**Programozott sejthalál formák és kulcsfehérjéinek kapcsolata, fókuszban a ferroptózis és az autofágia**

Közös munkánk elsődleges célja az volt, hogy az új sejthalál formát a ferroptózist elhelyezzük a többi sejthalálforma (nekroptózis, apoptózis, autofágia) között. Ehhez HepG2 sejteket kezeltünk a ferroptózist kiváltó erastinnel. Rendszeres időközönként fehérjemintákat vettünk, illetve nyomon követtük a GSH (mint legfontosabb ferroptózis kapcsoló) szintjét. Az autofágia markerek szintje az erastin kezelést követően tranziens növekedést mutatnak, ugyanakkor a nekroptózis és az apoptózis csak a kezelés végén aktiválódott. Érdekes módon mTOR aktivációt nem tapasztaltunk. A sejtek GSH szintje 2 órával a kezelést követően 50%-ra, 4 órával a kezelést követően 12%-ra, 6 órával a kezelést követően 5%-ra csökkent, majd a detektálási határ alá csökkent. Ezen túl a GSH szint hanyatlásával párhuzamosan a JNK foszforilációját is meg tudtuk megfigyelni erastin kezelést követően. Érdekes módon az életképesség csökkenésével párhuzamosan nem tapasztaltunk jelentős mértékű LDH kiáramlást, ami arra utalhat, hogy a ferroptotikus sejthalál során a sejtmembrán többé-kevésbé sértetlen marad. Eredményeink arra utalnak, hogy a ferroptózis és az autofágia illetve a nekroptózis között valamilyen kapcsolat állhat fenn. Az apoptózis rezisztens mtDNS fosztott, HepG2 Rho0 sejtek apoptózis induktor kezelés hatására a RIP3 szintjének növekedésével reagálnak, ami arra utal, hogy apoptózis helyett ezen sejtek nekroptózis útvonalra kapcsolnak át.

**Szinergia összegző űrlap**

* Adják meg a támogatott szinergia programjuk címét és szakmai fókuszpontját

Szinergia program címe: Programozott sejthalál formák és kulcsfehérjéinek kapcsolata, fókuszban a ferroptózis és az autofágia

Szakmai fókuszpontok: jelátviteli fehérjék szerepe gyulladásos és daganatos megbetegedésekben; szabályozó fehérjék szerepe az öregedési folyamat(ok)ban

* Adják meg a szinergia program keretében együttműködő partnerek nevét, tudományos fokozatát, tudományos besorolását, e-mail címét

Dr. Kapuy Orsolya, egyetemi adjunktus, kapuy.orsolya@med.semmelweis-univ.hu

Dr. Szarka András, egyetemi docens, szarka@mail.bme.hu

* Csatolják a MedInProt programnak köszönhetően elkészült tudományos közleményeik**,** szakmai megjelenésükbibliográfiai adatait, valamint e dokumentum pdf-ét**.** Minden publikáció esetében fejtsék ki max. 2 mondatban a MedInProt relevanciáját.

A MedinProt megjelölésével 2 benyújtott kézirat készült el. Egyiket kisebb szövegbeli módosításokkal elfogadták (Acta Physiol Plant), a másik jelenleg bírálat alatt van (J Pharmacol, Toxicol Methods). Amint elfogadásra kerülnek, illetve bibliográfiai adatokkal rendelkeznek, a pdf fájlokkal egyetemben elküldjük a MedinProt számára.

1. Fejtsék ki pontosan, hogy a kutatási együttműködésük hogyan kapcsolódott 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 ezért 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 eredményeit *(max. 300 szó).*

*Ahhoz, hogy ferroptózisos sejthalált tanulmányozhassuk, ferroptózist váltottunk ki RAS onkogén vonalakon (HepG2) erasztinnel, illetve primer hepatocitákon acetaminofennel (APAP) és erasztinnel. A kezelési koncentrációk és idők pontos beállítására mindkét ferroptózist kiváltó reagensből először titrálási sort készítettünk, és a sejtek életképességét folyamatosan nyomon követtük (élő sejtek számolásával és életképességi vizsgálatok végzésével), ezzel mintegy minőségi jellemzést adva a sejthalál viselkedéséről. Azt tapasztaltuk, hogy a sejtek életképessége 8 óráig alig változik, majd drasztikusan csökkenni kezd 16 óráig tartó 5 vagy 10 M erasztin kezelés hatására. 20 mM APAP 10 óra után csökkentette az élő sejtek számát. Mindkét esetben azt figyeltük meg, hogy a sejtek életképessége kapcsolószerűen változik bizonyos idő után. Erre fontos élet-és-halál közti kapcsoló szerepre a glutation tűnt a legesélyesebbnek, ezért minden egyes kezelésnél mértük a GSH szintet. A sejtek GSH szintje 2 órával a kezelést követően 50%-ra, 4 órával a kezelést követően 12%-ra, 6 órával a kezelést követően 5%-ra csökkent, majd a detektálási határ alá csökkent. A sejtekből nyert fehérjeminták segítségével ellenőriztük mind autofágia marker fehérjékkel (LC3II, p62, ULK-555P), mind apoptózis fehérjemarkerekkel (pro-Caspase3, hasított PARP) a két folyamat esetleges érintettségét, kapcsolatát a ferroptózissal. Ugyancsak összehasonlítottuk a két induktor molekula hatását a gyulladásos, nekroptózis markerekre (RIP1,3, JNK). Illetve azt is megnéztük mTOR markerrel (4-EBP1P), hogy a ferroptózis hogyan kapcsolódik az mTOR-hoz, ami számos jelátviteli útvonalon keresztül szabályozza a sejtek anyagcseréjét és növekedését. Azt tapasztaltuk, hogy mind az autofágia tranziens aktiválódást mutat a kezelés ideje alatt, míg a nekroptózis és az apoptotikus folyamatok aktiválódtak a kezelés végén aktiválódtak. Ez arra enged következtetni, hogy az autofágiának valamilyen szerepe lehet a túlélésben, vagy a ferroptózis folyamatának lejátszódásában, a ferroptotikus sejthalál tehát nem tiszte a többi programozott sejthalál formával szoros (feltételezhetően ok-okozati) kapcsolatot mutat. Az mTOR akitvációja nem volt megfigyelhető a kezelés során, pedig ez sok esetben együtt jár az apoptózis aktivációjával.*

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

*A közös munkát alapvetően sikeresnek tekinthetjük. Annyi év próbálkozás után végre lehetőségünk adódott, hogy egy közös projekt keretében együtt dolgozhassunk és egy újnak tekinthető, izgalmas területet fedezzünk fel. Doktoránsaik segítségével jól össze tudtuk hangolni a feladatokat, optimálisan kihasználtuk mind a SOTE, mind a BME vegyszer- és műszerparkjának az erősségeit. Ez a munka egy igen fontos alapját képezi a további közös munkáinknak és terveinknek. Célunk, hogy a közeljövőben nagyobb szabású pályázatokat is beadjunk és tovább gyümölcsözzön a közös munka.*

 *A legnagyobb nehézséget az okozta, hogy az idő viszonylag szűkre volt szabva, míg a kísérletes munkában nem várt nehézségekkel küzdöttünk. Bár a kísérleteinket megfelelő precizitással és alapossággal terveztük, ahogy az lenni szokott, a biológia átírta az elképzeléseinket, és az ehhez való igazodásaink sok időt elvettek. Ez azt eredményezte, hogy egynémely tervezett kísérletet nem sikerült megvalósítanunk, helyette viszont egyéb, molekuláris biológiai kérdésekre tudtunk választ kapni. Ezen túl sikerült egy új érzékeny, az autooxidáció okozta hibát minimálisra csökkentő glutation meghatározási módszert kifejlesztenünk. A következő programok hatékonyságát esetleg hosszabb pályázati időtartammal lehetne növelni.*

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 honlap jó, jól használhatóak a funkciói, egyetlen további javaslatunk lenne. A megvalósíthatósági és a nyári iskola pályázatok tovább segítették az együttműködést.*

*Javaslunk egy interaktívabb fórum felület 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.*