**The interrelationship of programmed cell deaths and their key proteins, focused to the ferroptosis and autophagy**

Our joint research aimed at the determination of the position of the novel cell death form ferroptosis within the other well defined cell death types such as necroptosis, apoptosis and autophagy. According to this plan HepG2 cells were treated by the ferroptosis inducer erastin and samples were collected for protein analysis and GSH determination in every 2 hours for 26 hours. On the base of the results gained by apoptosis and autophagy markers these cell death forms are totally independent from ferroptosis. However the level of the necroptosis marker, RIP3 reached its plateau 4-8 hours post erastin treatment, then it declined at 10 hour, finally it almost disappeared. Furthermore parallel with the depletion of GSH level, the phosphorylation of JNK could also be observed due to erastin treatment. All these results suggest a connection between the necroptotic and ferroptotic cell death forms. The level of necroptosis marker RIP3 was elevated by apoptosis inductor treatment in the apoptosis resistant, mtDNA depleted HepG2 Rho0 cells. This observation suggest a switch from apoptosis to necroptosis in these cells.

**Szinergia féléves összegző űrlap**

**1. Cím: Programozott sejthalál formák és kulcsfehérjéinek kapcsolata, fókuszban a ferroptózis és az autofágia**

**2. Résztvevők:**

Név: **Szarka András**

Tudományos fokozat: Ph.D.

Beosztás: habilitált egyetemi docens, BME

e-mail: szarka@mail.bme.hu

Név: **Kapuy Orsolya**

Tudományos fokozat: PhD

Beosztás: egyetemi adjunktus, SE

e-mail: kapuy.orsolya@med.semmelweis-univ.hu

1. Fejtsék ki pontosan, hogy a kutatási együttműködésük hogyan kapcsolódik az alább megadott MedinProt **fókuszpontok** legalább egyikéhez *(max. 300 szó)****.***

Az általunk tanulmányozott sejthalál folyamatok (autofágia, ferroptózis) szervesen kapcsolódnak két MedinProt fókuszponthoz is, úgymint „Jelátviteli fehérjék szerepe gyulladásos és daganatos megbetegedésekben” és „Szabályozó fehérjék szerepe az öregedési folyamat(ok)ban”. Korábban igazolták, hogy mind az autofágia függő önemésztés, mind a vasfüggő, redox egyensúly felborulása által indukált ferroptózis szorosan köthető bizonyos daganatos betegségek kialakulásához, ugyanakkor a pontos mechanizmus még nem minden részletében ismert. Autofágia esetében egy érdekes kettősséget is megfigyeltek, nevezetesen, hogy ezen sejthalál típus nemcsak a tumor-szupresszióban játszhat kulcsszerepet, de ugyancsak indukálhatja a tumorsejtek növekedését azáltal, hogy hipoxiás környezetben tápanyagokat tud biztosítani a sejt számára. Éppen azért az autofágiát irányító kulcsfehérjék és azok célirányainak azonosítása különböző stressz hatásokra kulcsszerepet játszhat a folyamat daganatos betegségek szabályozásában betöltött szerepében. A ferroptózist, illetve a ferroptózist kiváltó erasztint és RSL3-at (RSL: RAS-selective lethal) egy RAS mutáns tumor sejtek szelektív letalitását célzó vizsgálat során fedezték fel. Ezen kívül a közelmúltban kiderült, hogy a p53 képes ROS indukálta oxidatív stressz esetén mind az apoptózis, mind a ferroptózis folyamatát iniciálni. A ferroptózis így egy újabb komponense a sejthalál programnak, amelyet humán tumor sejtekben a p53 indukál. A ferroptózis tehát az autofágiához hasonlóan egyféle tumor-szupresszornak tekinthető, sőt, az sem kizárt, hogy a két folyamat együttesen vagy egymást követően aktiválódik, mintegy gátolva az apoptózist és a nekroptózist. Mivel mind az autofágia, mind a ferroptózis indukálódása közvetlenül kapcsolható a lipid peroxidációhoz és az ehhez köthető öregedési folyamatok során előforduló betegségek kialakulásához (pl. Alzheimer-kór), ezért ezen folyamtok működési mechanizmusának és az azokat irányító fehérje-fehérje kölcsönhatásainak vizsgálata mind az öregedési, mind a gyulladásos, tumoros folyamatokkal kapcsolatos MedinProt fókuszpontokhoz kapcsolódik.

1. Foglalják össze **közérthetően** szinergia programjuk, és közös munkájuk eddigi eredményeit *(max. 300 szó).*

Közös munkánk egyik legfontosabb célja az új sejthalál forma a ferroptózis elhelyezése a többi, már részletesebben karakterizált sejthalálforma (nekroptózis, apoptózis, autofágia) között. Ennek érdekében HepG2 sejteket kezeltünk a ferroptózist kiváltó erastinnel, majd 2 óránként 26 órán keresztül fehérjemintákat vettünk, illetve nyomon követtük a GSH szint (mint legfontosabb ferroptózis kapcsoló) szintjét. Megállapítottuk, hogy a sejtek életképessége 10 órával a kezelést követően kezd el szignifikáns mértékben csökkenni. Ezt megelőzően 8 órás kezelésnél csökken hirtelen mértékben a kontroll érték 50-ed részére a celluláris GSH szint. Az apoptózis és az autófágia markerek (PARP, caspase-3, LC-3, ULK1) alapján ez a két sejthalál forma teljes mértékben független a ferroptózistól. A nekroptózis marker RIP3 viszont érdekes mintázatot mutat: 4-8 órával az erastin kezelést követően szintje tetőzik, majd 10 órával a kezelést követően lecsökken, később szinte teljes mértékben eltűnik. Az eredmény arra utalhat, hogy az erastin kiváltotta GSH szint csökkenés, oxidatív stressz kiválthatja egy másik sejthalál a nekroptózis útvonal aktivációját is. Ez utóbbi útvonalnak fontos történése a JNK foszforilációja és az ezt követő mitokondriális transzlokációja, ROS generálása. Ezért különösen érdekes, hogy a GSH szint hanyatlásával párhuzamosan a JNK foszforilációját is meg tudtuk megfigyelni erastin kezelést követően. Eredményeink ily módon arra utalnak, hogy a ferroptózis és a nekroptózis között valamilyen kapcsolat állhat fenn. A közös pont szerepére igen esélyes lehet a sejt redox állapota, talán maga a GSH redox státusza. A kapcsolat meglétére utal az is, hogy a két sejthalál forma egymás (elvileg) specifikus gátlószereivel (necrostatin-1, ferrostatin-1) is gátolhatónak bizonyult.

Ezt követően mtDNS fosztott, HepG2 Rho0 sejteket is vizsgálatunk tárgyává tettük. A vonal érdekessége, hogy apoptózis rezisztenciát mutat. Érdekes módon apoptózis induktor kezelés hatására ezen sejtvonal esetében a RIP3 szint növekedését figyelhettük meg, ami arra utal, hogy apoptózis helyett ezen sejtek nekroptózis útvonalra kapcsolnak át.

Együttműködésünk második felében (félévében), terveinknek megfelelően primer hepatociták acetaminofen kiváltotta pusztulása esetében szeretnénk tisztázni az egyes sejthalál formák hozzájárulását.

1. Értékeljék és véleményezzék eddigi közös munkájukat (sikereiket, nehézségeiket, illetve azon ötleteiket, javaslataikat, amelyeknek köszönhetően a következő programok hatékonysága javulhat) *(max. 200 szó).*

Együttműködésünket egyértelműen a MedInProt szinergia program iniciálta. Korábban a személyes ismeretségen kívül semmiféle szakmai kapcsolat sem volt az együttműködő partnerek között. A munka kezdete zökkenőmentes volt. Szerencsére a közös munka során továbbgondoltuk az együttműködést és 2016 tavaszán egy-egy közös NKFIH pályázat is született a mindkét munkacsoport részvételével (egyiknek egyikünk a témavezetője és másikunk a résztvevője, a másik esetében pedig fordítva). A nehézség nem a programhoz köthető, Orsolya 2016 tavaszán egy új biokémikussal gazdagította együttműködésünket. A nehézséget, amennyiben ez annak nevezhető megoldottuk, még a szülést megelőzően részletes munkatervet készítettünk, amelyet mindkét munkacsoport részvételével alaposan átbeszéltünk. András közvetlen kapcsolatba került és tart fenn folyamatosan Orsolya doktoránsaival és egyféle közös, egyesített munkacsoportként dolgozunk. Orsolyával személyesen (már a szülést követő 3. napon) illetve skype, viber, e-mail segítségével tartjuk a kapcsolatot, így az együttműködés továbbra is zökkenőmentesen halad.

1. Szabadon fogalmazzák meg a MedInProt kapcsán támogató és/vagy kritikus észrevételeiket. *(max. 200 szó)*

A program egyértelműen hiányt pótló. Kiválóan összehozta és összefogja a fehérjetudományi szakterület képviselőit. A konferenciák kimondottan sikeresnek mondhatóak, nagy érdeklődés mellett, valós párbeszédekkel kerültek megrendezésre. A légkör egyértelműen alkotói, a színvonala (előadások, perbeszédek, konstruktivitás) elérte, sőt sok esetben meghaladta a nemzetközi konferenciákét. A „Tavaszi lendület a MedInProt-nál” program keretében egy korábban alacsony hatásfokkal termelődő fehérjénket immáron 30 l-es fermentor segítségével, keretében (Németh Áron) termeltetjük. A honlap jó, jól használhatóak a funkciói, egyetlen további javaslatunk lenne.

Javaslunk egy interaktívabb fórumfelület kialakítását a MedInProt honlapon, ahol egyszerűbben tehetünk fel kísérleti, kutatási problémákkal kapcsolatos kérdéseket a hálózat tagjainak, illetve így könnyebben alakulhatnának ki jövőbeli együttműködések is.

***A szinergizmus szakmai fókuszpontjai, kiemelt kutatási témák****:*

1. *Jelátviteli fehérjék szerepe gyulladásos és daganatos megbetegedésekben,*
2. *NMR és MRI adta lehetőségek a fehérjék feltekeredésével kapcsolatos betegségek molekuláris hátterének megértésében,*
3. *Szabályozó fehérjék szerepe az öregedési folyamat(ok)ban,*
4. *Alkalmas nanorendszerek fejlesztése peptid- és fehérjealapú hatóanyagok stabilitásának és felszívódásának fokozása érdekében.*