

**DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI**

**ARANY ÉS EZÜST NANORÉSZECSKÉK SEJTBiolÓGIAI  
HATÁSAINAK VIZSGÁLATA P53 DEFICIENS RÁKOS SEJTEKBEN  
ÉS TUMOR METASZTÁZIS MODELLBEN**

**KOVÁCS DÁVID**

**TÉMAVEZETŐ:**

**DR. KIRICSI MÓNIKA**  
**EGYETEMI ADJUNKTUS**

**BIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA**



**SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM**

**TERMÉSZETTUDOMÁNYI ÉS INFORMATIKAI KAR**  
**BIOKÉMIAI ÉS MOLEKULÁRIS BIOLÓGIAI TANSZÉK**

**SZEGED**

**2017**

## 1. Bevezetés

Annak ellenére, hogy a rákos betegek klinikai kezelése során ma már számos újgenerációs tumor-terápiás lehetőség áll rendelkezésre, a tumoros megbetegedések magas mortalitása továbbra is jelzi, hogy igen fontos a meglévő terápiás eszközök hatékonyságának növelése, illetve az új kezelési stratégiák kifejlesztése. Az elmúlt évtizedben a nanotechnológia tudományának rohamos fejlődése lehetővé tette, hogy a nano-méretű anyagok diagnosztikai vagy terápiás eszközként már az orvostudomány gyakorlatában is alkalmazhatóak legyenek. A fém nanorészecskék a nanoanyagok egyik legnagyobb csoportját képezik, és egyedi fizikai-kémiai tulajdonságaik miatt felhasználásuk magas terápiás potenciállal rendelkezik. Míg az ezüst nanorészecskék kitűnő apoptózis-indukáló, tumor-ellenes hatást mutatnak *in vitro* és *in vivo* rendszerekben is, addig az arany nanorészecskék egyedülálló biokompatibilis tulajdonságuk, valamint radio-, és fotoszenzitizáló aktivitásuk miatt tűnnek ígéretes terápiás eszközöknek. Habár kiemelkedő sajátosságaik miatt számos csoport foglalkozik a fém nanorészecskék biológiai hatásainak részletes megismerésével, ma még nem tisztázott, hogy a fém nanorészecskék különböző fizikai-kémiai paraméterei – mint például méretük, illetve kémiai összetételük – hogyan befolyásolja kölcsönhatásaikat az élő sejtekkel.

A rákos megbetegedések szerveződése több biológiai szinten értelmezhető, és az egyes szerveződési szintek részletes megismerése nélkülözhetetlen az új terápiás célpontok azonosítása szempontjából. A tumoros transzformáció során a sejtekben számos genetikai változás történik, aminek eredményeként a kialakult rákos sejtek szelekciós előnyhöz jutnak. Ezek a változások lehetővé teszik, hogy a rákos sejtek korlátlan proliferációs képességgel rendelkezzenek, valamint, hogy túléléssel reagáljanak az apoptotikus stimulusokra. A tumoros transzformáció egyik fontos állomása, az apoptózis elindításában nélkülözhetetlen szerepet játszó tumorszuppresszor molekulák funkciójának eliminálása. A tumoros sejtekben leggyakrabban megfigyelt tumorszuppresszort érintő funkcióvesztéses mutáció a p53 fehérje esetén figyelhető meg. A p53 funkciójának kikapcsolása lehetővé teszi, hogy a rákos sejt elkerülje az apoptózist, ráadásul a p53 fehérjét érintő mutációk driver mutációként működve megengedik, hogy a sejtben kialakult instabil genom újabb genetikai variációkat hozzon létre, így elősegítve a tumor mikroevolúcióját, és az invazív malignus sejtek kialakulását.

Az optimálisan instabil genomi háttérrel rendelkező rákos sejtek képesek intenzív kommunikációt kialakítani a gazda-szövettel, aminek eredményeként a képződött tumor egy támogató mikro környezetbe ágyazva fejlődik. A rákos sejtek által indukált reaktív sztróma sejtjei elsősorban fibroblasztok, de számos más sejt típus is – például makrofágok vagy adipociták – is áldozatul esnek

a rákos sejtek toborzó aktivitásának. A tumorban található fibroblasztok aktivált fibroblaszt (miofibroblaszt) markereket hordoznak, és számos növekedési faktor szekrécióján keresztül képesek növelni a primer tumor proliferációs, inváziós és áttétképző aktivitását is.

## **2. Célkitűzések**

Mivel a p53-deficiens tumorsejtekben a kemoterápiás kezelések sok esetben nem, vagy csak csökkent mértékben képesek apoptotikus sejthalált indukálni, szeretnénk volna megtudni, hogy az ezüst nanorészecskék milyen hatékonysággal képesek apoptózist okozni p53-at kifejező, és p53-deficiens tumorsejtekben. Munkánk során azt is szeretnénk volna megállapítani, hogy az 5 nm és a 35 nm átmérőjű ezüst nanorészecskék eltérő, vagy megegyező molekuláris útvonalakon keresztül képesek a tumorsejtekben sejthalált kiváltani. Ennek érdekében vad típusú p53-at tartalmazó U2Os és p53-deficiens Saos-2 oszteoszarkóma sejteket kezeltünk 5 nm és 35 nm átmérőjű ezüst nanorészecskékkel, és megvizsgáltuk a sejtek apoptotikus válaszreakcióit az egyes kezeléseken során.

A reaktív tumor sztróma sejteinek támogató hatása nélkülözhetetlen szerepet játszik a metasztázisok kialakulása során. A tumorsejtek és a sztróma sejtek közti kommunikáció kitűnő terápiás célpontként szolgálhat a tumorok áttétképző aktivitásának csökkentése

érdekében. Éppen ezért, munkánk során egyrészt szeretttük volna megvizsgálni, hogy a fém nanorészecskék jelenléte a tumorok mikrokörnyezetében hogyan befolyásolja a sztróma fibroblaszt sejtei és a tumorsejtek közti kommunikációt. Másrészt, azt is szeretttük volna megállapítani, hogy a tumorsejt-fibroblaszt kommunikáció befolyásolása milyen mértékben függ az alkalmazott fém nanorészecskék kémiai összetételétől. Ennek érdekében ezüst, és arany nanorészecskék hatásait is vizsgáltuk tumorsejtekből és fibroblaszt sejtekből készített ko-kultúrákban, valamint *in vivo* 4T1 metasztázis modellben. Hogy ötvözzük az ezüst nanorészecskék kitűnő apoptózis-indukáló hatásait, de ugyanakkor csökkentjük az ezüst citotoxicitását és kihasználjuk az arany nanorészecskék biokompatibilis jellegét, a kísérletek során egy arany magból és ezüst héjból álló hibrid nanorészecske hatásait is megvizsgáltuk.

### 3. Anyagok és módszerek

A kísérletek során különböző tumorsejtekből és fibroblaszt sejtekből álló *in vitro* mono- és ko-kultúrákat használtunk. Indokolt esetekben a sejteket transzfektáltuk, valamint stimuláltuk nanorészecskékkel és más citotoxikus hatóanyagokkal. A sejtek viabilitásának vizsgálatát MTT esszé segítségével végeztük el, illetve a plazmamembrán integritásának tanulmányozása érdekében LDH aktivitást mértünk a sejtek felülszójából. A sejtek proliferációját és migrációját az egyes kezelések során BrdU inkorporációs és „wound healing” esszével határoztuk meg. A kísérletek során a sejtek apoptotikus válaszainak vizsgálatát áramlási citometria felhasználásával végeztük el. Immuncitokémiai módszerekkel detektáltuk a kaszpáz 3 aktivációját, és western blot eljárással detektáltuk az alkalmazott transzgén kifejeződését, illetve a citoplazmába jutott Citoktóm c fehérje mennyiségét. Szkennning és transzmissziós elektronmikroszkópia segítségével detektáltuk a sejtek felszínére tapadt, illetve a sejtekbe jutott nanorészecskéket, fluoreszcens mikroszkópia segítségével pedig a sejtek mitokondriális membránpotenciálját vizsgáltuk. Génexpressziós vizsgálatokat RT-qPCR-el, valamint Illumina MiSeq platformon végzett újgenerációs szekvenálással kivitelezett transzkriptóm analízissel végeztünk. Az *In vivo* tumornövekedést és metasztázis képződést Balb/c egérben alkalmazott 4T1 tumor modellben vizsgáltuk.

#### **4. Főbb eredmények és megállapítások**

1. Az 5 nm és 35 nm átmérőjű ezüst nanorészecskék bejutnak az oszteoszarkóma sejtekbe és megegyező mértékben csökkentik a p53-at tartalmazó U2Os és p53-deficiens Saos-2 sejtek viabilitását.
2. Az ezüst nanorészecskék p53 hiányában is képesek apoptotikus sejthalált indukálni.
3. Az 5 nm és 35 nm átmérőjű ezüst nanorészecskék aktiválják a p53-függő jelpályát U2Os sejtekben.
4. Az 5 nm és 35 nm átmérőjű nanorészecskék mitokondriális stresszt okoznak oszteoszarkóma sejtekben.
5. Az 5 nm és 35 nm átmérőjű ezüst nanorészecskék megegyező molekuláris útvonalakon keresztül okoznak sejthalált a vizsgált oszteoszarkóma sejtvonalakban.
6. Az ezüst és arany-ezüst hibrid nanorészecskék erősebb citotoxikus hatást gyakorolnak tumoros sejtekben, mint nem-tumoros fibroblaszt sejtekben.
7. Az ezüst és arany-ezüst hibrid nanorészecskék csökkentik a metasztatikus 4T1 sejtek proliferációs, migrációs és inváziós képességeit, míg az arany nanorészecske kezelések esetén nem tapasztalható ilyen hatás.

8. Az ezüst és arany-ezüst hibrid nanorészecskék csökkentik a tumor-asszociált fibroblaszt sejtek tumorsejt-támogató hatásait.
9. Az ezüst és arany-ezüst nanorészecskék hasonló transzkriptomikai változásokat indukálnak tumor-asszociált fibroblasztokban, és csökkentik számos extracelluláris növekedési faktor kifejeződését.
10. A lokálisan alkalmazott arany-ezüst hibrid nanorészecskék *in vivo* csökkentik a metasztatikus 4T1 tumorok áttétképző aktivását, és erősítik az intravénás doxorubicin terápia hatásfokát.

## 5. Összefoglalás

Munkánk során különböző fém nanorészecskék sejtbiológiai hatásait figyeltük meg p53-deficiens oszteoszarkóma sejtekben, valamint a tumorok mikrokörnyezetét szimuláló *in vitro*, és az áttétképzést modellező *in vivo* rendszerekben. Más kutatócsoportok eredményeihez hasonlóan mi is megállapítottuk, hogy a kisebb, 5 nm-átmérőjű ezüst nanorészecskék citoxikus hatása erősebb, mint a nagyobb méretű nanorészecskéké. Ez mellett megállapítottuk, hogy az ezüst nanorészecskék citotoxikus hatása mögött p53 hiányában is az apoptotikus folyamatok aktiválódása áll. Ez fontos tulajdonság, ugyanis a p53 hiánya miatt a tumorok sok esetben nem képesek apoptózissal válaszolni a konvencionális kemoterápiás kezelésekre, ami a terápia hatástalanságát eredményezheti. Megállapítottuk, hogy mind az 5 nm



mind a 35 nm méretű ezüst nanorészecskék elsősorban mitokondriális stressz kiváltásán keresztül, p53-tól független útvonalon indukálnak apoptotikus sejthalált. Eredményeink azt mutatják, hogy annak ellenére, hogy a kisebb nanorészecskék – nagyobb reaktív felszínük miatt – citotoxikusabbak, mint a nagyobb részecskék, a sejtekben mind a kisebb, mind a nagyobb ezüst nanorészecskék hasonló biológiai válaszreakciókat váltanak ki, valamint megegyező molekuláris útvonalakon keresztül okoznak sejthalált.

Bizonyítottuk továbbá, hogy az ezüst és arany-ezüst nanorészecskék citotoxikus hatásai tumorsejt-specifikusak, ugyanis a vizsgált nem-tumoros sejtvonalak esetében jelentősen kisebb mértékű citotoxicitást tapasztaltunk, mint a tumoros sejtek esetén. Megállapítottuk, hogy a reaktív sztóma fibroblaszt sejtjeinek stimulálása ezüst tartalmú nanorészecskékkel terápiás szempontból előnyös lehet. Kísérleteink ugyanis azt mutatják, hogy a nanorészecskék jelenléte csökkenti a fibroblaszt sejtek tumorsejt-támogató hatásait. A kísérleti megfigyelésünket *in vivo* eredmények is alátámasztják, mivel a tumorok mikro környezetébe juttatott arany-ezüst nanorészecskék csökkentették a létrehozott tumorok áttétképző képességét. Ráadásul, ezek a nanorészecskék képesek voltak a doxorubicin terápia hatásfokát is erősíteni. A kísérlet során ötvöztük az ezüst nanorészecskék egyedülálló apoptózis indukáló hatásait, valamint az arany nanorészecskék biokompatibilis jellegét, hiszen az arany-ezüst hibrid nanorészecskékkel értük el a legjobb tumorsejt gátló hatást, viszont

ezek a nanorészecskék kevésbé voltak citotoxikusak, mint a csak ezüstből készült részecskék. Munkánk során megállapítottuk, hogy a hibrid nanorészecskék aktív komponense a héjat alkotó ezüst. Ezt a megállapítást tovább erősíti az is, hogy az arany-ezüst nanorészecskékkel kezelt nanorészecskék transzkripciós profilja nagymértékben hasonlított ezüst nanorészecske kezeléseket esetén tapasztaltakéhoz.

Munkánkkal hozzájárultunk ahhoz, hogy jobban megértsük a fém nanorészecskék sejtbioológiai hatásait. Eredményeink azt mutatják, hogy a fém nanorészecskék további optimalizálása és tesztelése révén, új terápiás eszközök fejleszthetőek, melyek akár a klinikai gyakorlatban is alkalmazhatók válhatnak. Habár számos ígéretes lehetőség rejlik a fém nanorészecskék terápiás felhasználásában, pontos biológiai hatásuk, és toxikus tulajdonságaik megismerése miatt, még számos vizsgálat elvégzésére van szükség.

## **Publikációk listája**

MTMT azonosító: 10048382

Dávid Kovács, Nóra Igaz, Csilla Keskeny, Péter Bélteky, Tímea Tóth, Renáta Gáspár, Dániel Madarász, Zsolt Rázga, Zoltán Kónya, Imre M. Boros, Mónika Kiricsi: Silver nanoparticles defeat p53-positive and p53-negative osteosarcoma cells by triggering mitochondrial stress and apoptosis. Scientific Reports 06/2016; 6., DOI:10.1038/srep27902 IF: **5.228**

Dávid Kovács, Krisztina Szőke, Nóra Igaz, Gabriella Spengler, József Molnár, Tímea Tóth, Dániel Madarász, Zsolt Rázga, Zoltán Kónya, Imre M. Boros, Mónika Kiricsi: Silver nanoparticles modulate ABC transporter activity and enhance chemotherapy in multidrug resistant cancer. Nanomedicine: nanotechnology, biology, and medicine 12/2015; 12(3)., DOI:10.1016/j.nano.2015.10.015 IF: **5.671**

Nóra Igaz, Dávid Kovács, Zsolt Rázga, Zoltán Kónya, Imre M. Boros, Mónika Kiricsi: Modulating chromatin structure and DNA accessibility by deacetylase inhibition enhances the anti-cancer activity of silver nanoparticles. Colloids and surfaces B: Biointerfaces 07/2016; 146., DOI:10.1016/j.colsurfb.2016.07.004 IF: **3.90**

Andrea Rónavári, Dávid Kovács, Nóra Igaz, Csaba Vágvölgyi, Imre Miklós Boros, Zoltán Kónya, Ilona Pfeiffer, Mónika Kiricsi: Biological activity of green-synthesized silver nanoparticles depends on the applied natural extracts: a comprehensive study. International Journal of Nanomedicine 01/2017; Volume 12., DOI:10.2147/IJN.S122842 IF: **4.320**

Renáta Gáspár, Márton Pipicz, Fatime Hawchar, Dávid Kovács, Luna Djirackor, Anikó Görbe, Zoltán V. Varga, Mónika Kiricsi, Goran Petrovski, Attila Gácser, Csaba Csonka, Tamás Csont: The cytoprotective effect of biglycan core protein involves Toll-like receptor 4 signaling in cardiomyocytes. Journal of Molecular and Cellular Cardiology 08/2016; 99., DOI:10.1016/j.jmcc.2016.08.006 IF: **4.874**

Andrea Rónavári, Dávid Kovács, Csaba Vágvölgyi, Zoltán Kónya, Mónika Kiricsi, Ilona Pfeiffer: Ion exchange defines the biological activity of titanate nanotubes. Journal of Basic Microbiology 03/2016;, DOI:10.1002/jobm.201500742 IF: **1.585**

Barbara N Borsos, Tibor Pankotai, Dávid Kovács, Christina Popescu, Zoltán Páhi, Imre M Boros: Acetylations of Ftz-F1 and histone H4K5 are required for the fine-tuning of ecdysone biosynthesis during *Drosophila* metamorphosis. *Developmental Biology* 05/2015; 404(1)., DOI:10.1016/j.ydbio.2015.04.020 IF: **3.155**

**Összesített impakt faktor: 28,733**

## **Témavezetői nyilatkozat**

Alulírott, Dr. Kiricsi Mónika, Kovács Dávid PhD munkájának témavezetőjeként kijelentem, hogy a jelölt tézisei az általa végzett munka eredményeit tükrözi és a disszertációhoz felhasznált közlemény létrehozásához a jelölt jelentős mértékben hozzájárult.

.....

Dr. Kiricsi Mónika

## Társ szerzői nyilatkozat

Alulírott Igaz Nóra, Keskeny Csilla, Bélteky Péter, Tóth Tímea, Gáspár Renáta, Madarász Dániel, Rázga Zsolt, Kónya Zoltán, Boros Imre és Kiricsi Mónika nyilatkozok arról, hogy a „Silver nanoparticles defeat p53-positive and p53-negative osteosarcoma cells by triggering mitochondrial stress and apoptosis” (*Scientific reports* 2016) című közleményünkben, illetve az „arany és ezüst nanorészecskék sejtbiológiai hatásainak vizsgálata p53 deficiens rákos sejtekben és tumor metasztázis modellben” című doktori értekezésben Kovács Dávid szerepe meghatározó fontosságú. Hozzájárulok, hogy a közleményben foglalt eredményeket a jelölt felhasználja a Szegedi Tudományegyetem Biológia Doktori Iskola keretében a doktori fokozat eléréséhez nyújtott dolgozatában, és egyúttal kijelentem, hogy ezeket az eredményeket nem használtam fel tudományos fokozat megszerzésekor, és ezt a jövőben sem teszem.

.....  
Kovács Dávid (jelölt)

.....  
Igaz Nóra

.....  
Keskeny Csilla

.....  
Bélteky Péter

.....  
Tóth Tímea

.....  
Gáspár Renáta

.....  
Madarász Dániel

.....  
Rázga Zsolt

.....  
Kónya Zoltán

.....  
Boros Imre

.....  
Kiricsi Mónika