcensen jelölt analitok detektálása 390 nm-es gerjesztési hullámhosszon és 475 nm-es emissziós hullámhosszon történt. A kvantifikáció standard oldatok segítségével felállított

kalibrációs egyenes alapján történt. A mintaelőkészítés nagy részét és az analitikai méréseket Dr. Ditrói Tamás kollégám végezte.

5.4.19. A fehérje perszulfidáció mérése tömegspektrométer segítségével

A vizsgálatok Akaike és munkatársai korábbi közleménye ⁹¹ alapján történt. Röviden összefoglalva, a letapadt sejteket HBSS pufferrel mostuk, majd 5mM HPE-IAM-ot tartalmazó RIPA lízispufferben, módszertől függően 5 mM dimedon jelenlétében vagy távollétében, 10 másodperces szonikálással feltártuk. Centrifugálási lépést követően (14000g, 10 perc, 4 °C) 100 µl felülúszót sómentesítettünk Zepa spin-oszlopok (7 kDa, 0,5 ml) segítségével. Az átfolyó frakció fehérjetartalmát BCA módszerrel mértük, majd a sómentesített fehérjemintákat 5 mM HPE-IAM alkilezőszerrel és oxidált fehérjemódosulatok mérése esetén 5 mM dimedonnal egészítettük ki. Az egyforma töménységűre hígított sómentesített fehérjemintákat pH 5,0-ös 35 mM nátrium-acetát pufferben 3 mg/ml pronázzal 37 °C-on 1 órán át emésztettük. Az emésztetlen fehérjéket 10% triklórsav hozzáadásával kicsaptuk, majd a felülúszót centrifugálással (14000g, 10 perc, szobahőmérséklet) választottuk el. A felülúszót folyadékkromatográffal kapcsolt tömegspektrométerre injektáltuk és a derivatizált analitokat Phenomenex Kinetex C18 oszlopon, Thermo C-Exact Focus Orbitrap tömegspektrométerrel kapcsolt Thermo Vanquish UHPLC segítségével történt. A detektálás pozitív ionizációs módban HCD használatával történt. Az előkészített mintákból történő analitikai méréseket Jurányi Eszter Petra kolléganőm végezte.

5.4.20. A fehérje perszulfidáció gél alapú vizsgálata

A mérések alapjául Dóka és munkatársai korábbi publikációjában szereplő fehérje perszulfidációt vizsgálatára szolgáló módszer, a ProPerDP (*Protein Persulfide Detection Protocol*) szolgált ¹¹⁴, melyet apró módosításokkal használtunk. Röviden, a letapadt sejteket HBSS pufferrel történő mosást követően 1% CHAPS-ot, proteázgátlót és 5 mM EZ-Link iodoacetyl-PEG2-biotint (IAB) tartalmazó pufferben tártuk fel. 15 másodperces szonikálást, alkilezést (90 min, 37 °C, 600 rpm) és centrifugálást (14000 g, 10 min, 4 °C) követően 150 µl felülúszót Zeba spin oszloppal (7 kDa, 0,5 ml) sómentesítettünk. Az átfolyó frakció fehérjetartalmát BCA módszerrel mértük. Az egyforma koncentrációjúra hígított fehérjemintákból az alkilezett frakció elválasztása Pierce Streptavidin mágneses gyöngyök segítségével történt. Az affinitás alapú dúsítást követően háromszor mostuk a gyöngyöket TBST pufferrel, majd a kiindulási perszulfid-frakciót 30 µl 25 mM ditiotreitoll hozzáadásával nyertük ki 1 órás szobahőmérsékleten történő redukciós lépéssel. A mintákat 10 µl négyszeres

Laemmlli pufferrel egészítettük ki, majd 95 °C-on 5 perc alatt denaturáltuk. A perszulfid frakcióból 30 µl-t vittünk fel poliakrilamid gélre. Az SDS-PAGE-t követően a fehérje-perszulfidok detektálása ezüstoffestéssel történt (Proteo-Silver Plus Silver Stain Kit). A sejtlyázatok teljes fehérjetartalmának meghatározására Coomassie-festést használtunk a gyártó utasításai szerint. Ezen méréseket Szatmári Réka Zsuzsanna kolléganóm végezte.

5.4.21. A fehérje perszulfidáció vizsgálata proteomikai megközelítéssel

Az ezüstoffestést követően annál a molekulatömegnél, ahol kezelés hatására különbséget találtunk, kivágtuk a gélből az érintett területet és festékmentesítettük Proteo-Silver Plus Silver Stain készlet segítségével. A géldarabokat ditiotreitollal redukáltuk, jódacetamiddal alkileztük, végül tripszinnel emésztettük a Kaliforniai Egyetem (San Francisco, Amerikai Egyesült Államok) Tömegspektrometriai Létesítményének ajánlása szerint^{115,116}. Az emésztett fehérjemintákat sómentesítettük C18-as spinoszlopok segítségével. A szárazra párolt triptikus peptideket 16 µl 0,1% hangyasavat és 3% acetonitrilt tartalmazó vizes oldatban visszaoldottuk, majd 8 µl mintát injektáltunk UltiMate 3000 RSLCnano folyadékkromatográffal kapcsolt Orbitrap Exploris 240 tömegspektrométerre. Az analitokat Acclaim PepMap 100 C18 (0,1 x 200 mm) oszlopon koncentráltuk 0,1% hangyasavat tartalmazó 1%-os acetonitril oldatban 20 µl/perc áramlási sebességgel 2 percen keresztül, majd Thermo Scientific EASY-spray PepMap RSLC C18 (0,075 x 500 mm, 2 µm) oszlopon lineáris gradiens elucióval választottuk el. Az „A” eluens 0,1%-os hangyasav vizes oldata, míg a „B” eluens 0,1%-os hangyasav acetonitriles oldata volt. Az áramlási sebesség 250 nl/perc, az oszlop hőmérséklete 40 °C volt. A kezdeti 3% B eluenst lineárisan emeltük 40%-ra 120 perc alatt. Az ionizáció elektropray ionizációval történt 2 kV energiával pozitív ionizációs módban. A spektrumok felvételéhez adatfüggő adatgyűjtési módszert alkalmaztunk, mely során a prekursor ionokat 350-2000 m/z tartományban monitoroztuk, 60000 felbontással. A 20 legintenzívebb prekursor ion kiválasztása után ezek MS/MS fragmentációja 30% HCD ütközési energiával, történt, a fragmenseket 1 m/z izolációs ablakkal, 15000 felbontással monitoroztuk. A fragmentáció előtt a prekursor ionokat intenzitásuk (1×10^3) és töltésük (2-4) alapján szűrtük, 60 s időtartamú kizárási listát alkalmazva.

A peptidek és a fehérjék lekeresését a Swissprot adatbázisában (hozzáférés dátuma: 2024. október) végeztük egy házon belüli 2.6.2 verziójú Mascot szerver segítségével. A tömegek határértékét 10 és 20 ppm-re állítottuk a prekursor és a fragment ionokra nézve, egy tévesztést engedélyezve. A karbamido-metilációt kötöttnek tekintettük, míg a metionin-oxidációt változó

módosulatnak tekintettük. A hamis találati arányt 1%-ra állítottuk decoy adatbázis alapján. Ezen méréseket és a lekereséseket Szatmári Réka Zsuzsanna kolléganőm végezte.

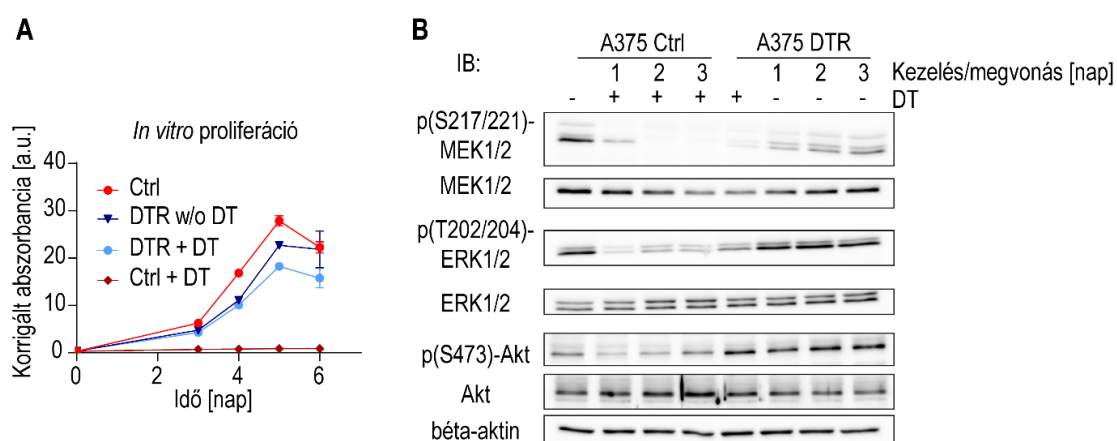
5.4.22. Statisztikai módszerek

A statisztikai analízist a Graphpad Prism 8 szoftverrel végeztük. A használt statisztikai tesztek az ábrafeliratokban tüntettük fel. Normalitásvizsgálathoz a Shapiro-Wilk tesztet, a variancia vizsgálatára pedig a Bartlett tesztet használtuk. Két csoport esetén az összehasonlítás az adatsorok eloszlásától és a varianciától függően Student-féle t-teszttel és Mann-Whitney u-teszttel történt, kivéve a Western blotok vizsgálata esetén, ahol páros t-próbát használtunk. Több csoport összehasonlítása esetén eloszlástól és varianciától függően egyutas ANOVA-t és Dunnett-tesztet használtunk. Az adatokat átlag \pm szórás formátumban tüntettük fel, kivéve, ha ezt az ábrafelirat külön jelzi. A szignifikancia szintje az alábbi volt: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

6. Eredmények

6.1. Az *in vitro* modell felállítása és karakterizálása

A V600E mutációt hordozó B-Raf és a MEK1/2 fehérjék dabrafenibbel és trametinibbel (a továbbiakban DT) történő gátlását követően a melanómasejtek egy része programozott sejthalállal elpusztul, míg egy másik része nyugalmi állapotban átvészeli a kezelést. Ezeket a terápiát túlélő, de nem osztódó sejteket perziszter sejteknek nevezzük. A dabrafenib-trametinibre rezisztens (a továbbiakban DTR) sejtvonalat úgy hoztuk létre, hogy a gyógyszer dózist fokozatosan növeltük, amíg a sejtek osztódni nem kezdtek és végül elérték a terápia-naiv (a továbbiakban kontroll) sejtekre jellemző proliferációs rátát (5/A ábra). Munkánk során egyrészt a DT kezelés akut hatását vizsgáltuk, tehát a perziszter sejtekben bekövetkezett változásokat, másrészt a szerzett rezisztencia kialakulása során végbement változásokat. A detektált változásokat a terápia-naiv kontroll sejtekhez viszonyítottuk.



5. ábra | A dabrafenib-trametinibre rezisztens (DTR) A375 sejtvonal létrehozása. (A) A terápia-naiv kezeletlen és DT-vel kezelt kontroll (Ctrl), illetve kezeletlen és DT-vel kezelt rezisztens sejtvonalak osztódásának összehasonlítása SRB módszer segítségével. (B) A MEK1/2, az ERK1/2 és az Akt foszforilációjának vizsgálata a DT kezelés hatására és a rezisztencia kialakulása során Western blot technikával. A kontroll sejteket 1-3 napig kezeltük DT-vel, míg a rezisztens sejtektől ugyanennyi időre megvontuk a gyógyszereket. A géltre történő feltöltés ellenőrzéséhez béta-aktin antitestet használtunk. A Western blot eredmények kiértékelése megtalálható a Függelékben.

A terápia-naiv kontroll sejteket DT-vel kezelve a MEK1/2 foszforilációja a 217-es és a 221-es szerin oldalláncokon (p-MEK1/2) és az ERK1/2 foszforilációja a 202-es és a 204-es treonin oldalláncokon (p-ERK1/2) jelentős mértékben lecsökkent 72 órás kezelést követően (5/B ábra).

Ezzel szemben a DTR vonal esetén a MEK1/2 és ERK1/2 foszforilációja DT kezelés jelenlétében is detektálható volt, míg az Akt foszforilációja a 473-as szerin oldalláncon a rezisztens sejtekben jelentős mértékben megnőtt (5/B ábra). Ez azt jelenti, hogy a rezisztencia során az PI3K/Akt útvonal aktiválódik, illetve a MAPK útvonal részlegesen visszanyeri aktivitását, ezzel lehetővé téve a rezisztens melanómasejtek proliferációját. Ez az észlelés összhangban áll korábbi közleményekkel, melyek a PI3K/Akt útvonal szerepéről számolnak be MAPK inhibitorokra rezisztens melanóma esetén ^{8,23,24}.

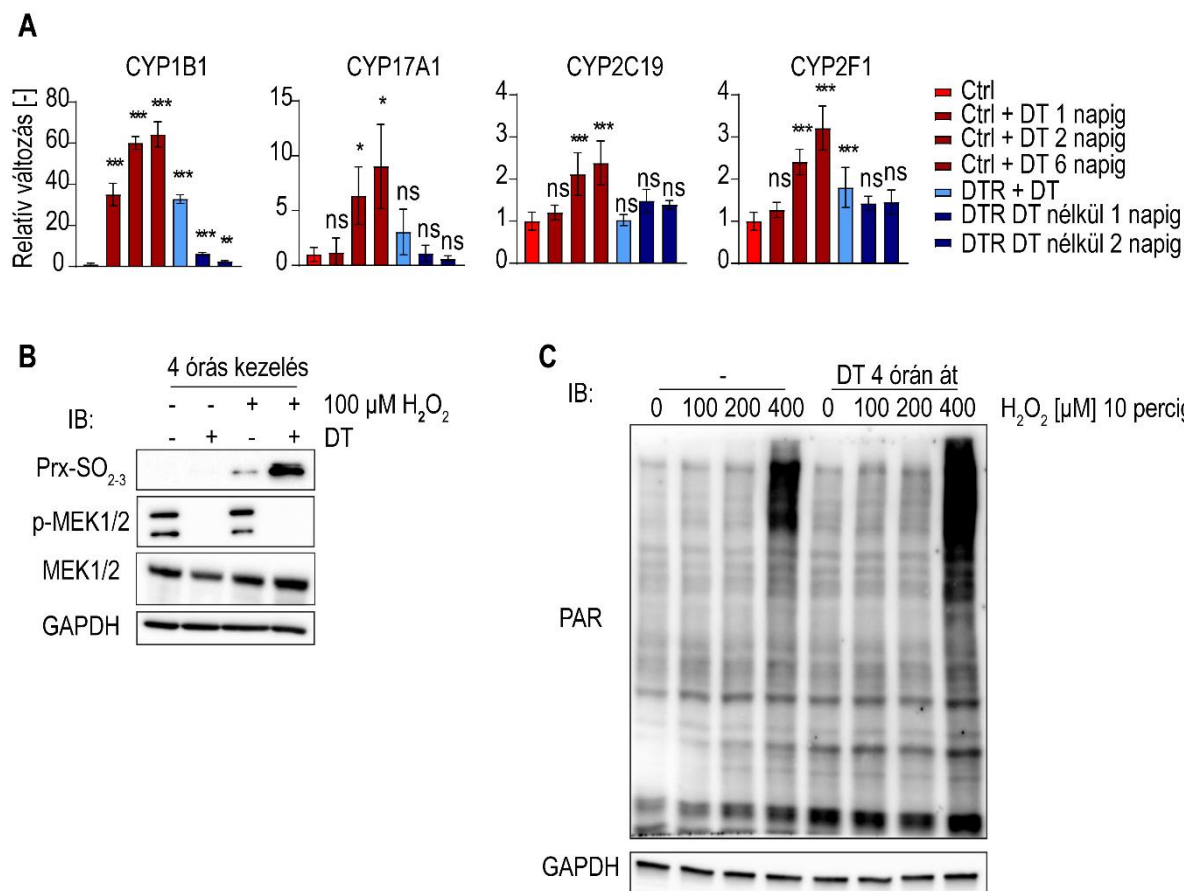
6.2. Változások a sejtek redox rendszereiben a MAPK gátlás következtében

6.2.1. Oxidatív stressz a MAPK gátlás hatására

Annak érdekében, hogy a DT kezelés és a rezisztencia kialakulása révén bekövetkezett génexpressziós változásokat azonosítsuk, reverz transzkripció kvantitatív PCR-rel vizsgáltuk a szerzett rezisztenciában általában szerepet játszó gének expresszióját. Analízisünk során azt találtuk, hogy számos citokróm 450 (CYP) fehérjecsaldába tartozó gén magasabb expressziót mutat DT kezelés következtében. Közülük a *CYP1B1* és a *CYP2F1* a DTR sejtekben is magasabbnak bizonyult a kezeletlen kontroll sejtekhez képest (6/A ábra). A CYP fehérjék monooxigenázok, melyek a különböző gyógyszermolekulák semlegesítése mellett ROS-t termelnek, így növelve a sejtekben az oxidatív terhelést ¹¹⁷. A redox homeosztázis fenntartása érdekében az emelkedett termelés általában fokozott lebontással párosul, mely az oxidatív ágensek emelkedett fluxusát vonja maga után és nem feltétlenül jelent magas egyensúlyi ROS szinteket.

Korábbi publikációk utaltak a MAPK útvonal gátlása és az oxidatív stressz közötti összefüggésre ^{32,33,56,118}. Mivel a ROS mérésére használt módszerek nagyon érzékenyek és a kapott eredményeket kellő óvatossággal kell kezelni, mi arra voltunk kíváncsiak, hogy a DT kezelés hatással van-e a fehérjék oxidációjára és az oxidatív stressz által kiváltott DNS károsodásra. A Prx-ek a sejtek minden kompartmentjében nagy koncentrációban jelenlévő fehérjék, melyek a hidrogén-peroxiddal reagálnak. A Prx-ek túlzott oxidációja, tehát a Cys oldalláncokon a szulfin- és szulfonsav (Prx-SO₂₋₃) módosulat megjelenése markáns oxidatív terhelést fémjelez, mely robusztusan mérhető. A szulfonsav képződése egy irreverzibilis módosulat, mely a fehérje degradációjához vezet, ezért normál körülmények között ezt a sejt eltünteti. A markáns oxidatív terhelés alatt álló sejtekben azonban ez a forma felhalmozódik.

Továbbá az oxidatív stressz hatására keletkezett DNS károsodás a fehérjék PAR-ilációjához vezet, melyet szintén megbízhatóan lehet mérni.



6. ábra | A DT kezelés következtében kialakult oxidatív stressz vizsgálata A375 sejtvonalban.

(A) A citokróm P450 (CYP) gének expressziójának vizsgálata reverz transzkripciós kvantitatív PCR segítségével terápia-naiv kezeletlen és DT-vel kezelt kontroll (Ctrl), illetve kezeletlen és DT-vel kezelt rezisztens (DTR) sejtekben. (B) A peroxiredoxinok irreverzibilis oxidatív módosulatát, a peroxiredoxin-szulfín- és szulfonsavat (Prx-SO₂₋₃) Western blot technikával mértük hidrogén-peroxid (H₂O₂) kezelést és/vagy DT kezelést követően. (C) A poli-ADP-ribozilációt (PAR-iláció) Western blot módszerrel mértük H₂O₂ kezelést és/vagy DT kezelést követően. A Western blot eredmények kiértékelése megtalálható a Függelékben.

Ezen vizsgálataink során a fenti gondolatmenettel összhangban azt találtuk, hogy bár a DT kezelés önmagában nem okozott emelkedést a Prx-SO₂₋₃ szintjében (6/B ábra) és az oxidatív terhelés következtében kialakult PAR-iláció mértékében (6/C ábra), hidrogén-peroxid (H₂O₂) kezeléssel kombinálva azt láttuk, hogy a DT-vel és H₂O₂-vel együttesen kezelt sejtekben sokkal magasabb a Prx-SO₂₋₃ és a PAR-iláció mértéke, mint a kizárólag H₂O₂-vel kezelt sejtekben. Ezen észleléseink új megközelítéssel és módszerekkel támasztották alá korábbi tanulmányok

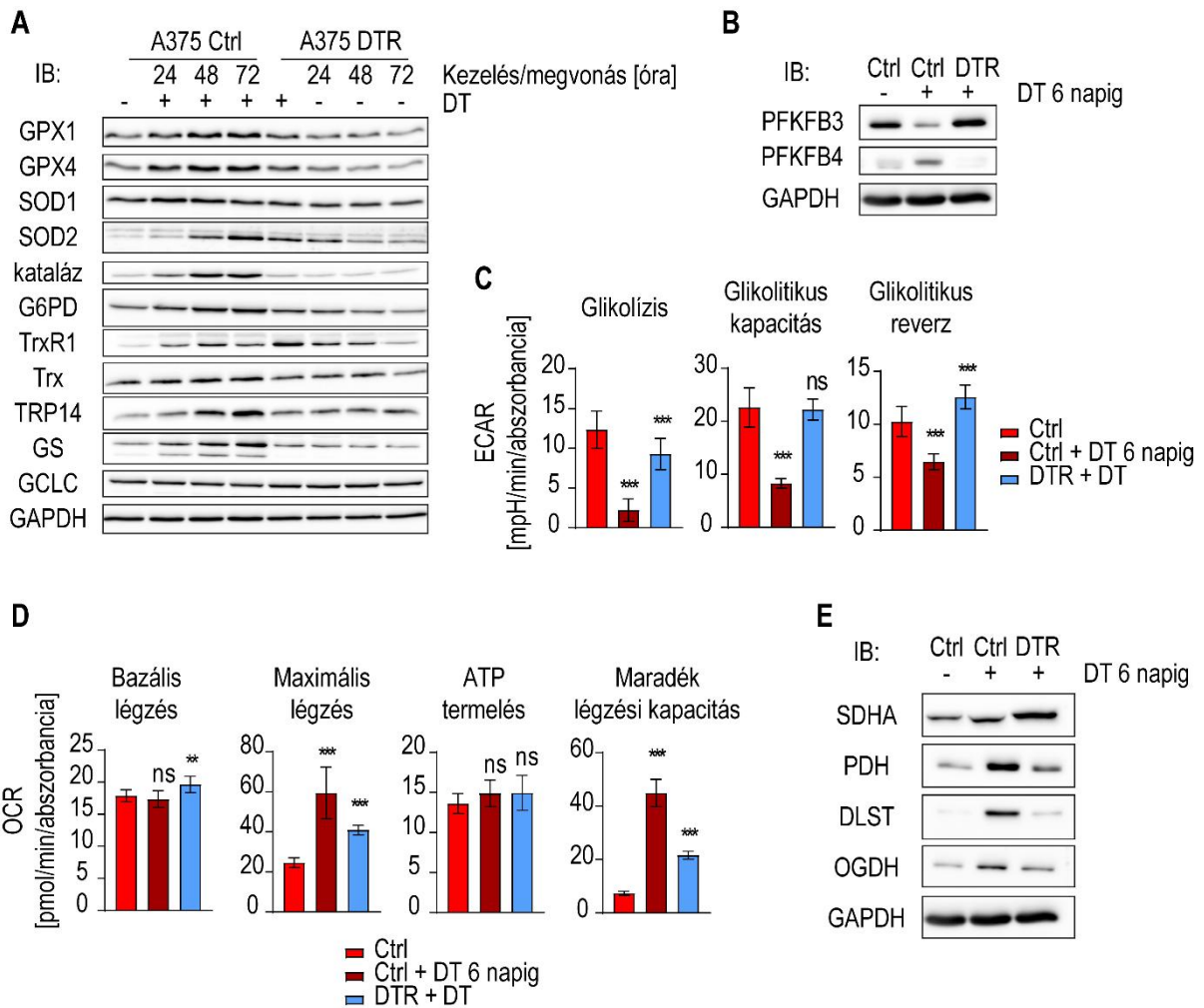
észleléseit, melyek a melanómasejtekben MAPK gátlásra bekövetkezett oxidatív stresszről írnak^{32,33,56}, továbbá megmutatták, hogy a DT kezelés kihatással van a fehérjék oxidációjára és az oxidatív stressz okozta DNS károsodásra.

6.2.2. Enzimszintváltozások az antioxidáns védelmi rendszerben

Az emelkedett oxidatív terhelés ellensúlyozása érdekében a melanómasejtekben a DT kezelés következtében számos védelmi kulcsenzim szintjében emelkedést tapasztaltunk. Ilyen például a szuperoxid-diszmutáz 2 (SOD2) és a tioredoxin-reduktáz 1 (TrxR1), melyek mind a DT-vel kezelt kontroll, mind a DTR sejtekben magasabb szintet mutattak. A kataláz, a 14 kDa-os tioredoxin-szerű fehérje (TRP14, *thioredoxin-related protein 14*), a GPX1 és 4 emelkedett expressziót mutattak DT kezelés hatására, míg a DTR sejtekben ezek szintje visszacsökkent a kezeletlen kontroll szintjére (7/A ábra).

A redukálóerőt ezen redox rendszerek működtetéséhez a TrxR és a GR fehérjéken keresztül a NADPH szolgáltatja, melyet a sejtek elsősorban a pentóz-foszfát úton keresztül állítják elő a glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz (G6PD) fehérje révén. A megemelkedett antioxidáns igénnyel összhangban DT kezelés következtében emelkedést találtunk a G6PD fehérje szintjében is (7/A ábra). Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a DT kezelés alatt álló sejtek széleskörű választ adnak az oxidatív stresszre. Ez összhangban áll azzal, hogy a sejteket önmagában DT-vel kezelve nem tapasztaltunk emelkedést a Prx-SO₂₋₃ és a PAR-iláció szintjében, hiszen az aktiválódott védelmi rendszerek ezeket közömbösíteni tudják a perziszter sejtek túlélése érdekében.

A pentóz-foszfát út és a glikolízis közötti anyagcserefluxus szigorúan szabályozott a sejtek anyagcsereigényeinek megfelelően, melyben a PFKFB 3 és 4 fehérjéknek fontos szerep jut. A PFKFB3 kináz aktivitása révén a glikolízis, míg a PFKFB4 foszfatáz aktivitása révén a pentóz-foszfát út működését fokozza⁴⁴. Jelen munkánk során a PFKB3 és 4 szintjét vizsgálva azt találtuk, hogy a melanómasejteket DT-vel kezelve a PFKFB4 szintje megemelkedett, míg a PFKFB3 szintje lecsökkent, ami arra utal, hogy a sejteknek sokkal nagyobb szüksége van az oxidatív stressz ellensúlyozásához szükséges NADPH-t termelő folyamatra, mint a sejtosztódáshoz szükséges glikolízis aktivitására. A rezisztens sejtekben a PFKFB3 és 4 szintek gyakorlatilag „visszaálltak” a terápia-naiv sejtekben mért szintekre, mely a DT-vel akut kezelt sejtekhez képest egy sokkal kiegyensúlyozottabb redox környezetet feltételez (7/B ábra). Továbbá a rezisztens sejtek már visszanyerték osztódási képességüket (5/A ábra), melyhez a glikolízis helyreállt működése elengedhetetlen.



7. ábra | A DT kezelés hatásának vizsgálata a sejtek redox homeosztázisára és mitokondriális működésére. (A) Az oxidatív stresszel szembeni védelemben szerepet játszó fehérjék szintjének vizsgálata Western blot technikával a DT kezelés hatására terápia-naiv (Ctrl) és DT-re rezisztens (DTR) A375 sejtekben. (B) A glikolízis és pentóz-foszfát út közötti fluxust szabályozó 6-foszfofrukto-2-kináz 3 és 4 (PFKFB3,4) fehérjék vizsgálata a DT kezelés következtében Western blot technikával. (C-D) A DT kezelés hatásának vizsgálata a sejtek glikolitikus aktivitására (C) és a sejtlegzés működésére (D) Seahorse sejtanalizátor segítségével. (E) A DT kezelés hatásának vizsgálata Western blot technikával a citromsavciklus azon enzimeinek szintjében, melyek a NADH és FADH₂ termelésében játszanak szerepet. Egyéb rövidítések: oxigénfogyás rátája (OCR), extracelluláris savanyítási ráta (ECAR), szukcinát-dehidrogenáz A (SDHA), piruvát-dehidrogenáz (PDH), dihidrolipoamid-szukcinil-transzferáz (DLST), 2-oxoglutarát-dehidrogenáz (OGDH). A Western blot eredmények kiértékelése megtalálható a Függelékben.

6.3. Anyagcsere-változások a melanómasejtekben DT kezelés hatására

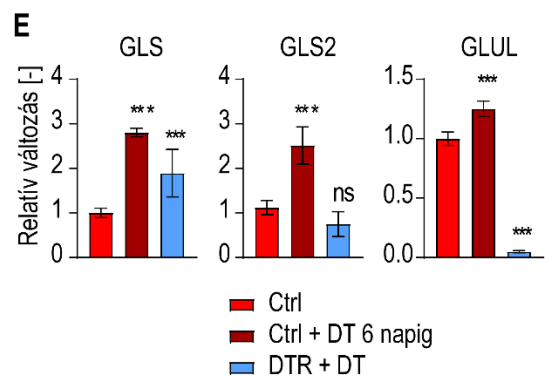
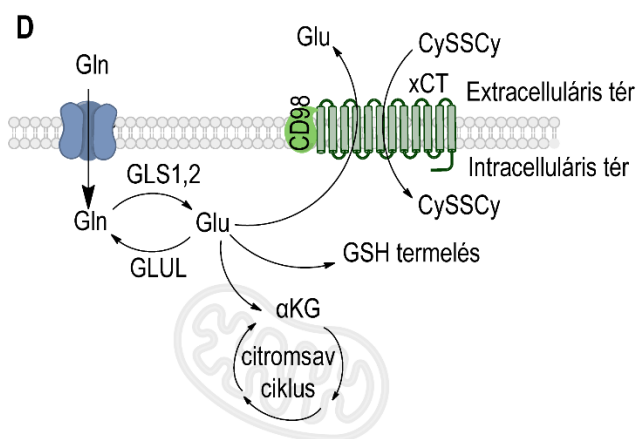
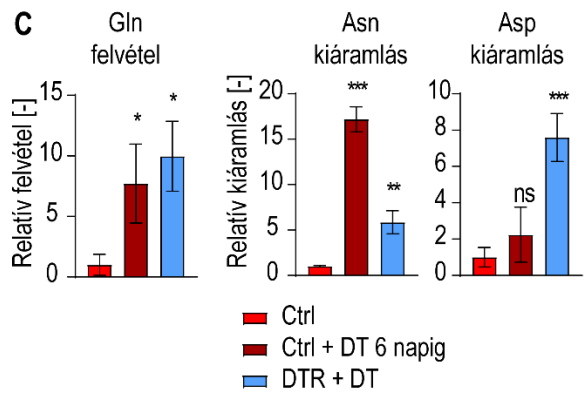
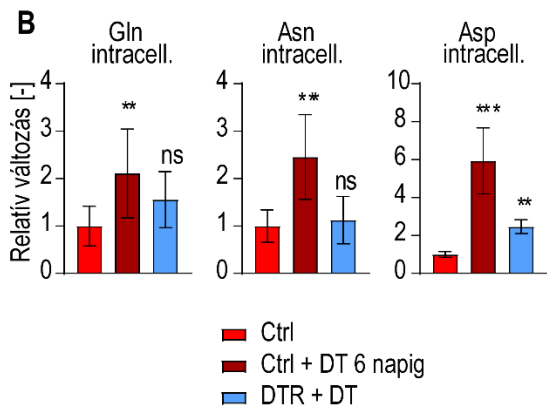
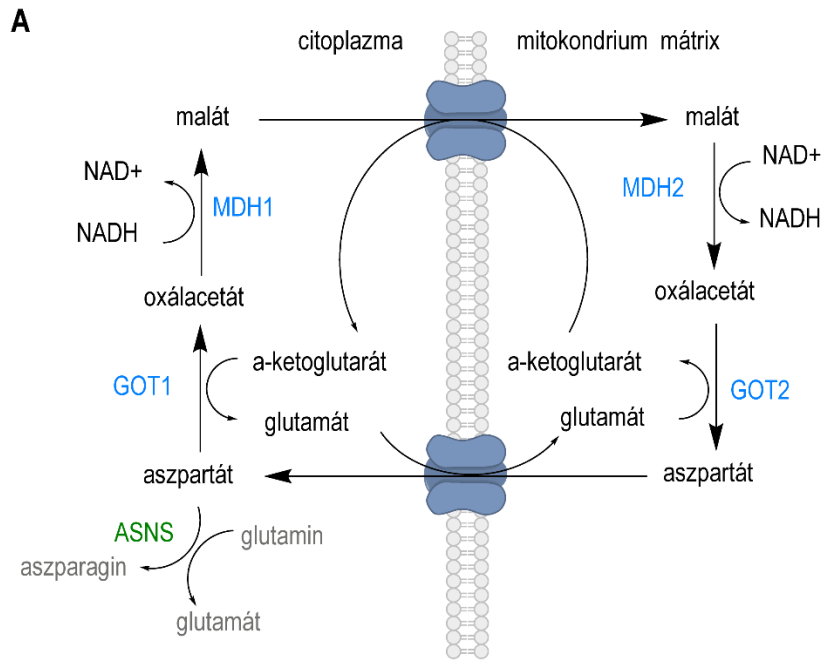
6.3.1. A DT kezelés hatása a melanómasejtek energiatermelésére

A glikolízis és a pentóz-foszfát út szabályozásában szerepet játszó PFKFB3 és 4 fehérjék szintjében mért változásokkal összhangban a sejtek glikolitikus aktivitását vizsgálva azt találtuk, hogy a DT kezelés hatására a glikolízis mértéke csökkent, míg a rezisztens sejtekben helyreállt a terápia-naiv sejtekben mért szintre (7/C ábra). Ez összhangban áll azzal, hogy a DTR sejtek a DT jelenlétében is képesek a terápia-naiv melanómasejtekhez hasonló mértékben osztódni, melyhez az aerob glikolízis helyreállt működése elengedhetetlen.

Más kutatócsoportokkal összhangban ^{32,33}, a saját modellrendszerünkben azt találtuk, hogy a DT kezelés hatására megemelkedett a melanómasejtek mitokondriális légzési kapacitása (7/D ábra), és a citromsavciklusban résztvevő számos fehérje szintje (7/E ábra). A fokozott mitokondriális légzés a fokozott CYP működés mellett (6/A ábra) kiváltóoka lehet a megemelkedett oxidatív terhelésnek (6/B és C ábrák). A rezisztens sejtekben emelkedett sejtlégzést tapasztaltunk, illetve emelkedett a PDH és a szukcinát-dehidrogenáz A (SDHA) szintje (7/E ábra), emellett azonban helyreállt a sejtek glikolitikus aktivitása (7/C ábra). Ezek az eredményeink konzisztensek a PFKFB3 és 4 fehérjék szintjében bekövetkezett változásokkal (7/B ábra). A rezisztens sejtek az emelkedett sejtlégzés okozta megnövekedett ROS termelést képesek ellensúlyozni, és ebben a kiegyensúlyozottabb redox környezetben képesek visszanyerni az osztódáshoz szükséges glikolitikus aktivitásukat.

6.3.2. A glutamin-anyagcsereben bekövetkezett változások

Ezt követően a modellrendszerünket célzott aminosav-analízisnek vetettük alá, mely során eltéréseket tapasztaltunk a glutamin, az aszparagin és az aszpartát intracelluláris szintjében DT kezelés hatására, illetve a DTR sejtekben egyaránt. Ezen aminosavak anyagcsereje szorosan kapcsolódik a citromsavciklus működéséhez, illetve az elektrontranszportlánc működtetéséhez szükséges NADH egyensúly fenntartásához, melyben a citoplazma és a mitokondriális mátrix között működő malát-aszpartát inga elengedhetetlen (8/A ábra).



8. ábra | A DT kezelés glutamin-anyagcserére gyakorolt hatásának vizsgálata. (A) A malát-aszpartát inga működését bemutató egyszerűsített ábra, illetve a szerepet játszó anyagcseretermékek (feketével) és enzimek (kézzel), kiegészítve az aszparát-aszparagin átalakulásban szerepet játszó anyagcseretermékekkel (szürkével) és enzimmel (zölddel). A mitokondrium kettős membránját ábrán az egyszerűség kedvéért egy membrán jelöli. (B) A glutamin, az aszparagin (Asn) és az aszpartát (Asp) intracelluláris szintjének vizsgálata a DT kezelés következtében EZ:faast aminosav-analízis készlet használatával. (C) A glutamin felvételének meghatározása, illetve az aszparagin és az aszpartát sejten kívüli térből történő mérése EZ:faast aminosav-analízis készlet használatával. (D) A glutamin (Gln) termelése és hasznosítása a különböző anyagcsere-útvonalak által. (E) A glutamin és a glutamát átalakulásában szerepet játszó fehérjéket kódoló gének expressziójának vizsgálata reverz transzkripciós kvantitatív PCR segítségével. Egyéb rövidítések: MDH (malát-dehidrogenáz), GOT (aszpartát-aminotranszferáz), ASNS (aszparagin-szintetáz), GLS (glutamináz), GLUL (glutamin-szintetáz), α GK (alfa-ketoglutarát).

Aminosav-analízisünk során azt találtuk, hogy a DT kezelés hatására megemelkedett a sejtekben a glutamin, aszparagin és az aszpartát szintje, míg a rezisztens sejtekben az aszpartát enyhén emelkedett szintjét tapasztaltuk (8/B ábra). Emellett a sejtek tápoldatából történő méréssel azt találtuk, hogy mind a DT-vel kezelt, mind a DTR sejtek több glutamint vettek fel az extracelluláris térből. A DT-vel kezelt kontroll sejtek esetén emelkedést tapasztaltunk az aszparagin szintjében a sejtmediumban, míg a rezisztens sejtekben az aszparagin és az aszpartát szintje is megnőtt a mediumban (8/C ábra). Ez azért kiemelkedően fontos, mert az aszpartát és a glutamát aminosavak fontos szerepet játszanak malát-aszpartát inga működésében, mely a citoszól és a mitokondrium közötti NADH egyensúly fenntartásához elengedhetetlen (8/A ábra).

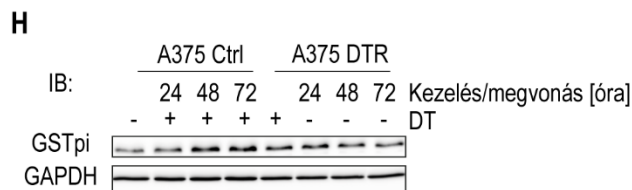
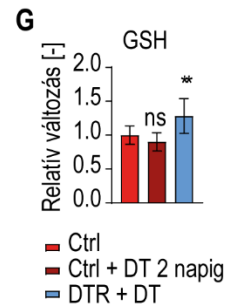
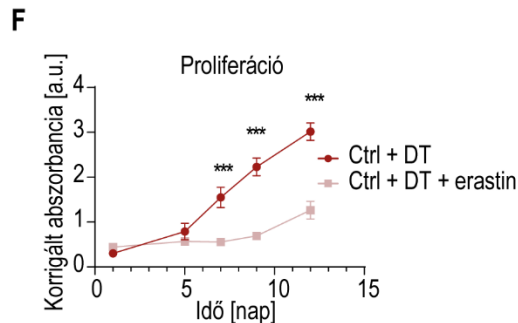
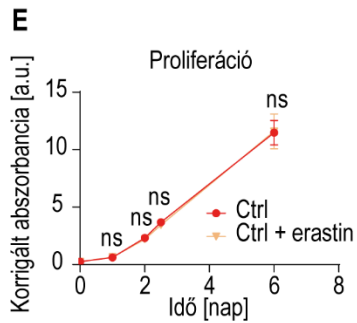
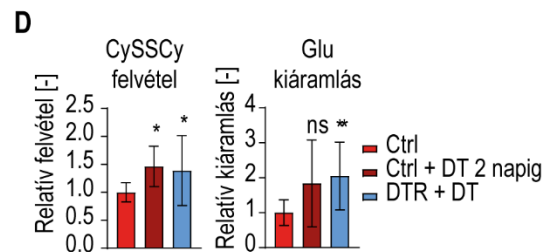
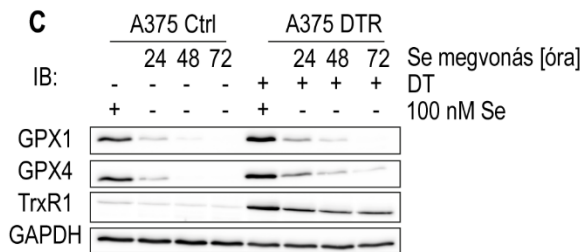
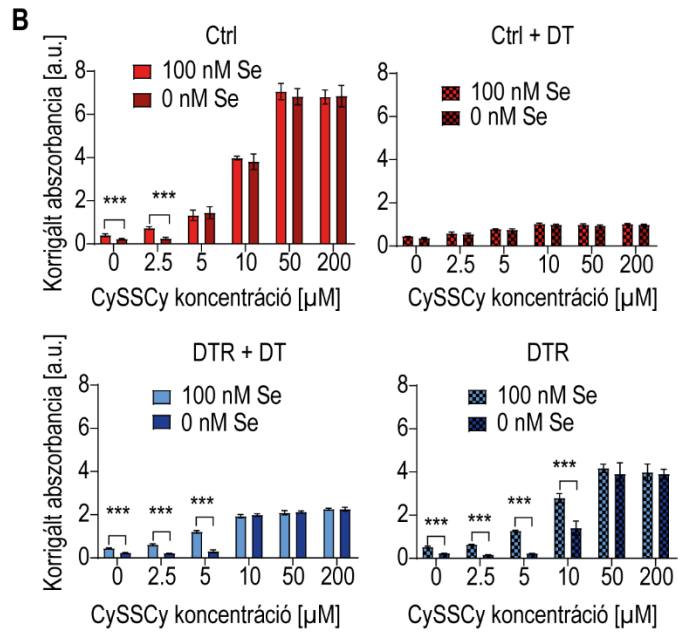
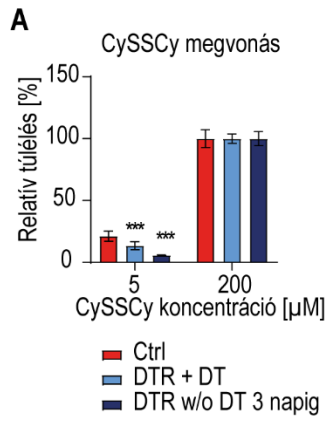
A glutamát az alfa-ketoglutarát termelése mellett a CySSCy extracelluláris térből történő felvételéhez szükséges, illetve a GSH szintéziséhez elengedhetetlen, mely kulcsfontosságú a redox egyensúly fenntartásában (8/D ábra). Az emelkedett glutaminfelvétel, a citromsavciklus fokozott működése és az emelkedett oxidatív stressz megnövekedett glutamátigényre utaltak, így megvizsgáltuk a glutamin-glutamát átalakulásban szerepet játszó gének expresszióját. A glutamin-szintetáz (GLUL) a glutamátból glutamint, míg a glutamináz 1 és 2 (GLS1,2) a glutaminból állítanak elő glutamátot (8/D ábra). Azt találtuk, hogy DT-vel történő kezelés hatására megemelkedett a GLS1 és 2 expressziója a kontroll sejtekhez képest, míg a DTR sejtekben a GLUL expressziója csökkent a kezeltlen kontroll sejtekhez képest (8/E ábra). Ezek

az észlelések arra utalnak, hogy mind a DT kezelés alatt álló terápiára érzékeny sejteknek, mind a terápiára rezisztens sejteknek nagy szüksége van a glutamátra, azonban az emelkedett glutamátszükségletüket máshogy fedezik: a DT-vel kezelt sejtek fokozzák a szintézist, míg a DTR sejtek csökkentik a glutaminná történő visszaalakulást (8/E ábra). Korábbi tanulmányokban megmutatták, hogy a glükóz és a glutamin anyagcseréjének átprogramozásának fontos szerep jut a B-Raf inhibitorokra rezisztens melanómasejtekben^{34,119}, melyek összhangban állnak jelen észleléseinkkel.

6.4. A cisztein-anyagcsere átprogramozása

6.4.1. A megemelkedett cisztinszükséglet

A B-Raf V600E inhibitorokra rezisztens melanómasejteknél korábban megfigyelték, hogy a CySSCy felvételéért felelős x_c^- antiporter xCT alegységének transzkripció gátlására érzékenyek⁵⁶. Ezzel összhangban azt találtuk, hogy a DTR sejtek valóban érzékenyebbek voltak a CySSCy megvonására (9/A ábra), azonban csupán akkor, ha a sejtmediumból hiányzott a nátrium-szelenit (9/B ábra). Ennek a háttérben az állhat, hogy a szelenit szükséges a szeleno-cisztein, és ezáltal a szelenofehérjék szintéziséhez, melyek közül a TrxR, illetve a GPX 1 és 4 elengedhetetlenek a redox homeosztázis fenntartásához. Ahogy ezt a korábbiakban megmutattuk, mindhárom szelenofehérje szintje megemelkedett DT kezelés hatására, illetve a rezisztens sejtekben a TrxR1 mutatott magas expressziót, jelezve, hogy a kezelés alatt álló sejteknek szüksége van ezek működésére (7/A ábra). Továbbá a GPX4 egyike a ferroptotikus sejthalál elleni védelem kulcsfehérjéinek, ezáltal aktivitásának csökkenése tovább fokozza a ferroptózisra való érzékenységet^{53,120}. Normál körülmények között az emberi szervezet elegendő szelenithez jut, így a szelenofehérjék kiegyensúlyozott működése adott a megfelelő sejtműködés biztosításához. A sejt kultúrák fenntartásához használt médiumok azonban általában nem tartalmazzak elegendő szelenitet a fiziológias működéshez. Annak érdekében, hogy a sejtek redox rendszerei megfelelően működjenek, mi kiegészítjük a sejtmediumot nátrium-szelenittel. Egy következő kísérletben megvizsgáltuk, hogy mi történik a TrxR1 és a GPX1 és 4 fehérjék szintjével szelenit-megvonás hatására és azt találtuk, hogy már 24 óra elteltével jelentősen lecsökkent mindhárom enzim szintje (9/C ábra). Ez összhangban áll azzal, hogy a rezisztens sejteknél az érzékenység CySSCy megvonással szemben a szelenit-megvonással válik markánsá.



9. ábra | A cisztin felvételének jelentősége a DT rezisztencia kialakulása során. (A) A cisztin (CySSCy) megvonás hatása a melanómasejtek túlélésére szelenit (Se) megvonása esetén. (B) A cisztin megvonás túlélésre gyakorolt hatása a terápia-naiv és a DT-vel kezelt kontroll (felső két diagram), illetve a DTR (alsó két diagram) A375 sejtek esetén szelén jelenlétében és távollétében. (C) A szelenofehérjék szintjében bekövetkezett változások vizsgálata szelénmegvonás következtében Western blot technikával terápia-naiv kontroll és DTR sejtekben. (D) Az x_c^- antiporter működésének vizsgálata EZ:faast aminosav-analízis készlet segítségével a CySSCy sejtmediumból történő fogyása és a glutamát (Glu) szintjének emelkedése által. (E-F) Az x_c^- antiportert gátló erastin sejtosztódásra kifejtett hatása terápia-naiv kontroll (E) és DT-vel együttesen kezelt (F) A375 sejtek esetén. (G) A redox védelemben szerepet játszó intracelluláris glutation (GSH) szintjének mérése folyadékkromatográffal kapcsolt tandem tömegspektrométerrel történt. (H) A különböző gyógyszermolekulák közömbösítéséért felelős GST-pí expressziójának vizsgálata Western blot technikával. A Western blot eredmények kiértékelése megtalálható a Függelékben.

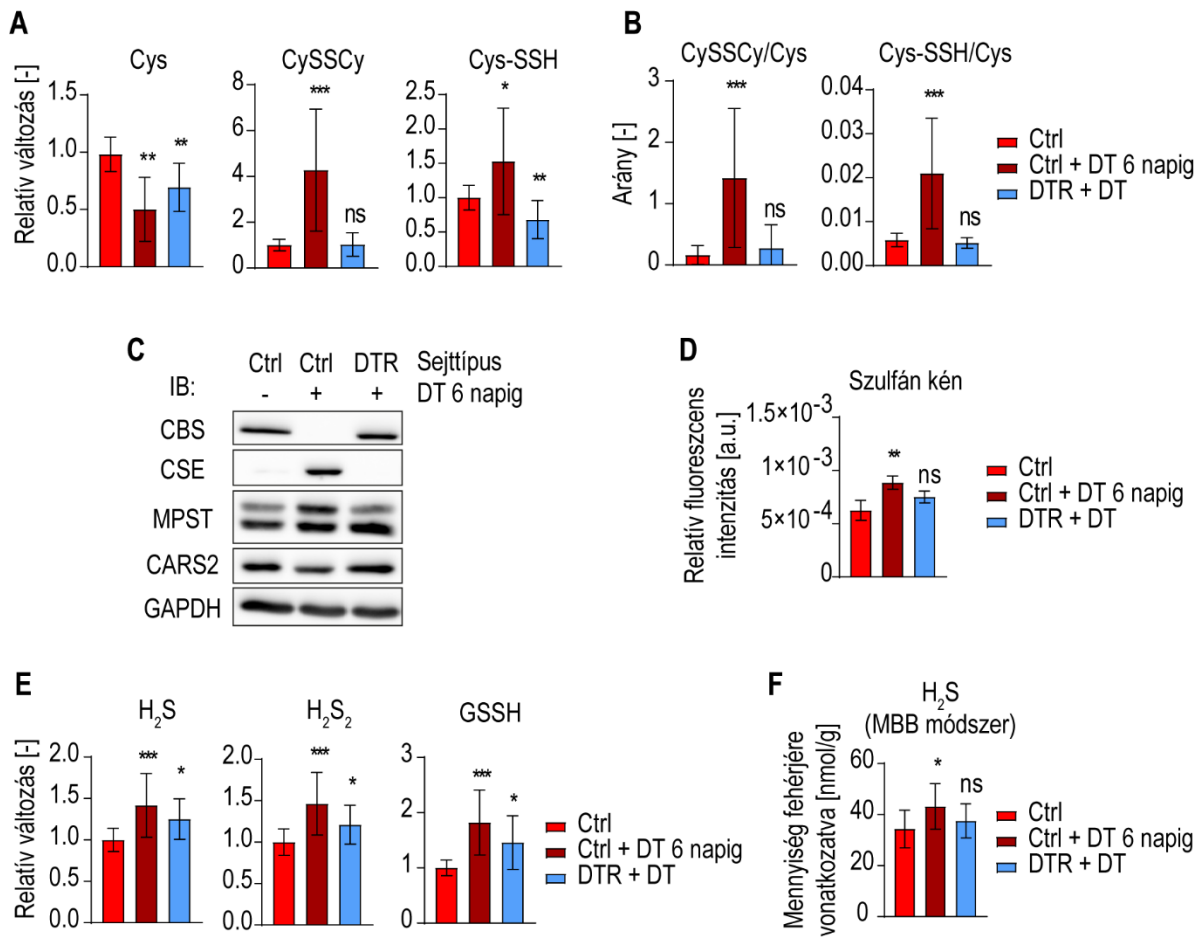
Hasonlóan Wang és munkatársai közleményéhez⁵⁶, a sejtek CySSCy felvételét vizsgálva azt találtuk, hogy mind a DT-vel kezelt, mind a DTR sejtek több CySSCy-t vettek fel az extracelluláris térből a terápia-naiv sejtekhez képest (9/D ábra). Továbbá az x_c^- antiportert gátló erastint olyan koncentrációban alkalmazva, mely a terápia-naiv kontroll sejtek osztódását nem befolyásolta (9/E ábra) a DT terápiával együttesen késleltetni tudtuk a rezisztencia kialakulását (9/F ábra). Ez azt mutatja, hogy nem csupán a rezisztens sejteknek, hanem a DT-vel kezelt perzisztens sejteknek is nagy szüksége van a CySSCy-re az életben maradáshoz és a szerzett rezisztencia kialakulásához.

A rezisztens sejtekben továbbá emelkedett intracelluláris GSH szinteket mértünk (9/G ábra), mely szintéziséhez a Cys elengedhetetlen szubsztrát. A GSH a GPX-ek és egyéb redox-aktív enzimek működése mellett szükséges a glutation-S-transzferáz (GST) fehérjék funkciójához, melyek a különböző xenobiotikumok közömbösítésében játszanak fontos szerepet, ezáltal hozzájárulva az egyes daganattípusokban a különböző rezisztenciamechanizmusokhoz^{121,122}. A GST-pí szintjét vizsgálva valóban azt találtuk, hogy a DT kezelés hatására megemelkedett és a rezisztens sejtekben is magasabb maradt, mint a kontroll sejtekben (9/H ábra), tehát valószínűsíthető, hogy a GSH-t a terápia alatt álló melanómasejtek részben a gyógyszermolekulák semlegesítésére használják.

6.4.2. A kéntartalmú metabolitok termelése

Ezt követően megvizsgáltuk, hogy az emelkedett CySSCy felvétel mellett hogyan befolyásolja a DT kezelés a melanómasejtekben a Cys anyagcseréjét. A felvételét követően a CySSCy a citoszólban a tioredoxin rendszer által hamar Cys-né redukálódik⁵⁷. A GSH szintézise mellett a Cys-t a sejtek számos redox aktív molekula szintézisére használják. Érdekes módon azonban a megemelkedett CySSCy felvétel ellenére az intracelluláris kéntartalmú metabolitok szintjét vizsgálva azt találtuk, hogy a Cys szintje sokkal alacsonyabb volt a DT-vel kezelt kontroll és a DTR sejtekben, mint a terápia-naiv sejtekben (10/A ábra). Az alapján, hogy a DT kezelés alatt álló sejtek több CySSCy-t vesznek fel mégis a Cys intracelluláris szintje alacsonyabb arra következtettünk, hogy DT kezelés hatására megemelkedik a Cys anyagcserefluxusa. Az intracelluláris CySSCy szinteket vizsgálva azt láttuk, hogy DT kezelés hatására a CySSCy szintje mintegy négyszeresére nőtt a kontroll sejtekhez képest (10/A ábra), és a CySSCy/Cys arány is jelentősen magasabb volt, mint normál körülmények között (10/B ábra). Ezek az észlelések összhangban állnak a korábban ismertetett eredményeinkkel, hogy DT kezelésre megnő a CySSCy felvétele és fokozódik az oxidatív terhelés, tehát eltolódik az oxidált/redukált arány.

Ezt követően megvizsgáltuk a Cys termelésében szerepet játszó transzszulfurációs út két fő enzimjének szintjét és meglepő módon azt találtuk, hogy DT kezelés hatására a CBS szintje jelentősen lecsökkent, míg a CSE szintje megnőtt. A DTR sejtekben egy ellentétes mintázatot figyeltünk meg, a CSE szintje lecsökkent, míg a CBS szintje megemelkedett a terápia-naiv kontroll szintjére (10/C ábra). Ez az észlelés azért volt érdekes, mert eddigi eredményeink alapján úgy tűnt, hogy a Cys szükséges a DT kezelés alatt álló sejtek túléléséhez, azonban a Cys termeléséhez (kanonikus funkció) a CSE és CBS fehérjék együttes működésére lenne szükség, hiszen ezek egymást követő reakciólépéseket katalizálnak (3. ábra, I-es és II-es reakciók).



10. ábra | **A** *cisztein-anyagcserében bekövetkezett változások DT kezelés következtében. (A-B)* Az intracelluláris cisztein (Cys), cisztin (CySSCy) és cisztein-perszulfid (Cys-SSH) intracelluláris szintjében (A) és oxidált/redukált arányában (B) bekövetkezett változások folyadékkromatográffal kapcsolt tandem tömegspektrométerrel történt. (C) A Cys, H₂S és Cys-SSH termelésében szerepet játszó fehérjék szintjének vizsgálata DT kezelés következtében és a rezisztencia kialakulása Western blot módszerrel. (D) A sejtek szulfán kén tartalmának vizsgálata DT kezelés hatására élősejtes fluoreszcens mikroszkópiával SSP4 festék használatával. (E-F) A H₂S, H₂S₂ és GSSH szintjének vizsgálata folyadékkromatográffal kapcsolt tandem tömegspektrométerrel (E) és fluoreszcens jelöléses kromatográfiás módszerrel (F) történt. A Western blot eredmények kiértékelése megtalálható a Függelékben.

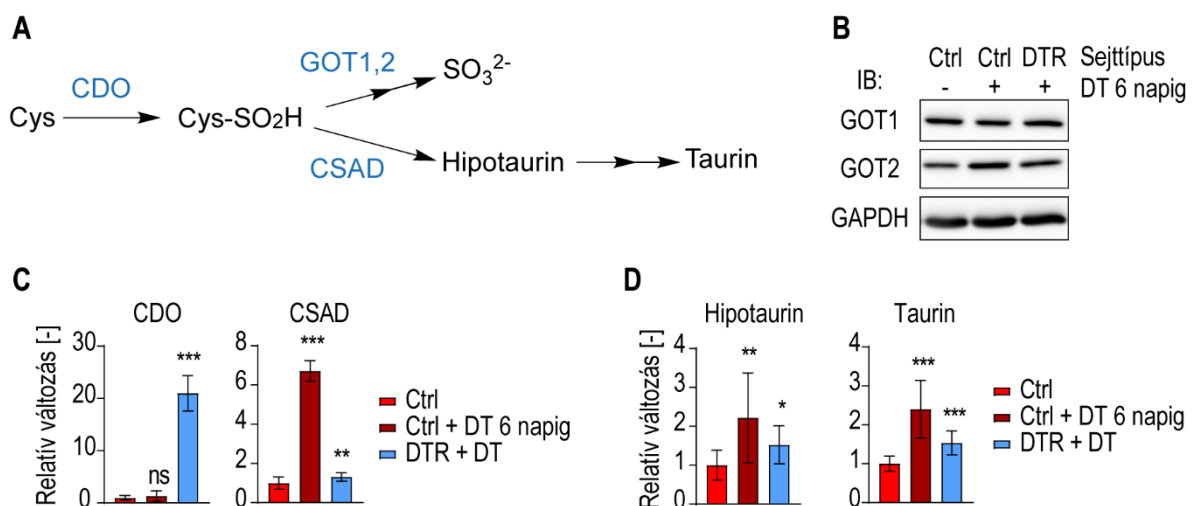
A CSE és a CBS kanonikus funkciójuk mellett szerepet játszanak a reaktív kén származékok termelésében egymástól függetlenül, különböző reakciólépéseken keresztül (3. ábra, III-IX. reakciók) ^{63,90}. Valóban a DT-vel kezelt sejtekben megemelkedett a szulfán kén mennyisége (10/D ábra), valamint a kis molekulatömegű Cys-SSH, a H₂S és a H₂S₂ szintjében emelkedést találtunk, míg a GSSH-nak mind a DT-vel kezelt, mind a DTR sejtekben magasabb szintjét mértük (10/A, F és G ábrák). Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a DT kezelés okozta változások a CSE és CBS szintjében valójában a reaktív kén származékokat termelő funkciójukhoz köthető.

A CSE és CBS mellett a merkaptó-piruvát-szulfur-transzferáz (MPST) fehérje is termel H₂S-ot ^{63,123,124} és szerepet játszik a fehérjék Cys oldalláncainak perszulfidációjában ^{95,96}. DT kezelés hatására a citoszolikus MPST szintje (felső sáv) enyhén megemelkedett (10/C ábra), ezáltal az MPST hozzájárulhat DT-vel kezelt sejtekben mért emelkedett H₂S szintekhez. Azonban a H₂S az MPST fehérjén keresztüli termeléséhez 3-merkaptopiruvátra van szükség, melyet a sejtek az aszpartát-amino-transzferáz (GOT) fehérjéken keresztül termelnek. Tekintettel arra, hogy az GOT-ok számára az aszpartát a preferált szubsztrát ^{95,125}, és ahogy korábban megmutattuk az aszpartát szintje DT kezelés hatására jelentős mértékben megnövekedett (8/B ábra), azt feltételezzük, hogy ilyen körülmények között nem a 3-merkaptopiruvát GOT-ok általi termelése lesz a meghatározó, tehát az emelkedett H₂S szint feltehetően nem az MPST-nek tulajdonítható.

Ezek alapján azt feltételeztük, hogy a CSE és CBS szintekben bekövetkezett változások mögött a reaktív kén származékok termelése áll, és általuk a melanómasejtek védelme és a sejtanyagcsere szabályozása.

6.4.3. A cisztein lebontó útvonal

A CDO a Cys-t cisztein-szulfinsavvá (Cys-SO₂H) alakítja, melyet vagy a GOT-ok alakítják tovább szulfittá, vagy a cisztein-szulfinsav-dekarboxiláz (CSAD) alakítja hipotaurinná. A hipotaurinból a hipotaurin-dehidrogenázon keresztül taurin képződik (11/A ábra), mely egy kéntartalmú aminosav kevésbé ismert onkológiai funkciókkal ¹²⁶. A GOT 1 és 2 enzimek szintjét vizsgálva nem találtunk különbséget DT kezelés hatására (11/B ábra). A CDO és CSAD expresszióját vizsgálva viszont azt találtuk, hogy DT kezelés hatására a CSAD expressziója 7-szeresére nőtt, míg DTR sejtekben a CSAD másfélszeresére, a CDO pedig mintegy 20-szorosára emelkedett (11/C ábra). Emellett mind a DT-vel kezelt, mind a DTR sejtekben a taurin és a hipotaurin emelkedett szintjét mértük (11/D ábra), mely összhangban áll az génextpressziós változásokkal. Ezen észlelések alátámasztják az intracelluláris Cys szintekben bekövetkezett csökkenést a DT kezelés alatt álló melanómasejtekben.

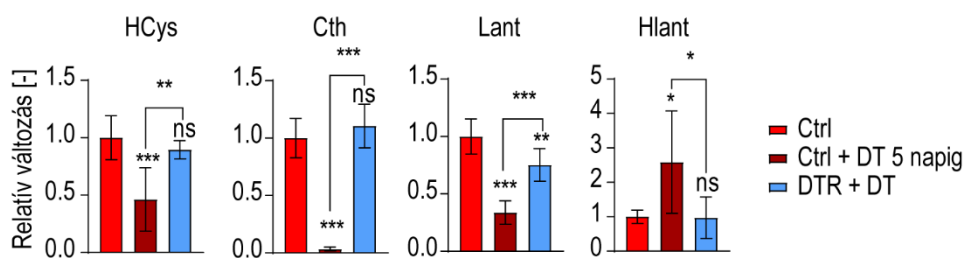


11. ábra | A cisztein lebontó útvonal vizsgálata a DT kezelés hatására. (A) Egyszerűsített ábra a cisztein lebontó útvonal működéséről. (B) Az aszpartát-amino-transzferáz 1, 2 (GOT1, 2) szintjének vizsgálata DT kezelés következtében Western blot módszer segítségével. (C) A cisztein-dioxigenáz (CDO) és a cisztein-szulfinsav-dekarboxiláz (CSAD) fehérjéket kódoló gének expressziójának vizsgálata reverz transzkripciós kvantitatív PCR segítségével DT kezelés hatására és a DTR sejtekben. (D) A DT kezelés és a szerzett rezisztencia következtében Cys lebontó útvonal során termelődő hipotaurin és taurin szintjében bekövetkezett változások mérése folyadékkromatográffal kapcsolt tandem tömegspektrométerrel történt. A Western blot eredmények kiértékelése megtalálható a Függelékben.

6.5. A transzszulfurációs út működésének mechanisztikus vizsgálata

6.5.1. A kéntartalmú metabolitok egyensúlyi szintjének vizsgálata

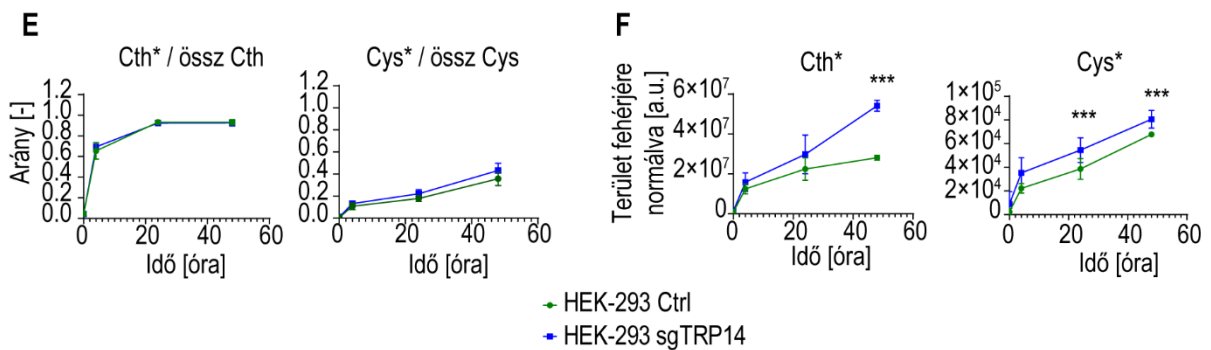
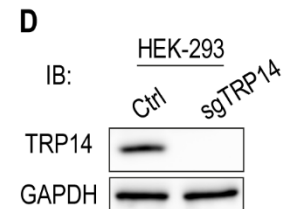
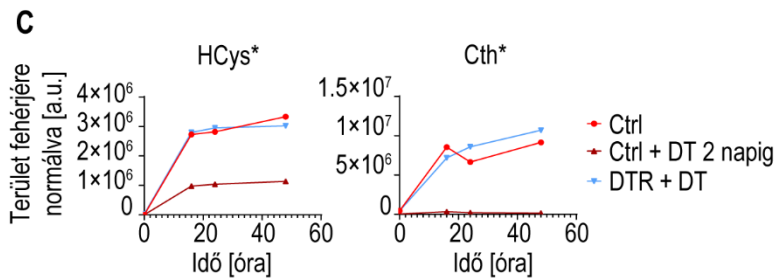
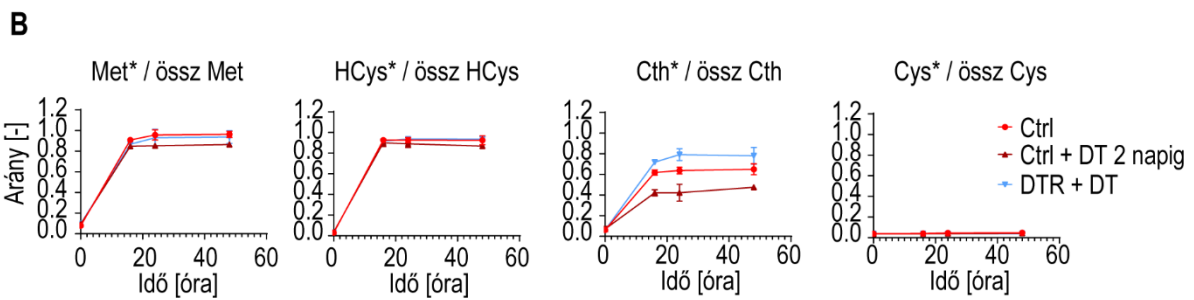
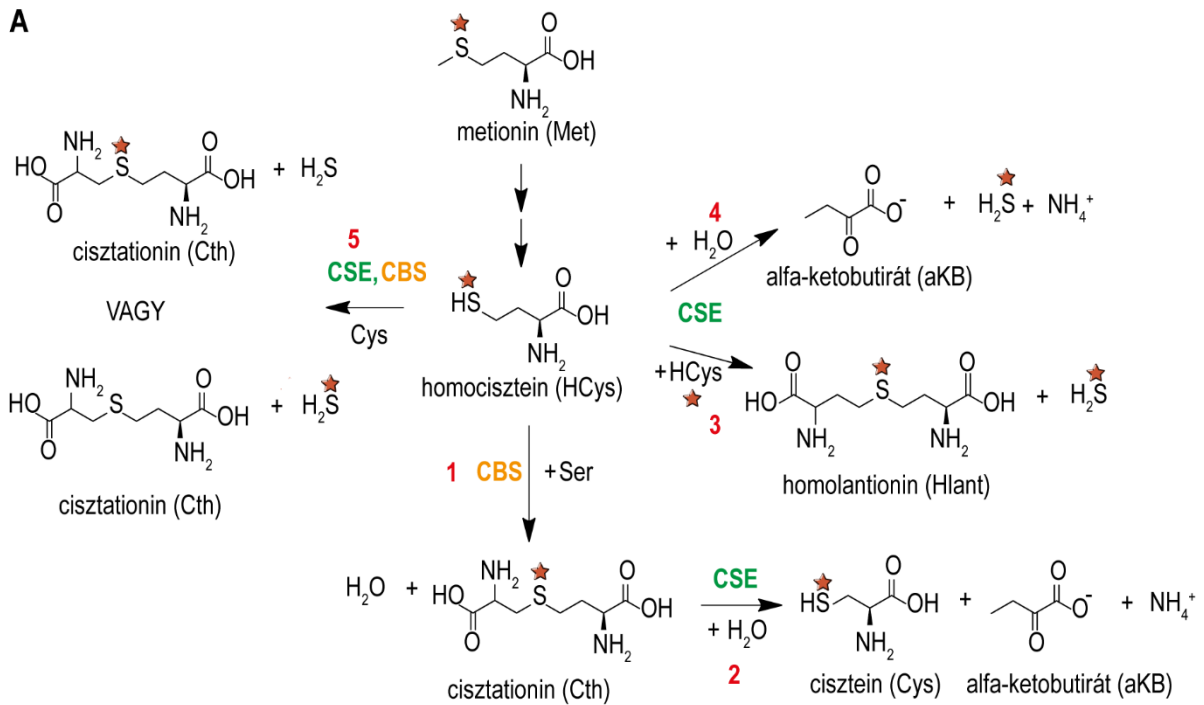
A Cys-anyagcserében bekövetkezett változások mélyebb megértése érdekében célzott metabolomikai vizsgálatot folytattunk. A Cys-anyagcserében szerepet játszó metabolitok közül a homocisztein (HCys), cisztationin (Cth) és lantionin (Lant) szintjében csökkenést tapasztaltunk a DT kezelés következtében (12. ábra). Ezek közül a Cth-t alig tudtuk detektálni a DT-vel kezelt kontroll sejtekben, mely a CSE és CBS kanonikus funkciója szempontjából összhangban áll az alacsony CBS (Cth-t termelő) és magas CSE (Cth-t fogyasztó) szintekkel (3. ábra, I. és II. reakció). Emellett ez azt is mutatja, hogy az emelkedett H₂S szintek hátterében nem a CSE Cys és HCys szubsztrátokból H₂S és Cth termelését végző reakciója (3. ábra, VI. reakció) áll. Más részről a homolantionint (Hlant) a sejt 2 HCys-ből termeli (3. ábra, VII. reakció), így a DT kezelés hatására a Hlant emelkedése és a HCys szint csökkenése azt mutatja (12. ábra), hogy a VII-es reakció hozzájárulhat az emelkedett H₂S termeléshez. A Lant szintén egy olyan kéntartalmú metabolit, melynek szintje a CSE és a CBS H₂S-ot termelő funkciójáról ad információt (3. ábra, V. reakció). A DT kezelésre bekövetkezett csökkenés a Lant szintjében arra utal, hogy nem ez a reakció felel az emelkedett H₂S termelésért. A DTR sejtekben a Cth és a Lant egyensúlyi szintje még mindig alacsonyabb volt, mint a kontroll sejtekben, viszont a DT-vel kezelt kontroll sejtekhez képest magasabb (12. ábra), mely a CBS részlegesen helyreállt funkciójára utal, a fehérjeszintekkel összhangban (10/C ábra). Bár a rezisztens sejtekben részlegesen helyreállt a CBS aktivitása, a Cth és Lant szintek alapján a rezisztens sejtekben megfigyelt emelkedett H₂S szintek nem az V. és VI. reakcióknak köszönhetőek (3. ábra).



12. ábra | A cisztein-anyagcserében szerepet játszó anyagcseretermékek vizsgálata DT kezelés következtében. A homocisztein (HCys), a cisztationin (Cth), a lantionin (Lant) és a homolantionin (Hlant) intracelluláris szintjében bekövetkezett változások vizsgálata folyadékkromatográffal kapcsolt tandem tömegspektrométerrel történt a DT-vel kezelt és a DTR A375 sejtekben.

6.5.2. A transzszulfurációs út vizsgálata jelölt metioninnal

Ahogy erről az előzőekben részletesen írtunk, a CSE és a CBS számos reakciót katalizálnak (13/A ábra). Annak érdekében, hogy a CSE és a CBS által katalizált reakciókat szelektíven vizsgálni tudjuk és ezáltal a DT kezelés következtében bekövetkezett változásokat a transzszulfurációs út működésében mélyebben megértsük, a sejtek médiumát kénizotóppal (^{34}S) jelölt metionint tartalmazó médiumra cseréltük és követtük a nehéz kén beépülését a különböző metabolitokba. A sejtekben 18 óra elteltével az összes jelöletlen Met és HCys lecserélődött a jelölt változatokra. A Met-ből keletkező jelölt Cys-t egyik esetben sem tudtuk detektálni (13/B ábra), ami azt jelenti, hogy normál sejtenyésztési körülmények között a Cys HCys-en és Cth-on keresztül Met-ből történő szintézise elhanyagolható. Ennek hátterében valószínűleg az áll, hogy a sejtmedium nagy koncentrációban ($200\ \mu\text{M}$) tartalmaz CySSCy-t, így a sejteknek célszerűbb felvenniük, mint több reakciólépésen keresztül előállítani. A jelölt/teljes Cth arány a kontroll és a DTR sejtekben nagyjából 60%-os volt, míg ez az arány a DT-vel kezelt kontroll sejtekben csupán 30% volt (13/B ábra). Ez összhangban áll azzal, hogy a DT-vel kezelt sejtekben a CSE túltermelése mellett a CBS szintje lecsökkent, tehát nem tudnak annyi Cth-t szintetizálni a HCys-ből és Ser-ből a CBS-en keresztül (13/A ábra, 1-es reakció), mely megmutatkozik a jelölt Cth alacsony szintjében (13/C ábra). Azonban a HCys-ből és a Cys-ből tudnak Cth-t termelni, hiszen ezt a reakciót a CBS mellett a CSE tudja katalizálni (13/A ábra, 5-ös reakció). Fontos kiemelni, hogy a Cth Cys-ből történő előállítása H_2S -ot is termel, ezáltal hozzájárulhat az emelkedett H_2S szinthez. A rezisztens sejtek a helyreállt CBS és az alacsony CSE szintek mellett képesek Cth-t szintetizálni HCys-ből és Ser-ből a CBS-en keresztül (13/A ábra, 1-es reakció), azonban azt nem tudják tovább alakítani Cys-né (13/A ábra, 2-es reakció). Ezek az észlelések alátámasztják az egyensúlyi szintek alapján vont konklúziókat.

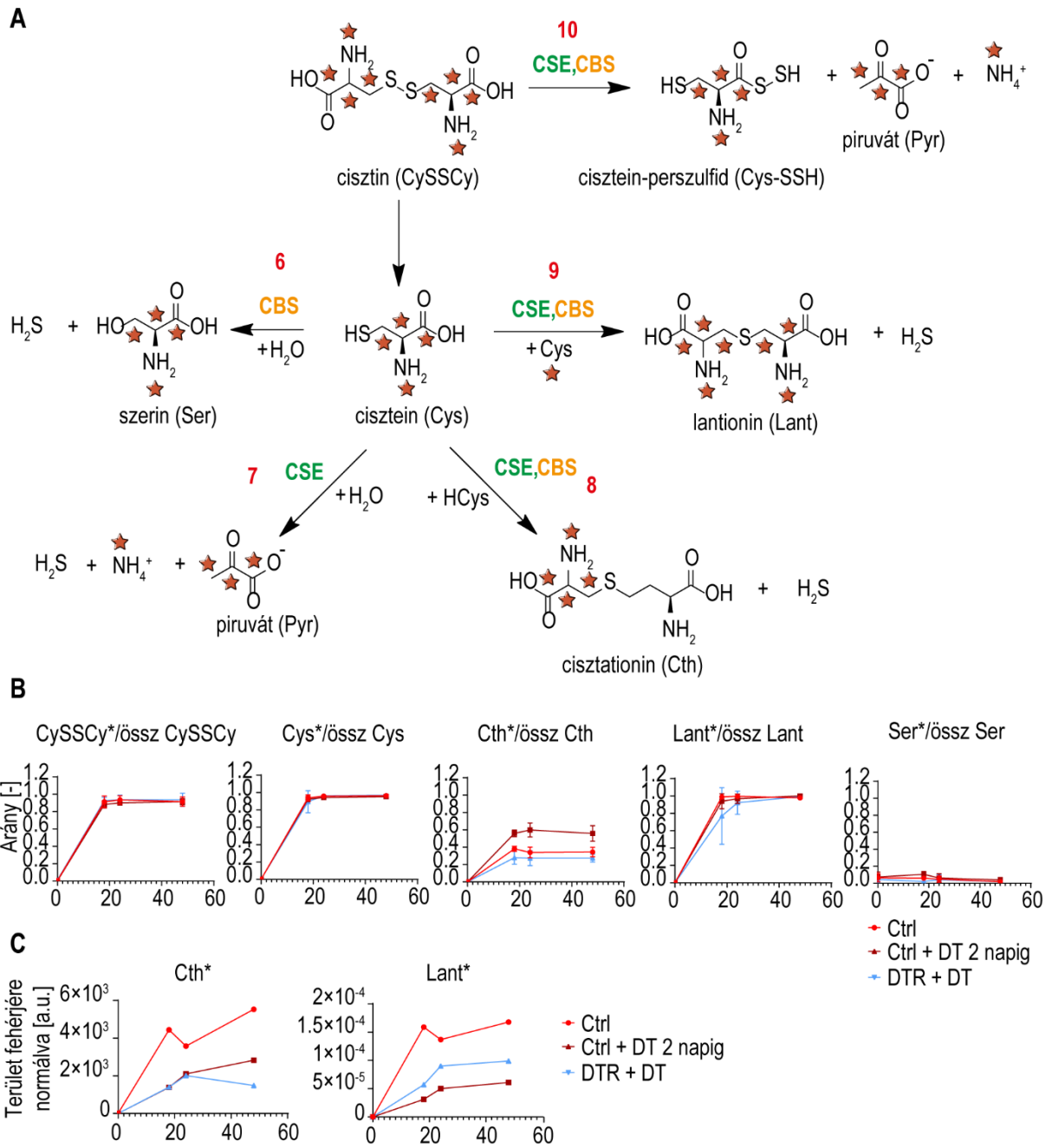


13. ábra | *A transzszulfurációs enzimek működésének vizsgálata jelölt metioninnal. (A) A CSE és a CBS által katalizált reakciólépéseket bemutató egyszerűsített ábra, mely a nehéz kénizotóp (piros csillag) egyes anyagcseretermékekbe történő beépülését követi. (B-C) A jelölt (*) és jelöletlen metionin (Met), homocisztein (HCys), cisztationin (Cth) és cisztein (Cys) intracelluláris szintjét folyadékromatográffal kapcsolt tömegspektrométerrel mértük, majd a jelölt analitok összmennyiséghez vett arányát (B) és az intracelluláris egyensúlyi szintjét (C) ábrázoltuk. (D) A TRP14 génkiütés hatékonyságának ellenőrzése a kontroll és a TRP14 hiányos (sgTRP14) HEK-293 sejtvonalakban Western blot segítségével. Az egyenletes feltöltés ellenőrzésére GAPDH antitestet használtunk. (E-F) A nehéz kénizotóp beépülésének vizsgálata a Cth-ba és a Cys-be a kontroll és a TRP14 hiányos (sgTRP14) HEK-293 sejtvonalakban CySSCy csökkentett (4 μ M a sejtmediumban) körülmények között. A méréseket folyadékromatográffal kapcsolt tandem tömegspektrométer segítségével végeztük, az analitok összmennyiséghez vett arányát (E) és az egyensúlyi szinteket (F) ábrázoltuk.*

A sejtmediumban valóban nagy koncentrációban tartalmaz CySSCy-t, ezért nem meglepő, hogy normál tenyésztési körülmények között a Cys Met-ből történő szintézise nem jelentős. Ahhoz azonban, hogy a sejtek a CySSCy-t Cys-né tudják redukálni, szükség van a Trx rendszerre, illetve közvetlenül a TRP14 fehérje működésére (2. ábra). Mint megmutattuk, a DT kezelés hatására a TRP14 szintje több redox enzimmel együtt jelentős mértékben megemelkedett (7/A ábra). Egy másik tanulmány keretein belül HEK-293 embrionális vese sejtvonalon megmutattuk, hogy amennyiben az *in vivo* körülmények között elérhető mennyiséghez hasonló koncentrációban adunk CySSCy-t a sejteknek (200 μ M helyett 4 μ M-t), akkor a kanonikus útvonal működése jelentős mértékben megemelkedik. Ezek a kísérletek elsősorban a TRP14 génkiütés transzszulfurációs út működésére kifejtett hatásának vizsgálatát célozták, melyhez kontroll és TRP14 hiányos (sgTRP14) sejtvonalakat használtunk (13/D ábra). A melanómasejtekkel ellentétben, melyeket normál mediumban tenyésztettük, alacsonyabb CySSCy elérhetőség mellett a HEK-293 sejtek teljes Cth készlete lecserélődött a jelölt metabolitra (13/E ábra). Továbbá jelölt kén Cys-be történő beépülése is megemelkedett már 48 órával a kezelést követően (13/E ábra). Az egyensúlyi szinteket összehasonlítva azt találtuk, hogy a TRP14 hiányos (sgTRP14) sejtekben mind a jelölt Cth mind a jelölt Cys mennyisége megemelkedett (13/F ábra). Ez azt jelzi, hogy a TRP14-nek valóban fontos szerep jut a Cys-szükséglet fedezésében, hiszen hiányában a sejtek fokozott mértékben állították elő a Cys-t a kanonikus útvonal által, hogy a megfelelő Cys-szükségletüket biztosítani tudják ¹²⁷.

6.5.3. A transzszulfurációs út vizsgálata jelölt cisztin-izotóppal

A CBS és a CSE reaktív kén származékokat termelő funkcióinak vizsgálata érdekében a következő kísérletekben a sejtmediumot olyan változatra cseréltük, melyben nehéz nitrogént és nehéz szén tartalmazó CySSCy izotóp van, és vizsgáltuk a jelölt szén- és nitrogénváz beépülését a különböző anyagcseretermékekbe (14/A ábra). A vizsgált időpontokban a sejtek teljes CySSCy és Cys készlete lecserélődött a jelölt metabolitokra. Azt találtuk, hogy normál tenyésztési körülmények között (tehát 200 μ M CySSCy-t tartalmazó sejtmediumban) a Lant és a Cth Cys-ből történő termelése jelentős volt, míg a szerin termelése elhanyagolhatónak bizonyult (14/B ábra). A jelölt Lant és Cth egyensúlyi szintjeit vizsgálva azt állapítottuk meg, hogy a kontroll sejteknél ezen reakciók sokkal markánsabban voltak jelen, mint a DT-vel kezelt kontroll és a rezisztens sejtekben (14/C ábra). Ez azonban azt jelenti, hogy nem ezek a reakciók állnak a kezelés alatt álló perzisztens és rezisztens sejtekben észlelt emelkedett H₂S szintek mögött. A jelölt Cth össz mennyiséghez vett arányát vizsgálva a jelölt metioninos kísérlethez hasonlóan azt találtuk, hogy a kontroll és a rezisztens sejtekben a Cth mintegy 60%-ban a HCys-en keresztül metioninból termelődött, míg csupán 40%-ban Cys-ből. A DT-vel kezelt sejtek esetén ez az arány megfordult, a kezelés alatt álló sejtekben lévő Cth 60%-a Cys-ből származott. Ez azzal is magyarázható, hogy a Cth HCys-ből történő termeléséért kizárólag a CBS felel, míg Cys-ből a CSE is elő tudja állítani.



14. ábra | *A transzszulfurációs enzimek működésének vizsgálata jelölt cisztinnel. (A) A CSE és a CBS által katalizált reakciólépéseket bemutató egyszerűsített ábra, mely a nehéz szén- és nitrogénizotóp (piros csillag) egyes anyagcseretermékekbe történő beépülését követi. (B-C) A jelölt (*) és jelöletlen cisztin (CySSCy) cisztein (Cys), cisztationin (Cth), lantionin (Lant) és szerin (Ser) intracelluláris szintjét folyadékkromatográffal kapcsolt tandem tömegspektrométerrel mértük, majd a jelölt analitok összmenységhez vett arányát (B) és az intracelluláris egyensúlyi szintjét (C) ábrázoltuk.*

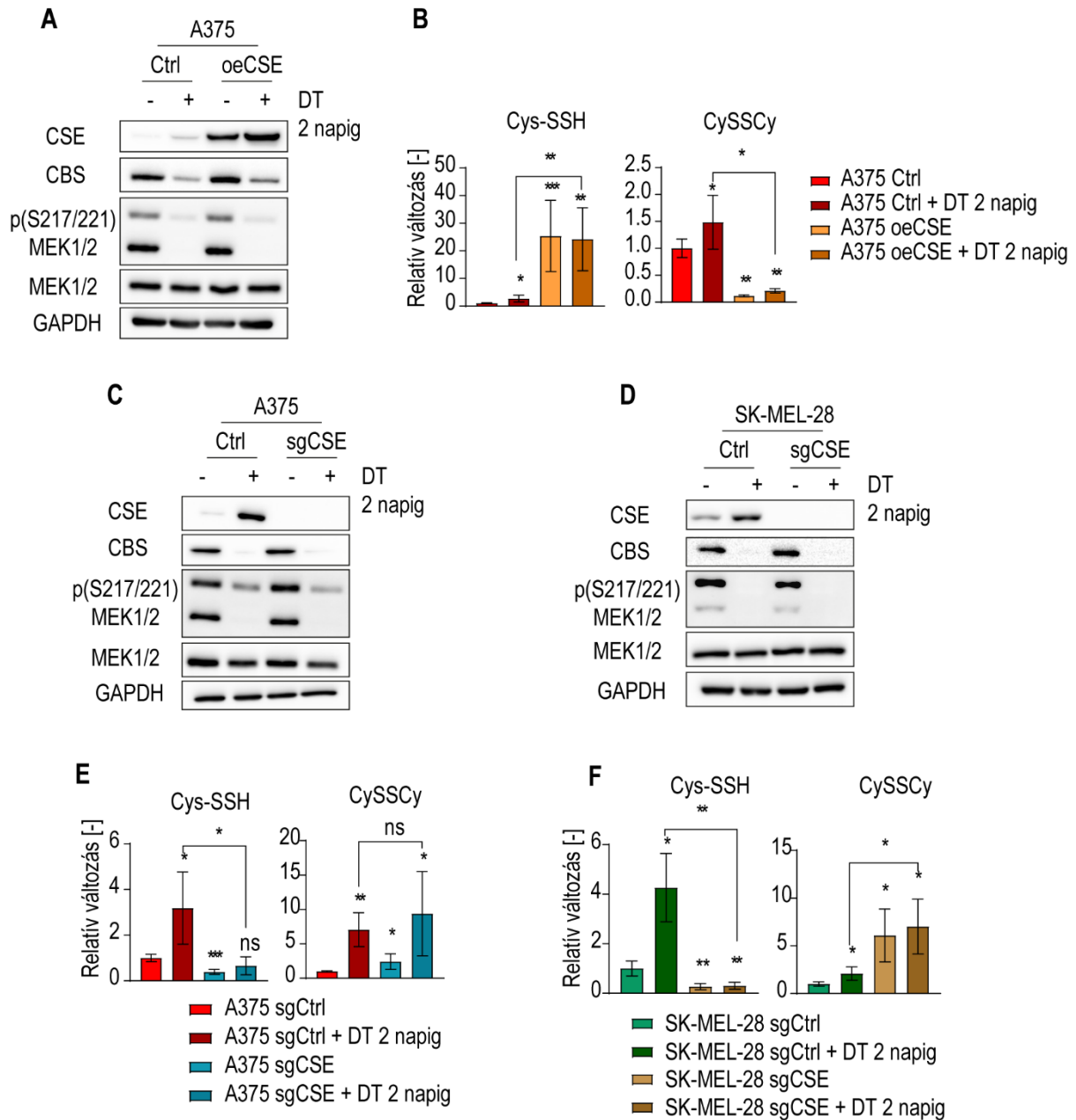
6.5.4. A kis molekulatömegű cisztein-perszulfid termelése

Ida és munkatársai korábban megmutatták, hogy a CBS és a CSE CySSCy-ből közvetlenül tudnak kis molekulatömegű Cys-SSH-t előállítani (3. ábra, IX-es reakció) ⁶³, mely transzperszulfidációs reakciókon keresztül más tiol-származékok perszulfidációját okozhatja, ezáltal emelve a H₂S szintjét ^{98,128}. Bár a CySSCy mintegy 100-szor jobb szubsztrátja a CSE-nek mint a Cys ⁶³, kinetikai szimulációk azt sugallták, hogy fiziológiai körülmények között ez a reakció elhanyagolható, ugyanis a CySSCy intracelluláris koncentrációja alacsony, míg a CSE másik két szubsztrátja, a Cys és a Cth szintje magas. Olyan rendszerben azonban, ahol a CySSCy/Cys arány megemelkedik, például oxidatív terhelés következtében, ez a reakció hozzájárulhat az emelkedett Cys-SSH termeléséhez ⁹⁰.

Ehhez hasonlóan DT kezelés hatására azt találtuk, hogy a CySSCy/Cys arány megemelkedett (10/B ábra), míg a Cys és a Cth szintje jelentősen lecsökkent (10/A és 12. ábrák), így a DT-vel kezelt sejtek esetén ennek a reakciónak fontos szerep juthat. Ez a feltételezés megmagyarázná azt a látszólagos ellentmondást, hogy bár a DT-vel kezelt sejtek több CySSCy-t vesznek fel (9/D ábra) és érzékenyek a CySSCy felvételéért felelős transzporter gátlására (9/F ábra), mégis bontják az intracelluláris Cys-t a CDO útvonal által (11/B-C ábrák). Az xc⁻ antiporter biztosítja a magas CySSCy ellátást, CDO útvonal fokozott expressziója biztosítja az alacsony Cys szinteket és ezáltal a magas CySSCy/Cys arányt okoz (10/B ábra), míg az alacsony CBS szint (10/C ábra) révén lecsökken a Cth szintje (12. ábra). Tehát a DT kezelés esetén a csökkent Cys és Cth szintek és az emelkedett CySSCy szint következtében a Cys-SSH termelése a CSE enzim által a CySSCy-t használva szubsztrátként lehet az oka az emelkedett perszulfid szinteknek (3. ábra, IX-es reakció).

Annak érdekében, hogy a CSE CySSCy-ből Cys-SSH-ot termelő funkciójának jelentőségét a DT kezelés során megvizsgáljuk, létrehoztunk egy olyan génmódosított sejt vonalat, mely túltermeli a CSE-t, illetve egy-egy olyan vonalat, melyből a CSE génjét kiütöttük. A CSE-t túltermelő A375 sejt vonalban (15/A ábra) azt találtuk, hogy a túltermelés hatására a CySSCy (szubsztrát) szintje lecsökkent, míg a Cys-SSH (termék) szintje megemelkedett (15/B ábra). A CSE-hiányos A375 sejtekben (15/C ábra) a CySSCy szintje a terápia-naiv CRISPR kontroll (*single-guide* Ctrl, sgCtrl) sejtekhez képest megemelkedett, míg a Cys-SSH szintje lecsökkent. Továbbá a DT kezelés hatására történő emelkedés a Cys-SSH szintben a CSE-hiányos sejtekben nem történt meg (15/E ábra). Az SK-MEL-28 sejteknél (15/D ábra) mind a DT-vel kezelt, mind a terápia-naiv CSE-hiányos sejtekben megemelkedett a CySSCy szintje, miközben a Cys-SSH

szintje lecsökkent, és ezekben a sejtekben DT kezelés hatására sem emelkedett meg (15/F ábra). Összefoglalva ezek a kísérletek azt mutatják, hogy a CSE túlermelése növeli, míg a CSE hiánya csökkenti a Cys-SSH termelését. Ezen eredmények egyértelműen alátámasztják, hogy a DT kezelés hatására emelkedett CSE szintek felelősek a Cys-SSH emelkedett szintjéért a 3. ábra IX. reakciója szerint.

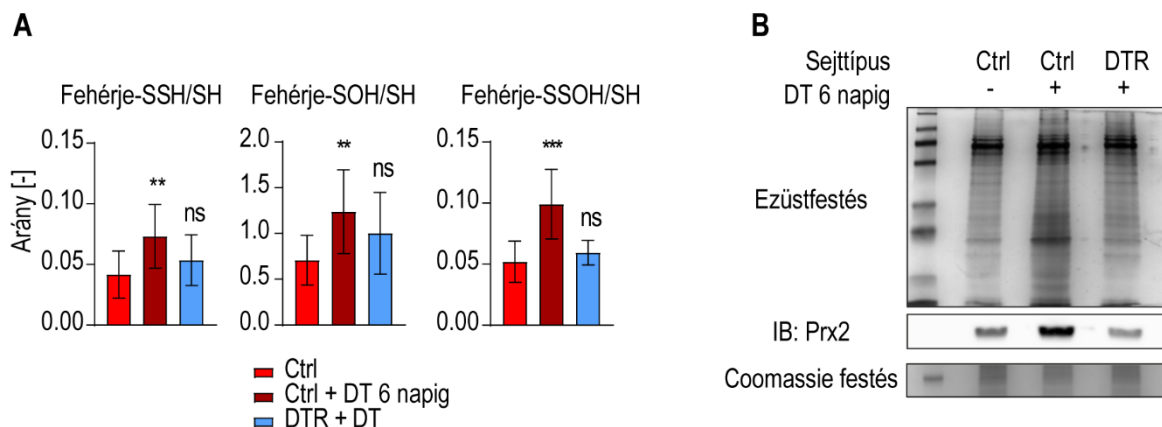


15. ábra | A CSE cisztein-perszulfidot termelő funkciójának vizsgálata génmódosított melanóma sejtvonalak használatával. (A) A CSE és a CBS szintjének ellenőrzése a kontroll és a CSE-t túltermelő (oeCSE, overexpressing CSE) A375 sejtvonalban terápia-naiv és DT-vel kezelt körülmények között Western blot technikával. **(B)** A kis molekulatömegű cisztein-perszulfid (Cys-SSH) és a cisztin (CySSCy) intracelluláris szintjének mérése kontroll és oeCSE A375 sejtekben terápia-naiv és DT-vel kezelt körülmények között folyadékkromatográffal kapcsolt tandem tömegspektrométerrel történt. **(C-D)** A CSE és a CBS szintjének ellenőrzése CRISPR kontroll (sgCtrl, single guide Ctrl) és CSE-hiányos (sgCSE, single guide CSE) A375 **(C)** és SK-MEL-28 **(D)** sejtvonalakban kontroll és DT-vel kezelt körülmények között Western blot technikával. **(E-F)** A kis molekulatömegű Cys-SSH és CySSCy intracelluláris szintjének mérése sgCtrl és sgCSE A375 **(E)** és SK-MEL-28 **(F)** sejtvonalakban kontroll és DT-vel kezelt körülmények között folyadékkromatográffal kapcsolt tandem tömegspektrométerrel történt. A Western blot eredmények kiértékelése megtalálható a Függelékben.

6.6. A fehérje perszulfidáció védő szerepe

A DT-vel kezelt és a DTR sejtekben a H_2S , a H_2S_2 és a GSSH emelkedett szintje védelmet nyújthat a metallofehérjék által indukált oxidatív stresszel szemben⁷⁵ és az oxidatív stressz által kiváltott ferroptózis ellen^{93,94}. Emellett a fehérjék Cys oldalláncainak perszulfidációja megvédi működésüket az oxidatív stressz során, hiszen perszulfidok oxidációja reverzibilis, ezek redukálhatók a natív tiol formává (4. ábra)^{98,99}. Annak érdekében, hogy a fehérje perszulfidáció szerepét a melanómasejtek DT kezeléssel szembeni védelmében megvizsgáljuk, először megnéztük a fehérje perszulfidáció mértékét tömegspektrometriai módszer⁹¹ és a kutatócsoportunk által korábban fejlesztett ProPerDP (*Protein Persulfide Detection Protocol*) módszer¹¹⁴ használatával. Azt találtuk, hogy a kis molekulatömegű Cys-SSH szintekhez hasonlóan a fehérje perszulfidáció szintje is megemelkedett DT kezelés hatására, azonban a DTR sejtekben visszacsökkent a terápia-naiv kontroll sejtekben mért szintre (16/A és B ábrák). Továbbá a DT-vel kezelt sejtekben a fehérje-szulfénsav (fehérje-SOH) és a -per-tio-szulfénsav (fehérje-SSOH) szintje is megemelkedett (16/A ábra), melyek a tiolok és a perszulfidok oxidációs termékei. Az emelkedett -SOH és -SSOH szintek összhangban állnak a DT kezelésre bekövetkezett oxidatív stresszel (6/B-C ábrák), mely a fehérjék perszulfidációjának emelkedéséhez vezet, hogy megvédje a fehérjéket az oxidatív károsodás okozta degradációtól. A mért módosulatok szintjében bekövetkezett változások összhangban vannak ezzel a modellel.

A DT kezelés következtében nem csak a teljes perszulfid frakcióban láttunk emelkedést, hanem az ezüstoffestés azt is megmutatta, hogy bizonyos molekulatömegű fehérjék esetén a perszulfidáció mértéke még inkább emelkedett. Ezért ezeknél a molekulatömegeknél izoláltuk a fehérjéket a kivágott gélcsíkokból, és proteomikai megközelítéssel azonosítottuk őket. A perszulfidált fehérjefrakciót proteomikai megközelítéssel vizsgálva azt találtuk, hogy a perszulfidált fehérjék között számos stresszválaszban fontos fehérje szerepelt, például a kataláz, fehérje-diszulfid-izomerázok, hősokk-fehérjék és a Prx-ek. Ezek közül immunoblot technikával sikerült megerősítenünk a Prx2 emelkedett perszulfidációját DT kezelés hatására (16/B ábra). Mivel a perszulfidáció megvédi a Prx-ek tiol oldalláncait az irreverzibilis oxidációtól, a Prx-ek perszulfidációjának emelkedett szintje megmagyarázza, hogy a korábbi kísérletünk során a DT kezelés önmagában miért nem vezetett az irreverzibilisen oxidált formák felhalmozódásához (6/B ábra). Ezek az eredmények azt mutatják, hogy az emelkedett Cys-SSH szintek a fehérje perszulfidáció emelkedéséhez vezetnek, melyek megvédik a fehérje Cys oldalláncokat a DT kezelés okozta oxidatív stressztől, ezáltal elősegítve a perziszter sejtek túlélését, és hosszú távon a rezisztencia kialakulását.

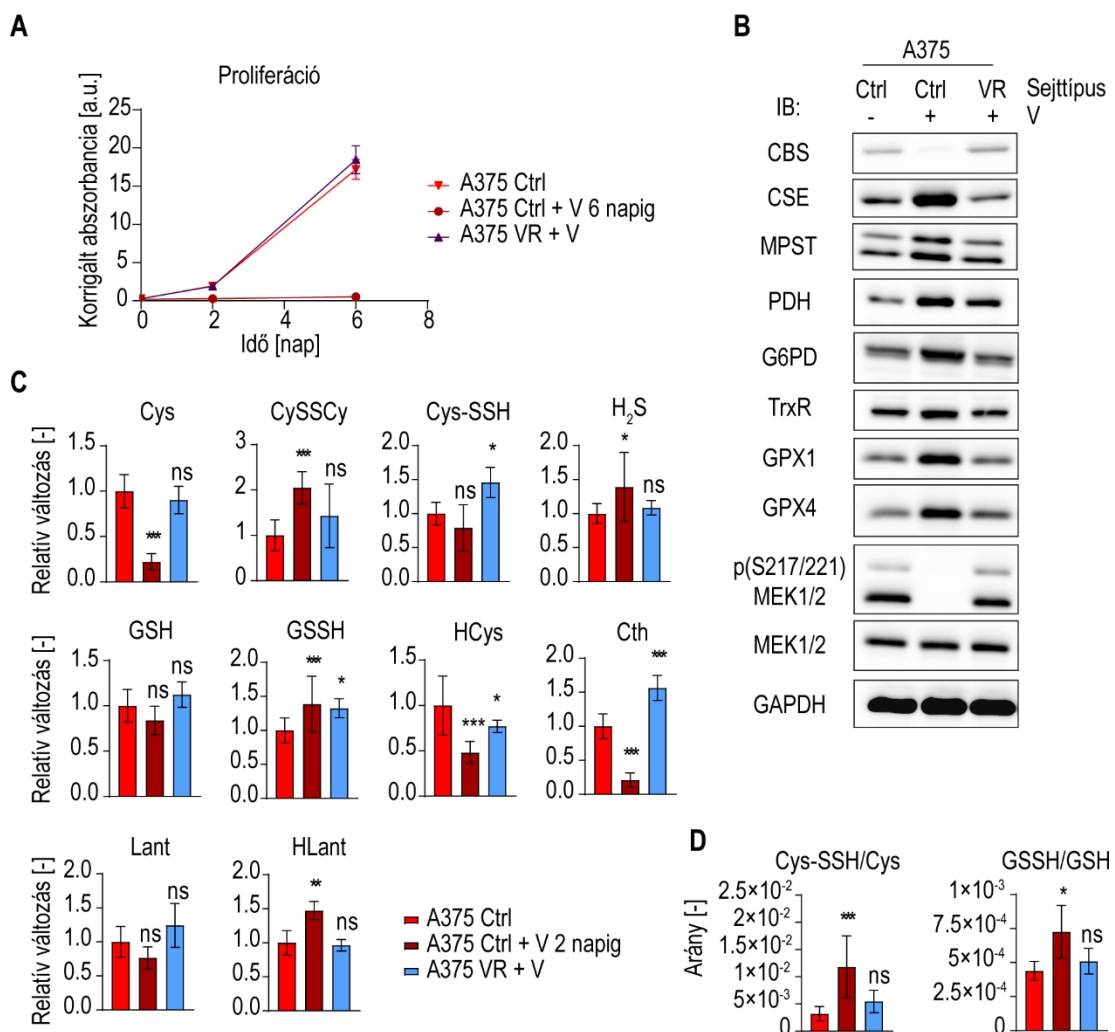


16. ábra | A fehérje perszulfidáció vizsgálata a DT kezelés és a DT rezisztencia kialakulása során. (A) A fehérjék perszulfid (-SSH), szulfénsav (-SOH) és per-tio-szulfénsav (-SSOH) módosulatainak szintjét folyadékromatográffal kapcsolt tandem tömegspektrométerrel mértük. A kapott értékeket az teljes tiol (-SH) mennyiséggel korrigáltuk. (B) A fehérje perszulfidációt a ProPerDP módszerrel mértük. A teljes perszulfid frakciót ezüstoffestéssel, a perszulfidált peroxiredoxin 2 (Prx2) szintjét Western blottal mértük, míg a lizátum teljes fehérjetartalmát Coomassie festéssel ellenőriztük. A Western blot és az ezüstoffestés eredményének kiértékelése megtalálható a Függelékben.

6.7. A MAPK útvonal gátlásának vizsgálata más modellrendszerekben

6.7.1. A vemurafenib kezelés hatásának vizsgálata A375 sejtvonalban

Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk, hogy a DT kezelés hatására tapasztalt változások mennyire általánosak, létrehoztunk egy vemurafenibre rezisztens (VR) A375 sejtvonalat (17/A ábra). Az A375 sejtvonalat vemurafenibbel kezelve hasonló eredményeket kaptunk, mint a DT-vel való kezelés esetén. Röviden összefoglalva, a V kezelés szintén a redox védelmi fehérjék, a TrxR1, GPX1 és 4 és G6PD emelkedett szintjéhez vezetett, továbbá emelte a CSE szintjét, miközben a CBS szintje lecsökkent (17/B ábra). A V kezelés következtében továbbá emelkedést találtunk a CySSCy, a H₂S, a Hlant és a GSSH szintjében, illetve a Cys-SSH/Cys arányban, míg a Cys, HCys, Lant és Cth egyensúlyi szintje lecsökkent (17/C ábra). A VR sejtek esetén azonban a DTR sejtekkel ellentétben emelkedést tapasztaltunk a Cth szintjében, mely emelkedett CBS aktivitásra utal. Ettől eltekintve a VR sejtek esetén a legtöbb változás hasonló volt a DTR sejtekhez.

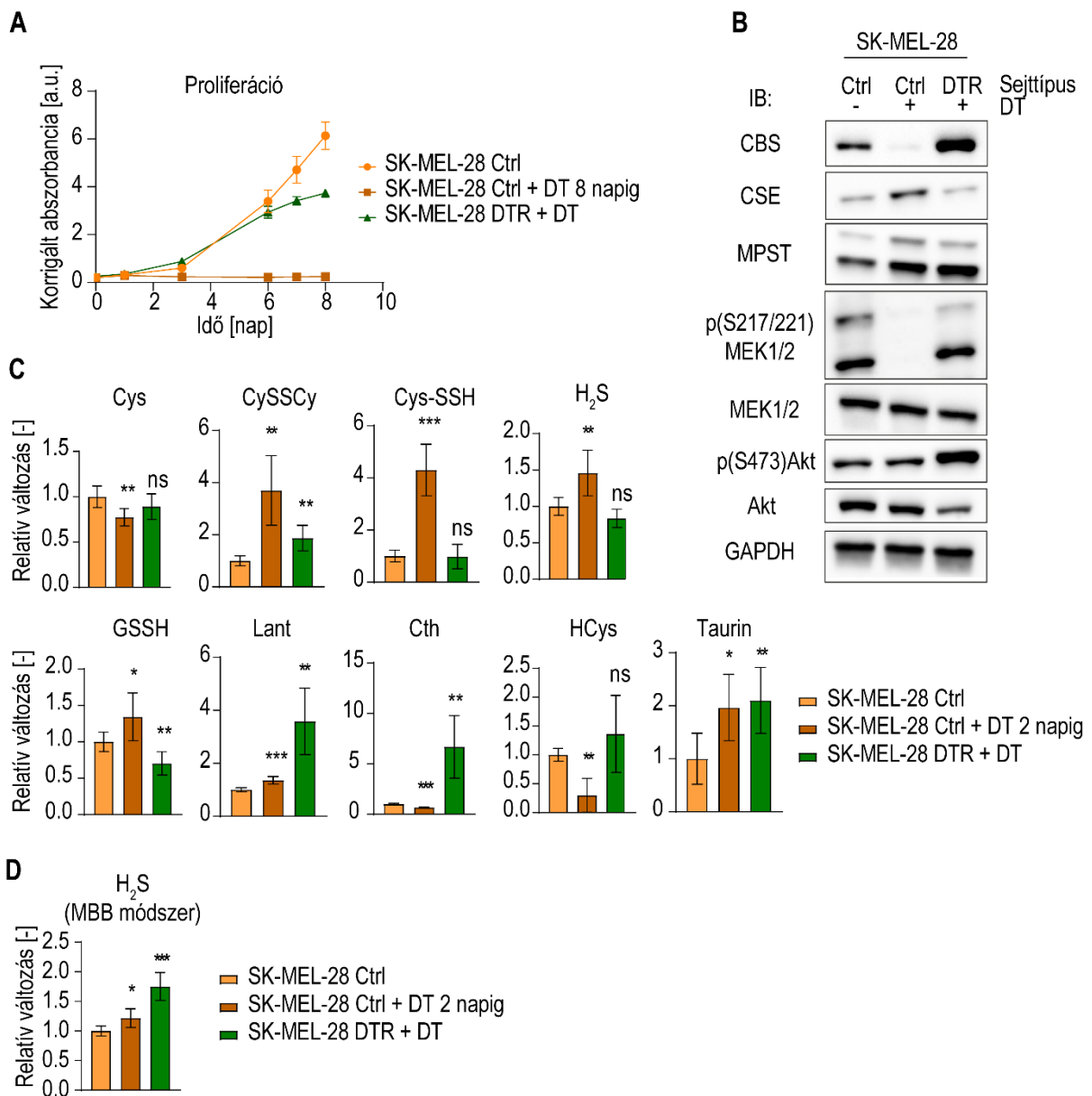


17. ábra | A vemurafenib kezelés redox rendszerekre kifejtett hatásának vizsgálata A375 melanómasejtekben. (A) A vemurafenibre rezisztens (VR) sejtvonal és a V-vel kezelt, illetve a kontroll A375 sejtek osztódásának összehasonlítása SRB módszerrel. (B) A V-vel történő kezelés cisztein (Cys) és H₂S anyagcserében, illetve a redox védelemben szerepet játszó fehérjék expressziójára kifejtett hatásának vizsgálata Western blot módszerrel. (C-D) A Cys és H₂S anyagcseretermékeinek vizsgálata V-vel történő kezelés hatására és a VR sejtekben folyadékkromatográffal kapcsolt tandem tömegspektrométerrel történt. Az analitok egyensúlyi szintjében bekövetkezett relatív változások (C) és arányok ábrázolása (D). A Western blot eredmények kiértékelése megtalálható a Függelékben.

6.7.2. A DT kezelés hatásának vizsgálata az SK-MEL-28 sejtvonalban

Ahhoz, hogy a MAPK inhibitor terápia melanómasejtekre gyakorolt hatását általánosítani tudjuk, a legfontosabb kísérleteket elvégeztük SK-MEL-28 sejtvonalon is. Az SK-MEL-28 sejtvonalat DT-vel kezelve DTR sejtvonalat hoztunk létre (18/A ábra). Az A375 sejtvonalhoz hasonlóan azt találtuk, hogy a DT kezelés az SK-MEL-28 sejtvonalban is a CBS szintek csökkenéséhez, és a CSE (18/B ábra), illetve a reaktív kén származékok emelkedett szintjéhez vezetett (18/C-D ábra). Továbbá a korábbiakhoz hasonlóan emelkedést találtunk a taurin szintjében, míg a Cth, a Lant és a Cys szintje lecsökkent.

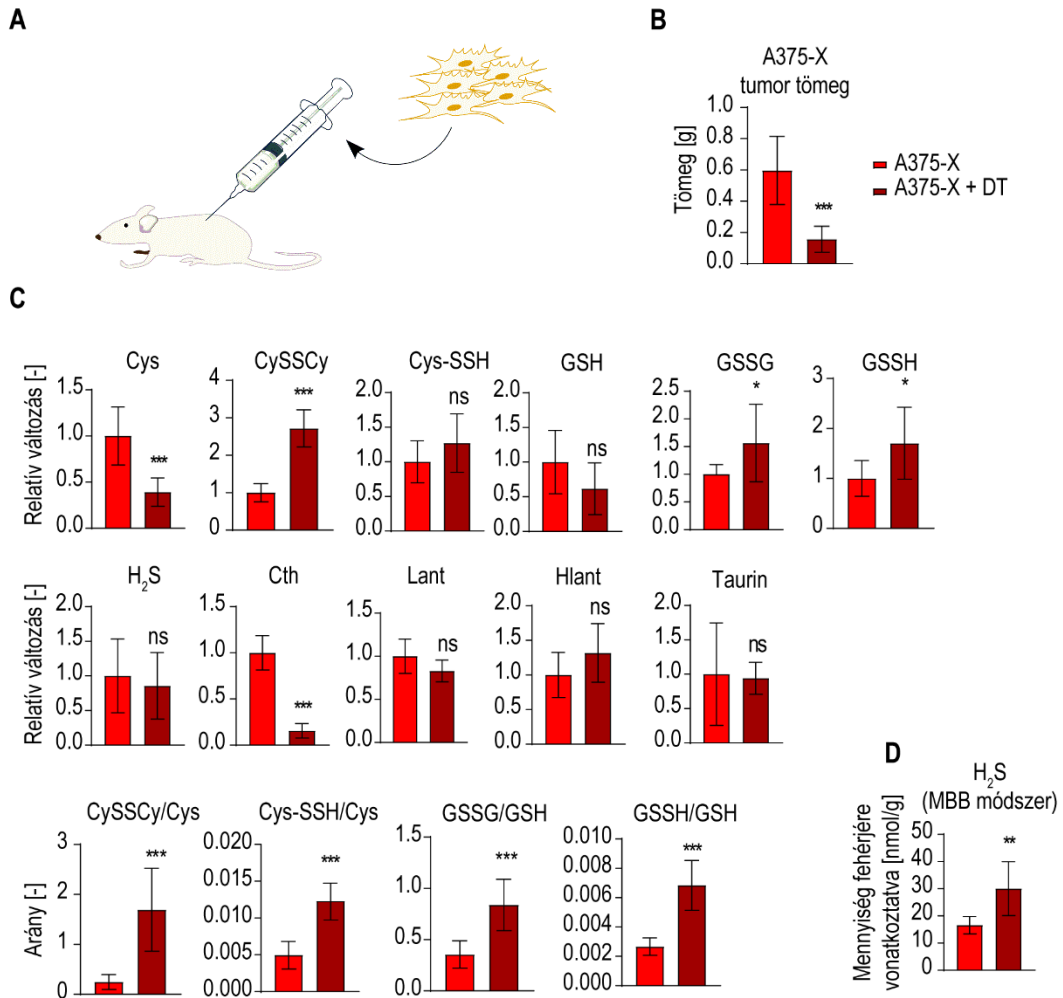
A VR sejtekhez hasonlóan a DTR SK-MEL-28 sejtekben is emelkedést tapasztaltunk a Cth szintjében, viszont ebben az esetben a Cth szint emelkedése sokkal markánsabb volt és emelkedett Lant és CBS szintekkel párosult (18/C ábra). Ez arra utal, hogy az SK-MEL-28 sejtvonal esetén a MAPK inhibitorokkal szembeni rezisztencia kialakulásához nem elegendő a CBS aktivitásának helyreállítása, hanem magasabb CBS aktivitás szükséges. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a DTR SK-MEL-28 sejtvonalban az emelkedett CBS szint hozzájárulhat az emelkedett H₂S szinthez a 3. ábra V. és VI. reakciói szerint.



18. ábra | A DT kezelés kénanyagcserére kifejtett hatásának vizsgálata SK-MEL-28 sejtvonalban. (A) Az általunk létrehozott DTR SK-MEL-28 sejtvonal osztódását a DT-vel kezelt és terápia-naiv kontroll sejtekhez hasonlítottuk SRB módszerrel. (B-D) A DT kezelés cisztein (Cys) és H₂S anyagcseréjében szerepet játszó fehérjék expressziójára kifejtett hatását Western blot módszerrel mértük (B), míg a metabolitok egyensúlyi szintjében bekövetkezett változásokat folyadékkromatográffal kapcsolt tandem tömegspektrométerrel (C), illetve fluoreszcens detektálással (D) mértük. A Western blot eredmények kiértékelése megtalálható a Függelékben.

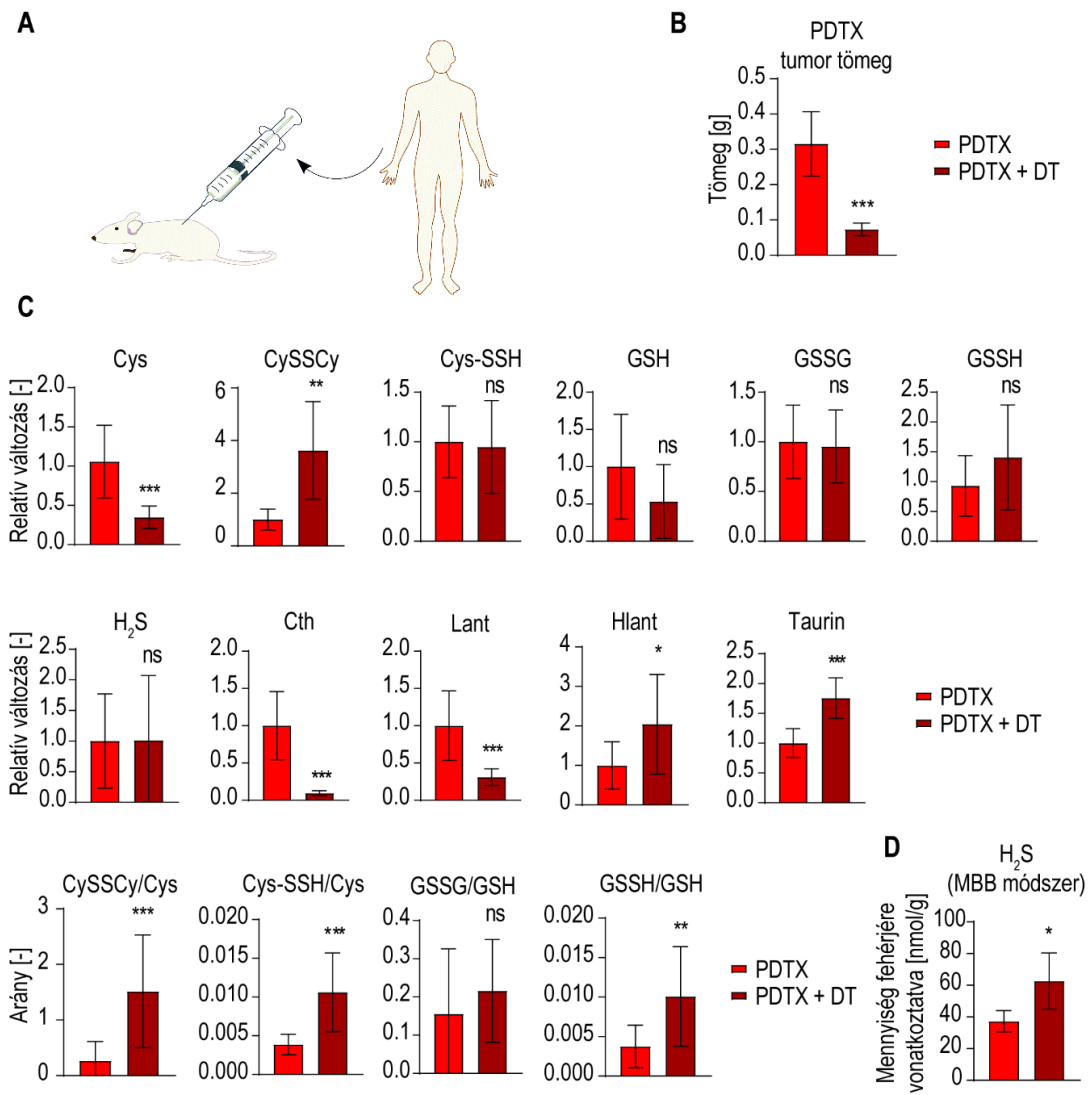
6.7.3. A DT kezelés hatásának vizsgálata *in vivo*

Azzal a céllal, hogy a DT kezelés által kiváltott anyagcsere-változásokat *in vivo* körülmények között is vizsgálni tudjuk, létrehoztunk egy-egy xenograft egérmodellt immunhiányos egerek használatával. Ehhez A375 sejteket (A375-X, 19/A ábra) vagy *BRAF* V600E mutáns humán tumormintát (PDTX, *patient-derived tumor xenograft*, 20/A ábra) oltottunk NOD.CB17-*Prkdc^{scid}*/NCRHsd (NOD-SCID) egerekbe.



19. ábra | A DT kezelés kénanyagcsere-re kifejtett hatásának vizsgálata az A375 sejtvonal eredetű xenograft tumorokban. (A) Az A375 sejteket immuhiányos egerek bőre alá oltva xenograft egérmodellt hoztunk létre. (B) Az eltávolított tumorok tömegét lemértük, és a DT kezelés hatására jelentős csökkenést tapasztunk. (C-D) A DT kezelés kénanyagcsere-re kifejtett hatását a DT-vel kezelt és kontroll xenograft egerekből származó tumorban folyadékkromatográffal kapcsolt tandem tömegspektrométerrel (C) és fluoreszcens detektálással (D) mértük. A kísérlet részletes leírására, beleértve a kezelési időket és körülményeket az „Anyagok és módszerek” fejezet 5.4.10. alfejezetében került sor.

A DT kezelés mindkét egérmodell esetén a tumorméret gyors csökkenéséhez vezetett (19/B és 20/B ábrák). Az egereket 4 kezelés után feláldoztuk és a tumorokból megnéztük a különböző kéntartalmú metabolitok szintjét, hogy a DT kezelés akut hatását vizsgálni tudjuk. Az A375-X esetén azt találtuk, hogy az *in vitro* kísérletekhez hasonlóan lecsökkent a Cys és a Cth szintje, míg a GSSH, illetve a Cys-SSH/Cys és a CySSCy/Cys aránya megemelkedett (19/C ábra). Emellett a biológiailag hozzáférhető H₂S szintén emelkedett a DT kezelés hatására (19/D ábra).



20. ábra | A DT kezelés kénanyagcserére kifejtett hatásának vizsgálata a humán tumor eredetű xenograft tumorokban. (A) Xenograft egérmodellt hoztunk létre azért, hogy BRAF V600E mutációt hordozó betegből származó tumormintát immuhiányos egerek bőre alá oltottunk. (B) Az eltávolított tumorok tömegét lemértük, és a DT kezelés hatására jelentős csökkenést tapasztaltunk. (C-D) A DT kezelés kénanyagcserére kifejtett hatását a DT-vel kezelt és kontroll xenograft egerekből származó tumorban folyadékkromatográffal kapcsolt tandem tömegspektrométerrel (C) és fluoreszcens detektálással (D) mértük. A kísérlet részletes leírására, beleértve a kezelési időket és körülményeket az „Anyagok és módszerek” fejezet 5.4.10. alfejezetében került sor.

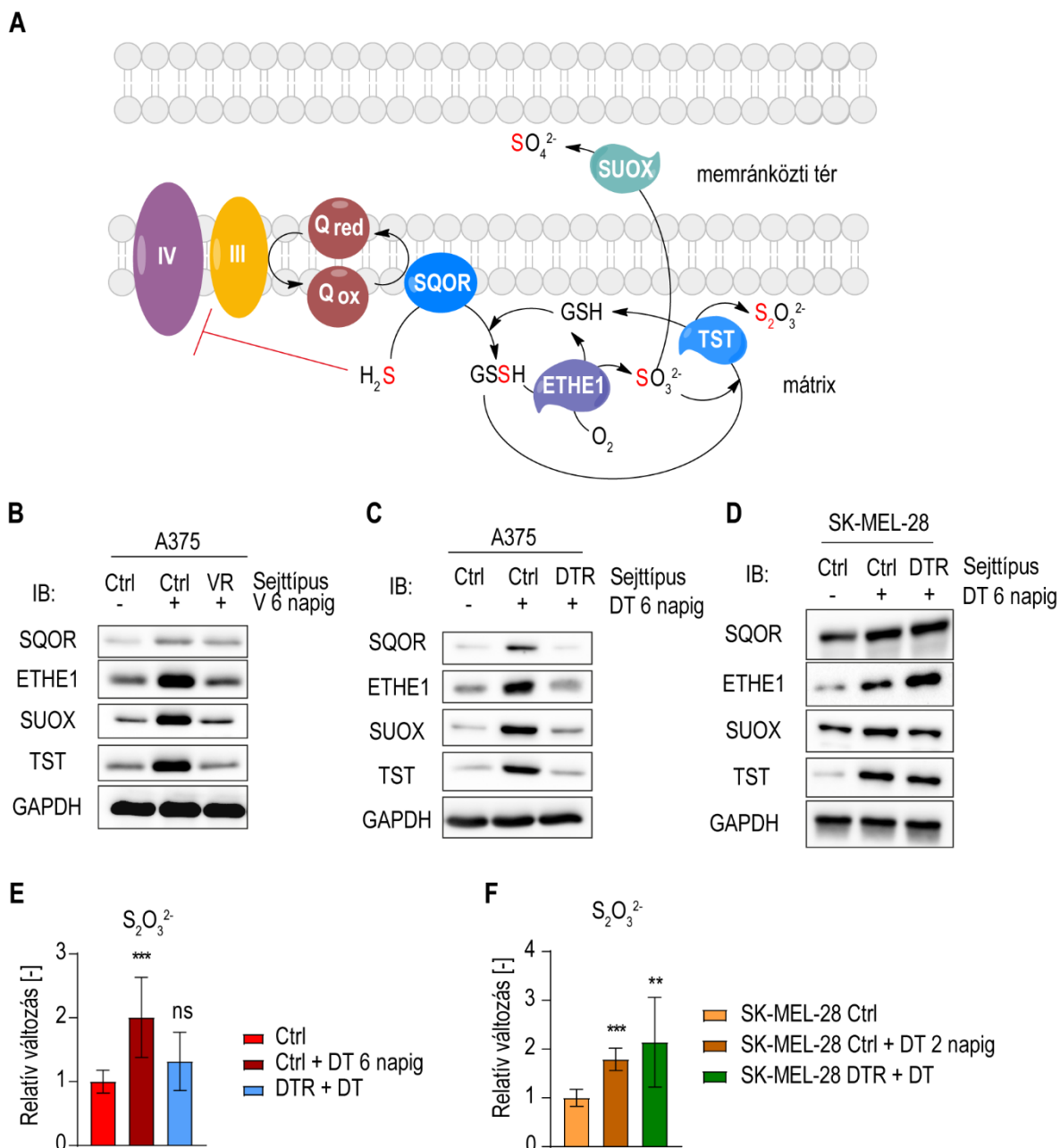
A PDTX esetén DT kezelés hatására a Cys, Cth és Lant csökkenését, míg a CySSCy, Hlant, taurin, illetve a Cys-SSH/Cys, CySSCy/Cys és GSSH/GSH arányában emelkedést tapasztaltunk (20/C ábra). Továbbá a PDTX modell esetén is emelkedést találtunk a biológiailag hozzáférhető H₂S szintjében DT kezelés hatására (20/D ábra).

Mindkét modell esetén a legnagyobb különbséget a Cth szintjében találtuk, mely több mint 90%-os csökkenést mutatott DT kezelés hatására (19/C és 20/C ábrák). Ez arra utal, hogy a DT kezelés hatására a CBS aktivitása *in vivo* körülmények között is lecsökkent. Az alacsony Cys szintekkel együtt ez arra utal, hogy a DT-vel kezelt xenograft tumorokban a reaktív kén származékok emelkedett szintje nem a CSE/CBS a Cys és HCys direkt felhasználásával H₂S termelő funkciójának tulajdonítható (3. ábra, VI. reakció), hanem a CySSCy-ből piruvátot és Cys-SSH-ot termelő funkciónak (3. ábra, IX. reakció) és a 2 HCys-ből Hlant-t és H₂S-t termelő funkciónak (3. ábra, VII. reakció). Ez az anyagcsereprofil, különösen a Hlant emelkedése, melyet kizárólag a CSE termel 2 HCys-ből (3. ábra, VII-es reakció) egyértelműen a CSE emelkedett aktivitására utal. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a DT kezelés által okozott változások a Cys-anyagcseréjében nem csupán *in vitro*, hanem *in vivo* körülmények között is bekövetkeznek.

6.8. A szulfid lebontó útvonal vizsgálata *in vitro*

A H₂S és a perszulfidok a sejtek védelme mellett fontos szerepet játszanak az elektrontranszportlánc működésének szabályozásában^{91,129-131}. A H₂S magas koncentrációban, tehát például exogén H₂S kezelés esetén, gátolja az elektrontranszportlánc IV-es komplexét, és ezáltal a mitokondriális sejtlegzést. Alacsony koncentrációban viszont az elektrontranszportlánc működésében elektron donorként funkcionál. A H₂S szintjét a szulfid lebontó útvonal szabályozza, mely működése során az SQOR fehérjén keresztül elektronokat ad le az elektrontranszportláncba, ezzel fokozva annak működését fiziológias H₂S szintek mellett^{132,133}. Az SQOR a H₂S-ot GSH felhasználásával GSSH-vá oxidálja, miközben a koenzim Q-t redukálja. Ezt követően a perszulfid-dioxigenáz (PDO/ETHE1) a GSSH-t szulfittá és GSH-ná alakítja, a tioszulfát-szulfur-transzferáz (TST) pedig a GSSH-t szulfittá és tioszulfáttá (S₂O₃²⁻), míg a szulfid-oxidáz a toxikus szulfitot távolítja el (21/A ábra).

A lebontó útvonal enzimjeit megvizsgálva azt találtuk, hogy a kontroll sejteket V-vel vagy DT-vel kezelve mind a négy fehérje, illetve a S₂O₃²⁻ szintje megemelkedett (21/B-F ábrák), mely arra utal, hogy a fokozott szulfid- és perszulfid-termelés mellett a lebontás sebessége is emelkedett, tehát nőtt a reaktív kén származékok mitokondriális fluxusa a DT kezelés hatására. A rezisztens A375 sejtekben a H₂S lebontó fehérjék és a S₂O₃²⁻ szintje lecsökkent a kontroll sejtekben mért szintre, míg az SK-MEL-28 esetén a rezisztens sejtekben is magas maradt. Ez arra utal, hogy az SK-MEL-28 sejtekben a reaktív kénszármazékok emelkedett fluxusa a rezisztens sejtekben is detektálható.

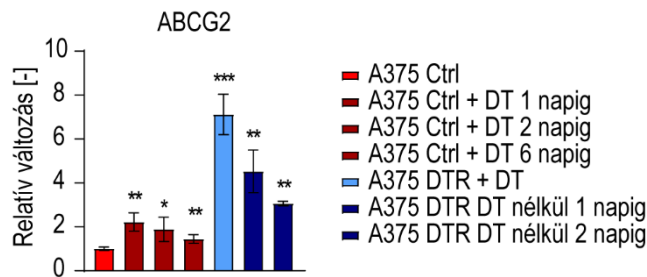


21. ábra | *A szulfid lebontó útvonal működésében bekövetkezett változások a MAPK útvonal gátlása következtében.* (A) A mitokondriális szulfid lebontó útvonalat szemléltető egyszerűsített ábra. A H_2S , mely nagy dózisban a IV-es komplex gátlásához vezet, fysiológias koncentrációban táplálja az elektrontranszportláncot a szulfid-kinon-oxidoreduktáz (SQOR) fehérjén keresztül. A keletkezett glutation-perszulfidot (GSSH) a perszulfid-dioxigenáz (ETHE1) szulfittá (SO_3^{2-}) bontja, miközben regenerálja a glutationt (GSH), illetve a tiosulfát-szulfur-transzferáz (TST) a GSSH-t és az ETHE1 által termelt szulfidot tiosulfáttá ($S_2O_3^{2-}$) alakítja, miközben regenerálja a GSH-t. Az ETHE1 által termelt szulfidot a szulfid-oxidáz (SUOX) szulfáttá (SO_4^{2-}) alakítja. (B-D) A szulfid lebontó útvonal négy enzimjének szintjét vemurafenib (V)-kezelésre (B), illetve dabrafenib-trametinib (DT)-kezelésre (C-D) A375 (B-C) és SK-MEL-28 (D) sejtvonalban

vizsgáltuk Western blot technikával. (E-F) A DT kezelés tioszulfát termelésre gyakorolt hatását A375 (E) és SK-MEL-28 (F) sejtvonalban folyadékkromatográfiás módszerrel mértük. A Western blot eredmények kiértékelése megtalálható a Függelékben.

A H₂S a IV-es komplex gátlása mellett a koenzim Q túlzott redukciója által is tudja gátolni a mitokondriális légzést, és reverz elektron transzportozomhoz vezethet, mely szintén emelkedett ROS termelést von maga után¹³⁴⁻¹³⁶. A DT kezelés azonban csupán alig másfélszeres emelkedéshez vezetett a H₂S egyensúlyi szintjében (10/F és G ábrák), mely valószínűleg nem elég magas ahhoz, hogy a IV-es komplex gátlásához vagy reverz elektron transzferhez vezessen. Továbbá korábbi tanulmányok azt mutatták, hogy a MAPK inhibitorokra rezisztens melanómasejtek érzékenyek a légzési láncot gátló szerekre³², mely együttesen a saját eredményeinkkel arra utal, hogy a fokozott sejtlégzés fontos szerepet játszik a perziszter sejtek túlélése és a rezisztencia kialakulása szempontjából. A DTR A375 sejtek esetén a szulfid lebontó út enzimeit és a S₂O₃²⁻ szintje visszaálltak a terápia-naiv kontroll sejtekben mért szintre (21/B, C és E ábrák), mely szintén arra utal, hogy ezekben a sejtekben már csökken az oxidatív foszforiláció, mellette azonban helyreáll a glikolízis működése (7/C-D ábrák). Az SK-MEL-28 sejtek esetén a H₂S lebontó enzimek és S₂O₃²⁻ emelkedett szintje (21/D és F ábrák) alapján lebontó útvonal hozzájárulása a mitokondriális sejtlégzéshez a rezisztencia kialakulását követően is fontos.

Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a reaktív kén származékok emelkedett fluxusa fokozza az elektrontranszportlánc működését, mely hozzájárulhat a fokozott ATP termeléshez. A gyógyszer-molekulák közömbösítése és extracelluláris térbe pumpálása ugyanis rendkívül energiaigényes. A gyógyszer-molekulák CYP fehérjéken keresztüli oxidatív semlegesítését, illetve a GST-pí szerepét a fentiekben ismertettük. Emellett génexpressziós vizsgálataink során azt találtuk, hogy mindezek mellett megemelkedett az ABC transzporter családba tartozó ABCG2 gén expressziója DT kezelés hatására, illetve a DTR sejtekben (22. ábra), mely a különböző gyógyszer-molekulák kipumpálásában szerepet játszó membránfehérjét kódol. Ezek alapján azt gondoljuk, hogy az elektrontranszportlánc fokozott működtetése mind az emelkedett NADH termelés, mind a fokozott szulfid fluxus által a sejtek emelkedett energiaigényét hivatott fedezni.

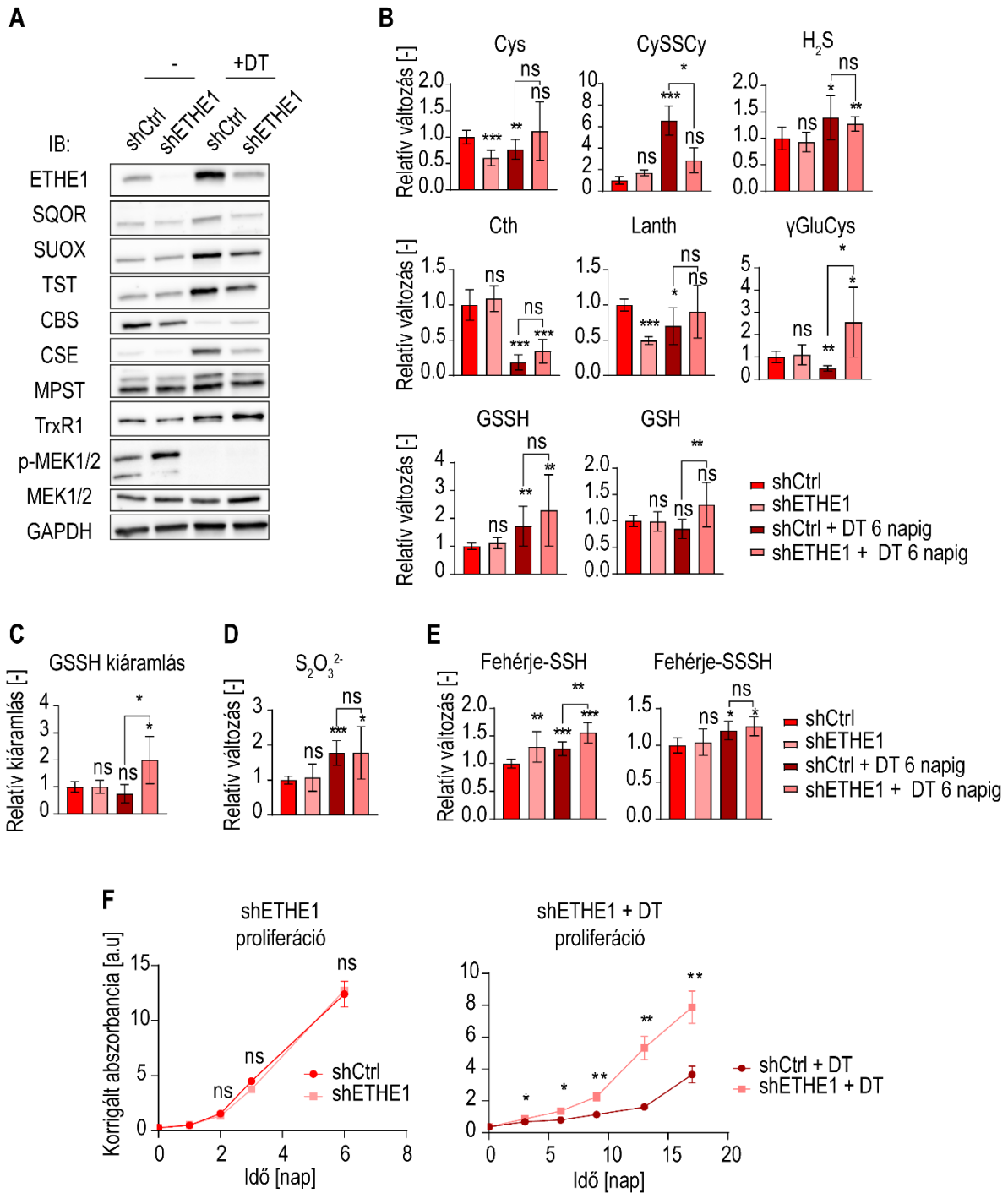


22. ábra | Az *ABCG2* gén expressziójában bekövetkezett változások DT kezelés és rezisztencia kialakulása során. A gyógyszerek kipumpálásában szerepet játszó *ABCG2*-t kódoló gén expresszióját reverz transzkripciós kvantitatív PCR-al mértük.

6.9. A perszulfidok szerepének vizsgálata *ETHE1* géncsendesítés által

Annak érdekében, hogy a perszulfidáció szerepét a DT kezelés alatt álló perziszter sejtek túlélésében megvizsgáljuk, stabil géncsendesítést hoztunk létre az *ETHE1* génre nézve (23/A ábra). Az *ETHE1* fehérje fontos szerepet játszik a perszulfidszint szabályozásában azok bontásán keresztül (22/A ábra). A kísérletekhez használt géncsendesített sejtvonalat a továbbiakban sh*ETHE1*-nek, míg a kontroll víruspartikulával fertőzött sejtvonalat shCtrl-nak nevezzük. Az *ETHE1* géncsendesítés önmagában nem okozott jelentős változást a Cys és a H₂S anyagcseréjében szerepet játszó fehérjék szintjében. DT kezelés hatására azonban a DT-vel kezelt sh*ETHE1* sejtekben magasabb volt a TrxR1 szintje, mint a szintén kezelés alatt álló shCtrl sejtekben (23/A ábra). Ennek hátterében az állhat, hogy a TrxR1 a redox homeosztázis fenntartása mellett képes a perszulfidok redukciójára¹¹⁴. Az *ETHE1* működésének hiányában a perszulfidok szintje megemelkedett, így a perszulfidok redukáló szerepét valószínűleg részben a TrxR1 vette át. Az shCtrl sejtekhez képest az sh*ETHE1* sejtekben megemelkedett a GSH, a GSSH és a GSSG szintje, illetve a GSH szintézisének prekursora, a gamma-glutamil-cisztein szintje. A DT-vel kezelt shCtrl sejtekhez képest a kezelt sh*ETHE1* sejtekben szintén magasabb volt az egyes GSH származékok szintje (23/B ábra).

Továbbá a sejtmediumból mérve háromszoros emelkedést tapasztaltunk a GSSH extracelluláris szintjében *ETHE1* csendesítés hatására, mely a felesleges GSSH sejten kívüli térbe juttatását jelzi (23/C ábra). A gamma-glutamil-cisztein és GSH szintekben bekövetkezett emelkedés *ETHE1* csendesítés hatására arra utal, hogy mivel a sejtek nem tudják regenerálni a GSH-t a GSSH-ból, ezért fokozzák a GSH szintézisét. Mint megmutattuk, a GSH-ra szüksége van a DT kezelés alatt álló sejteknek a túlélés érdekében, ugyanis a GSH szükséges a GPX1 és 4, illetve a GST-pí enzimek működéséhez, és ezek által a redox homeosztázis fenntartásához és a gyógyszerek semlegesítéséhez.



23. ábra | A perszulfidáció szerepének vizsgálata ETHE1 géncsendesítés által. (A) Az ETHE1 géncsendesítés hatását a H₂S anyagcserében szerepet játszó fehérjék szintjében kontroll és DT-vel kezelt körülmények között Western blot technikával vizsgáltuk. (B) Az ETHE1 géncsendesítés hatását a Cys anyagcseretermékeiben folyadékkromatográffal kapcsolt tandem tömegspektrométerrel mértük. (C) A GSSH szintjének vizsgálata a sejteken lévő médiumból folyadékkromatográffal kapcsolt tandem tömegspektrométerrel történt. (D) Az ETHE1 géncsendesítés tioszulfát-termelésre gyakorolt hatását folyadékkromatográfiás módszerrel mértük. (E) Az ETHE1 csendesítés fehérje perszulfidációra gyakorolt hatását folyadékkromatográffal kapcsolt tandem tömegspektrométerrel mértük. (F) Az ETHE1 csendesítés sejtproliferációra gyakorolt hatását kontroll (balra) és DT-vel kezelt (jobbra) körülmények között SRB módszerrel vizsgáltuk. A Western blot eredmények kiértékelése megtalálható a Függelékben.

A DT kezelés alatt álló shETHE1 sejteket a szintén kezelés alatt álló shCtrl-hoz hasonlítva nem tapasztaltunk eltérést a S₂O₃²⁻ szintjében (23/D ábra), mely arra utal, hogy a szulfid lebontó úton keresztüli fluxus nem csökken az ETHE1 csendesítésének következtében. Ez azért lehetséges, mert a TST reakciójához szükséges szulfidot a GOT fehérjék is elő tudják állítani (11/A ábra), így a TST az ETHE1 csendesítéstől függetlenül is el tudja látni a funkcióját.

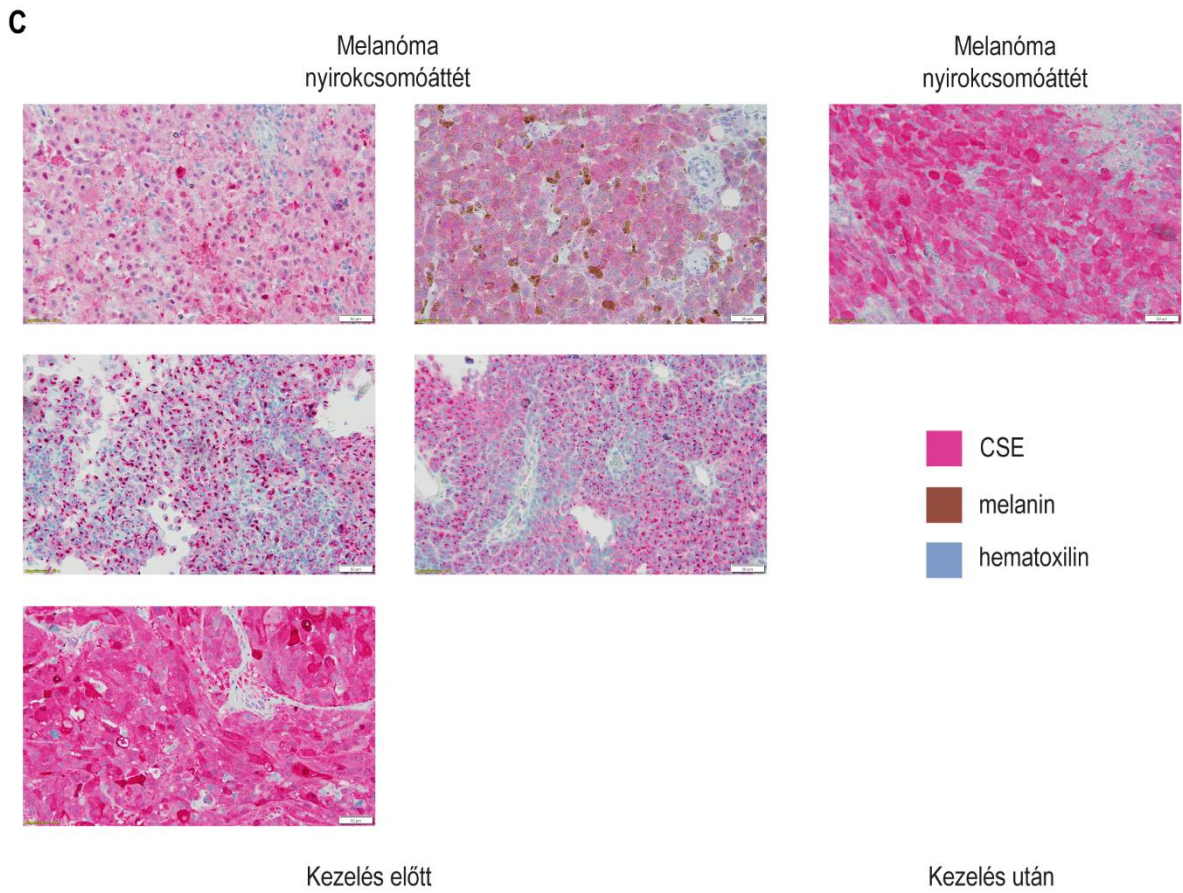
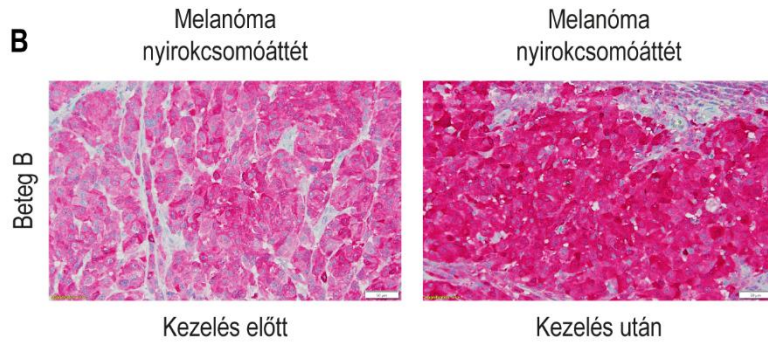
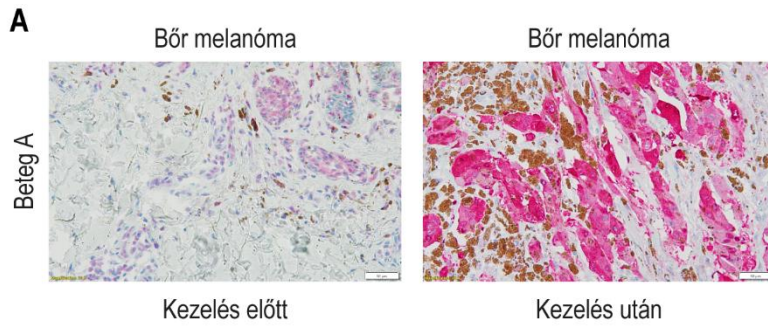
Ezt követően megvizsgáltuk az ETHE1 géncsendesítés hatását a fehérje perszulfidációra és azt találtuk, hogy az shETHE1 sejtekben megemelkedik a fehérje perszulfidáció, mind a DT kezelés során, mind terápia-naiv körülmények között (23/E ábra). Mint azt a korábbiakban ismertettük, feltételezzük, hogy a perszulfidáció emelkedése fontos a DT kezelés alatt álló perziszter sejtek túlélése szempontjából, ezért a következő kísérletben megvizsgáltuk ezen sejtek osztódását. Azt találtuk, hogy normál körülmények között az ETHE1 géncsendesítés nem befolyásolta az A375 sejtek osztódását (23/F ábra, balra), míg DT kezelés során az shETHE1 sejtek, melyekben a GSSH és fehérje perszulfidok szintje megemelkedett, hamarabb kezdtek el osztódni, mint a kezelés alatt álló shCtrl sejtek (23/F ábra, jobbra). Ez az eredmény megerősíti korábbi felvetésünket, hogy a perszulfidációnak valóban fontos szerepe van a perziszter sejtek túlélésében és a terápiával szembeni szerzett rezisztencia kialakulásában.

6.10. A CSE szintjének vizsgálata betegmintákban

Annak érdekében, hogy a DT kezelés által indukált CSE túltermelés fiziológias jelentőségét megvizsgáljuk, betegmintákat gyűjtöttünk és mértük a CSE fehérje szintjében bekövetkezett változásokat a DT kezelés következtében. Az ilyen klinikai minták gyűjtése azonban rendkívül nehéz, ugyanis a melanómák sebészi úton történő eltávolítása a kezelés során, amikor még a kezelés valójában hatékony, csak ritka esetekben fordul elő. Bár országos szinten az Országos Onkológiai Intézet Biobankja rendelkezik a legnagyobb elemszámú mintával, csupán egy olyan beteget tudunk a vizsgálatba bevonni, akiből rendelkezésre állt a kezelést megelőzően, illetve a kezelés időtartama alatt vett minta. A minták immunhisztokémiai vizsgálata azt mutatta, hogy a CSE szintje a DT kezelés hatására lényegesen magasabb volt, mint a kezelést megelőzően (24/A ábra). Fontos azonban megjegyeznünk, hogy a vizsgálataink során azt észleltük, hogy a CSE expressziója a metasztatikus melanómából származó mintákban általánosságban is magasabb volt. A kutatómunka során találtunk egy olyan minta párt, mely egyazon beteg két melanómából származó nyirokcsomóattétből került eltávolításra a kezelést megelőzően, illetve a kezelés közben. Ennél a betegnél is a CSE emelkedett szintjét láttuk a nyirokcsomóattétben, azonban a DT kezelés hatására a CSE szintje a kezelés előtti mintához képest emelkedett (24/B ábra).

A továbbiakban olyan metasztatikus melanómából származó nyirokcsomóattéteket vizsgáltunk, melyek nem egyazon betegből származtak. Az öt minta esetén négyenél alacsonyabb CSE szinteket mértünk, mint a DT kezelés alatt álló betegek esetén, az ötödik azonban kezelés nélkül is rendkívül magas CSE szinteket mutatott (24/C ábra).

Összefoglalva az egyazon betegből kezelés előtti és utáni minták alapján úgy tűnik, hogy a DT kezelés valóban emeli a CSE fehérje szintjét betegek esetén is, mely összhangban áll a sejt- és egérmodell eredményekkel. A vizsgálatokat azonban nehezíti, hogy a CSE expressziójára valószínűleg nem csak a kezelés, hanem a betegség stádiuma is kihatással van, így ezek vizsgálata a jövőben egy átfogóbb analízist igényel. Továbbá fontos hangsúlyozni, hogy a vizsgálatba bevonható minták rendkívül alacsony száma miatt ezen vizsgálatokból nem tudunk messzemenő következtetéseket levonni.



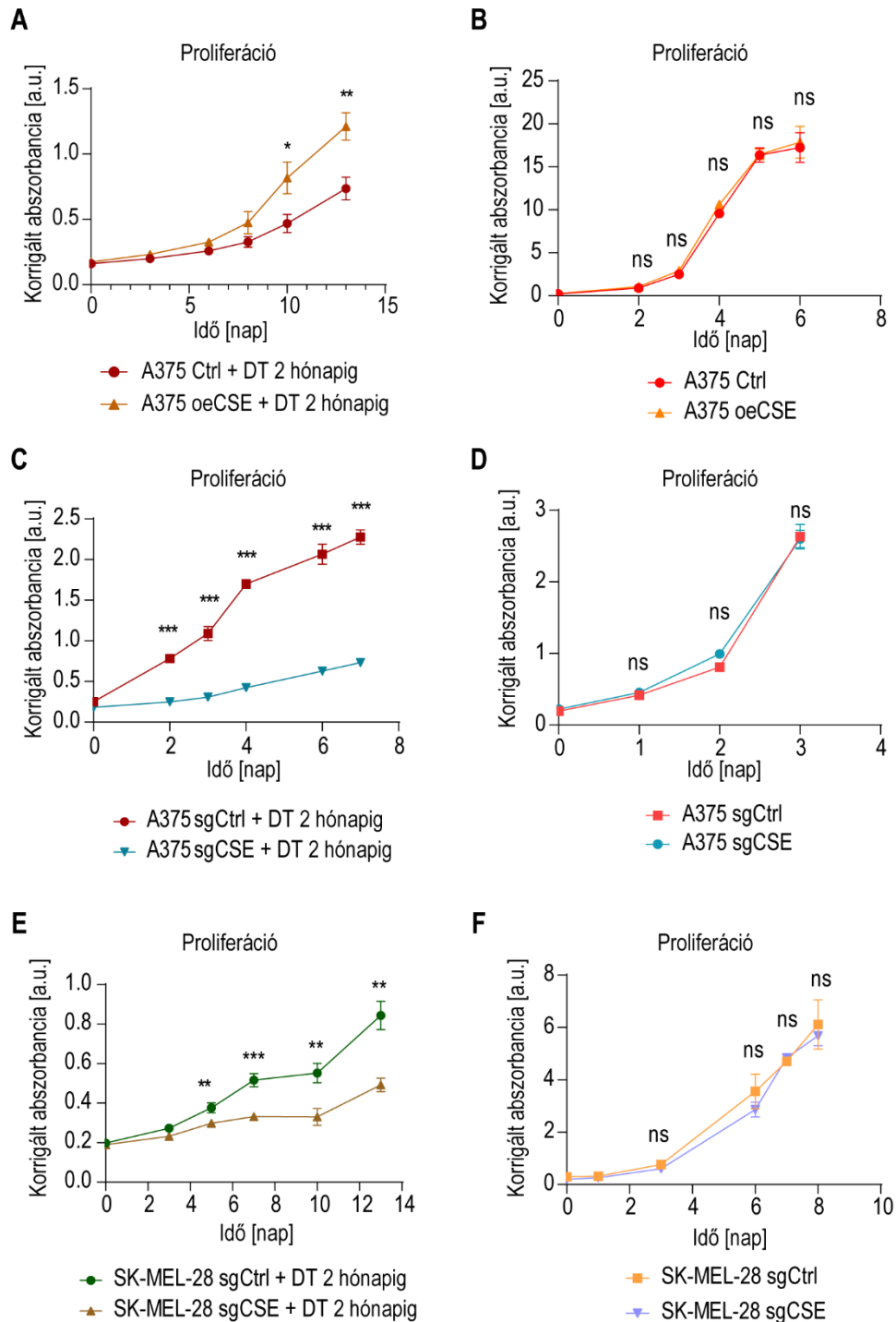
24. ábra | *A CSE expressziójának vizsgálata melanóma betegmintákban DT terápia hatására. (A) CSE (magenta) szintjét immunfestéssel mértük egyazon betegből kezelés előtt (balra) és kezelés után (jobbra). (B) A CSE szintjét immunfestéssel egy másik beteg kezelés előtti (balra) és DT terápia után (jobbra) mértük melanóma nyirokcsomó áttétéből. (C) A DT kezelés vizsgálata különböző kezelés előtt (balra) és DT kezelés után (jobbra) álló betegekből származó melanóma nyirokcsomóáttétekben.*

6.11. A CSE szerepének vizsgálata a perziszter sejtek túlélésében *in vitro*

Az eddigiekben részletezett *in vitro* és *in vivo* eredményeink arra utaltak, hogy a DT kezelés következtében a CSE expressziója fokozódik és általa a perszulfidok szintje megemelkedik. ETHE1 csendesítés által sikerült azt is igazolnunk, hogy az emelkedett perszulfidációnak a perziszter melanómasejtek túlélésében fontos szerep jut. A továbbiakban vizsgálataink arra irányultak, hogy a CSE fokozott expressziója adaptív-e a perziszter sejtek túlélése szempontjából, és szolgálhat-e esetleges célmolekulaként a szerzett rezisztencia kialakulásának elkerülése érdekében.

Ehhez a korábbiakban ismertetett CSE-t túltermelő oeCSE sejtvonalat (15/A ábra), és a CSE-hiányos sgCSE sejtvonalakat használtuk (15/C-D ábrák). A oeCSE sejtvonal esetén azt találtuk, hogy a CSE-t túltermelő, emelkedett perszulfid szintekkel rendelkező A375 sejtvonal (15/B ábra) hamarabb vált rezisztenssé DT kezeléssel szemben, mint a normál A375 sejtvonal (25/A ábra). Ez azt mutatja, hogy a DT kezelés hatására a CSE és ezáltal a perszulfidáció emelkedése valóban adaptív a kezelés alatt álló melanómasejtekre nézve, szintjüket tovább emelve rezisztencia kialakulása a célzott terápiával szemben gyorsabban megy végbe. Ezzel szemben terápia-naiv körülmények között nem találtunk különbséget az A375 sejtek osztódásában (25/B ábra).

A következő „ellentét” kísérletben a CSE-hiányos sejtvonalakat használva azt találtuk, hogy a CSE hiányában a melanómasejtek lassabban váltak rezisztenssé a DT kezeléssel szemben, mint a kontroll társaik (25/C és E ábrák), míg terápia-naiv körülmények között a CSE génkiütés nem befolyásolta a melanómasejtek osztódását (25/D és F ábrák). Ez összhangban az előbbi kísérlettel azt mutatja, hogy DT kezelés során a CSE emelkedett szintje védi a perziszter sejteket a kezelés okozta stresszel szemben, és ezáltal fontos szerepet játszik a szerzett rezisztencia kialakulásában.



25. ábra | A CSE génmódosítás hatása a perziszter melanómasejtek túlélésére. (A-B) Sejtosztódás vizsgálata a CSE-t túltermelő (oeCSE, overexpressing CSE) melanómasejtekben DT-vel kezelt (balra) és terápia-naiv körülmények között (jobbra) SRB módszerrel. (C-F) A CSE génkiütés sejtosztódásra kifejtett hatásának vizsgálata A375 (C-D) és SK-MEL-28 (E-F) sejtvonalakban DT kezelés alatt (C, E) és kontroll (D, F) körülmények között SRB módszerrel.

6.12. A CSE gátlás célzott terápiával együttesen történő alkalmazása

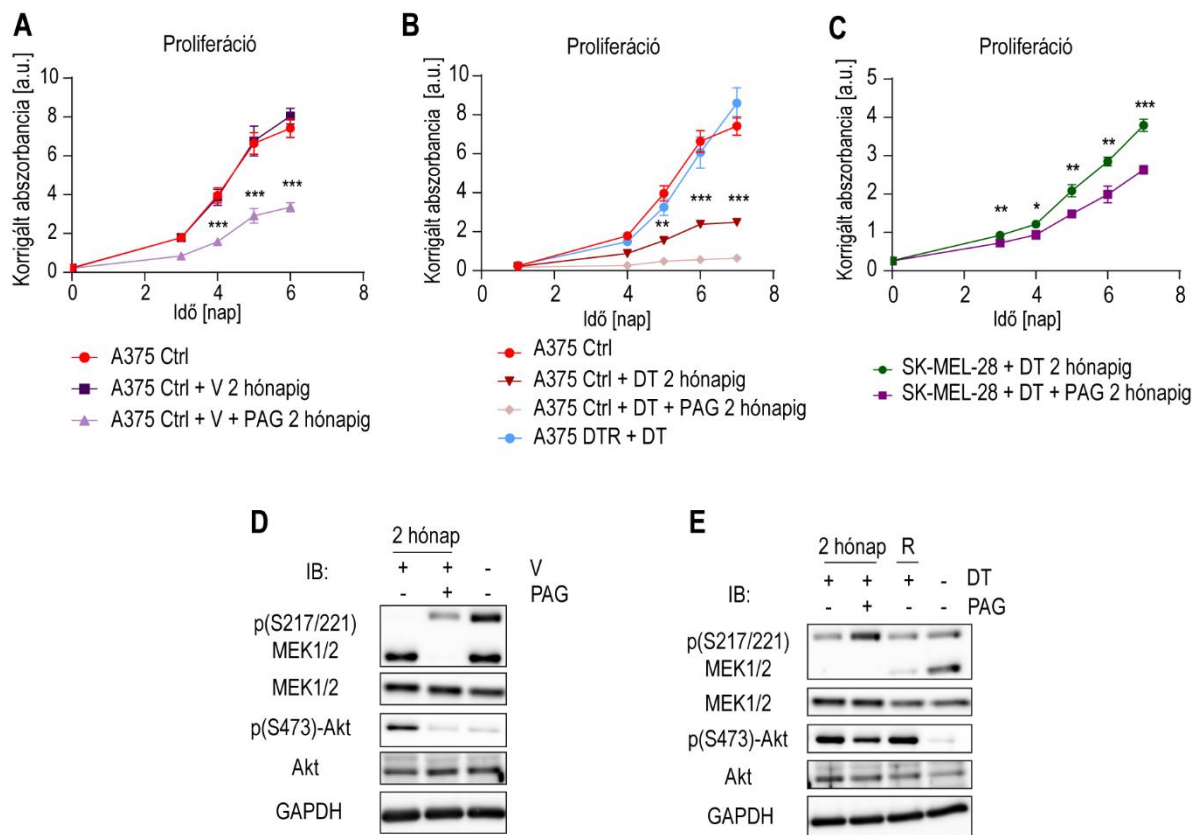
6.12.1. A CSE és MAPK gátlás hatásának vizsgálata *in vitro*

A CSE-hiányos sejteken végzett kísérleteink arra utaltak, hogy a CSE gátlása előnyös lehet a célzott terápiával szembeni szerzett rezisztencia késleltetése szempontjából, ezért a következő kísérletekben a megvizsgáltuk, hogy a CSE szelektív gátlása hatékonyabb terápiás válaszhoz vezet-e *in vitro*. Ehhez a kísérlethez a kereskedelmi forgalomban elérhető leghatékonyabb CSE inhibitorot, a PAG-ot használtuk. A sejteket a DT és a V célzott terápiák mellett PAG-gal együtt kezdtük el kezelni, és kéthetente ellenőriztük a sejtek osztódását. Korábbi kísérleteinkkel összhangban a V-vel kezelt sejtek két hónap után rezisztenssé váltak, míg a V + PAG kombinációt kapott sejtek sokkal kisebb mértékben osztódtak ugyanennyi idő után (26/A ábra). A DT-vel kezelt sejtek két hónap után még nem nyerték vissza teljes mértékben az osztódási képességüket, azonban a DT + PAG kombinációt kapott sejtek még náluk is kisebb mértékben osztódtak (26/B-C ábrák). Ezen kísérletek arra utalnak, hogy a MAPK útvonal és a CSE együttes gátlása valóban késlelteti a szerzett rezisztencia kialakulását *in vitro*.

Ahogy azt a korábbiakban ismertettük, a szerzett rezisztencia kialakulásához szükséges a MEK1/2 foszforilációjának helyreállása a különböző *upstream* jelátviteli utak fokozott működése által. Ezért a következő kísérletben összehasonlítottuk a p-MEK1/2 szintjét a MAPK inhibitorokkal kezelt és a MAPK inhibitorokkal és PAG-gal együttesen kezelt sejtekben és azt találtuk, hogy p-MEK1 szintje (alsó sáv) alacsonyabb a V+PAG kombinációt kapott sejtekben mint a kizárólag V-vel kezelt sejtekben, mely arra utal, hogy a CSE által termelt reaktív kén származékok a MEK1 foszforilációját fokozzák a MAPK inhibitorok jelenlétében, mely hozzájárulhat a rezisztencia kialakulásához, azonban a sejteket PAG-gal együtt kezelve ez nem valósul meg. Érdekes módon azonban a MEK2 (felső sáv) esetén pont ellenkező hatást találtunk, a V+PAG és a DT+PAG kombinációt kapott sejtekben a p-MEK2 szintje magasabb volt, mint a kizárólag V-t vagy DT-t kapott sejtekben (26/D-E ábrák). Ezt az ellentmondást egyelőre nem tudjuk megmagyarázni, de azt gondoljuk, hogy a háttérben sokkal komplexebb jelátviteli események állnak, ugyanis ahogy azt a korábbi eredményeink mutatják, a fehérjék perszulfidációjának szintje és mintázata is jelentősen megváltozott a MAPK útvonal gátlása révén, ami számos jelátviteli út működésére kihathat.

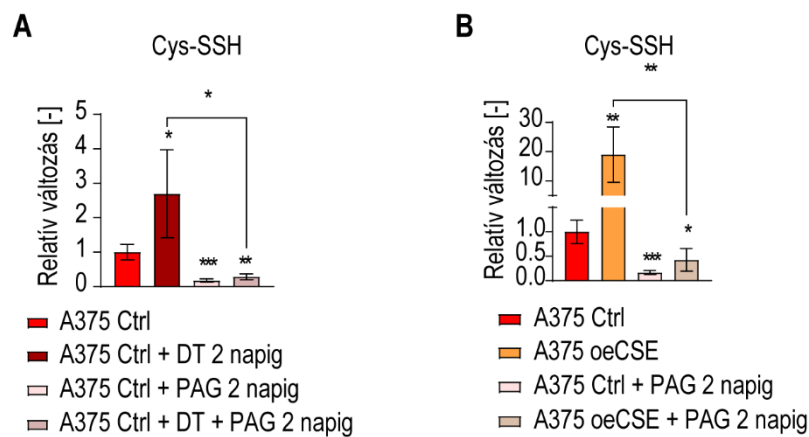
A MAPK inhibitorokkal szembeni szerzett rezisztencia kialakulásában a különböző jelátviteli utaknak, köztük a PI3K/Akt útvonal megváltozott működésének fontos szerep jut ⁸. Ezzel összhangban mi is azt találtuk, hogy a p-Akt szintje megemelkedett a rezisztens sejtekben (5/B

ábra). Érdekes módon azt találtuk, hogy a PAG-gal együttesen kezelt sejtekben az Akt foszforilációja szignifikánsan csökkent (26/D-E ábrák), mely hozzájárulhat ahhoz, hogy a MAPK útvonal és a CSE együttes gátlása késlelteti a szerzett rezisztencia kialakulását.



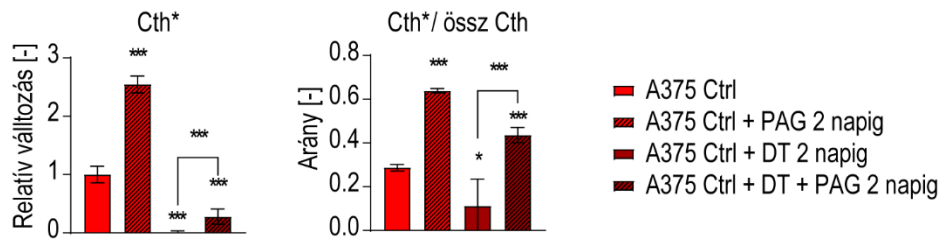
26. ábra | A CSE gátlás hatása a MAPK inhibitorokkal szembeni szerzett rezisztencia kialakulására. (A-C) Az A375 (A-B) és az SK-MEL-28 (C) melanómasejteket vemurafenibbel (V) (A) vagy dabrafenib-trametinib (DT) kombinációval (B-C) kezeltük a CSE inhibitor PAG jelenlétében vagy távollétében. A sejteket két hónapig az inhibitorokat tartalmazó sejtmediumban tenyésztettük, majd a sejtosztódást SRB módszerrel mértük. (D-E) A MEK1/2 és az Akt foszforilációját a V-vel és V+PAG-gal (D), illetve a DT-vel és DT+PAG-gal (E) tenyésztett melanómasejtekben Western blot technikával mértük. A Western blot eredmények kiértékelése megtalálható a Függelékben.

Annak érdekében, hogy igazoljuk a PAG gátló hatását a CSE fehérjén keresztüli perszulfidtermelésre, a következő kísérletekben PAG-gal kezeltük a sejteket és mértük a kis molekulatömegű Cys-SSH szintjét. Azt találtuk, hogy a PAG valóban gátolta a perszulfidtermelést a kontroll és a DT-vel kezelt sejtek esetén egyaránt, mely alátámasztja hipotézisünket, hogy a CSE a reaktív kén származékokat termelő funkciója által védi a perziszter sejteket, ami hozzájárul a szerzett rezisztencia kialakulásához (27/A ábra). Továbbá a PAG nem csupán a DT kezelés hatására emelkedett Cys-SSH termelést, hanem a CSE túltermelés által kiváltott Cys-SSH termelést egyaránt gátolta (27/B ábra).



27. ábra | A CSE gátlás cisztein-perszulfid termelésre gyakorolt hatása. (A) A kontroll sejteket két napig kezeltük DT-vel és/vagy PAG-gal. Az intracelluláris cisztein-perszulfid (Cys-SSH) szinteket folyadékkromatográffal kapcsolt tandem tömegspektrométerrel mértük. (B) A Cys-SSH termelés vizsgálata CSE túltermelés (oeCSE, overexpressing CSE) és PAG kezelés hatására folyadékkromatográffal kapcsolt tandem tömegspektrométerrel történt.

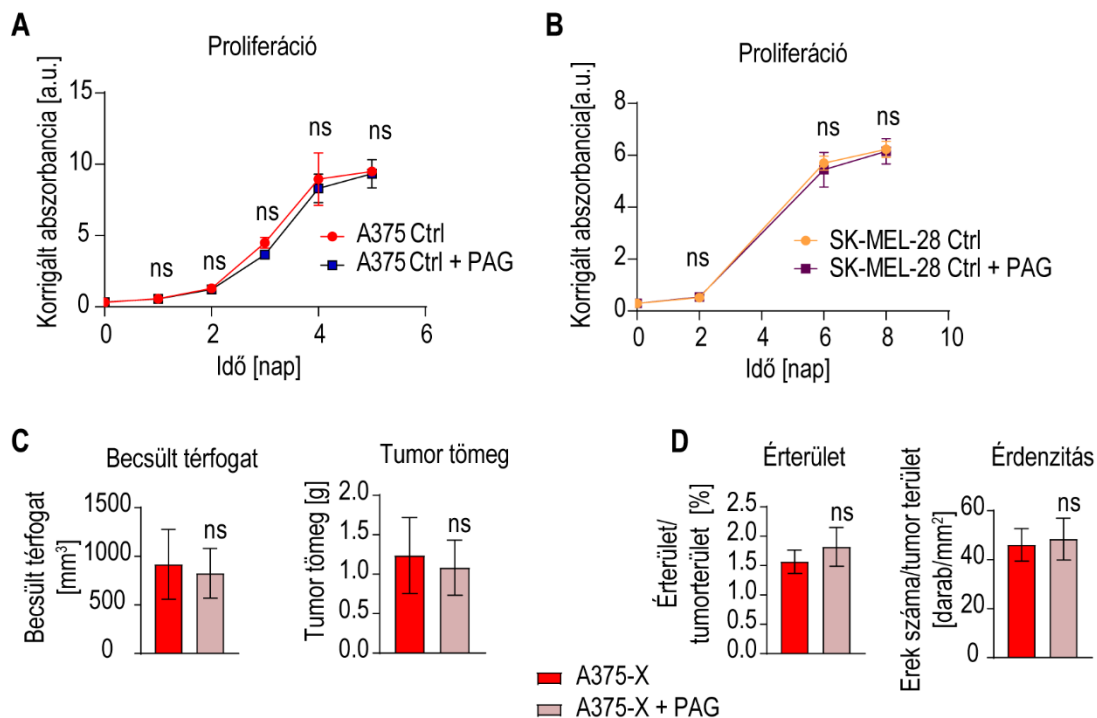
Mivel a PAG magas koncentrációban gátolhatja más PLP-függő enzim működését, a következő kísérletben megvizsgáltuk a PAG szelektivitását. Ehhez megnéztük a szintén PLP-függő CBS enzim aktivitását izotóppal jelölt szerin alkalmazásával, ugyanis Cth Ser-ből és HCys-ből történő szintézisét (3. ábra, I. reakció) kizárólag a CBS enzim katalizálja, így ezzel a módszerrel a CBS kanonikus aktivitását sejten belüli környezetben szelektíven tudjuk mérni. Azt találtuk, hogy a PAG kezelés nem befolyásolta a jelölt Cth (Cth*) szintjét, illetve arányát a teljes Cth mennyiséghez képest (28. ábra), mely arra utal, hogy a PAG az általunk használt dózisban a CSE-re nézve szelektívnek tekinthető. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a PAG kezelés a CSE szelektív gátlásán keresztül késlelteti a szerzett rezisztencia kialakulását, ezáltal hatékonyabb terápiás válaszhoz vezet.



28. ábra | A CSE-gátlás hatása a CBS kanonikus aktivitására. A CBS intracelluláris aktivitását nehéz szén- és nitrogénizotópot tartalmazó szerin (*) használatával mértük. A nehéz szén- és nitrogénváz cisztationinba (Cth) történő beépülését (Cth*) folyadékkromatográffal kapcsolt tandem tömegspektrométerrel mértük.

6.12.2. A CSE gátlás hatásának vizsgálata terápia-naiv melanómában

Mivel a H₂S szerteágazó fiziológiai funkciói révén fontos szerepet játszik a tumornövekedésben a sejtes jelátvitel és anyagcsereutak szabályozása által, illetve a tumor érzettségére kifejtett hatása révén, korábbi tanulmányok alapján a H₂S termelésében főszerepet játszó enzimek gátlása számos tumortípusban befolyásolta a tumornövekedést^{70,73,107,109,137}. A következő kísérletben arra voltunk kíváncsiak, hogy a PAG kezelés befolyásolja-e a terápia-naiv melanóma növekedését. *In vitro* és *in vivo* vizsgálataink során azt találtuk, hogy a PAG kezelés nem befolyásolta a melanómasejtek osztódását és a tumornövekedést (29/A-C ábrák). Mivel a H₂S szerepet játszik a tumor érzettségének szabályozásában, CD34 markerrel történő immunfestés segítségével megvizsgáltuk a xenograft tumorok érzettségét. A PAG hatására azonban nem találtunk különbséget az érdenzitásban és a teljes érterületben (29/D ábra). Ez arra utal, hogy az általunk használt dózisban a PAG nem gátolja a melanómasejtek osztódását, a tumornövekedést és a tumorok érzettségét terápia-naiv körülmények között.



29. ábra | **A CSE gátlás hatása a terápia-naív melanóma növekedésére.** (A-B) A PAG sejtosztódásra kifejtett hatását terápia-naív az A375 (A) és az SK-MEL-28 (B) melanómasejtek osztódására SRB módszerrel mértük. (C-D) Az A375 sejtvonal eredetű xenograft egereket PAG-gal kezeltük. A tumorméretet digitális tolómérővel történő mérés alapján becsültük (C, balra), majd az eltávolított tumorok tömegét megmértük (C, jobbra). Az erek százalékos területét (D, balra) és denzitását (D, jobbra) CD34 markerrel történő immunfestés alapján mértük.

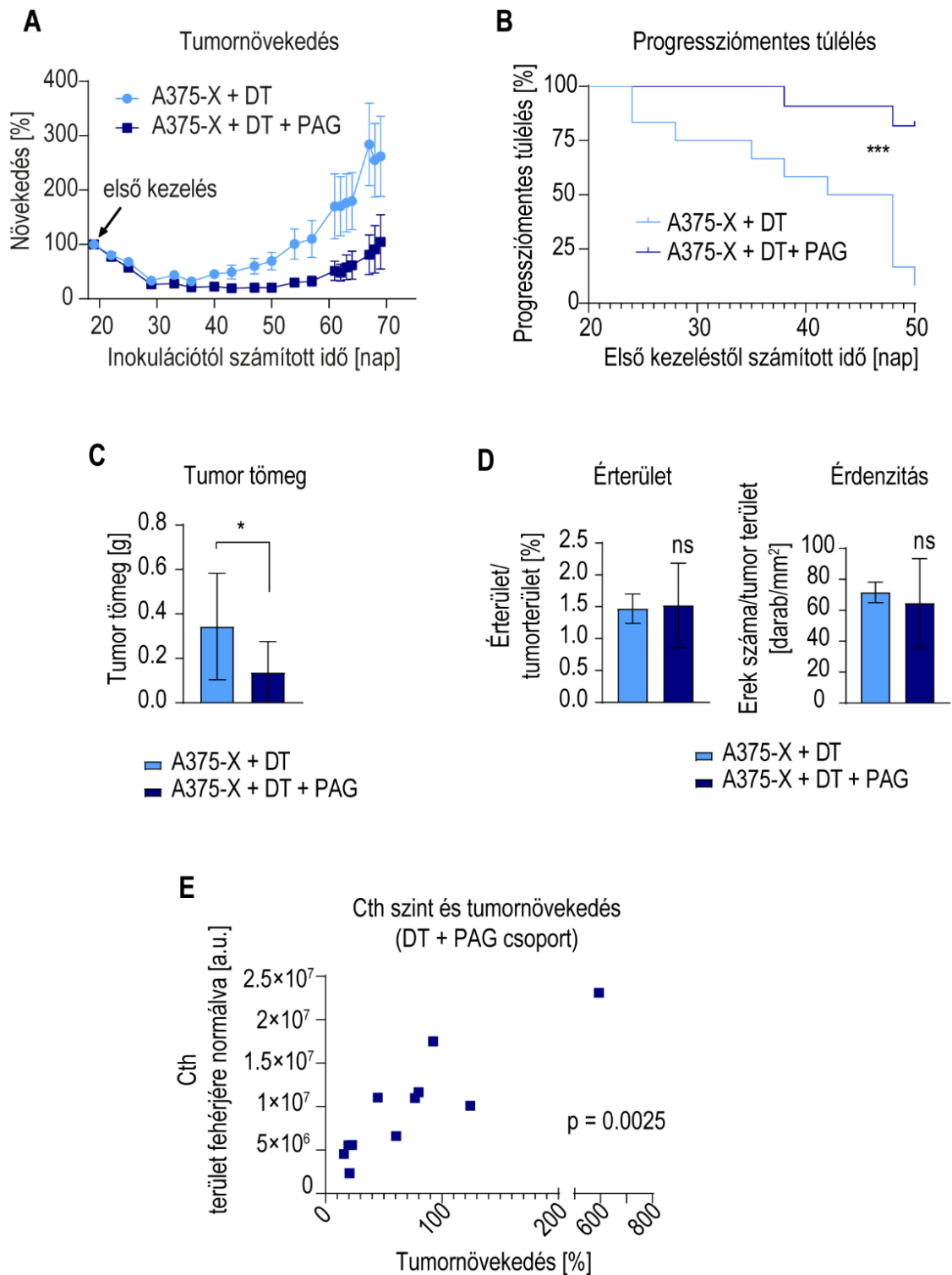
6.12.3. A CSE és a MAPK útvonal együttes gátlása *in vivo*

Az *in vitro* kísérleteink arra utaltak, hogy a MAPK útvonal és a CSE együttes gátlása a szerzett rezisztencia kialakulásának késleltetéséhez vezet, ezért a következő kísérletben megvizsgáltuk ennek a kombinációnak a hatását *in vivo* körülmények között. Ehhez sejtvonal-eredetű tumor xenograft egereket kezeltünk DT-vel és a DT+PAG kombinációval több mint két hónapon keresztül és a tumorok méretét hetente kétszer digitális tolómérővel mértük. A kezelés kezdetét követően a tumorok mérete mindkét csoportban drasztikusan csökkent, a kezelés előtti tumorméret mintegy 10-20%-ára és az első néhány hét során a tumorok nem mutattak növekedést, tehát ebben az időszakban a terápia hatékonynak bizonyult (30/A ábra).

A DT csoportban a kezelés kezdetétől számított 24. napon érte el az első tumor a kezelés előtti tumortérfogatot, míg a DT+PAG csoportban ez a 38. napon történt meg (30/B ábra). A csoportot együttesen vizsgálva a DT-vel kezelt egereknél a tumornövekedés nagyjából a kezeléstől számított 25. napon (tehát az inokulációtól számított 44. napon) indult meg, míg a

DT+PAG csoportban ez 20 nappal később történt (30/A ábra). A terápiát addig tekintettük hatékonynak, amíg a tumorméret el nem érte a kezelés előtti tumorméretet, tehát ezt az időszakot nevezzük progressziómentes túlélésnek. A kísérlet során a DT+PAG csoportba tartozó egerek progressziómentes túlélése szignifikánsan magasabb volt, mint a kizárólag DT-t kapott egereké (30/B ábra). A kezeléstől számított 50. napon a DT csoportban a 12 egérből 11 rezisztenssé vált, míg a DT+PAG csoportban a 11 egér közül mindössze 2 vált rezisztenssé. Ekkor a kísérletet leállítottuk, az egereket feláldoztuk és az eltávolított tumorok tömegét lemértük. A DT+PAG csoportban a tumorok tömege szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a kizárólag DT-vel kezelt egereknél (30/C ábra). A tumorokat CD34 markerrel vizsgálva a terápia-naiv kísérlethez hasonlóan nem találtunk különbséget a tumorok erezettségében (30/D ábra), mely arra utal, hogy a tumorok méretbeli különbségének hátterében nem a CSE által termelt H₂S vaszkularizációra gyakorolt hatása áll.

Érdekes módon a korábbi *in vitro* kísérletben a PAG kezelés következtében a CBS enyhén emelkedett aktivitását tapasztaltuk (28. ábra). A CSE és a CBS hasonló reakciói által egy bizonyos mértékig képesek egymás funkcióját kompenzálni, melyet korábbi tanulmányunk során bazális emlőkarcinómában megmutattunk⁴⁶. Ezen észlelések alapján feltételeztük, hogy a DT+PAG csoportban a tumornövekedés hátterében állhat a CBS fokozott aktivitása. Ahogy korábban megmutattuk, a DT kezelés hatására a CBS és a Cth szintje jelentős mértékben lecsökkent, azonban a rezisztencia kialakulása során ezek helyreálltak a terápia-naiv kontrollhoz hasonló szintre, illetve egyes modelljeink esetén még magasabb szintre. A DT+PAG csoport esetén azt találtuk, hogy a tumorokban a Cth szintje és a tumorméret korrelációt mutattak (30/E ábra), mely arra utal, hogy a DT+PAG csoportban azok a tumorok tudtak elkezdeni nőni, melyekben a CBS aktivitása emelkedett. Ez az eredmény azt mutatja, hogy a CBS aktivitásának fokozódása fontos a tumornövekedésben, amennyiben a CSE aktivitása gátolt.



30. ábra | *A MAPK útvonal és a CSE együttes gátlása in vivo.* (A-B) Az A375 sejtvonal eredetű xenograft egereket DT-vel és DT+PAG kombinációval kezeltük. A tumorok méretét digitális tolómérővel kéthetente mértük, a tumortérfogatot ez alapján becsültük (A). Amikor az adott tumor mérete elérte a kezelés előtti tumortérfogatot, a terápiát hatástalannak tekintettük. Ez alapján kalkuláltuk az egerek progressziómentes túlélését (B). (C) Amikor a kezelés a DT csoportban szinte teljesen hatástalanná vált, az egereket feláldoztuk és a tumorok tömegét

megmértük. (D) A tumorok vaszkularizációját CD34 markerrel történő immunfestéssel ellenőriztük. (E) A cisztationin (Cth) szint és a tumorok méretbeli növekedése közötti összefüggést Pearson korrelációs koefficienssel számoltuk. A kísérlet részletes leírására, beleértve a kezelési időket és körülményeket az „Anyagok és módszerek” fejezet 5.4.10. alfejezetében került sor.

6.13. Egyéni hozzájárulás a dolgozatban bemutatott eredményekhez

A dolgozatban bemutatott kísérletek esetén általánosságban elmondható, hogy minden kísérletben részt vettem szakmai ismereteimnek megfelelően. A kísérletek tervezését, az eredmények kiértékelését és ábrázolását, illetve a sejtvonalak fenntartását, kezelését és túlélésük vizsgálatát minden esetben én végeztem. Emellett az élősejtes mikroszkópiát, a reverz transzkripció kuantitatív PCR-t és a Western blot vizsgálatokat, illetve az utóbbi két méréshez szükséges mintaelőkészítést én végeztem. A szövetek beágyazását, az immunohisztokémiai vizsgálatokat és a Seahorse méréseket többnyire én végeztem. A géncsendesített és génkiütött sejtvonalak létrehozását kollégáimmal közösen folytattuk, miközben én tanultam az adott módszert. A műszeres analitikai méréseket, a ProPerDP mérést, a CSE-t túltermelő sejtvonal létrehozását, a vaszkularizáció-analízist, a tumormetszetek készítését, illetve az egerek kezelését és boncolását kollégáim végezték, nevük az „Anyagok és módszerek” fejezetben minden esetben külön kiemelésre került. A műszeres analitikai mérések esetén a mintaelőkészítést részben vagy egészében én végeztem, az egerek boncolásánál pedig segítettem kollégáim munkáját. Emellett azonban fontosnak érzem itt is kiemelni, hogy rengeteg segítséget kaptam kollégáimtól a teljes doktori munkám során, melyet a „Köszönetnyilvánítás” fejezetben részletesen kifejttek.

7. Megbeszélés

Bár a jelenleg elérhető terápiás ágensek nagy hatékonysággal gátolják a *BRAF* mutációt hordozó melanóma növekedését, a szerzett rezisztencia kialakulása legtöbb esetben elkerülhetetlen, amely a tumor kiújulásához és agresszív progressziójához vezet^{4,5}. Az első gátlószerek megjelenése óta mintegy 15 év telt el, amely időszak során számos, a szerzett rezisztencia háttérben álló mechanizmus azonosításra került, azonban a rezisztencia kialakulásának megakadályozása még mindig nem megoldott^{7-9,12,13,16}. Korábbi tanulmányok azt mutatták, hogy a MAPK gátlószerekre rezisztens melanómasejtekre az oxidatív stressz magasabb szintje jellemző^{32,33,56}. Doktori munkám elsődleges célja az volt, hogy a szerzett rezisztencia kialakulásában szerepet játszó molekuláris biológiai folyamatokat azonosítsuk, különös tekintettel az oxidatív stresszt ellensúlyozó redox rendszerek működésére és a különböző anyagcsere-útvonalaira. Ezzel hosszútávú célunk az volt, hogy olyan potenciális támadási pontokat azonosítsunk, amelyek célzása a jelenleg elérhető terápiák hatékonyságát, és ezáltal a progressziómentes túlélést növelni tudják.

Ahhoz, hogy a DT terápiával szembeni szerzett rezisztencia kialakulását megvizsgáljuk, létrehoztunk egy DT terápiára rezisztens melanóma sejtvonalat, amelyet először *in vitro* karakterizáltunk. Emellett a DT terápia akut hatását is vizsgáltuk, hogy a kezelés alatt álló perziszter sejtekben végbemenő változásokat feltárjuk. A perziszter sejtek esetén fontos kiemelni, hogy ezek vizsgálata bizonyos korlátokba ütközik, amelyeket az eredmények értelmezésénél fontos szem előtt tartani. Mint azt az „Irodalmi áttekintés” fejezetben kiemeltük, a perziszter sejtek a terápiát nyugalmi állapotban átvészelő, nem vagy csupán minimálisan osztódó sejtek, amelyek fenotípusos változásai átmenetiek és reverzibilisek, illetve ezek a változások nem genetikai mechanizmuson alapulnak¹⁰. Vizsgálataink során a kezelést túlélő sejtpopulációt vizsgáltuk, amelyben azonban a perziszter sejtek mellett előfordulhatnak alapesetben rezisztens sejtek is. A kezelési időket minden kísérlet esetén úgy választottuk meg (3-6 napos kezeléseket), hogy a vizsgált sejtpopuláció túlnyomó része nyugvó stádiumban legyen, így feltételeztük, hogy az alapesetben rezisztens sejtek aránya elhanyagolható. A kezelés hatására a melanómasejtek egy része elpusztult, amelyeket mosási lépésekkel minden mérésünk előtt eltávolítottuk, hogy kizárólag a kezelést túlélő sejtpopulációt tudjuk vizsgálni. Munkánk során azt tapasztaltuk, hogy a kezelés alatt álló sejtek nagyjából egy hónap után kezdtek el osztódni, tehát innentől a sejtpopuláció már az alapesetben rezisztens sejtekből és a perziszterből rezisztenssé vált sejtekből állt. Ahhoz azonban, hogy ezek a rezisztens sejtek elérjék a terápia-naiv kontrollhoz hasonló osztódási rátát, mintegy 3-4 hónap kezelésre volt

szükség. A rezisztens sejtek vizsgálatához azt a vonalat használtuk, amelyek már a terápia-naiv sejtekhez hasonló osztódási rátát mutatták (5/A ábra). Kísérleteink során kíváncsiak voltunk arra, hogy a terápiát túlélő, nagyrészt perziszter sejtekből álló populációban milyen stresszválaszok aktiválódnak és vizsgáltuk, hogy ezek közül melyek adaptívok, továbbá, hogy ehhez képest a rezisztens sejtekben mely tulajdonságok maradnak meg.

A rezisztens sejtekben az Akt fehérje fokozott foszforilációját mértük, mely arra utal, hogy a MAPK gátlás következtében a PI3K-Akt jelátviteli út veszi át a szerepet, ezzel hozzájárulva a rezisztens sejtek proliferációjához a gátlószerek jelenlétében is. Továbbá a rezisztens sejtekben a MAPK útvonal kinázai, a MEK1/2 és az ERK1/2 a terápia-naiv sejtekhez hasonló foszforilációs mintázatot mutattak, amelyek szintén hozzájárulnak a helyreállt sejtosztódáshoz.

A DT kezelés hatására a jelátviteli változások mellett számos rezisztenciagén fokozott expresszióját találtuk, köztük a GST-pí fehérjét, az ABC transzporter családba tartozó ABCG2-t, illetve az egyes CYP fehérjék különböző izoformáit kódoló géneket. A CYP fehérjék és a GST-pí a különböző gyógyszermolekulák közömbösítése, míg az ABCG2 a xenobiotikumok sejten kívüli térbe juttatása által járulnak hozzá a perziszter sejtek túléléséhez és a szerzett rezisztencia kialakulásához. A CYP fehérjék monooxygenázok, amelyek működésük során ROS-t termelnek, fokozva az oxidatív terhelést.

Az oxidatív stressz *in vitro* vizsgálata számos nehézségbe ütközik. A sejt kultúrákat magas oxigénkoncentráció mellett tenyésztjük, amely nem felel meg a hipoxiás tumor mikro környezetben mérhető alacsony oxigénellátottságnak. Részben emiatt, részben pedig az *in vitro* modellek és a tumor mikro környezet tápanyagellátottságából adódó különbségek miatt (különös tekintettel a CySSCy elérhetőségére) tartottuk nagyon fontosnak, hogy a DT kezelés akut hatását *in vivo* körülmények között is tanulmányozzuk, amelyet a későbbiekben részletesen kifejtünk. További problémát jelent, hogy a kereskedelmi forgalomban kapható „ROS” mérésére használt szondák eltérően reagálnak a különböző specieszekkel, amelyek kémiai tulajdonságaikban, életidejükben és reaktivitásukban is különbözhetnek egymástól. Emellett a különféle oxidatív származékok intracelluláris lokalizációjukban különbözhetnek, illetve az egyes kompartmentekben eltérő koncentrációban lehetnek jelen, amelyet szintén figyelembe kell venni¹³⁸. Kísérleteink során először arra voltunk kíváncsiak, hogy a feltételezett oxidatív stressz milyen hatással van a kezelés alatt álló perziszter és rezisztens melanómasejtek működésére. Mivel a ROS semlegesítésében szerepet játszó rendszerek nagyon dinamikusan képesek alkalmazkodni a sejtek redox állapotához^{39,118}, sok esetben a ROS egyensúlyi szintjében nehéz különbséget detektálni, valójában a ROS fluxusa az, ami megváltozik.

Azonban azok a sejtek, amelyek nagyobb oxidatív terhelés alatt állnak, sokkal inkább védtelenek a további oxidatív stressz ellen³⁷⁻⁴⁰, ezért a kísérleteinket H₂O₂ kezeléssel kiegészítve végeztük, hogy ezáltal kibillentsük a sejteket az egyensúlyból. Ezzel az elgondolással összhangban azt találtuk, hogy a DT kezelés önmagában nem emelte az irreverzibilisen oxidálódott Prx-ek szintjét és az oxidatív stressz hatására bekövetkezett DNS károsodást jelző PAR-ilációt, azonban H₂O₂ kezeléssel kombinálva mind a Prx-SO₂₋₃, mind a PAR-iláció mértéke jelentős mértékben emelkedett a DT kezelés alatt álló sejtekben. Ez azt jelenti, hogy nem csupán a rezisztens, hanem a kezelés alatt álló perziszter sejtek is nagyobb oxidatív terhelésnek vannak kitéve a MAPK gátlás hatására, amelyet ellensúlyoznak a túlélés érdekében. Azonban ebből a redox egyensúlyból könnyebb őket kibillenteni, mint a terápia-naiv társaikat, mely a fehérjék túlzott oxidációjához és az oxidatív stressz hatására bekövetkező DNS károsodáshoz vezet. A kísérleti kondíciók kiválasztásánál azt kellett mérlegelnünk, hogy míg a Prx-SO₂₋₃ egy irreverzibilis módosulat, amely erős oxidatív stressz esetén bizonyos szintig halmozódni tud a sejtekben, addig a PAR-iláció egy reverzibilis módosulat, amelynek szintje dinamikusan változik, a poli-ADP-glikohidroláz végzi a lebontását. Emiatt a kísérleti körülményeket úgy választottuk meg, hogy a DT kezelés mindkét kísérlet esetén azonosan 4 óra volt, a H₂O₂ kezelés a PAR-iláció vizsgálatához annak dinamikus szabályozása miatt szigorúan 10 perc, a Prx-SO₂₋₃ esetén pedig a módosulat halmozódása és az optimális detektálhatóság érdekében 4 óra volt.

A sejtek redox védelmi rendszereit vizsgálva a fenti eredményekkel összhangban azt találtuk, hogy a kezelés alatt álló perziszter sejtekben valóban megnőtt az oxidatív ágensek közömbösítésében szerepet játszó fehérjék expressziója, amelyek fenntartják a redox homeosztázist, ezáltal hozzájárulva a sejtek túléléséhez és hosszútávon a szerzett rezisztencia kialakulásához. A kezelés alatt álló perziszter sejtekhez képest a rezisztens sejtekben mérséklődött ezen fehérjék expressziója, amely egy kiegyensúlyozottabb redox környezetre utal. Azonban a rezisztens sejtekre is jellemző például a TrxR1 és a SOD2 fehérjék fokozott expressziója a terápia-naiv kontroll sejtekhez képest, amely azt mutatja, hogy a rezisztens sejtekben is fokozott a ROS termelés a normál körülményekhez képest.

Annak érdekében, hogy a sejtek fenn tudják tartani az oxidatív ágensek közömbösítésért felelős rendszerek működését, a redukáló erőt biztosító NADPH fokozott előállítására van szükségük, amely elsősorban a pentóz-foszfát úton, a G6PD fehérjén keresztül történik. Ezzel összhangban a DT kezelés következtében a G6PD fokozott expresszióját találtuk. Ezen eredmények azt mutatják, hogy a DT kezelés által kiváltott oxidatív stresszre a melanómasejtek széleskörű

választ adnak és számos védelmi fehérjét aktiválva biztosítják a túlélést. Ez összhangban áll azzal, hogy a sejteket csupán DT-vel kezelve nem tapasztaltunk emelkedést a Prx-SO₂₋₃ szintjében és a PAR-ilációban, hiszen az aktiválódott védelmi rendszerek ezeket közömbösíteni tudják ¹³⁹.

Összhangban a redox rendszerekben detektált különbségekkel, a glikolízis és a pentóz-foszfát út szabályozásában szerepet játszó PFKFB 3 és 4 szintjében mért változások is arra utalnak, hogy a MAPK útvonal gátlásának következtében a két útvonal közötti fluxus eltolódik a pentóz-foszfát út felé annak érdekében, hogy az oxidatív ágensek közömbösítéséhez szükséges NADPH igényüket fedezzék, hiszen a perziszter sejtek szempontjából a stressz túlélése az elsődleges szempont. A rezisztens sejtekben azonban a kiegyensúlyozottabb redox környezet már lehetővé teszi az aerob glikolízis helyreállt működését, amely elengedhetetlen a fokozott sejtproliferáció biztosításához.

A sejtek energiatermelő folyamatait vizsgálva azt találtuk, hogy a glikolízis aktivitása és a sejtek glikolitikus kapacitása a DT kezelés hatására lecsökkent. Ennek hátterében részben állhat közvetlenül a mutáns B-Raf gátlása, ugyanis a mutáció révén bekövetkező fokozott B-Raf működés közvetve aktiválja számos glikolitikus fehérje működését, így a B-Raf és a downstream MEK1/2 gátlásával „megfosztjuk” a sejteket az egyik aktiváló mechanizmustól. Egy másik kiváltó ok lehet a korábban bemutatott csökkenés a PFKFB3 szintjében és emelkedés a PFKFB4 szintjében, amelyek az anyagcserefluxus eltolódását eredményezik glikolízistől a pentóz-foszfát út felé. Ezzel szemben a rezisztens sejtek glikolitikus aktivitása helyreállt a terápia-naiv kontroll sejtekhez hasonló szintre, ezzel alátámasztva a PFKFB 3 és 4 fehérjék szintjében mért mennyiségeket.

A DT kezelés alatt álló sejtek mitokondriális légzését vizsgálva azt találtuk, hogy mind a DT-vel kezelt sejteknek, mind a terápiára már rezisztens sejteknek magasabb volt a légzési kapacitása, a rezisztens sejteknek azonban a bazális légzése is magasabbnak bizonyult, mint a terápia-naiv kontroll sejteknek. Ez a CYP fehérjék magas expressziójával együttesen okozhatja az emelkedett ROS termelést a kezelés alatt álló melanómasejtekben.

Mivel a sejtek redox homeosztázisáért felelős útvonalak a különböző anyagcsere-útvonalakkal szoros összeköttetésben működnek, nem meglepő, hogy a MAPK útvonal gátlása során megemelkedett oxidatív terhelés széleskörű változásokat generál a melanómasejtek különböző anyagcsere-útvonalaiiban ¹¹⁹. Feltételeztük, hogy az emelkedett sejtlégzés biztosítása érdekében a sejteknek megnő az igénye a különböző elektron donor molekulákra, hogy az

elektrontranszportlánc működéséhez szükséges elektronszükségletet fedezze. Valóban, a DT kezelés következtében több, a NADH és a FADH₂ termeléséért felelős fehérje expressziójában emelkedést tapasztaltunk, amelyek a citromsavciklus fokozott működésére utalnak. A citromsavciklus a sejtek egyik fő anyagcsereközpontja, hiszen összeköttetésben áll számos folyamattal, így például az aminosav-, a zsírsav- és a nukleotid-anyagcserével. A továbbiakban kíváncsiak voltunk arra, hogy az aminosav-anyagcserét hogyan befolyásolja a MAPK útvonal gátlása. Aminosav-analízisünk azt mutatta, hogy a DT kezelés emelte a glutamin, az aszparagin és az aszpartát intracelluláris szintjét, fokozta a glutamin felvételét, illetve az aszparagin és az aszpartát sejten kívüli térbe juttatását. Az említett három aminosav szintjében bekövetkezett változások nem meglepőek, ugyanis mindhárom anyagcsereje szorosan kötődik a citromsavciklus működéséhez. Az aszpartát-oxálacetát átalakulás a malát-aszpartát inga működtetésében játszik szerepet, ezáltal a redukáló erő mitokondriumba juttatásához szükséges. Az aszparagin aszpartátból keletkezik a glutamin glutamáttá történő átalakulása közben. A glutamint a melanómasejtek nagy mennyiségben veszik fel az extracelluláris térből, szerepét a rezisztencia kialakulásában már korábbi tanulmányban ismertették³⁴. A glutamin és glutamát oda-vissza alakulását a GLUL (glutamint termelő) és GLS (glutamin bontó) fehérjék szigorúan szabályozzák. A melanómasejtek megnövekedett glutaminigénye irányulhat részben a citromsavciklus táplálására, méghozzá a glutamáton keresztül az alfa-ketoglutarát termelése által. A glutamát emellett szubsztrátként szolgál a GSH szintéziséhez, illetve a CySSCy extracelluláris térből történő felvételéhez.

A Cys aminosav redox egyensúlyban betöltött szerepe révén elengedhetetlen az oxidatív stresszel szembeni védelemben, hiszen számos kofaktor, kén tartalmú antioxidáns vegyület és redox egyensúlyban szerepet játszó fehérje termeléséhez szolgál szubsztrátként. A rezisztens sejtek CySSCy megvonásra való érzékenysége, illetve a CySSCy felvételét gátló erastin rezisztenciát késleltető hatása azt mutatja, hogy a DT kezelés alatt álló melanómasejteknek valóban nagy mennyiségű CySSCy-re van szüksége a redox homeosztázis fenntartásához. A sejtekben nagy mennyiségben jelenlévő, redox pufferként szolgáló GSH szintéziséhez a glicin mellett a Cys és glutamát aminosavak szükségesek. A rezisztens sejtekben a GSH emelkedett szintjét tapasztaltuk, amely emelkedett GSH termelésre és ezáltal nagyobb Cys és glutamát igényre utal. Mind a sejtek megemelkedett Cys igénye, mind az emelkedett GSH szintézis összhangban áll az emelkedett glutamát igénnyel, amelyet a sejtek a glutamát glutaminból történő emelkedett termelése (DT kezelés alatt álló sejtek esetén) vagy a glutamin glutamátból történő csökkent termelése által (rezisztens sejtek esetén) fedeznek.

Mint említettük, a sejtek a GSH-t az oxidatív ágensek közömbösítése mellett a különböző gyógyszermolekulák semlegesítésére is használják a GST fehérjék által. Tekintettel arra, hogy a DT kezelés hatására a GST-pí magasabb expresszióját találtuk, feltételezzük, hogy a célzott terápiával szembeni rezisztencia kialakulásában a GSH-nak kettős szerep jut, egyrészt a melanómasejtek védelmét szolgálja az oxidatív stresszel szembeni túlélés céljából, másrészt a gyógyszermolekulák közömbösítését a GST-pí fehérjén át.

A CySSCy a sejtekbe jutva redukálódik a TRP14 fehérjén keresztül a tioredoxin rendszer által, majd hasznosításra kerül a különböző útvonalakon keresztül. A DT kezelés hatására azonban a Cys egyensúlyi szintjében csökkenést tapasztaltunk a terápia-naiv sejtekhez képest, amely a CySSCy emelkedett intracelluláris szintjével párosult, ami a DT kezelés következtében megfigyelt oxidatív stresszel összhangban áll (31. ábra). A Cys intracelluláris elérhetősége azonban nem csupán a felvételén keresztül szabályozott, ugyanis szemiesszenciális aminosav révén a sejtek több reakciólépésen keresztül metioninból származó homociszteinből és szerinből is elő tudják állítani a CBS és CSE fehérjéken keresztül. Azonban a DT kezelés hatására mért emelkedés a CSE és ezzel együtt csökkenés a CBS szintjében nem arra utal, hogy a Cys termelése fokozódna a kezelés következtében, ugyanis a Cys termeléséhez mindkét fehérje együttes működésére van szükség, hiszen ezek egymást követő reakciólépéseket katalizálnak. Ezzel szemben a rezisztens sejtekben a terápia-naiv sejtekhez hasonlóan ellentétes mintázatot láttunk, a CSE szintje alacsony, míg a CBS szintje relatíve magas volt a perziszter sejtekhez képest.

A kanonikus, Cys-t termelő funkciójuk mellett mindkét fehérjének számos egyéb funkciója ismert, ugyanis a reaktív kén származékok termelésén keresztül szabályozzák a különböző jelátviteli- és sejtanyagcsere-folyamatok működését. A reaktív kén származékok közé tartozó szulfid és perszulfid származékok szintjét mérve azt találtuk, hogy a DT kezelés hatására megemelkedett a kis molekulatömegű Cys-SSH, a H₂S és a H₂S₂, míg a GSSH mind a DT-vel kezelt, mind a rezisztens sejtekben egyaránt magasabb szintet mutatott. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a DT kezelés hatására emelkedett CSE szint nem a sejtek emelkedett Cys igényét hivatott fedezni, hanem a reaktív kén származékok termelése által játszik fontos szerepet (31. ábra).

A CSE és a CBS, illetve a funkciójukhoz köthető kéntartalmú metabolitok szintjét más modellrendszerekben vizsgálva azt találtuk, hogy a MAPK útvonal gátlása vemurafenibbel, illetve más melanóma sejtvonalon DT-vel nagyon hasonló változásokat indukál. A DTR A375 sejtekkel ellentétben a DTR SK-MEL-28 sejtvonala és a VR A375 sejtvonala esetén a CBS

magasabb aktivitását tapasztaltuk, amely arra utal, hogy bizonyos körülmények között a rezisztencia kialakulásához nem elég a CBS funkciójának helyreállt működése, hanem fokozott aktivitása szükséges. A Cys-anyagcserében bekövetkezett változásokat sejtvonal-eredetű, illetve humán tumor-alapú xenograft egerek segítségével *in vivo* körülmények között vizsgálva úgy tűnt, hogy a DT kezelés által kiváltott emelkedés a reaktív kén származékok szintjében, illetve csökkenés a Cys, Cth és Lant szintjében *in vivo* körülmények között is végbemegy. Továbbá a Cth alacsony szintje a DT-vel kezelt xenograft tumorokban arra utal, hogy a CBS aktivitása DT kezelés hatására *in vivo* körülmények között is lecsökken. A DT kezelés hatására emelkedett CySSCy/Cys arány *in vivo* körülmények között továbbá erősíti azt az *in vitro* észlelésünket, hogy a terápia hatására az oxidatív terhelés valóban megemelkedik a tumor mikrokörnyezet limitált oxigénellátottsága mellett is. Bár ezeknél a méréseknél a tumorok eltérő felület/térfogat aránya magában hordozza az esetleges mérési hiba lehetőségét, vizsgálataink során ennek mértékét úgy igyekeztünk csökkenteni, hogy a tumorok egészében fagyasztásra kerültek és a tumor homogenizátumokból azonos mennyiséget használtunk, majd a mérések kiértékelésénél az analitok szintjét a minták összfehérje-tartalmára normalizáltuk.

A reaktív kén származékoknak számos fiziológias szerepe ismert: védelmet nyújtanak az oxidatív stresszel és a ferroptózissal szemben^{93,98,103}, táplálják az elektrontranszportlánc működését és az ATP-termelést^{79,91,140}, illetve szabályozzák a glikolízis aktivitását^{78,81}. Ezek alapján azt feltételeztük, hogy a DT kezelés hatására a CSE és CBS szintekben bekövetkezett változások mögött a melanómasejtek védelme, illetve a sejttanyagcsere és a jelátviteli utak szabályozása állhatnak. A CSE valójában egy erősen indukálható fehérje, amely különböző stimulációra, köztük az oxidatív stresszre, reagál⁵⁸. A CSE gyors indukciója a DT-vel kezelt nyugalmi állapotban lévő, nem osztódó perziszter sejtekben tehát egy adaptív túlélési stratégia lehet.

A DT kezelés hatására fokozódó CySSCy felvétel és a kéntartalmú kismolekulák emelkedett termelése magasabb Cys igényre utalnak, amely a Cys oxidatív katabolizmusának fokozódásával együtt elsősorban ellentmondásosnak tűnik. Erre az ellentmondásra egy lehetséges magyarázat, hogy a Cys lebontó út végterméke, a taurin, hasznos a kezelés alatt álló perziszter sejtek túlélése szempontjából. A taurin onkológiai szerepe egyelőre kevésbé ismert, szerepének feltárása melanómasejtekben a célzott terápiával szembeni rezisztencia kialakulása során egy potenciális új kutatási irány lehet a jövőben.

Tekintettel arra, hogy a CSE és a CBS fehérjék számos különböző reakciólépésen keresztül termelnek reaktív kén származékokat, megvizsgáltuk a Cys anyagcseretermékeinek egyensúlyi

szintjét, továbbá jelölt metioninnal és CySSCy-nel végeztünk kísérleteket, hogy az egyes enzimaktivitásokat specifikusan vizsgálni tudjuk. Ezek a kísérletek megerősítették a fehérjeszintekben mért különbségeket, ugyanis azt találtuk, hogy normál tenyésztési körülmények között, tehát elegendő CySSCy ellátottság mellett a CBS és CSE Cys-t termelő (kanonikus) funkciója elhanyagolható (3. ábra, I-es és II-es reakciók). Továbbá azt találtuk, hogy a DT kezelés hatására bekövetkezett emelkedés a CSE szintjében a 2 HCys-ből Hlant és H₂S termelésén keresztül hozzájárulhat a kezelés alatt álló sejtekben mért emelkedett H₂S szinthez. Ezek a kísérletek továbbá arra is rámutattak, hogy a DT kezelés alatt álló sejtekben az emelkedett H₂S termelés nem a 3. ábra IV., V. és VI. reakcióin keresztül történik. Fontos megemlíteni, hogy a III. és IX. reakciót ezzel a megközelítéssel nem tudjuk elválasztani egymástól, ugyanis mindkét reakció esetén jelölt piruvát keletkezik a H₂S vagy a Cys-SSH termelése mellett.

Bár normál tenyésztési körülmények között a CSE és CBS kanonikus funkciója elhanyagolhatóan bizonyult *in vitro*, egy másik projekt keretein belül HEK-293 sejtvonalon megmutattuk, hogy az *in vivo* körülményekhez hasonló CySSCy koncentráció mellett a kanonikus út aktivitása fokozódik. Továbbá TRP14 génkiütés hatására azt láttuk, hogy a TRP14 hiányában a sejtek a Cys igényüket emelkedett transzszulfurációs aktivitással igyekeznek pótolni.

Ida és munkatársai korábban megmutatták, hogy a CySSCy jobb szubsztrátja a CSE-nek (3. ábra, IX. reakció), mint a Cys⁶³, azonban fiziológiás körülmények között az alacsony CySSCy/Cys arány következtében ez a IX. reakció alacsony mértékben megy végbe⁹⁰. A mi rendszerünkben azonban, ahol a DT kezelés a fokozott CSE expresszió mellett emelkedett CySSCy szintekhez és magasabb CySSCy/Cys arányhoz, illetve csökkent egyensúlyi Cys és Cth szintekhez vezetett, a IX. reakció releváns lehet a kezelés alatt álló perziszter sejtekben a Cys-SSH emelkedett termelésében a túlélés biztosítása érdekében. Azzal a céllal, hogy a CSE Cys-SSH-ot termelő funkcióját a melanómasejtekben igazoljuk, a CSE-t túltermelő és CSE-hiányos melanóma sejtvonalakat vizsgáltunk. Ezek a kísérletek rámutattak arra, hogy a CSE szintjét tovább emelve a Cys-SSH termelése tovább fokozódott, míg a CSE-hiányos sejtekben a Cys-SSH még DT kezelés hatására sem emelkedett meg. Ezek a kísérletek egyértelműen azt mutatják, hogy melanómasejtekben a DT kezelés hatására emelkedett CSE expresszió fokozott Cys-SSH termeléshez vezet a 3. ábra IX. reakcióján keresztül, hiszen a CSE túltermelése a CySSCy szintjét (szubsztrát) csökkentette, míg a génkiütés hatására a CySSCy szintje megemelkedett. Továbbá ezek a kísérletek bizonyítják, hogy a DT kezelés hatására emelkedett

CSE aktivitás felelős a Cys-SSH emelkedett termeléséért, hiszen a CSE-hiányos sejtekben a Cys-SSH szintje DT kezelés hatására sem emelkedett meg. Ezek az eredmények alapkutatói szempontból is nagy jelentőséggel bírnak, ugyanis rávilágítanak, hogy a transzszulfurációs enzimeknek a kanonikus szerepük mellett reaktív kén származékokat termelő funkciójuk által is rendkívül fontos daganatbiológiai szerep jut ⁶⁷.

Az emelkedett perszulfid szintek védelmet nyújthatnak a metallofehérjék által indukált oxidatív stresszel ⁷⁵ és a lipid peroxidáció által kiváltott ferroptózissal szemben ^{93,94}. Emellett a fehérjék tiol csoportjainak perszulfidációja mint poszttranszlációs módosulat fontos jelátviteli szerepet tölt be a fehérjefunkciók szabályozásán keresztül ^{90,99-101}, illetve védi a fehérjéket az irreverzibilis oxidatív módosulatok kialakulásától ^{98,103,128}. Az emelkedett kis molekulatömegű perszulfid szintekkel összhangban, a DT kezelés következtében két különböző módszerrel is emelkedést találtunk a fehérjék perszulfidációjában. Továbbá a fehérje-szulfénsav és -per-tio-szulfénsav származékok emelkedett szintje a DT kezelés következtében igazolja a kezelés hatására keletkezett oxidatív stressz fehérjék oxidációjára kifejtett hatását, továbbá közvetlenül mutatja, hogy a perszulfidáció védi a fehérjéket az oxidatív károsodás okozta degradációtól (31. ábra).

A perszulfidált fehérje frakcióból történő azonosítás rávilágított arra, hogy a DT kezelés hatására számos stresszválaszban fontos fehérje perszulfidációja megemelkedett, köztük a kataláz, a fehérje-diszulfid-izomerázok, a hősokk fehérjék és a Prx-ek. A Prx2 esetén sikerült megerősítenünk ezen fehérje emelkedett perszulfidációját, amely összhangban áll azzal, hogy önmagában a DT kezelés során miért nem találtunk emelkedést a Prx-SO₂₋₃ forma szintjében, hiszen a perszulfidált Prx-ek oxidációja révén olyan módosulatok keletkeznek, amelyet a sejtek redox védelmi rendszere még vissza tud alakítani natív tiol formává (4. ábra), így az oxidált, degradációra ítélt módosulat nem halmozódik fel. A perszulfidált fehérjék azonosítása a különböző kezelésekként álló daganatos sejtekből új mechanisztikus információkat szolgáltathat a jövőben és ezáltal mélyebben megérthetjük a perszulfidáció tumorbiológiai szerepét.

Annak érdekében, hogy a perszulfidáció szerepét a perziszter melanómasejtek védelmében megvizsgáljuk, stabil géncsendesítést hoztunk létre a perszulfidok lebontásáért felelős *ETHE1*-re nézve. Az *ETHE1* géncsendesített sejtekben valóban emelkedett a perszulfidok szintje, amelyet DT kezeléssel még tovább tudtunk emelni. A DT kezelés esetén az sh*ETHE1* sejtekben mért emelkedett gamma-glutamil-cisztein szint arra utal, hogy az *ETHE1* géncsendesítés fokozta a GSH termelését, ami azért is fontos, mert az sh*ETHE1* sejtek nem tudják a GSSH-t

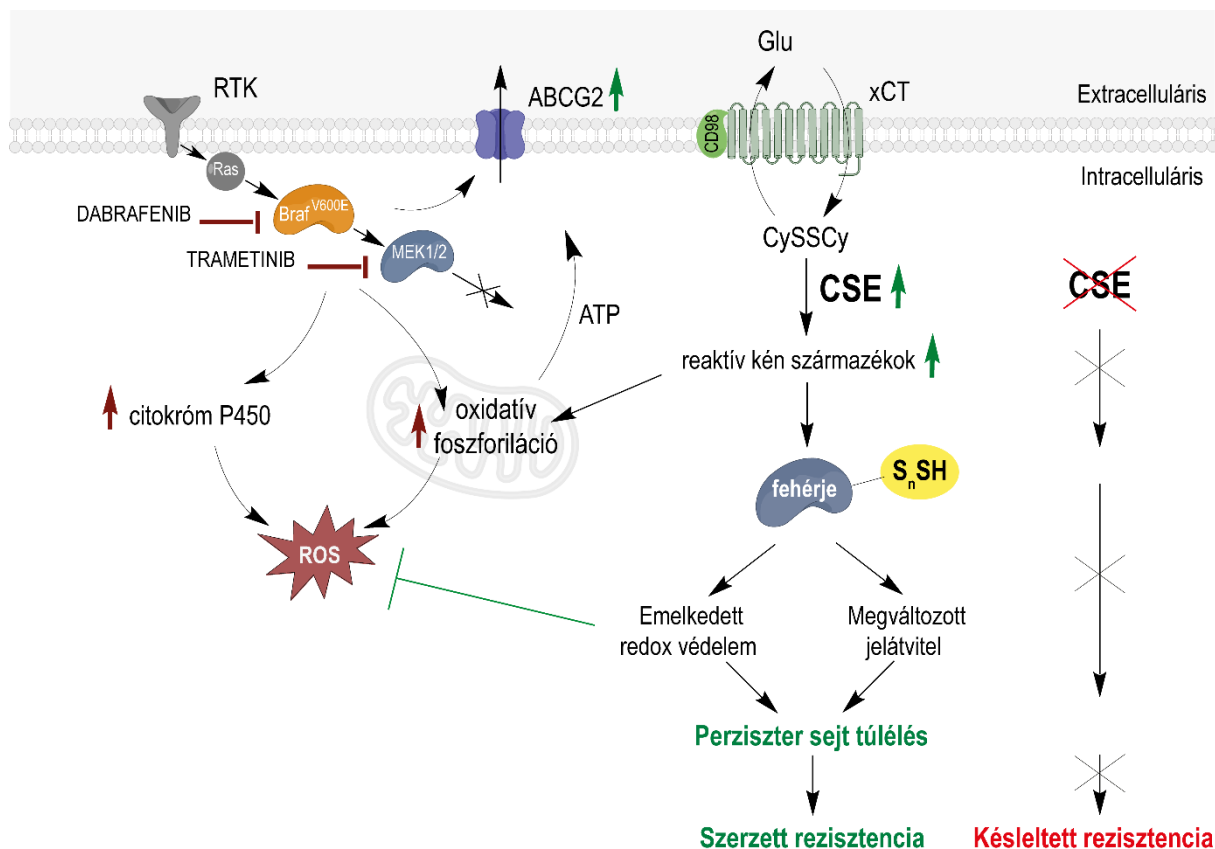
visszaredukálni GSH-ná, így feltehetően a GSH termelése által próbálják ezt a hiányukat kompenzálni. Továbbá a DT kezelés alatt álló shEHE1 melanómasejtekben a TrxR1 magasabb szintje arra utal, hogy az ETHE1 hiányában a DT kezelés hatására emelkedett perszulfidszinteket a TrxR1 tartja kordában. Ez azért is fontos, mert a TrxR1 egyike azoknak a fehérjéknek, amelyek szintje a rezisztens sejtekben is magas expressziót mutat, tehát az ETHE1 géncsendesítés a TrxR1 szintek emelése által is hozzájárulhat a szerzett rezisztencia kialakulásához. Az észlelésünk, miszerint az ETHE1 hiánya előnyt jelent a DT kezelés alatt álló melanómasejteknek a szerzett rezisztencia kialakulása során azt mutatja, hogy a perszulfidok emelkedett szintje valóban védi a kezelés alatt álló perziszter sejteket a MAPK útvonal gátlása révén keletkező stressztől, így hozzájárulva a szerzett rezisztencia kialakulásához.

A reaktív kén származékok intracelluláris szintje nem csupán a termelésükön keresztül szabályozott. A szulfid és perszulfid szintek kordában tartása elengedhetetlen, ugyanis a H₂S nagy koncentrációban gátolja az elektrontranszportlánc IV-es komplexét, ezáltal blokkolva a mitokondriális sejtlegzést. A szulfid/perszulfid szintek egyik legfőbb szabályozója a mitokondriális lebontó útvonal, amely működése nélkülözhetetlen a fiziológias H₂S koncentráció fenntartásához. Fontos azonban kiemelni, hogy H₂S toxicitás leginkább exogén H₂S hatására következik be, fiziológias körülmények között a H₂S fokozza az elektrontranszportlánc működését, ugyanis lebontása révén elektronokat ad le az SQOR-en keresztül a koenzim Q-nak. Mindhárom *in vitro* modellrendszerünkben azt találtuk, hogy a fokozott szulfid/perszulfid termelés mellett a MAPK útvonal gátlása a szulfid lebontó útvonalat is aktiválta, ezáltal a reaktív kén származékok fokozott fluxusához vezetett. Ez azért is nagyon fontos, mert mint azt a fentiekben ismertettük, a MAPK gátlás alatt álló melanómasejtekben fokozódott a mitokondriális sejtlegzés, amelyhez az emelkedett szulfid fluxus is hozzájárulhat (31. ábra), ehhez pedig a citromsavciklus NADH-t és FADH₂-t termelő lépései is segítséget nyújtanak. Az emelkedett sejtlegzés az oxidatív foszforiláción keresztül fokozott ATP termelést eredményez, amely szükséges a gyógyszerek kipumpálásáért felelős az energiaigényes ABCG2 transzporter működtetéséhez. Az ABCG2 fehérje egy tumorsejtekben széleskörben expresszálandó transzporter, amely egyaránt képes a módosítatlan és a módosított xenobiotikumok eltávolítására a sejten kívüli térbe ¹⁴¹. Szerepe elsősorban az említett folyamatban ismert, bár vannak arra utaló irodalmi adatok, hogy az ABC transzporter családba tartozó egyes izoformák képesek a terápia indukálta oxidatív stressz közvetett vagy közvetlen ellensúlyozására ¹⁴², és ezáltal például a lipid peroxidáció közömbösítésében is szerepet

játszanak ¹⁴³. Bár ezt jelen munkánk során egyelőre nem teszteltük, elképzelhetőnek tartjuk, hogy az ABCG2-nek a dolgozatban bemutatott folyamatok esetén is hasonló szerep juthat, hiszen a terápia indukálta oxidatív terhelést rajtunk kívül más publikációkban is alátámasztották ^{33,56}, illetve a lipid peroxidáció jelentőségét egy másik munkacsoport korábban igazolta ¹⁴⁴. Ehhez hasonlóan a GSH esetén a jelen dolgozatban megmutattuk, hogy a redox védelemben és a gyógyszer-közömbösítésben egyaránt fontos jelentőséggel bír.

További terveink között szerepel, hogy az ABCG2 szerepét a B-Raf és MEK inhibitorokra rezisztens melanómában a jövőben kísérletesen is alátámasszuk. Elképzelhetőnek tartjuk, hogy az ABCG2 központi szerepet játszik a rezisztencia kialakulásában, bár ettől függetlenül azt gondoljuk, hogy a dolgozatban említett redox rendszerek a rezisztens állapot eléréséhez a kezelés hatására kialakuló oxidatív stressz közömbösítésének és a kezelés túlélésének lényeges elemei. Irodalmi adatok és saját eredményeink alapján a rezisztens sejtek érzékenyek a sejtleggést gátló szerekre, az oxidatív ágensek közömbösítésében részt vevő fehérjék gátlására, illetve a PI3K/Akt útvonal gátlószereire. Tehát korábbi publikációk és saját kísérleti eredményeink alapján azt gondoljuk, hogy a melanómasejtekben bekövetkezett anyagcsere-átrendeződések a jelátviteli változásokkal és a gyógyszersemlegesítési mechanizmusokkal együttesen szükségesek a rezisztencia kialakulásához, részben azért, hogy az említett energiaigényes pumpa (vagy adott esetben pumpák) működtetése meg tudjon valósulni. A jelen dolgozat egyik célja az volt, hogy a rezisztencia kialakulását vezérlő sejtbiológiai folyamatok komplexitására rávilágítson és az egyes útvonalakat összefüggéseiben tárgyalja.

Az itt bemutatott munka egy fontos célkitűzése az volt, hogy olyan célpontot azonosítsunk, amelynek gátlása a rezisztencia kialakulásának késleltetéséhez vezet. Ahogy azt a dolgozat során ismertettük, a MAPK útvonal gátlásának következtében számos fehérje expressziója megemelkedett, amelyek a sejtek védelmét célozzák és ezáltal potenciális célpontként szolgálhatnak. Ezek közül a CSE azért is lehet egy kiváló választás, mert viszonylag szelektív gátlószere, a PAG kereskedelmi forgalomban is kapható. Emellett megmutattuk, hogy a másik enzim, a CBS, amely a H₂S és a perszulfidok termelésében szintén fontos, lecsökken a MAPK útvonal gátlása következtében, így feltételeztük, hogy a kezelés alatt álló perziszter sejtek érzékenyebbek a CSE gátlására. Az *in vitro* és *in vivo* eredményeinkkel összhangban a CSE emelkedett szintet mutatott a DT kezelés alatt álló páciensek szövetmintáiban. Bár ez az eredmény, amely az ilyen minták limitált elérhetősége révén rendelkezésre álló alacsony elemszám miatt óvatossággal kezelendő, arra utal, hogy a CSE-nek a kezelés alatt álló humán tumorok esetén is fontos szerep juthat.



31. ábra | A dolgozat legfontosabb eredményeit röviden összefoglaló szemléltető ábra. A B-Raf V600E és a MEK1/2 gátlás következtében nő az oxidatív foszforiláció és a citokróm P450 fehérjék expressziója, amelyek emelkedett ROS termeléshez vezetnek. Az oxidatív stressz ellensúlyozásához a sejtek több CySSCy-t vesznek fel, amelyből a CSE reaktív kén származékokat termel, amelyek tovább fokozzák az oxidatív foszforilációt. A reaktív kén származékok emelkedett szintje fokozott fehérje perszulfidációhoz vezet, amely védi a sejteket az emelkedett ROS szintektől és megváltoztatja a jelátviteli utak működését, ezáltal hozzájárulva a perziszter sejtek túléléséhez és a szerzett rezisztencia kialakulásához. A CSE gátlás együttes alkalmazása a MAPK útvonal gátlásával késlelteti a rezisztencia kialakulását.

Ezzel összhangban a CSE aktivitásának módosításával a rezisztencia kialakulását befolyásolni tudtuk *in vitro*: a kezelés alatt álló sejtek esetén a CSE túltermelése proliferatív előnyt jelentett, ameddig hiánya, illetve aktivitásának farmakológiai gátlása késleltette a rezisztencia kialakulását (31. ábra). Továbbá a terápia-naiv sejtekkel végzett *in vitro* és *in vivo* kísérletek arra utaltak, hogy a CSE a kezelés alatt álló melanómasejtekben lesz meghatározó jelentőségű, a CSE gátlása terápia-naiv sejtek esetén nem befolyásolta a melanómasejtek proliferációját, a tumorok növekedését, illetve azok vaszkularizációját. Bár a MAPK inhibitorok és a PAG hatékonysága mögött álló molekuláris mechanizmusok egyelőre csak részlegesen feltártak, a

detektált változások alapján azt feltételezzük, hogy a CSE által termelt kis molekulatömegű Cys-SSH a perszulfidáció emelkedett szintjéhez, és ezáltal a célzott terápia alatt álló melanómasejtek védelméhez vezet. Továbbá az emelkedett perszulfidáció következtében a poszttranszlációs módosítások révén változik a különböző jelátviteli útvonalak, például a PI3K/Akt útvonal aktivitása, amely fontos szerepet játszik a szerzett rezisztencia kialakulásában. Ezáltal a PAG kezelés esetén mért csökkenés az Akt foszforilációjában azt jelzi, hogy a hosszútávú PAG kezelés gátolja a PI3K-Akt útvonal működését, amely részben hozzájárulhat a szerzett rezisztencia kialakulásának gátlásához. A háttérben álló molekuláris mechanizmusok még nem kerültek egészében feltárássra, későbbi terveink között szerepel, hogy módszertani fejlesztéseket követően a perszulfidáció szerepét a B-Raf és MEK inhibitor kezelés alatt álló melanómasejtek jelátviteli folyamatainak szabályozásában mélyebben megértsük.

A célzott terápia és a PAG kombináció hatékonysága *in vivo* körülmények között azt mutatja, hogy a CSE gátlása, mint kiegészítő terápia növelheti a jelenleg elérhető terápiás lehetőségek nyújtotta progressziómentes túlélés időtartamát, ezáltal új fejlesztéseket nyitva a jövőben elérhető kezelési lehetőségek terén.

8. Új Kísérleti eredmények tézispontokban összefoglalva

- Az általunk felállított *in vitro* modell karakterizálása során azt találtuk, hogy a dabrafenib-trametinib kezelés alatt álló sejtekben megemelkedett a rezisztencia kialakulásában szerepet játszó az ABCG2 transzporter, a glutation-S-transzferáz pi és a citokróom P450 gének expressziója, melyek közül az utóbbi hozzájárulhat a dabrafenib-trametinib kezelés hatására kialakuló oxidatív stresszhez.
- Megmutattuk, hogy a *BRAF* V600E mutációt hordozó melanómasejtek esetén a MAPK útvonal gátlása révén kialakult oxidatív stressz a fehérjék oxidatív módosulatainak emelkedett szintjéhez vezetett.
- Azt találtuk, hogy a dabrafenib-trametinib kezelés következtében számos antioxidáns fehérje expressziója megemelkedett, melyek közül a tioredoxin-reduktáz 1 és a szuperoxid-diszmutáz 2 a rezisztens sejtekben is magasabbnak bizonyult.
- Megmutattuk, hogy a glikolízis és a pentóz-foszfát ciklus szabályozásában szerepet játszó 6-foszfofrukto-2-kináz (PFKFB) 3 dabrafenib-trametinib kezelés hatására lecsökkent, míg a PFKB 4 szintje megnőtt.
- Azt találtuk, hogy a dabrafenib-trametinib kezelés alatt álló sejtekben észlelt emelkedett glutaminfelvétel a perziszter sejtekben magas glutamináz expresszióval, míg a rezisztens sejtekben alacsony glutamin-szintetáz szinttel párosult.
- Megmutattuk, hogy a dabrafenib-trametinib kezelés hatására bekövetkezett emelkedett cisztinfelvétellel összhangban a célzott terápiát a cisztin-glutamát antiportert gátló erastin vegyülettel kombinálva a szerzett rezisztencia késleltethető volt.
- Azt találtuk, hogy a B-Raf V600E gátlásának következtében a cisztationin-gamma-liáz (CSE) expressziója megnőtt, mely a reaktív kén származékok emelkedett szintjével párosult, miközben a cisztationin-béta-szintáz (CBS) szintje lecsökkent. A rezisztens sejtekben a CSE, a CBS és a reaktív kén származékok szintje is helyreállt a terápia-naiv sejtekben mért szintre, a glutation-perszulfid szintje azonban magas maradt.
- Megmutattuk, hogy a dabrafenib-trametinib kezelés alatt álló perziszter sejtekben magasnak bizonyult a cisztin szintje, míg a cisztein szintje mind a perziszter, mind a rezisztens sejtekben alacsonyabb volt, mely mindkét sejtvonal esetén a cisztein katabolizmus fokozott aktivitásával párosult.

- Metabolomikai és fluxomikai mérésekkel megmutattuk, hogy a dabrafenib-trametinib kezelés alatt álló perziszter sejtekben a CSE emelkedett szintje fokozott hidrogén-szulfid termeléshez vezetett, mégpedig homocisztein szubsztrátból homolantionin termelése mellett.
- CSE-hiányos és a CSE-t stabilan túltermelő melanómasejtvonalakkal megmutattuk, hogy a CSE emelkedett expressziója felelős a kezelés alatt álló perziszter sejtekben a cisztein-perszulfid fokozott termeléséért, még hozzá a cisztint használva szubsztrátként.
- Azt találtuk, hogy a dabrafenib-trametinib kezelés hatására bekövetkezett oxidatív stressz a fehérjék cisztein oldalláncainak fokozott oxidációjához és perszulfidációjához vezetett. Emellett megmutattuk, hogy a perszulfidáció védi a fehérjéket az irreverzibilis oxidatív módosulatok kialakulásától.
- Megmutattuk, hogy a perszulfidáció emelkedett szintje fontos a perziszter sejtek védelmében, ugyanis a perszulfidok bontásáért felelős enzim csendesítésével a perszulfidok szintje megemelkedett és a géncsökkentett sejtek hamarabb váltak rezisztenssé a dabrafenib-trametinib kezeléssel szemben.
- Azt találtuk, hogy a hidrogén-szulfid mitokondriális lebontásának fluxusa megemelkedett dabrafenib-trametinib kezelés hatására.
- A cisztein és a hidrogén-szulfid anyagcseréjében bekövetkezett változásokat vemurafenib kezelés alatt álló A375 sejtvonal, illetve dabrafenib-trametinib kezelés alatt álló SK-MEL-28 sejtvonal, A375 sejtvonal-alapú és humán tumor-alapú xenograft egérmodellek esetén is igazoltuk.
- Azt találtuk, hogy a kezelés előtti és utáni humán melanóma mintapárokban a dabrafenib-trametinib kezelés hatására a CSE szintje megemelkedett.
- A CSE-t túltermelő sejtvonal használatával megmutattuk, hogy a magasabb CSE szintek mellett a rezisztencia hamarabb kialakult.
- *In vitro* kísérleteink alapján a CSE genetikai vagy farmakológiai gátlásával a szerzett rezisztencia kialakulása késleltethető volt.
- Állatmodellben megmutattuk, hogy a B-Raf V600E és MEK inhibitorokat a CSE gátlószerekkel kombinálva az egerek progressziómentes túlélése növelhető.

9. Összefoglalás

A *BRAF* V600E mutációt hordozó melanóma az egyik legveszélyesebb bőrráktípus, mely az agresszivitása és folyamatosan növekvő incidenciája miatt óriási terhet jelent. Bár a jelenleg elérhető célzott kezelések nagyon hatékony terápiás válaszhoz vezetnek, a szerzett rezisztencia kialakulása a legtöbb esetben elkerülhetetlen. A mutáns B-Raf és a *downstream* MEK1/2 kináz gátlása szerteágazó anyagcsere-átprogramozáshoz vezet, mely magába foglalja a csökkent glikolízist, illetve az emelkedett glutaminolízist, oxidatív foszforilációt, CYP aktivációt és oxidatív stresszt. A fokozott oxidatív terhelést a kezelés alatt álló perziszter sejtek a pentóz-foszfát út aktivációjával és a redox védelmi rendszerek emelkedett működésével kompenzálják. Az oxidatív stressz ellensúlyozásához szükséges Cys-t a kezelés alatt álló sejtek emelkedett CySSCy felvétellel igyekeznek pótolni, mely elengedhetetlen a túlélésük szempontjából, hiszen a kezelés alatt álló melanómasejtek érzékenyebbek a CySSCy transzport gátlására. A B-Raf gátlás következtében a perziszter sejtekben a CBS szintje lecsökken, míg a CSE és a H₂S lebontó útvonal enzimek megemelkednek. A rezisztencia kialakulását követően ezen fehérjék szintje a terápia-naiv sejtekhez hasonló szintre áll vissza. Ezek az észlelések a célzott terápia hatására fellépő akut stresszválaszra utalnak, mely a rezisztencia kialakulása során mérséklődik az anabolikus utak helyreállása és ezáltal sejtproliferáció fokozódása érdekében. A célzott metabolomikai vizsgálataink, illetve a génmódosított sejtvonalakkal végzett kísérleteink együttesen arra utalnak, hogy a célzott terápia hatására emelkedett CSE aktivitás nem a Cys-t termelő funkciója, hanem a reaktív kén származékokat termelő szerepe révén segíti a perziszter sejtek túlélését. A Cys-SSH CySSCy-ből történő termelését a sejtek a CySSCy fokozott felvételével és a CDO útvonalon keresztül az alacsony egyensúlyi Cys szint szabályozásával fedezik, mely a magas CySSCy/Cys arány és a csökkent CBS aktivitás következtében kialakult alacsony Cth szint révén kedvez ennek a reakciónak. A sejtvonal- és a humán betegminta-alapú xenograft modellek segítségével sikerült a DT kezelés kénanyagcserére kifejtett hatását *in vivo* körülmények között is igazolnunk. Eredményeink azt mutatják, hogy a célzott terápia hatására bekövetkezett emelkedés a szulfid/perszulfid termelésben fokozza az elektrontranszportlánc működését és megvédi a fehérjék tiol oldalláncait. Legfontosabb észlelésünk, hogy a CSE aktivitásának genetikai és farmakológiai módosítása befolyásolja a szerzett rezisztencia kialakulását, illetve a CSE szelektív gátlásával a szerzett rezisztencia kialakulása késleltethető. A CSE DT kezelés hatására történő túltermelése melanóma páciensek esetén együtt az *in vivo* eredményeinkkel azt mutatja, hogy a MAPK útvonal gátlását CSE gátlással kiegészítve a jelenleg elérhető terápiák nyújtotta progressziómentes túlélés növelhető.

10. Summary

BRAF V600E mutant melanoma is one of the deadliest forms of skin cancer, remains to be a serious healthcare issue with its aggressivity and elevated incidence each year. Although the available targeted therapies are initially highly efficient, acquired resistance rapidly develops in most cases leading to tumor progression. Dual inhibition of the mutant B-Raf and the downstream MEK1/2 kinase leads to metabolic reprogramming including decreased glycolysis with increased activity of glutaminolysis, oxidative phosphorylation, CYP activation, which also leads to oxidative stress. The increased oxidative burden is counteracted by elevated activity of the pentose phosphate pathway and the antioxidant systems utilizing NADPH. Increased Cys demand to support these systems is covered by elevated CySSCy uptake which is inevitable for persister cell survival shown by the sensitivity of drug-treated persister cells to xCT inhibition. Inhibition of B-Raf leads to decreased levels of CBS, whereas the levels of CSE and H₂S catabolic enzymes increased. By acquiring resistance, these enzyme levels restored to therapy-naïve control levels. These observations reflect an immediate stress response upon targeted therapy, which is balanced upon acquiring resistance to restore the anabolic machinery allowing cell proliferation. Our targeted metabolic analyses together with experiments using genetically modified cells showed that increased activity of CSE upon targeted therapy support persister cell survival by producing elevated levels of reactive sulfur species. Production of Cys-SSH from CySSCy is supported by increased uptake of CySSCy and decreased levels of Cys, where the latter was maintained by the CDO pathway leading to increased CySSCy/Cys ratio which together with low Cth levels (as a result of decreased CBS activity) favor this reaction. Using cell line- and patient-derived xenograft models, effects of DT treatment on sulfur metabolism were confirmed under *in vivo* conditions. Our results show that targeted therapy resulting in increased sulfide/persulfide production activates the mitochondrial electron transport chain and protects protein thiols from irreversible oxidation. Most importantly, by genetically or pharmacologically altering the activity of CSE we can influence the onset of acquired resistance. Hence, CSE upregulation upon DT treatment in melanoma patients' samples together with our *in vivo* results show that using CSE as a secondary drug target can improve progression free survival.

11. Irodalomjegyzék

1. Forsea, A.M. (2020). Melanoma Epidemiology and Early Detection in Europe: Diversity and Disparities. *Dermatol Pract Concept* 10, e2020033. 10.5826/dpc.1003a33.
2. Davies, H., Bignell, G.R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., Teague, J., Woffendin, H., Garnett, M.J., Bottomley, W., et al. (2002). Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 417, 949-954. 10.1038/nature00766.
3. Prahallad, A., Sun, C., Huang, S., Di Nicolantonio, F., Salazar, R., Zecchin, D., Beijersbergen, R.L., Bardelli, A., and Bernards, R. (2012). Unresponsiveness of colon cancer to BRAF(V600E) inhibition through feedback activation of EGFR. *Nature* 483, 100-103. 10.1038/nature10868.
4. Robert, C., Karaszewska, B., Schachter, J., Rutkowski, P., Mackiewicz, A., Stroiakovski, D., Lichinitser, M., Dummer, R., Grange, F., Mortier, L., et al. (2015). Improved overall survival in melanoma with combined dabrafenib and trametinib. *N Engl J Med* 372, 30-39. 10.1056/NEJMoa1412690.
5. Sosman, J.A., Kim, K.B., Schuchter, L., Gonzalez, R., Pavlick, A.C., Weber, J.S., McArthur, G.A., Hutson, T.E., Moschos, S.J., Flaherty, K.T., et al. (2012). Survival in BRAF V600-mutant advanced melanoma treated with vemurafenib. *N Engl J Med* 366, 707-714. 10.1056/NEJMoa1112302.
6. Davis, L.E., Shalin, S.C., and Tackett, A.J. (2019). Current state of melanoma diagnosis and treatment. *Cancer Biol Ther* 20, 1366-1379. 10.1080/15384047.2019.1640032.
7. Luis, R., Brito, C., and Pojo, M. (2020). Melanoma Metabolism: Cell Survival and Resistance to Therapy. *Adv Exp Med Biol* 1219, 203-223. 10.1007/978-3-030-34025-4_11.
8. Sun, C., Wang, L., Huang, S., Heynen, G.J., Prahallad, A., Robert, C., Haanen, J., Blank, C., Wesseling, J., Willems, S.M., et al. (2014). Reversible and adaptive resistance to BRAF(V600E) inhibition in melanoma. *Nature* 508, 118-122. 10.1038/nature13121.
9. Tangella, L.P., Clark, M.E., and Gray, E.S. (2021). Resistance mechanisms to targeted therapy in BRAF-mutant melanoma - A mini review. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 1865, 129736. 10.1016/j.bbagen.2020.129736.
10. Pu, Y., Li, L., Peng, H., Liu, L., Heymann, D., Robert, C., Vallette, F., and Shen, S. (2023). Drug-tolerant persister cells in cancer: the cutting edges and future directions. *Nat Rev Clin Oncol* 20, 799-813. 10.1038/s41571-023-00815-5.
11. Santos-de-Frutos, K., and Djouder, N. (2021). When dormancy fuels tumour relapse. *Commun Biol* 4, 747. 10.1038/s42003-021-02257-0.
12. Johnson, D.B., Menzies, A.M., Zimmer, L., Eroglu, Z., Ye, F., Zhao, S., Rizos, H., Sucker, A., Scolyer, R.A., Gutzmer, R., et al. (2015). Acquired BRAF inhibitor resistance: A multicenter meta-analysis of the spectrum and frequencies, clinical behaviour, and phenotypic associations of resistance mechanisms. *Eur J Cancer* 51, 2792-2799. 10.1016/j.ejca.2015.08.022.
13. Patel, M., Eckburg, A., Gantiwala, S., Hart, Z., Dein, J., Lam, K., and Puri, N. (2021). Resistance to Molecularly Targeted Therapies in Melanoma. *Cancers (Basel)* 13. 10.3390/cancers13051115.

14. Long, G.V., Fung, C., Menzies, A.M., Pupo, G.M., Carlino, M.S., Hyman, J., Shahheydari, H., Tembe, V., Thompson, J.F., Saw, R.P., et al. (2014). Increased MAPK reactivation in early resistance to dabrafenib/trametinib combination therapy of BRAF-mutant metastatic melanoma. *Nat Commun* 5, 5694. 10.1038/ncomms6694.
15. Nazarian, R., Shi, H., Wang, Q., Kong, X., Koya, R.C., Lee, H., Chen, Z., Lee, M.K., Attar, N., Sazegar, H., et al. (2010). Melanomas acquire resistance to B-RAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation. *Nature* 468, 973-977. 10.1038/nature09626.
16. Rizos, H., Menzies, A.M., Pupo, G.M., Carlino, M.S., Fung, C., Hyman, J., Haydu, L.E., Mijatov, B., Becker, T.M., Boyd, S.C., et al. (2014). BRAF inhibitor resistance mechanisms in metastatic melanoma: spectrum and clinical impact. *Clin Cancer Res* 20, 1965-1977. 10.1158/1078-0432.CCR-13-3122.
17. Shi, H., Hugo, W., Kong, X., Hong, A., Koya, R.C., Moriceau, G., Chodon, T., Guo, R., Johnson, D.B., Dahlman, K.B., et al. (2014). Acquired resistance and clonal evolution in melanoma during BRAF inhibitor therapy. *Cancer Discov* 4, 80-93. 10.1158/2159-8290.CD-13-0642.
18. Carlino, M.S., Fung, C., Shahheydari, H., Todd, J.R., Boyd, S.C., Irvine, M., Nagrial, A.M., Scolyer, R.A., Kefford, R.F., Long, G.V., and Rizos, H. (2015). Preexisting MEK1P124 mutations diminish response to BRAF inhibitors in metastatic melanoma patients. *Clin Cancer Res* 21, 98-105. 10.1158/1078-0432.CCR-14-0759.
19. Corcoran, R.B., Dias-Santagata, D., Bergethon, K., Iafrate, A.J., Settleman, J., and Engelman, J.A. (2010). BRAF gene amplification can promote acquired resistance to MEK inhibitors in cancer cells harboring the BRAF V600E mutation. *Sci Signal* 3, ra84. 10.1126/scisignal.2001148.
20. Poulidakos, P.I., Persaud, Y., Janakiraman, M., Kong, X., Ng, C., Moriceau, G., Shi, H., Atefi, M., Titz, B., Gabay, M.T., et al. (2011). RAF inhibitor resistance is mediated by dimerization of aberrantly spliced BRAF(V600E). *Nature* 480, 387-390. 10.1038/nature10662.
21. Vido, M.J., Le, K., Hartsough, E.J., and Aplin, A.E. (2018). BRAF Splice Variant Resistance to RAF Inhibitor Requires Enhanced MEK Association. *Cell Rep* 25, 1501-1510 e1503. 10.1016/j.celrep.2018.10.049.
22. Johannessen, C.M., Boehm, J.S., Kim, S.Y., Thomas, S.R., Wardwell, L., Johnson, L.A., Emery, C.M., Stransky, N., Cogdill, A.P., Barretina, J., et al. (2010). COT drives resistance to RAF inhibition through MAP kinase pathway reactivation. *Nature* 468, 968-972. 10.1038/nature09627.
23. Chi, M., Ye, Y., Zhang, X.D., and Chen, J. (2014). Insulin induces drug resistance in melanoma through activation of the PI3K/Akt pathway. *Drug Des Devel Ther* 8, 255-262. 10.2147/DDDT.S53568.
24. Irvine, M., Stewart, A., Pedersen, B., Boyd, S., Kefford, R., and Rizos, H. (2018). Oncogenic PI3K/AKT promotes the step-wise evolution of combination BRAF/MEK inhibitor resistance in melanoma. *Oncogenesis* 7, 72. 10.1038/s41389-018-0081-3.
25. Anastas, J.N., Kulikauskas, R.M., Tamir, T., Rizos, H., Long, G.V., von Euw, E.M., Yang, P.T., Chen, H.W., Haydu, L., Toroni, R.A., et al. (2014). WNT5A enhances resistance of melanoma cells to targeted BRAF inhibitors. *J Clin Invest* 124, 2877-2890. 10.1172/JCI70156.

26. Yoo, H.C., and Han, J.M. (2022). Amino Acid Metabolism in Cancer Drug Resistance. *Cells* *11*. 10.3390/cells11010140.
27. DeBerardinis, R.J., and Chandel, N.S. (2016). Fundamentals of cancer metabolism. *Sci Adv* *2*, e1600200. 10.1126/sciadv.1600200.
28. Pavlova, N.N., and Thompson, C.B. (2016). The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *Cell Metab* *23*, 27-47. 10.1016/j.cmet.2015.12.006.
29. Pavlova, N.N., Zhu, J., and Thompson, C.B. (2022). The hallmarks of cancer metabolism: Still emerging. *Cell Metab* *34*, 355-377. 10.1016/j.cmet.2022.01.007.
30. Schulze, A., and Harris, A.L. (2012). How cancer metabolism is tuned for proliferation and vulnerable to disruption. *Nature* *491*, 364-373. 10.1038/nature11706.
31. Hall, A., Meyle, K.D., Lange, M.K., Klima, M., Sanderhoff, M., Dahl, C., Abildgaard, C., Thorup, K., Moghimi, S.M., Jensen, P.B., et al. (2013). Dysfunctional oxidative phosphorylation makes malignant melanoma cells addicted to glycolysis driven by the (V600E)BRAF oncogene. *Oncotarget* *4*, 584-599. 10.18632/oncotarget.965.
32. Corazao-Rozas, P., Guerreschi, P., Andre, F., Gabert, P.E., Lancel, S., Dekioux, S., Fontaine, D., Tardivel, M., Savina, A., Quesnel, B., et al. (2016). Mitochondrial oxidative phosphorylation controls cancer cell's life and death decisions upon exposure to MAPK inhibitors. *Oncotarget* *7*, 39473-39485. 10.18632/oncotarget.7790.
33. Corazao-Rozas, P., Guerreschi, P., Jendoubi, M., Andre, F., Jonneaux, A., Scalbert, C., Garcon, G., Malet-Martino, M., Balayssac, S., Rocchi, S., et al. (2013). Mitochondrial oxidative stress is the Achille's heel of melanoma cells resistant to Braf-mutant inhibitor. *Oncotarget* *4*, 1986-1998. 10.18632/oncotarget.1420.
34. Baenke, F., Chaneton, B., Smith, M., Van Den Broek, N., Hogan, K., Tang, H., Viros, A., Martin, M., Galbraith, L., Girotti, M.R., et al. (2016). Resistance to BRAF inhibitors induces glutamine dependency in melanoma cells. *Mol Oncol* *10*, 73-84. 10.1016/j.molonc.2015.08.003.
35. Murphy, M.P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J* *417*, 1-13. 10.1042/BJ20081386.
36. Wallace, D.C. (2012). Mitochondria and cancer. *Nat Rev Cancer* *12*, 685-698. 10.1038/nrc3365.
37. Halliwell, B. (2007). Oxidative stress and cancer: have we moved forward? *Biochem J* *401*, 1-11. 10.1042/BJ20061131.
38. Hayes, J.D., Dinkova-Kostova, A.T., and Tew, K.D. (2020). Oxidative Stress in Cancer. *Cancer Cell* *38*, 167-197. 10.1016/j.ccell.2020.06.001.
39. Trachootham, D., Alexandre, J., and Huang, P. (2009). Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nat Rev Drug Discov* *8*, 579-591. 10.1038/nrd2803.
40. Wang, J., and Yi, J. (2008). Cancer cell killing via ROS: to increase or decrease, that is the question. *Cancer Biol Ther* *7*, 1875-1884. 10.4161/cbt.7.12.7067.
41. Arner, E.S., and Holmgren, A. (2006). The thioredoxin system in cancer. *Semin Cancer Biol* *16*, 420-426. 10.1016/j.semcancer.2006.10.009.

42. Lu, J., and Holmgren, A. (2014). The thioredoxin antioxidant system. *Free Radic Biol Med* 66, 75-87. 10.1016/j.freeradbiomed.2013.07.036.
43. Nicolussi, A., D'Inzeo, S., Capalbo, C., Giannini, G., and Coppa, A. (2017). The role of peroxiredoxins in cancer. *Mol Clin Oncol* 6, 139-153. 10.3892/mco.2017.1129.
44. Yi, M., Ban, Y., Tan, Y., Xiong, W., Li, G., and Xiang, B. (2019). 6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3 and 4: A pair of valves for fine-tuning of glucose metabolism in human cancer. *Mol Metab* 20, 1-13. 10.1016/j.molmet.2018.11.013.
45. Ros, S., Santos, C.R., Moco, S., Baenke, F., Kelly, G., Howell, M., Zamboni, N., and Schulze, A. (2012). Functional metabolic screen identifies 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 4 as an important regulator of prostate cancer cell survival. *Cancer Discov* 2, 328-343. 10.1158/2159-8290.CD-11-0234.
46. Erdelyi, K., Ditroi, T., Johansson, H.J., Czikora, A., Balog, N., Silwal-Pandit, L., Ida, T., Olasz, J., Hajdu, D., Matrai, Z., et al. (2021). Reprogrammed transsulfuration promotes basal-like breast tumor progression via realigning cellular cysteine persulfidation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 118. 10.1073/pnas.2100050118.
47. Bonifacio, V.D.B., Pereira, S.A., Serpa, J., and Vicente, J.B. (2021). Cysteine metabolic circuitries: druggable targets in cancer. *Br J Cancer* 124, 862-879. 10.1038/s41416-020-01156-1.
48. Stipanuk, M.H. (2004). Sulfur amino acid metabolism: pathways for production and removal of homocysteine and cysteine. *Annu Rev Nutr* 24, 539-577. 10.1146/annurev.nutr.24.012003.132418.
49. Stipanuk, M.H., and Ueki, I. (2011). Dealing with methionine/homocysteine sulfur: cysteine metabolism to taurine and inorganic sulfur. *J Inherit Metab Dis* 34, 17-32. 10.1007/s10545-009-9006-9.
50. Dominy, J.E., Jr., Hirschberger, L.L., Coloso, R.M., and Stipanuk, M.H. (2006). Regulation of cysteine dioxygenase degradation is mediated by intracellular cysteine levels and the ubiquitin-26 S proteasome system in the living rat. *Biochem J* 394, 267-273. 10.1042/BJ20051510.
51. Combs, J.A., and DeNicola, G.M. (2019). The Non-Essential Amino Acid Cysteine Becomes Essential for Tumor Proliferation and Survival. *Cancers (Basel)* 11. 10.3390/cancers11050678.
52. Cramer, S.L., Saha, A., Liu, J., Tadi, S., Tiziani, S., Yan, W., Triplett, K., Lamb, C., Alters, S.E., Rowlinson, S., et al. (2017). Systemic depletion of L-cyst(e)ine with cyst(e)inase increases reactive oxygen species and suppresses tumor growth. *Nat Med* 23, 120-127. 10.1038/nm.4232.
53. Dixon, S.J., Lemberg, K.M., Lamprecht, M.R., Skouta, R., Zaitsev, E.M., Gleason, C.E., Patel, D.N., Bauer, A.J., Cantley, A.M., Yang, W.S., et al. (2012). Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell* 149, 1060-1072. 10.1016/j.cell.2012.03.042.
54. Lin, W., Wang, C., Liu, G., Bi, C., Wang, X., Zhou, Q., and Jin, H. (2020). SLC7A11/xCT in cancer: biological functions and therapeutic implications. *Am J Cancer Res* 10, 3106-3126.

55. Tang, X., Ding, C.K., Wu, J., Sjol, J., Wardell, S., Spasojevic, I., George, D., McDonnell, D.P., Hsu, D.S., Chang, J.T., and Chi, J.T. (2017). Cystine addiction of triple-negative breast cancer associated with EMT augmented death signaling. *Oncogene* *36*, 4379. 10.1038/onc.2017.192.
56. Wang, L., Leite de Oliveira, R., Huijberts, S., Bosdriesz, E., Pencheva, N., Brunen, D., Bosma, A., Song, J.Y., Zevenhoven, J., Los-de Vries, G.T., et al. (2018). An Acquired Vulnerability of Drug-Resistant Melanoma with Therapeutic Potential. *Cell* *173*, 1413-1425 e1414. 10.1016/j.cell.2018.04.012.
57. Pader, I., Sengupta, R., Cebula, M., Xu, J., Lundberg, J.O., Holmgren, A., Johansson, K., and Arner, E.S. (2014). Thioredoxin-related protein of 14 kDa is an efficient L-cystine reductase and S-denitrosylase. *Proc Natl Acad Sci U S A* *111*, 6964-6969. 10.1073/pnas.1317320111.
58. Sbodio, J.I., Snyder, S.H., and Paul, B.D. (2019). Regulators of the transsulfuration pathway. *Br J Pharmacol* *176*, 583-593. 10.1111/bph.14446.
59. Czikora, A., Erdelyi, K., Ditroi, T., Szanto, N., Juranyi, E.P., Szanyi, S., Tovari, J., Strausz, T., and Nagy, P. (2022). Cystathionine beta-synthase overexpression drives metastatic dissemination in pancreatic ductal adenocarcinoma via inducing epithelial-to-mesenchymal transformation of cancer cells. *Redox Biol* *57*, 102505. 10.1016/j.redox.2022.102505.
60. Weber, R., and Birsoy, K. (2019). The Transsulfuration Pathway Makes, the Tumor Takes. *Cell Metab* *30*, 845-846. 10.1016/j.cmet.2019.10.009.
61. Zhang, H.F., Klein Geltink, R.I., Parker, S.J., and Sorensen, P.H. (2022). Transsulfuration, minor player or crucial for cysteine homeostasis in cancer. *Trends Cell Biol* *32*, 800-814. 10.1016/j.tcb.2022.02.009.
62. Zhu, J., Berisa, M., Schworer, S., Qin, W., Cross, J.R., and Thompson, C.B. (2019). Transsulfuration Activity Can Support Cell Growth upon Extracellular Cysteine Limitation. *Cell Metab* *30*, 865-876 e865. 10.1016/j.cmet.2019.09.009.
63. Ida, T., Sawa, T., Ihara, H., Tsuchiya, Y., Watanabe, Y., Kumagai, Y., Suematsu, M., Motohashi, H., Fujii, S., Matsunaga, T., et al. (2014). Reactive cysteine persulfides and S-polythiolation regulate oxidative stress and redox signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* *111*, 7606-7611. 10.1073/pnas.1321232111.
64. Kumar, R., and Banerjee, R. (2021). Regulation of the redox metabolome and thiol proteome by hydrogen sulfide. *Crit Rev Biochem Mol Biol* *56*, 221-235. 10.1080/10409238.2021.1893641.
65. Cirino, G., Szabo, C., and Papapetropoulos, A. (2023). Physiological roles of hydrogen sulfide in mammalian cells, tissues, and organs. *Physiol Rev* *103*, 31-276. 10.1152/physrev.00028.2021.
66. Cortese-Krott, M.M., Koning, A., Kuhnle, G.G.C., Nagy, P., Bianco, C.L., Pasch, A., Wink, D.A., Fukuto, J.M., Jackson, A.A., van Goor, H., et al. (2017). The Reactive Species Interactome: Evolutionary Emergence, Biological Significance, and Opportunities for Redox Metabolomics and Personalized Medicine. *Antioxid Redox Signal* *27*, 684-712. 10.1089/ars.2017.7083.

67. Borbenyi-Galambos, K., Czikora, A., Erdelyi, K., and Nagy, P. (2024). Versatile roles of cysteine persulfides in tumor biology. *Curr Opin Chem Biol* 79, 102440. 10.1016/j.cbpa.2024.102440.
68. Ascencao, K., and Szabo, C. (2022). Emerging roles of cystathionine beta-synthase in various forms of cancer. *Redox Biol* 53, 102331. 10.1016/j.redox.2022.102331.
69. Giuffre, A., Tome, C.S., Fernandes, D.G.F., Zuhra, K., and Vicente, J.B. (2020). Hydrogen Sulfide Metabolism and Signaling in the Tumor Microenvironment. *Adv Exp Med Biol* 1219, 335-353. 10.1007/978-3-030-34025-4_17.
70. Hellmich, M.R., and Szabo, C. (2015). Hydrogen Sulfide and Cancer. *Handb Exp Pharmacol* 230, 233-241. 10.1007/978-3-319-18144-8_12.
71. Machado-Neto, J.A., Cerqueira, A.R.A., Verissimo-Filho, S., Muscara, M.N., Costa, S.K.P., and Lopes, L.R. (2023). Hydrogen Sulfide Signaling in the Tumor Microenvironment: Implications in Cancer Progression and Therapy. *Antioxid Redox Signal*. 10.1089/ars.2021.0256.
72. Panza, E., De Cicco, P., Armogida, C., Scognamiglio, G., Gigantino, V., Botti, G., Germano, D., Napolitano, M., Papapetropoulos, A., Bucci, M., et al. (2015). Role of the cystathionine gamma lyase/hydrogen sulfide pathway in human melanoma progression. *Pigment Cell Melanoma Res* 28, 61-72. 10.1111/pcmr.12312.
73. Szabo, C. (2016). Gasotransmitters in cancer: from pathophysiology to experimental therapy. *Nat Rev Drug Discov* 15, 185-203. 10.1038/nrd.2015.1.
74. Szczesny, B., Marcatti, M., Zatarain, J.R., Druzhyina, N., Wiktorowicz, J.E., Nagy, P., Hellmich, M.R., and Szabo, C. (2016). Inhibition of hydrogen sulfide biosynthesis sensitizes lung adenocarcinoma to chemotherapeutic drugs by inhibiting mitochondrial DNA repair and suppressing cellular bioenergetics. *Sci Rep* 6, 36125. 10.1038/srep36125.
75. Doman, A., Doka, E., Garai, D., Bogdandi, V., Balla, G., Balla, J., and Nagy, P. (2023). Interactions of reactive sulfur species with metalloproteins. *Redox Biol* 60, 102617. 10.1016/j.redox.2023.102617.
76. Kevil, C., Cortese-Krott, M.M., Nagy, P., Papapetropoulos, A., Feelisch, M., and Szabo, C. (2017). Cooperative Interactions Between NO and H₂S: Chemistry, Biology, Physiology, Pathophysiology. *Nitric Oxide: Biology and Pathobiology*, 3rd Edition, 57-83. 10.1016/B978-0-12-804273-1.00005-3.
77. Mustafa, A.K., Gadalla, M.M., Sen, N., Kim, S., Mu, W., Gazi, S.K., Barrow, R.K., Yang, G., Wang, R., and Snyder, S.H. (2009). H₂S signals through protein S-sulfhydration. *Sci Signal* 2, ra72. 10.1126/scisignal.2000464.
78. Libiad, M., Vitvitsky, V., Bostelaar, T., Bak, D.W., Lee, H.J., Sakamoto, N., Fearon, E., Lyssiotis, C.A., Weerapana, E., and Banerjee, R. (2019). Hydrogen sulfide perturbs mitochondrial bioenergetics and triggers metabolic reprogramming in colon cells. *J Biol Chem* 294, 12077-12090. 10.1074/jbc.RA119.009442.
79. Szabo, C. (2021). Hydrogen Sulfide, an Endogenous Stimulator of Mitochondrial Function in Cancer Cells. *Cells* 10. 10.3390/cells10020220.
80. Szabo, C., Coletta, C., Chao, C., Modis, K., Szczesny, B., Papapetropoulos, A., and Hellmich, M.R. (2013). Tumor-derived hydrogen sulfide, produced by cystathionine-

- beta-synthase, stimulates bioenergetics, cell proliferation, and angiogenesis in colon cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* *110*, 12474-12479. 10.1073/pnas.1306241110.
81. Vitvitsky, V., Kumar, R., Libiad, M., Maebius, A., Landry, A.P., and Banerjee, R. (2021). The mitochondrial NADH pool is involved in hydrogen sulfide signaling and stimulation of aerobic glycolysis. *J Biol Chem* *296*, 100736. 10.1016/j.jbc.2021.100736.
 82. Cai, F.F., Xu, H.R., Cao, N.N., Zhang, X.Y., Liu, J., Lu, Y.Y., Chen, J., Yang, Y.W., Cheng, J., Hua, Z.C., and Zhuang, H.Q. (2020). ADT-OH, a hydrogen sulfide-releasing donor, induces apoptosis and inhibits the development of melanoma in vivo by upregulating FADD. *Cell Death & Disease* *11*. ARTN 33
10.1038/s41419-020-2222-9.
 83. De Cicco, P., Panza, E., Armogida, C., Ercolano, G., Tagliatalata-Scafati, O., Shokoohinia, Y., Camerlingo, R., Pirozzi, G., Calderone, V., Cirino, G., and Ianaro, A. (2017). The Hydrogen Sulfide Releasing Molecule Acetyl Deacylasadisulfide Inhibits Metastatic Melanoma. *Front Pharmacol* *8*, 65. 10.3389/fphar.2017.00065.
 84. De Cicco, P., Panza, E., Ercolano, G., Armogida, C., Sessa, G., Pirozzi, G., Cirino, G., Wallace, J.L., and Ianaro, A. (2016). ATB-346, a novel hydrogen sulfide-releasing anti-inflammatory drug, induces apoptosis of human melanoma cells and inhibits melanoma development in vivo. *Pharmacol Res* *114*, 67-73. 10.1016/j.phrs.2016.10.019.
 85. Ercolano, G., De Cicco, P., Frecentese, F., Saccone, I., Corvino, A., Giordano, F., Magli, E., Fiorino, F., Severino, B., Calderone, V., et al. (2019). Anti-metastatic Properties of Naproxen-HBTA in a Murine Model of Cutaneous Melanoma. *Front Pharmacol* *10*, 66. 10.3389/fphar.2019.00066.
 86. Xiao, Q., Ying, J., Qiao, Z.H., Yang, Y.W., Dai, X.X., Xu, Z.Y., Zhang, C.F., and Xiang, L.H. (2020). Exogenous hydrogen sulfide inhibits human melanoma cell development via suppression of the PI3K/AKT/ mTOR pathway. *J Dermatol Sci* *98*, 26-34. 10.1016/j.jdermsci.2020.02.004.
 87. Nagy, P., Palinkas, Z., Nagy, A., Budai, B., Toth, I., and Vasas, A. (2014). Chemical aspects of hydrogen sulfide measurements in physiological samples. *Biochim Biophys Acta* *1840*, 876-891. 10.1016/j.bbagen.2013.05.037.
 88. Bianco, C.L., Chavez, T.A., Sosa, V., Saund, S.S., Nguyen, Q.N.N., Tantillo, D.J., Ichimura, A.S., Toscano, J.P., and Fukuto, J.M. (2016). The chemical biology of the persulfide (RSSH)/perthiyl (RSS.) redox couple and possible role in biological redox signaling. *Free Radic Biol Med* *101*, 20-31. 10.1016/j.freeradbiomed.2016.09.020.
 89. Switzer, C.H. (2023). How super is supersulfide?: Reconsidering persulfide reactivity in cellular biology. *Redox Biol* *67*, 102899. 10.1016/j.redox.2023.102899.
 90. Yadav, P.K., Martinov, M., Vitvitsky, V., Seravalli, J., Wedmann, R., Filipovic, M.R., and Banerjee, R. (2016). Biosynthesis and Reactivity of Cysteine Persulfides in Signaling. *J Am Chem Soc* *138*, 289-299. 10.1021/jacs.5b10494.
 91. Akaike, T., Ida, T., Wei, F.Y., Nishida, M., Kumagai, Y., Alam, M.M., Ihara, H., Sawa, T., Matsunaga, T., Kasamatsu, S., et al. (2017). Cysteinyl-tRNA synthetase governs cysteine polysulfidation and mitochondrial bioenergetics. *Nat Commun* *8*, 1177. 10.1038/s41467-017-01311-y.

92. Kohl, J.B., Mellis, A.T., and Schwarz, G. (2019). Homeostatic impact of sulfite and hydrogen sulfide on cysteine catabolism. *Br J Pharmacol* *176*, 554-570. 10.1111/bph.14464.
93. Barayeu, U., Schilling, D., Eid, M., Xavier da Silva, T.N., Schlicker, L., Mitreska, N., Zapp, C., Grater, F., Miller, A.K., Kappl, R., et al. (2022). Hydropersulfides inhibit lipid peroxidation and ferroptosis by scavenging radicals. *Nat Chem Biol*. 10.1038/s41589-022-01145-w.
94. Wu, Z., Khodade, V.S., Chauvin, J.R., Rodriguez, D., Toscano, J.P., and Pratt, D.A. (2022). Hydropersulfides Inhibit Lipid Peroxidation and Protect Cells from Ferroptosis. *J Am Chem Soc* *144*, 15825-15837. 10.1021/jacs.2c06804.
95. Pedre, B., and Dick, T.P. (2021). 3-Mercaptopyruvate sulfurtransferase: an enzyme at the crossroads of sulfane sulfur trafficking. *Biol Chem* *402*, 223-237. 10.1515/hsz-2020-0249.
96. Pedre, B., Talwar, D., Barayeu, U., Schilling, D., Luzarowski, M., Sokolowski, M., Glatt, S., and Dick, T.P. (2023). 3-Mercaptopyruvate sulfur transferase is a protein persulfidase. *Nat Chem Biol*. 10.1038/s41589-022-01244-8.
97. Dey, A., Prabhudesai, S., Zhang, Y., Rao, G., Thirugnanam, K., Hossen, M.N., Dwivedi, S.K.D., Ramchandran, R., Mukherjee, P., and Bhattacharya, R. (2020). Cystathione beta-synthase regulates HIF-1alpha stability through persulfidation of PHD2. *Sci Adv* *6*. 10.1126/sciadv.aaz8534.
98. Doka, E., Ida, T., Dagnell, M., Abiko, Y., Luong, N.C., Balog, N., Takata, T., Espinosa, B., Nishimura, A., Cheng, Q., et al. (2020). Control of protein function through oxidation and reduction of persulfidated states. *Sci Adv* *6*, eaax8358. 10.1126/sciadv.aax8358.
99. Filipovic, M.R., Zivanovic, J., Alvarez, B., and Banerjee, R. (2018). Chemical Biology of H₂S Signaling through Persulfidation. *Chem Rev* *118*, 1253-1337. 10.1021/acs.chemrev.7b00205.
100. Gao, X.H., Krokowski, D., Guan, B.J., Bederman, I., Majumder, M., Parisien, M., Diatchenko, L., Kabil, O., Willard, B., Banerjee, R., et al. (2015). Quantitative H₂S-mediated protein sulfhydration reveals metabolic reprogramming during the integrated stress response. *Elife* *4*, e10067. 10.7554/eLife.10067.
101. Krishnan, N., Fu, C., Pappin, D.J., and Tonks, N.K. (2011). H₂S-Induced sulfhydration of the phosphatase PTP1B and its role in the endoplasmic reticulum stress response. *Sci Signal* *4*, ra86. 10.1126/scisignal.2002329.
102. Modis, K., Ju, Y., Ahmad, A., Untereiner, A.A., Altaany, Z., Wu, L., Szabo, C., and Wang, R. (2016). S-Sulfhydration of ATP synthase by hydrogen sulfide stimulates mitochondrial bioenergetics. *Pharmacol Res* *113*, 116-124. 10.1016/j.phrs.2016.08.023.
103. Zivanovic, J., Kouroussis, E., Kohl, J.B., Adhikari, B., Bursac, B., Schott-Roux, S., Petrovic, D., Miljkovic, J.L., Thomas-Lopez, D., Jung, Y., et al. (2019). Selective Persulfide Detection Reveals Evolutionarily Conserved Antiaging Effects of S-Sulfhydration. *Cell Metab* *30*, 1152-1170 e1113. 10.1016/j.cmet.2019.10.007.
104. Asimakopoulou, A., Panopoulos, P., Chasapis, C.T., Coletta, C., Zhou, Z., Cirino, G., Giannis, A., Szabo, C., Spyroulias, G.A., and Papapetropoulos, A. (2013). Selectivity of commonly used pharmacological inhibitors for cystathionine beta synthase (CBS)

- and cystathionine gamma lyase (CSE). *Br J Pharmacol* 169, 922-932. 10.1111/bph.12171.
105. Sun, Q., Collins, R., Huang, S., Holmberg-Schiavone, L., Anand, G.S., Tan, C.H., vanden-Berg, S., Deng, L.W., Moore, P.K., Karlberg, T., and Sivaraman, J. (2009). Structural basis for the inhibition mechanism of human cystathionine gamma-lyase, an enzyme responsible for the production of H₂S. *J Biol Chem* 284, 3076-3085. 10.1074/jbc.M805459200.
 106. Whiteman, M., Le Trionnaire, S., Chopra, M., Fox, B., and Whatmore, J. (2011). Emerging role of hydrogen sulfide in health and disease: critical appraisal of biomarkers and pharmacological tools. *Clin Sci (Lond)* 121, 459-488. 10.1042/CS20110267.
 107. Szabo, C. (2007). Hydrogen sulphide and its therapeutic potential. *Nat Rev Drug Discov* 6, 917-935. 10.1038/nrd2425.
 108. Lin, H., Yu, Y., Zhu, L., Lai, N., Zhang, L., Guo, Y., Lin, X., Yang, D., Ren, N., Zhu, Z., and Dong, Q. (2023). Implications of hydrogen sulfide in colorectal cancer: Mechanistic insights and diagnostic and therapeutic strategies. *Redox Biol* 59, 102601. 10.1016/j.redox.2023.102601.
 109. Wang, R.H., Chu, Y.H., and Lin, K.T. (2021). The Hidden Role of Hydrogen Sulfide Metabolism in Cancer. *Int J Mol Sci* 22. 10.3390/ijms22126562.
 110. Kolacsek, O., Krizsik, V., Schamberger, A., Erdei, Z., Apati, A., Varady, G., Mates, L., Izsvak, Z., Ivics, Z., Sarkadi, B., and Orban, T.I. (2011). Reliable transgene-independent method for determining Sleeping Beauty transposon copy numbers. *Mob DNA* 2, 5. 10.1186/1759-8753-2-5.
 111. Tovari, J., Vari-Mezo, D., Surguta, S.E., Ladanyi, A., Kigyos, A., and Cserepes, M. (2023). Evolving Acquired Vemurafenib Resistance in a BRAF V600E Mutant Melanoma PDTX Model to Reveal New Potential Targets. *Cells* 12. 10.3390/cells12141919.
 112. Bankhead, P., Loughrey, M.B., Fernandez, J.A., Dombrowski, Y., McArt, D.G., Dunne, P.D., McQuaid, S., Gray, R.T., Murray, L.J., Coleman, H.G., et al. (2017). QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Sci Rep* 7, 16878. 10.1038/s41598-017-17204-5.
 113. Kozich, V., Ditroi, T., Sokolova, J., Krizkova, M., Krijt, J., Jesina, P., and Nagy, P. (2019). Metabolism of sulfur compounds in homocystinurias. *Br J Pharmacol* 176, 594-606. 10.1111/bph.14523.
 114. Doka, E., Pader, I., Biro, A., Johansson, K., Cheng, Q., Ballago, K., Prigge, J.R., Pastor-Flores, D., Dick, T.P., Schmidt, E.E., et al. (2016). A novel persulfide detection method reveals protein persulfide- and polysulfide-reducing functions of thioredoxin and glutathione systems. *Sci Adv* 2, e1500968. 10.1126/sciadv.1500968.
 115. Havlis, J., Thomas, H., Sebela, M., and Shevchenko, A. (2003). Fast-response proteomics by accelerated in-gel digestion of proteins. *Anal Chem* 75, 1300-1306. 10.1021/ac026136s.
 116. Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., and Mann, M. (1996). Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* 68, 850-858. 10.1021/ac950914h.

117. Veith, A., and Moorthy, B. (2018). Role of Cytochrome P450s in the Generation and Metabolism of Reactive Oxygen Species. *Curr Opin Toxicol* 7, 44-51. 10.1016/j.cotox.2017.10.003.
118. Featherston, T., Paumann-Page, M., and Hampton, M.B. (2024). Melanoma redox biology and the emergence of drug resistance. *Adv Cancer Res* 162, 145-171. 10.1016/bs.acr.2024.06.004.
119. Khamari, R., Trinh, A., Gabert, P.E., Corazao-Rozas, P., Riveros-Cruz, S., Balayssac, S., Malet-Martino, M., Dekioui, S., Joncquel Chevalier Curt, M., Maboudou, P., et al. (2018). Glucose metabolism and NRF2 coordinate the antioxidant response in melanoma resistant to MAPK inhibitors. *Cell Death Dis* 9, 325. 10.1038/s41419-018-0340-4.
120. Yang, W.S., SriRamaratnam, R., Welsch, M.E., Shimada, K., Skouta, R., Viswanathan, V.S., Cheah, J.H., Clemons, P.A., Shamji, A.F., Clish, C.B., et al. (2014). Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPX4. *Cell* 156, 317-331. 10.1016/j.cell.2013.12.010.
121. Townsend, D.M. (2007). S-glutathionylation: indicator of cell stress and regulator of the unfolded protein response. *Mol Interv* 7, 313-324. 10.1124/mi.7.6.7.
122. Townsend, D.M., and Tew, K.D. (2003). The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene* 22, 7369-7375. 10.1038/sj.onc.1206940.
123. Modis, K., Coletta, C., Erdelyi, K., Papapetropoulos, A., and Szabo, C. (2013). Intramitochondrial hydrogen sulfide production by 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase maintains mitochondrial electron flow and supports cellular bioenergetics. *FASEB J* 27, 601-611. 10.1096/fj.12-216507.
124. Nandi, D.L., Horowitz, P.M., and Westley, J. (2000). Rhodanese as a thioredoxin oxidase. *Int J Biochem Cell Biol* 32, 465-473. 10.1016/s1357-2725(99)00035-7.
125. Ubuka, T., Ohta, J., Akagi, R., Hosaki, Y., Ishimoto, Y., Kiguchi, S., Ikeda, T., and Ishino, K. (1992). Metabolism of L-cysteine via transamination pathway (3-mercaptopyruvate pathway). *Amino Acids* 3, 243-252. 10.1007/BF00805999.
126. Vettore, L., Westbrook, R.L., and Tennant, D.A. (2020). New aspects of amino acid metabolism in cancer. *Br J Cancer* 122, 150-156. 10.1038/s41416-019-0620-5.
127. Marti-Andres, P., Finamor, I., Torres-Cuevas, I., Perez, S., Rius-Perez, S., Colino-Lage, H., Guerrero-Gomez, D., Morato, E., Marina, A., Michalska, P., et al. (2024). TRP14 is the rate-limiting enzyme for intracellular cystine reduction and regulates proteome cysteinylolation. *EMBO J* 43, 2789-2812. 10.1038/s44318-024-00117-1.
128. Wedmann, R., Onderka, C., Wei, S., Szijarto, I.A., Miljkovic, J.L., Mitrovic, A., Lange, M., Savitsky, S., Yadav, P.K., Torregrossa, R., et al. (2016). Improved tag-switch method reveals that thioredoxin acts as depersulfidase and controls the intracellular levels of protein persulfidation. *Chem Sci* 7, 3414-3426. 10.1039/c5sc04818d.
129. Combi, Z., Potor, L., Nagy, P., Sikura, K.E., Ditroi, T., Juranyi, E.P., Galambos, K., Szerafin, T., Gergely, P., Whiteman, M., et al. (2023). Hydrogen sulfide as an anti-calcification stratagem in human aortic valve: Altered biogenesis and mitochondrial metabolism of H₂S lead to H₂S deficiency in calcific aortic valve disease. *Redox Biol* 60, 102629. 10.1016/j.redox.2023.102629.

130. Fujii, S., Sawa, T., Motohashi, H., and Akaike, T. (2019). Persulfide synthases that are functionally coupled with translation mediate sulfur respiration in mammalian cells. *Br J Pharmacol* *176*, 607-615. 10.1111/bph.14356.
131. Marutani, E., Morita, M., Hirai, S., Kai, S., Grange, R.M.H., Miyazaki, Y., Nagashima, F., Traeger, L., Magliocca, A., Ida, T., et al. (2021). Sulfide catabolism ameliorates hypoxic brain injury. *Nat Commun* *12*, 3108. 10.1038/s41467-021-23363-x.
132. Gubern, M., Andriamihaja, M., Nubel, T., Blachier, F., and Bouillaud, F. (2007). Sulfide, the first inorganic substrate for human cells. *FASEB J* *21*, 1699-1706. 10.1096/fj.06-7407com.
133. Szabo, C., Ransy, C., Modis, K., Andriamihaja, M., Murghes, B., Coletta, C., Olah, G., Yanagi, K., and Bouillaud, F. (2014). Regulation of mitochondrial bioenergetic function by hydrogen sulfide. Part I. Biochemical and physiological mechanisms. *Br J Pharmacol* *171*, 2099-2122. 10.1111/bph.12369.
134. Banerjee, R., and Kumar, R. (2022). Gas regulation of complex II reversal via electron shunting to fumarate in the mammalian ETC. *Trends Biochem Sci* *47*, 689-698. 10.1016/j.tibs.2022.03.011.
135. Jia, J., Wang, Z., Zhang, M., Huang, C., Song, Y., Xu, F., Zhang, J., Li, J., He, M., Li, Y., et al. (2020). SQR mediates therapeutic effects of H₂S by targeting mitochondrial electron transport to induce mitochondrial uncoupling. *Sci Adv* *6*, eaaz5752. 10.1126/sciadv.aaz5752.
136. Kumar, R., Landry, A.P., Guha, A., Vitvitsky, V., Lee, H.J., Seike, K., Reddy, P., Lyssiotis, C.A., and Banerjee, R. (2022). A redox cycle with complex II prioritizes sulfide quinone oxidoreductase-dependent H₂S oxidation. *J Biol Chem* *298*, 101435. 10.1016/j.jbc.2021.101435.
137. Hellmich, M.R., Coletta, C., Chao, C., and Szabo, C. (2015). The therapeutic potential of cystathionine beta-synthetase/hydrogen sulfide inhibition in cancer. *Antioxid Redox Signal* *22*, 424-448. 10.1089/ars.2014.5933.
138. Murphy, M.P., Bayir, H., Belousov, V., Chang, C.J., Davies, K.J.A., Davies, M.J., Dick, T.P., Finkel, T., Forman, H.J., Janssen-Heininger, Y., et al. (2022). Guidelines for measuring reactive oxygen species and oxidative damage in cells and in vivo. *Nat Metab* *4*, 651-662. 10.1038/s42255-022-00591-z.
139. Zhang, Z., Tan, Y., Huang, C., and Wei, X. (2023). Redox signaling in drug-tolerant persister cells as an emerging therapeutic target. *EBioMedicine* *89*, 104483. 10.1016/j.ebiom.2023.104483.
140. Hanna, D., Kumar, R., and Banerjee, R. (2022). A Metabolic Paradigm for Hydrogen Sulfide Signaling via Electron Transport Chain Plasticity. *Antioxid Redox Signal*. 10.1089/ars.2022.0067.
141. Szakacs, G., Varadi, A., Ozvegy-Laczka, C., and Sarkadi, B. (2008). The role of ABC transporters in drug absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADME-Tox). *Drug Discov Today* *13*, 379-393. 10.1016/j.drudis.2007.12.010.
142. Shi, J., Pabon, K., Ding, R., and Scotto, K.W. (2024). ABCG2 and SLC1A5 functionally interact to rewire metabolism and confer a survival advantage to cancer cells under oxidative stress. *J Biol Chem* *300*, 107299. 10.1016/j.jbc.2024.107299.

143. Szebenyi, K., Furedi, A., Bajtai, E., Sama, S.N., Csiszar, A., Gombos, B., Szabo, P., Grusch, M., and Szakacs, G. (2023). Effective targeting of breast cancer by the inhibition of P-glycoprotein mediated removal of toxic lipid peroxidation byproducts from drug tolerant persister cells. *Drug Resist Updat* 71, 101007. 10.1016/j.drug.2023.101007.
144. Viswanathan, V.S., Ryan, M.J., Dhruv, H.D., Gill, S., Eichhoff, O.M., Seashore-Ludlow, B., Kaffenberger, S.D., Eaton, J.K., Shimada, K., Aguirre, A.J., et al. (2017). Dependency of a therapy-resistant state of cancer cells on a lipid peroxidase pathway. *Nature* 547, 453-457. 10.1038/nature23007.



Nyilvántartási szám: DEENK/90/2025.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Borbényi-Galambos Klaudia
Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10084191

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Galambos, K.**, Erdélyi, K., Ditrói, T., Jurányi, E. P., Szántó, N., Szatmári, R., Czikora, Á., Schmidt, E. E., Garai, D., Cserepes, M., Liskay, G., Tóth, E., Tóvári, J., Nagy, P.: Realigned transsulfuration drives BRAF-V600E-targeted therapy resistance in melanoma. *Cell Metab.* [Epub ahead of print], 2025.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2025.01.021>
IF: 27.7 (2023)
2. Martí-Andrés, P., Finamor, I., Torres-Cuevas, I., Pérez, S., Rius-Pérez, S., Colino-Lage, H., Guerrero-Gómez, D., Morato, E., Marina, A., Michalska, P., León, R., Cheng, Q., Jurányi, E. P., **Galambos, K.**, Millán, I., Nagy, P., Miranda-Vizuete, A., Schmidt, E. E., Martínez-Ruiz, A., Arner, E. S. J., Sastre, J.: TRP14 is the rate-limiting enzyme for intracellular cystine reduction and regulates proteome cysteinylolation. *EMBO J.* 43 (13), 2789-2812, 2024.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/s44318-024-00117-1>
IF: 9.4 (2023)
3. **Galambos, K.**, Czikora, Á., Erdélyi, K., Nagy, P.: Versatile roles of cysteine persulfides in tumor biology. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 79, 1-8, 2024.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2024.102440>
IF: 6.9 (2023)





További közlemények

4. Combi, Z., Potor, L., Nagy, P., Sikura, K. É., Ditrói, T., Jurányi, E. P., **Galambos, K.**, Szerafin, T., Gergely, P., Whiteman, M., Torregrossa, R., Ding, Y., Beke, L., Hendrik, Z., Méhes, G., Balla, G., Balla, J.: Hydrogen sulfide as an anti-calcification stratagem in human aortic valve: altered biogenesis and mitochondrial metabolism of H₂S lead to H₂S deficiency in calcific aortic valve disease.
Redox Biol. 60, 1-19, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2023.102629>
IF: 10.7
5. Bogdándi, V., Ditrói, T., Batai, I. Z., Sándor, Z., Mignon, M., Vasas, A., **Galambos, K.**, Buglyó, P., Pintér, E., Feelisch, M., Nagy, P.: Nitrosopersulfide (SSNO) Is a Unique Cysteine Polysulfidating Agent with Reduction-Resistant Bioactivity.
Antioxid. Redox Signal. 33 (18), 1277-1294, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1089/ars.2020.8049>
IF: 8.401

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 63,101

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
44**

A DEENK a Jelölt által a Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2025.03.14.



12. Tárgyszavak

Magyar	English
melanóma	melanoma
BRAF V600E mutáció	BRAF V600E mutation
szerzett rezisztencia	acquired resistance
oxidatív stressz	oxidative stress
sejtanyagcsere	cell metabolism
cisztein-anyagcsere	cysteine metabolism
reaktív kén származékok	reactive sulfur species
transzszulfurációs út	transsulfuration pathway
cisztationin-gamma-liáz	cystathionine gamma-lyase
cisztationin-béta-szintáz	cystathionine beta-synthase
perszulfidáció	persulfidation

13. Köszönetnyilvánítás

Első sorban szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, **Prof. Nagy Péternek**, hogy a doktori munkámat, illetve azt megelőzően a mesterszakos munkámat töretlenül segítette, irányt mutatott és támogatott. Neki köszönhetem, hogy megismerkedtem a redox biológia világával és az ő útmutatása mellett mélyültem el a kutatásban.

Hálával tartozom **Dr. Erdélyi Katalinnak**, aki nem csupán a kísérletek kivitelezésével járult hozzá a dolgozathoz, hanem mint mentor segítette a munkámat az évek során, és gyakorlatilag minden módszertani ismeretemet neki köszönhetem.

Köszönöm az áldozatos munkáját **Szántó Noéminek**, a Molekuláris Immunológia és Toxikológia Osztály vezető asszisztensének, aki idejét nem sajnálva segített a kísérletek kivitelezésében, és a hosszúra nyúlt munkanapokon is odaadással segített.

Hálás vagyok **Jurányi Eszter Petrának**, aki az analitikai mérések jelentős részét végezte és emellett a közleményünk revíziója során rengeteget segített nekem.

Köszönöm a munkáját **Dr. Ditrői Tamásnak**, aki a mesterszakos munkám és a PhD-m során egyaránt segítette munkámat az analitikai mérések kivitelezésével és tanácsaival.

Köszönöm a segítségét **Dr. Garai Dorottyának** az állatkísérletek kivitelezésében és hogy a PhD képzés során az adminisztratív teendőkben segített.

Köszönöm **Dr. Czikora Ágnesnek** és **Szatmári Réka Zsuzsannának**, akik kiemelkedő módszertani ismeretükkel hozzájárultak a dolgozatban bemutatott eredményekhez.

Hálával tartozom **Lénárt Zsuzsannának**, a munkacsoportunk adminisztrátorának, hogy odaadással segíti a munkacsoportunk működését.

Szerencsés vagyok, hogy az elmúlt éveket olyan munkacsoportban tölthettem, ahol bizalommal fordulhattam minden kollégámhoz, akik szakmailag és emberileg segítették a mindennapokat. Köszönöm **Dr. Erdélyi Katalinnak**, **Dr. Czikora Ágnesnek**, **Dr. Garai Dorottyának**, **Szántó Noéminek**, **Jurányi Eszter Petrának**, **Szatmári Réka Zsuzsannának**, **Lénárt Zsuzsannának**, **Ditrői Tamásnak**, **Dr. Ditrőiné Dóka Évának**, **Dr. Somodi Laurának**, **Hakl Annamáriának**, **Dr. Domán Andreának**, **Dr. Gyöngy Zsuzsannának**, **Dr. Lopata Annának** és **Dörgő Daniellának**.

Köszönettel tartozom továbbá **Dr. Tóvári Józsefnek** és **Dr. Cserepes Mihály Tamásnak** a szakmai segítségüket az állatkísérletek kivitelezésében.

Köszönöm **Dr. Tóth Erikának** és **Prof. Dr. Liszkay Gabriellának** hozzájárulásukat a humán minták vizsgálatához.

Szeretném megköszönni asszisztensi munkáját **Hidvégi Anitának**, **Hakl Annamáriának** és **Békné Kaplar Emesének**.

Nagyon hálás vagyok a Richter Talentum Alapítványnak, hogy támogatták a PhD munkámat.

Végezetül hálásan köszönöm a támogatást és segítséget a családomnak, különösen a férjemnek, **Borbényi Mártonnak**.