



BUDAPESTI MŰSZAKI ÉS GAZDASÁGTUDOMÁNYI EGYETEM
VEGYÉSZMÉRNÖKI ÉS BIOMÉRNÖKI KAR
OLÁH GYÖRGY DOKTORI ISKOLA

Glutation-függő sejthalál-folyamatok

Tézisfüzet

Szerző: Lőrincz Tamás
Témavezető: Dr. Szarka András

Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem,
Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszer-tudományi Tanszék
Molekuláris Biológia és Biokémia Laboratórium

Budapest, 2018

Irodalmi háttér

Programozott sejthalál-folyamatok

A sejthalál-folyamatokat alapvetően két részre lehet osztani: a programozott sejthalálformákra, amelyek iniciációját követően egy belső „molekuláris program” kerül végrehajtásra, valamint a programozottságot nélkülöző sejthalálra, amelyet nekrozisnak is nevezünk. A programozott sejthalálformák tekintetében a klasszikus példa az apoptózis, amelyet egy aktív (tehát egyrészt energiaigényes, másrészt egy működő apparátussal rendelkezik) folyamatnak tartunk, amely során programozott módon történik meg a sejt szétszerelése annak érdekében, hogy gyulladáskeltő belső komponensek ne kerüljenek a környezetbe. Ezzel szemben a nekrozis passzív sejthalálforma, amely esetlegesen történik környezeti perturbációk következtében, és eredményeképp gyulladáskeltő sejtalkotók szabályozás nélkül kerülnek ki a környezetbe. Annak okán, hogy a programozott sejthalálformák szabályozott folyamatok, megjelenésüket és felbukkanásukat nagy figyelem kíséri, hiszen a szabályozottság többek között lehetőséget ad beavatkozásra is.

Mára már az apoptózison kívül számos más programozott sejthalál-folyamat ismert, mint a jelen dolgozat által is tárgyalt nekroptózis, autofágia általi sejthalál és ferroptózis, valamint továbbiak (**Galluzzi et al., 2012**).

A nekroptózis

A nekroptózis egy nekrotikus fenotípust mutató programozott sejthalálforma. Aktivációja történhet apoptózis induktorok hatására is (ún. „halál ligandok” pl. FasL vagy TNF α) amennyiben az apoptózis útvonala genetikailag vagy kémiai gátolt (kaspáz inhibitorok pl. z-vad-fmk) (lásd részletesebben **Christofferson and Yuan, 2010** összefoglaló közleményét), továbbá belső aktiváció is lehetséges (pl. oxidatív stressz).

Molekuláris mechanizmusának fontos része az aktivált nekroszóma, amely a RIP1-RIP3 (*receptor interacting protein 1-3*) foszforilált kinázokból tevődik össze (**Holler et al., 2000; Degterev et al., 2005; Cho et al., 2009**) és egy apoptózis-nekroptózis sejthalálkapcsolóként működik (**Zhang et al., 2009**).

A nekroszóma aktivációját, így a nekroptózist is specifikusan gátolni képes inhibitor a necrostatin-1 (**Degterev et al., 2005, 2008; Ofengeim and Yuan, 2013**). A folyamat további downstream lépése az MLKL (mixed lineage kinase domain-like protein) fehérjével kiegészülő nekroptoszóma komplex (**Sun et al., 2012**) - inhibitora az NSA (necrosulfonamide) -, illetve a PGAM5 (*phosphoglycerate mutase/protein phosphatase 5*) fehérje (**Wang et al., 2012**). A PGAM5S (short) izoformát is tartalmazó komplex egy további fehérje, a Drp1 (*dynamamin-related*

protein 1) számára oligomerizációs felületet biztosít, amelynek hatására mitokondriális hasadás valósul meg (**Wang et al., 2012**) amely a nekroptózis egyik terminális lépése. A mitokondriális hasadás apoptózis és nekrozis folyamán is megfigyelhető, amely segíti a mitofágiát, a létrejövő fragmentált mitokondriumok viszont fokozott ROS termelést mutatnak és a fragmentáció befolyásolja az energiatermelést és kalcium-fluxust.

A ferroptózis

A ferroptózis egy – feltételezetten – programozott oxidatív sejthalálforma, amely rendelkezik saját specifikus induktorokkal (pl. erastin, RSL3) és specifikus inhibitorokkal (pl. ferrostatin-1, liproxstatin-1). Az induktorok hatása feltételezetten genotípus szelektív (H/K/N-RAS fehérje onkogén alléljára) tumorspecifikus (**Dolma et al., 2003; Dixon et al., 2012; Friedmann Angeli et al., 2014**).

A folyamatra specifikus inhibitorok is leírásra kerültek: 2012-ben a ferrostatin-1 (**Dixon et al., 2012**), ezt követően került használatra a sejthalálforma megnevezésére a ferroptózis szó amely a folyamat vasfüggésére is utal, illetve 2014-ben a liproxstatin-1 (**Friedmann Angeli et al., 2014**). A ferroptózis nem-specifikus inhibitorai: az antioxidáns glutation, a mérsékelt védőhatással rendelkező zsíroltható antioxidáns α -tokoferol és a vas-kelátor deferoxamin (**Yang and Stockwell, 2008; Dixon et al., 2012**).

Az ismert ferroptózis induktorokat (FIN) hatásmechanizmusuk alapján két csoportra lehet osztani:

- az FIN I. osztály GSH depléciót keresztül (erastin-szerű hatás),
- a FIN II. osztály a GPX4 enzimre való hatás révén (RSL3-szerű hatás)

váltják ki a ferroptózist. Az utóbbi években leírásra kerültek a szintén II. osztályba sorolható FIN56, valamint FINO₂; az előbbi a GPX4 (glutathion-peroxidáz 4) mennyiségének specifikus csökkenését okozza (**Shimada et al., 2016**), míg az utóbbi egy szerves peroxid, amely a vas-oxidációt és lipid-peroxidációt eredményez (**Gaschler et al., 2018**). A GPX4 szeleno-protein a lipid-peroxidok glutathion-függő eliminációjában játszik fontos szerepet.

Az I. osztályba tartozó FIN-ek a cisztin felvételen keresztül okoznak GSH depléciót: a GSH bioszintézishez szükséges prekursor cisztein oxidált formája a cisztin (cisztein-diszulfid), importja az x_c⁻ cisztein-glutamát antiporter rendszeren keresztül történik, ennek egyik közvetlen inhibitora az erastin (**Dixon et al., 2012**), továbbá az amerikai FDA-által már elfogadásra került, és pl. a hepatocelluláris karcinóma referencia kezelésének számítató antitumor terapeutikum sorafenib is, valamint a glióma és limfóma kezelésére használt kémiaiilag kevésbé stabil sulfasalazine (**Louandre et al., 2013; Dixon et al., 2014**)

Induktortól függetlenül a kiváltott ferroptotikus sejthalál folyamat markere a fokozott reaktív oxigén vegyület (ROS) termelés és lipid peroxidáció (LOOX), valamint az intracelluláris szabad vas szint (LIP) megemelkedése.

Az acetaminofen-indukálta májkárosodás

Az acetaminofen (*N*-acetyl-*para*-aminofenol, paracetamol, APAP) egy széleskörben alkalmazott, fájdalom és lázcsillapító hatású molekula, gyulladáscsökkentő hatása nincs. Hatásmechanizmusának ismerete limitált, nem a ciklo-oxigenázok (COX) útvonal gátlásán alapul, mint a legtöbb NSAID-típusú (nonsteroidal anti-inflammatory drug, pl. szalicilátok) vegyület, bár újabban kimutatták a központi idegrendszerben található COX-specifikus APAP általi gátlását (**Ghanem et al., 2016**).

A szájon át alkalmazott APAP majdnem teljes mennyiségében a bélrendszeren keresztül szívódik fel, felszívódást követően a máj által a dózis ~25%-a biotranszformációt követően eliminálódik („first-pass” metabolizmus) (**Clements et al., 1978**), végül a teljes dózis több mint 90% biotranszformációra kerül, míg 2%-a ürül ki a vizelettel változatlan formában (**Ghanem et al., 2016**). Az APAP főként transzferázok révén konjugálódik (glükuronidáció, szulfatáció), viszont kis százalékban (5-15%) a CYP450 több izoenzimjének (főként CYP2E1, valamint CYP1A2, CYP3A4) is szubsztrátja (**Larson, 2007; Ghanem et al., 2016**). Az APAP-ból CYP450-ek által végzett oxidáció eredményeképp *N*-acetyl-*para*-benzokinonimin (NAPQI) keletkezik, amely egy fokozott reaktivitással bíró elektrofil vegyület, amely gyorsan reagál a rendelkezésre álló glutationnal és az így kialakuló immár alacsony reaktivitású APAP-GSH addukt eliminálásra kerül (**Larson, 2007; Ghanem et al., 2016**). A NAPQI viszont gyorsan kimerítheti mind a citoszol, mind a mitokondrium GSH tartalékát depléciót és oxidatív stresszt váltva ki, valamint a depléciót követően (GSH < 30%-a a fiziológias mennyiségnek) a NAPQI biomolekulákkal (nukleofil makromolekulák, fehérjék, DNS, telítetlen lipidek) reagálva adduktot képezve hepatotoxicitáshoz vezet (**Ghanem et al., 2016**). A végső esetben sejthalálhoz vezető toxicitást leginkább specifikus fehérje célpontok károsodása válthatja ki – mintsem az általános addukt képződés – amely fokozott mitokondriális-diszfunkciót és -ROS termelést, a mitokondriális légzés gátlását és a celluláris ATP szint csökkenését vonja maga után (**Meyers et al., 1988; Ramsay, Rashed and Nelson, 1989; Jaeschke, 1990; Tirmenstein and Nelson, 1990; Burcham and Harman, 1991; Ghanem et al., 2016**).

A farmakológiai aszkorbát által kiváltott tumorspecifikus citotoxicitás

Bár az aszkorbinsav a humán sejtek számára egy rendkívül fontos kofaktor és vízoldható antioxidáns, látszólag ambivalens módon pro-oxidáns képességgel is rendelkezik. Ez a képesség, valamint a citotoxicitás az aszkorbát vas- és/vagy réz-ionok illetve oxigén jelenlétében jelentkezik. Ezen körülmények között játszódik le az ún. Haber-Weiss reakció:

- (1.) $\text{Fe}^{2+} + \text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{O}_2^{\bullet-}$
- (2.) $\text{O}_2^{\bullet-} + \text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{O}_2 + \text{Fe}^{2+}$
- (3.) $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{HO}^\bullet + \text{HO}^-$

továbbá aszkorbáttal (Asc^-) kiegészítve:

- (4.) $\text{Fe}^{3+} + \text{Asc}^- \rightarrow \text{Fe}^{2+} + \text{Asc}^{\bullet-}$

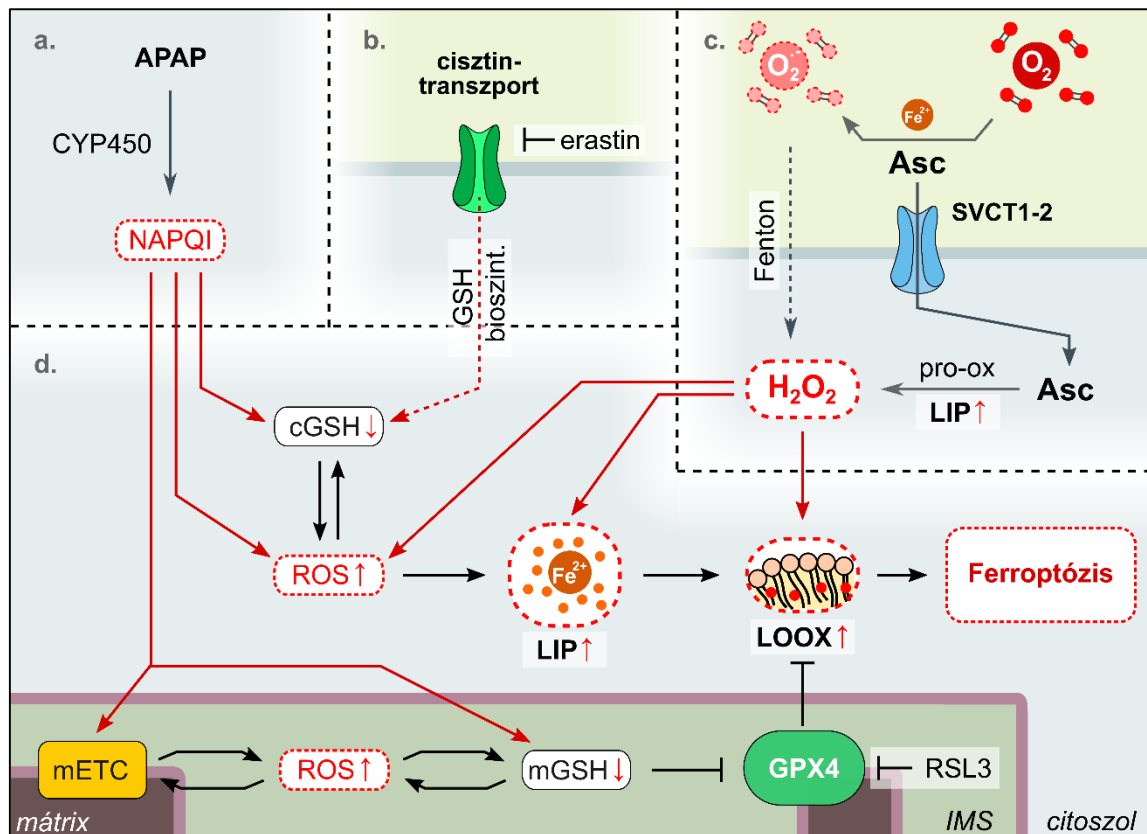
Az aszkorbát a (4.) egyenlet szerint a ferri-vas redukcióján keresztül reciklálására képes, amely az (1.) szerint fokozott szuperoxid ($\text{O}_2^{\bullet-}$) termelést eredményez és az a (3.) Fenton-reakció szerint hidrogén-peroxidon (H_2O_2) keresztül a toxikus hidroxil-gyök (HO^\bullet) képződését eredményezi. Ezen felül a $\text{O}_2^{\bullet-}$ diszproporcióval is képes a H_2O_2 termelésre. A H_2O_2 fokozott membránpermeabilitással rendelkezik, eliminálása a celluláris antioxidáns rendszert terheli, valamint bomlása (amely az intracelluláris szabad vasszinttől is függ) esetén további nagyreaktivitású HO^\bullet keletkezésével jár. A HO^\bullet citotoxikus potenciállal rendelkezik számos bioaktív makromolekula károsításán keresztül. Az oxidatív stressz és DNS károsodás PARP-aktivációhoz vezethet, amely NAD^+ és ATP deplécióval járhat. Mivel a GSSG és oxidált peroxiredoxin/tioredoxin rendszer regenerálása NADPH -n keresztül, végül glükóz terhére történik a pentóz-foszfát söntön keresztül, ez az ATP előállításának nehézségét és az ATP depléció súlyosságát fokozza (**Schraufstatter et al., 1986**).

A tumoros sejtek a szomatikus sejtekhez képest fokozott ROS termeléssel ($\text{O}_2^{\bullet-}$ és H_2O_2), valamint fokozott érzékenységgel rendelkeznek a glükóz-hiány következtében fellépő citotoxicitásra és oxidatív stresszre (**Ahmad et al., 2005; Aykin-Burns et al., 2009**). Továbbá a tumoros sejtek esetén az intracelluláris szabad vas (LIP) emelkedett szintjéről is beszámoltak, amely a Fenton-reakción keresztül fokozhatja az oxidatív ágensek citotoxikus hatását (**Torti and Torti, 2013**).

Számos kutatás beszámol az aszkorbinsav tumor-specifikus citotoxikus hatásáról, amelyet alkalmazása okán „farmakológiai aszkorbát”-ként neveznek (**Chen et al., 2005; Deubzer et al., 2010; Klingelhoefter et al., 2012; Parrow, Leshin and Levine, 2013**). A kiváltott citotoxikus hatáshoz mM nagyságrendben szükséges az aszkorbát koncentráció alkalmazása, amely eléréséhez *in vivo*, az aszkorbát felszívódási karakterisztikájának ismeretében, parenterális adagolás szükséges. A nagy dózisú aszkorbát *in vivo* alkalmazása képes volt egérben a hepatóma (**Verrax and Calderon, 2009**), méh- és hasnyálmirigy-eredetű, valamint glioblasztóma tumorok növekedésének lassítására (**Chen et al., 2008**). Az aszkorbát parenterális adagolása tizenkétszeresére növelte a vér és sejt közötti tér aszkorbil-gyök tartalmát, viszont a toxicitásért felelős H_2O_2 csak a sejt közötti térből volt mérhető, feltehetően a vér sejt elemek nagykapacitású peroxidáz képessége okán (**Chen et al., 2007**).

A farmakológiai aszkorbát által kiváltott citotoxicitás – többek között a Fenton-kémia érintettsége okán is – vas-függő folyamat, valamint számos esetben beszámolnak a vas-kelátorok inhibitor hatásáról (Verrax and Calderon, 2009; Ullah *et al.*, 2011), valamint a folyamat során önerősítő hatásként jelentkező ferritin exocitózisról (Deubzer *et al.*, 2010) és az intracelluláris szabad vasszint (LIP) növekedéséről (Baader *et al.*, 1996; Caltagirone, Weiss and Pantopoulos, 2001; Drisko, Chapman and Hunter, 2003).

Összefoglaló teoretikus ábra a kutatások során vizsgált folyamatokról



a. Az acetaminofen (APAP) indukálta citotoxicitás iniciációja; **b.** Ferroptózis indukció erastin által; **c.** Az aszkorbinsav (Asc) indukálta citotoxicitás iniciációja; **d.** A vizsgált folyamatok közös vonatkozásai a citoszolikus és mitokondriális kompartmentumban (IMS: mitokondriális intermembrán tér): citoszolikus/mitokondriális GSH depléció (c/mGSH ↓), ROS képződés (ROS↑), szabad vasszint emelkedés (LIP↑), lipid-peroxidáció (LOOX↑), mitokondriális elektrontranszport lánc (mETC) diszfunkció.

Célkitűzések

Doktori munkám során glutation-függő sejthalál folyamatok részletesebb feltárásával foglalkoztunk. Az általunk vizsgált folyamatok az acetaminofen által kiváltott hepatotoxicitás, a nagy dózisú aszkorbát által kiváltott tumorspecifikus citotoxicitás, valamint a ferroptózis. A vizsgált folyamatokban közös, hogy fokozott reaktív oxigén származék (ROS) termelés lép fel, amely lipid-peroxidációhoz (LOOX) vezethet, amennyiben az antioxidáns-rendszer elimináló képessége nem kielégítő. Az oxidatív károsodás mitokondriális diszfunkciót, valamint az intracelluláris szabad vas (LIP) emelkedését okozhatja. Utóbbi fokozza a ROS citotoxicitását a Fenton-reakción keresztül. Az acetaminofen és a nagy dózisú aszkorbát által kiváltott citotoxicitás nagy mértékű hasonlóságot mutat a ferroptózissal, felvetődött annak lehetősége, hogy a ferroptózis sejthalál mechanizmusa aktiválódik mindkét említett esetben. Tekintettel arra, hogy a folyamatok vizsgálata során kiemelt jelentőséggel bír a glutation, kísérleteink során megvizsgáltuk, hogy mely analitikai eljárás a legalkalmasabb meghatározására, valamint kísérletet tettünk a módszer optimalizálására. A ferroptózis lehetséges mitokondriális elemeinek vizsgálata során célul tűztük ki a ferroptózis kulcsfehérjének, a glutation-peroxidáz 4 mitokondriális lokalizációjának *In silico* módszerekkel történő vizsgálatát.

Ezek alapján a következő célkitűzéseket fogalmaztuk meg:

1. a rendelkezésre álló glutation meghatározásra alkalmas bioanalitikai módszerek összehasonlítása és optimalizálása, amely lehetővé teszi a glutation deplécio monitorozását, valamint redox állapotának meghatározását is,
2. az acetaminofen által kiváltott sejthalál és a ferroptózis *in vitro* kapcsolatának vizsgálatát hepatokarcinóma és primer egér hepatocita sejtmoddellen,
3. a nagy dózisú aszkorbát és a ferroptózis kapcsolatának vizsgálatát N-RAS mutáns fibroszarkóma sejtmoddellen,
4. a glutation-peroxidáz 4 enzim szubcelluláris lokalizációjának vizsgálatát *in silico* módszerekkel.

Alkalmazott kísérleti módszerek

- **Primer egér hepatociták izolálása**
- **In vitro citotoxicitás meghatározása**
- **Sejtéletképesség meghatározása Muse®-típusú áramlásos citométerrel**
- **ROS termelés meghatározása Muse®-típusú áramlásos citométerrel**
- **ROS termelés (szuperoxid- illetve hidroxil-gyök eredetű) és lipid peroxidáció meghatározása FACSCalibur-típusú áramlásos citométerrel**
- **Patkánymáj sejtorganelumok frakcionálása centrifugálással**
- **GSH meghatározása mCIB konjugációt követő HPLC-fluoreszcens technikával**
- **GSH meghatározás NEM konjugációt követő HPLC-UV technikával**
- **GSH meghatározás DTNB enzim-reciklálásos módszerrel**
- **Fehérjék vizsgálata Western Blot technikával**

Eredmények

Glutation meghatározási módszerek vizsgálata

Az eredményeink rávilágítanak a megfelelő módszer kiválasztásának fontosságára. Ugyan az *N*-etil-maleimid egy nagyon jó tiol-védő próba és a GS-NEM addukt kvantifikálása nem igényel nagy szakértelmet és műszerigényt egy HPLC-UV készüléken felül, de a magas meghatározási határ okán nem találtuk alkalmasnak organellumok GSH szintjének kvantifikálására, valamint DTT-vel való redukciót követő redox-állapot meghatározásra sem.

A farmakológiailag és toxikológiailag releváns sejtorganellumok jóval alacsonyabb GSH szintje viszont könnyen meghatározhatónak találtuk mCIB-nal való származékképzéssel és HPLC-fluoreszcens detektálással.

Mivel az organellumok izolálása időigényes (akár több óra), a minták GSH tartalma auto-oxidációra hajlamos. Ennek kivédésére a szövet homogenizációját megelőző mCIB adagolását vizsgáltuk és számos organellum esetén szignifikáns auto-oxidáció védelmet találtunk.

Továbbá a GS-mCIB addukt képződésének kinetikájában nagy szerepe van a GST enzimnek, amely katalizálja az addukt képződését. Ezzel összefüggésében megállapítottuk, hogy fontos figyelembe venni a GS-mCIB sztenderdek készítésénél, valamint a biológiai minták esetleges limitált endogén GST aktivitás szintjét. Eredményeink alapján a GSH szint alulmérésének elkerülése érdekében érdemes a konjugáció során legalább 100 mU/ml GST aktivitás biztosítása.

Ugyan a DTNB-t alkalmazó enzim reciklációs módszer egyszerű és nagyátersztőképességű, de méréseink alapján a meghatározás során fokozott mátrixhatás lép fel, amely a minta megfelelő hígítása nélkül a GSH szintek torzulásához vezet. A redox-állapot meghatározásához használt reagensek (NEM, 2VP) szintén befolyásolják a reciklálást, így szerves oldószerrel való extrakciójuk szükséges, amely hosszabbítja és nehezíti a módszert, valamint csökkenti az átersztőképességet.

Az acetaminofen által kiváltott citotoxicitás vizsgálata

Az acetaminofen kezelésekből származó kísérletei eredményeink alapján az alacsony CYP aktivitással rendelkező HepG2 hepatokarcinoma sejtek életképességét csak nagyon magas, míg a fokozott CYP aktivitással rendelkező primer egér hepatociták életképességét már alacsonyabb (20 mM-os) koncentrációban is jelentősen befolyásolta. Primer egér hepatocitákat használva az acetaminofen által kiváltott hepatotoxicitás mérséklésére volt képes a specifikus ferroptózis inhibitor, a ferrostatin-1, a specifikus nekroptózis inhibitor, a necrostatin-1, valamint a zsíroltható antioxidáns α -tokoferol és a vízoltható antioxidáns dehidroaszcorbinsav.

A ferroptózis induktorok (pl. erastin, RSL3) által kiváltott sejthalált a specifikus ferroptózis inhibitorok (pl. ferrostatin-1, lipoxstatin-1) közel 100%-ban képesek felfüggeszteni. Az ilyen mértékű mérsékelt védő hatásból arra következtettünk, hogy az acetaminofen által kiváltott citotoxicitás mechanizmusát tekintve valószínűleg nem tisztán ferroptotikus, de a ferrostatin-1 hatásossága alapján a ferroptózis is érintett folyamata során, ahogyan számos eredmény alapján a nekroptózis is. Az acetaminofen által kiváltott sejthalál folyamat valószínűleg nem egy elhatárolható sejthalálformaként zajlik, hanem több sejthalálút vonal is érintett.

Az aszkorbát és a ferroptózis közötti kapcsolat vizsgálata

A farmakológiai Asc és a ferroptózis induktorok tumorspecifikus citotoxicitással rendelkeznek, amely egy oxidatív folyamat ugyanis fokozott ROS termeléssel és lipid-peroxidációval jár. Eredményeink alapján, bár a két folyamat nagyfokú hasonlóságot mutat, programozottságában nem találtunk átfedést, mivel a ferroptózis specifikus inhibitorai a ferrosztatin-1 és liproxstatin-1 nem voltak képesek az Asc által kiváltott citotoxicitás felfüggesztésére. Ezen felül a két folyamat által kiváltott oxidatív stressz jelentős mértékben nem adódik össze, mi több, az Asc alacsonyabb koncentrációban (~0,1 mM) a ferroptózis gátlására képes feltehetően antioxidáns tulajdonságainak köszönhetően, ugyanis az RSL3 indukálta ROS termelést és lipid-peroxidációt felfüggesztette. Az Asc védőhatását tovább lehet fokozni, amennyiben piruváttal a pro-oxidáns tulajdonságát semlegesítjük.

Szubletális (0,5-0,6 mM) Asc koncentrációk esetén méréseink során az autofágia indukcióját figyeltük meg fehérje szinten, valamint ennél az Asc koncentrációknál szignifikáns hatással rendelkezett két vizsgált autofágia inhibitor is: a wortmannin és bafilomycin A1. Az apoptotikus útvonal aktivációját jelentő hasított PARP fehérjét nem tudtunk detektálni, viszont a nekroptózisban fontos szerephez jutó RIPK1 fehérje szintje alacsony (0,1 mM) és szubletális (0,6 mM) Asc esetén is emelkedett.

A GPX4 lokalizáció in silico vizsgálata

Az eddigiek során felismert egyedüli kulcsfehérje a ferroptózis folyamatában a lipid-peroxid elimináló GPX4. A GPX4 közvetlen gátlása, génkiütése vagy szubsztrátjának depléciója, valamint a GSH-prekursor transzportjának gátlása ferroptózishoz vezet. Ennek tekintetében megvizsgáltuk a két fiziológiailag releváns GPX4 izoforma (IGPX4 és sGPX4), valamint az SLC25A11 transzporter fehérje lokalizációjának predikcióját *in silico* eszközökkel, kiemelt figyelmet fordítva a mitokondriális szerepre. Eredményeink alapján számos szabály- és neurális-alapú algoritmus valószínűsített egybehangzóan adott útvonal szerinti lokalizációt az IGPX4 és sGPX4 számára, így több organellumba való targetingjük valószínűsített. Az sGPX4 esetén nem-kanonikus import útvonalak szerepe feltételezhető, így megvizsgáltuk az *in silico* módszerek hatékonyságát ismert kiméra szignált tartalmazó fehérje – a CYP2B1 –, valamint a kanonikus mitokondriális szignállal rendelkező izoenzimének – a CYP27A1– lokalizációjának predikciójában. Kutatásunk alapján az *in silico* eszközök hatékonysága ebben az esetben változó volt. Csak a CELLO prediktált mitokondriális importot a szomszédos-szekvenciaösszetétel alapján. Az SLC25A11 mitokondriális GSH transzporter fehérje esetén a hétből két algoritmus nagy, míg három közepes valószínűséggel prediktált mitokondriális lokalizációt.

Ezek az eredmények alátámasztják a feltételezést, miszerint az SLCA2511 juttatja a mitokondriumba a GPX4 számára a szubsztrát molekulákat, valamint, hogy a két fehérje részt vesz a mitokondriális lipid-peroxidok eliminálásában. Továbbá felvethető, hogy az SLCA2511 és a GPX4 fehérjék között kooperáció lép fel a mitokondriumban, amelynek szerepe lehet a ferroptózis szabályozásában, valamint megerősítené a mitokondrium szerepét a ferroptózis folyamatában.

Alkalmazási lehetőségek

A ferroptózist kevesebb mint fél évtizede írták le, mint a tumorsejtek specifikus eliminációjára használható programozott sejthalál-folyamatot. A ferroptózis molekuláris mechanizmusának felderítése napjainkban intenzíven kutatott terület. A folyamat patológiás aktivációjának tanulmányozása új inhibitorok és útvonalak felfedezését eredményezheti, amelyek által kivédhető a nemkívánatos sejtpusztulás.

Kísérleteink során a ferroptózis egyik kulcsmolekulájának, a glutationnak a meghatározására alkalmas bioanalitikai módszer továbbfejlesztését valósítottuk meg. Eredményeink alapján a sejtfeltárást megelőző konjugáció alkalmazásával a szubcelluláris glutation-szintje és redox-állapota pontosabban határozható meg.

Eredményeink alapján a ferroptózis folyamatának aktivációja szerephez jut az acetaminofen okozta májkárosodás során, amellyel hozzájárultunk a hepatotoxicitás mechanizmusának pontosabb megértéséhez.

Az aszkorbinsav és ferroptózis közötti kölcsönhatást tanulmányozva interferenciát tapasztaltunk, amelynek értelmében az aszkorbinsav a ferroptózis nagyfokú gátlására képes. Az eredményeink hozzájárulnak a ferroptózis mechanizmusának megértéséhez, valamint többek között arra is rávilágítanak, hogy a ferroptózis jövőbeli esetleges klinikai alkalmazása során kritikus a szöveti aszkorbinsav szintjének figyelembevétele.

Tézisek

1. Kimutattuk, hogy a szubcelluláris glutation-szint nyomon követésére a legalkalmasabb módszer a monoklórbimán (mClB) konjugációt és HPLC-fluoreszcens detektálást alkalmazó eljárás. A módszer előnye a többi vizsgált metodikával szemben az alacsony kimutatási határ ($<0,1 \mu\text{M}$), a redox-állapot meghatározásának lehetősége, illetve tiol-védő képessége. Eredményeink alapján legalább 100 mU/ml glutation-S-transzferáz (GST) aktivitás szükséges ahhoz, hogy a biológiai minták esetében 15 perces inkubációs idő alatt a glutation – mClB konjugáció végbemenjen, ezzel elkerülve meghatározáskor a minta glutation-szintjének alul mérését [4].
2. Az acetaminofen által kiváltott sejthalál mechanizmusának vizsgálata során kimutattuk, hogy primer egér hepatocitákban a ferrostatin-1 ferroptózis inhibitor képes a citotoxicitás mérséklésére az intracelluláris glutation-szint, valamint az acetaminofen biotranszformációjában szerephez jutó CYP2E1 izoenzim mRNS szintjének befolyásolása nélkül, tehát az acetaminofen indukálta citotoxicitásért részben a ferroptózis felelős. Primer egér hepatocita modellen alátámasztottuk, hogy a necrostatin-1 nekroptózis inhibitor, valamint az α -tokoferol és dehidroaszcorbinsav antioxidáns vegyületek az acetaminofen toxikus hatását csökkenteni képesek [3].
3. A nagy dózisú aszkorbát által kiváltott citotoxicitást vizsgálva meghatároztuk a HT-1080 RAS-mutációval rendelkező fibroszarkóma sejtvonal aszkorbát érzékenységét, valamint azonosítottunk két vegyületet, amely a toxicitás mérséklésére képes: a vas-kelátor deferoxamint, illetve az antioxidáns glutationt [7].
4. Vizsgálatainkkal kizártuk, hogy a nagy dózisú aszkorbát a HT-1080 fibroszarkóma sejtvonalban ferroptózist vált ki, mivel a ferrostatin-1, illetve lipoxstatin-1 specifikus ferroptózis gátlószerek nem rendelkeztek gátlóhatással. Kimutattuk, hogy sejtmentes tápoldatban az aszkorbát hatására a Fenton-reakcióban keletkező hidrogén-peroxid glutation és piruvát jelenlétében nem mérhető, míg deferoxamin jelenlétében keletkezése fokozódik. Az aszkorbát toxicitás által kiváltott fehérje aktiváció vizsgálatával megállapítottuk, hogy a korábbi kutatások során kimutatott autofágia és nekroptózis útvonala csak alacsony aszkorbát koncentráció esetén aktiválódik,

valamint a toxicitás csak ebben a koncentráció tartományban mérsékelhető specifikus inhibitorokkal [7].

5. Megállapítottuk, hogy az aszkorbát képes az RSL3 és erastin által kiváltott ferroptózis gátlására. Kutatásaink alapján az alacsony és közepes dózisú (200-500 μM) aszkorbát gátló hatással bírt a ferroptózis induktorok által kiváltott életképesség csökkenésre, a reaktív oxigén vegyület termelésre és a lipid-peroxidáció folyamatára [7].

6. *In silico* kutatásaink alapján a glutation-peroxidáz 4 (GPX4) lipid-peroxid elimináló enzim rövid (sGPX4), illetve hosszú (lGPX4) izoformák, valamint az SLC25A11 feltételezett glutation transzporter mitokondriális lokalizációja valószínűsíthető. Eredményeink felvetik, hogy a két fehérje, valamint a mitokondrium kulcsszerepet játszik a ferroptózis során fellépő lipid-peroxidok eliminálásában [6].

Publikációs lista

Közlemények az értekezés témájában:

1. Szarka András, Lőrincz Tamás (2013) A C-vitamin celluláris, intracelluláris transzportja: fiziológias vonatkozások. **Orvosi Hetilap** **154**:(42) pp. 1651–1656.
DOI: <https://doi.org/10.1556/OH.2013.29712>.
I: 3
2. Szarka András, Lőrincz Tamás (2014) The role of ascorbate in protein folding. **Protoplasma** **251**:(3) pp. 489-97.
DOI: <https://doi.org/10.1007/s00709-013-0560-5>.
IF: 2.651, I: 17
3. Lőrincz Tamás, Jemnitz Katalin, Kardon Tamás, Mandl József, Szarka András (2015) Ferroptosis is Involved in Acetaminophen Induced Cell Death. **Pathology Oncology Research** **21**:(4) pp. 1115-21.
DOI: <https://doi.org/10.1007/s12253-015-9946-3>.
IF: 1.940, I: 32
4. Lőrincz Tamás, Szarka András (2017) The determination of hepatic glutathione at tissue and subcellular level. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods** **88**:(Pt 1) pp. 32-39.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2017.05.004>.
IF: 2.269, I: 3

5. Tóth Szilvia Z, Lőrincz Tamás, Szarka András (2017) Concentration Does Matter: The Beneficial and Potentially Harmful Effects of Ascorbate in Humans and Plants. ***Antioxidants and Redox Signaling*** **29**:(15) pp. 1516-1533;
DOI: <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7125>.
IF: 6.530, I: 2

6. Lőrincz Tamás, Szarka András (2018) In silico Analysis on the Possible Role of Mitochondria in Ferroptosis. ***Periodica Polytechnica Chemical Engineering***:
[Epub ahead of print];
DOI: <https://doi.org/10.3311/PPch.12571>.
IF(2017): 0.877, I: 0

7. Lőrincz Tamás, Holczer Marianna, Kapuy Orsolya, Szarka András (2018) The interrelationship of pharmacologic ascorbate induced cell death and ferroptosis. ***Pathology Oncology Research***: [Accepted];
DOI: <https://doi.org/10.1007/s12253-018-0539-9>.
IF(2017): 1.935

Előadás az értekezés témájában:

Lőrincz Tamás: A farmakológiai aszkorbát által kiváltott sejthalál és a ferroptózis **MHT MMVBT MSZKT VI**, Balatonkenese (2018. április 20).

Poszterek az értekezés témájában:

Lőrincz Tamás, Szarka András: *Ascorbate and ferroptosis*. **Paris Redox Congress 2018**, Párizs (2018. június 25-26).

Lőrincz Tamás, Szarka András: *Ascorbate and ferroptosis*. **10th World Congress on Medicinal Chemistry and Drug Design 2018**, Barcelona (2018. június 14-15).

Lőrincz Tamás, Szarka András: *Pharmacologic ascorbate and ferroptosis*. **FEBS Advanced Course 2018**, Budapest (2018. április 4-6).

Lőrincz Tamás, Szarka András: *Glutation meghatározása szöveti és szubcelluláris szinten*. **47. Membrán-transzport konferencia 2017**, Sümeg (2017. május 16-19).

Lőrincz Tamás, Jemnitz Katalin, Mandl József, Szarka András: *A ferroptózis szerepe az acetaminofen által kiváltott hepatotoxicitásban*. **Farmakokinetika és Gyógyszermetabolizmus Szimpózium 2016**, Galyatető (2016. április 6-8).

Egyéb közlemény:

Balogh Tibor, Lőrincz Tamás, Stiller Ibolya, Mandl József, Bánhegyi Gábor, Szarka András (2016) The level of ALR is Regulated by the Quantity of Mitochondrial DNA. ***Pathology Oncology Research* 22**:(2) pp. 431-437.

DOI: <https://doi.org/10.1007/s12253-015-0020-y>.

Hajdinák Péter, Czobor Ádám, Lőrincz Tamás, Szarka András (2017) The Problem of Glutathione Determination: a Comparative Study on the Measurement of Glutathione from Plant Cells. ***Periodica Polytechnica Chemical Engineering***. [Epub ahead of print]

DOI: <https://doi.org/10.3311/PPch.11785>.

Egyéb előadás:

Balogh Tibor, Lőrincz Tamás: Mitokondriális genom és fehérje folding. **Számoljon velünk! Kutatás-fejlesztés és innováció a Műegyetemen**, Budapest, Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem (2013. június 21)

Irodalmi hivatkozások

- Ahmad, I. M. *et al.* (2005) *Journal of Biological Chemistry*, 280(6), pp. 4254–4263. doi: 10.1074/jbc.M411662200.
- Aykin-Burns, N. *et al.* (2009) *The Biochemical journal*, 418, pp. 29–37. doi: 10.1042/BJ20081258.
- Baader, S. L. *et al.* (1996) *FEBS Letters*, 381(1–2), pp. 131–134. doi: 10.1016/0014-5793(96)00098-1.
- Burcham, P. C. and Harman, A. W. (1991) *Journal of Biological Chemistry*, 266(8), pp. 5049–5054.
- Caltagirone, A., Weiss, G. and Pantopoulos, K. (2001) *Journal of Biological Chemistry*, 276(23), pp. 19738–19745. doi: 10.1074/jbc.M100245200.
- Chen, Q. *et al.* (2005) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(38), pp. 13604–13609. doi: 10.1073/pnas.0506390102.
- Chen, Q. *et al.* (2007) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(21), pp. 8749–8754. doi: 10.1073/pnas.0702854104.
- Chen, Q. *et al.* (2008) *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(32), pp. 11105–11109. doi: 10.1073/pnas.0804226105.
- Cho, Y. S. *et al.* (2009) *Cell*. Elsevier Inc., 137(6), pp. 1112–1123. doi: 10.1016/j.cell.2009.05.037.
- Christofferson, D. E. and Yuan, J. (2010) *Current Opinion in Cell Biology*. Elsevier Ltd, 22(2), pp. 263–268. doi: 10.1016/j.ceb.2009.12.003.
- Clements, J. A. *et al.* (1978) *Clinical pharmacology and therapeutics*, 24(4), pp. 420–31. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/688732>.
- Degterev, A. *et al.* (2005) *Nature Chemical Biology*, 1(2), pp. 112–119. doi: 10.1038/nchembio711.
- Degterev, A. *et al.* (2008) *Nature Chemical Biology*, 4(5), pp. 313–321. doi: 10.1038/nchembio.83.
- Deubzer, B. *et al.* (2010) *Cellular Physiology and Biochemistry*, 25(6), pp. 767–774. doi: 10.1159/000315098.
- Dixon, S. J. *et al.* (2012) *Cell*. Elsevier Inc., 149(5), pp. 1060–1072. doi: 10.1016/j.cell.2012.03.042.
- Dixon, S. J. *et al.* (2014) *eLife*, 2014(3), pp. 1–25. doi: 10.7554/eLife.02523.
- Dolma, S. *et al.* (2003) *Cancer Cell*, 3(3), pp. 285–296. Available at: www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12676586.
- Drisko, J. A., Chapman, J. and Hunter, V. J. (2003) *Journal of the American College of Nutrition*, 22(2), pp. 118–123. doi: 10.1038/nrendo.2014.175.
- Friedmann Angeli, J. P. *et al.* (2014) *Nature cell biology*, 3(August), pp. 1–9. doi: 10.1038/ncb3064.
- Galluzzi, L. *et al.* (2012) *Cell Death and Differentiation*, 19(1), pp. 107–120. doi: 10.1038/cdd.2011.96.
- Gaschler, M. M. *et al.* (2018) *Nature Chemical Biology*. Springer US, 14(May), pp. 1–9. doi: 10.1038/s41589-018-0031-6.
- Ghanem, C. I. *et al.* (2016) *Pharmacological Research*. Elsevier Ltd, 109, pp. 119–131. doi: 10.1016/j.phrs.2016.02.020.
- Holler, N. *et al.* (2000) *Nature immunology*, 1(6), pp. 489–495. doi: 10.1038/82732.
- Jaeschke, H. (1990) *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 255(3), pp. 935–41.

doi: 10.3967/0895-3988.2013.04.008.

- Klingelhoefter, C. *et al.* (2012) *BMC complementary and alternative medicine*, 12(1), p. 61. doi: 10.1186/1472-6882-12-61.
- Larson, A. M. (2007) *Clinics in Liver Disease*, 11(3), pp. 525–548. doi: 10.1016/j.cld.2007.06.006.
- Louandre, C. *et al.* (2013) *International Journal of Cancer*, 133(7), pp. 1732–1742. doi: 10.1002/ijc.28159.
- Meyers, L. L. *et al.* (1988) *Toxicology and applied pharmacology*, 93(3), pp. 378–387. doi: 10.1016/0041-008X(88)90040-3.
- Ofengeim, D. and Yuan, J. (2013) *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group, 14(11), pp. 727–736. doi: 10.1038/nrm3683.
- Parrow, N. L., Leshin, J. A. and Levine, M. (2013) *Antioxidants & redox signaling*, 19(17), pp. 2141–2156. doi: 10.1089/ars.2013.5372.
- Ramsay, R. R., Rashed, M. S. and Nelson, S. D. (1989), 273(2), pp. 449–457.
- Schraufstatter, I. U. *et al.* (1986) *Journal of Clinical Investigation*, 77(4), pp. 1312–1320. doi: 10.1172/JCI112436.
- Shimada, K. *et al.* (2016) *Nature Chemical Biology*. Nature Publishing Group, 12(7), pp. 497–503. doi: 10.1038/nchembio.2079.
- Sun, L. *et al.* (2012) *Cell*. Elsevier Inc., 148(1–2), pp. 213–227. doi: 10.1016/j.cell.2011.11.031.
- Tirmenstein, M. A. and Nelson, S. D. (1990) *The Journal of biological chemistry*, 265(6), pp. 3059–65. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2303440>.
- Torti, S. V and Torti, F. M. (2013) *Nature reviews. Cancer*, 13(5), pp. 342–355. doi: 10.1038/nrc3495.
- Ullah, M. F. *et al.* (2011) *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 67(1), pp. 103–10. doi: 10.1007/s00280-010-1290-4.
- Verrax, J. and Calderon, P. B. (2009) *Free Radical Biology and Medicine*, 47(1), pp. 32–40. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.02.016.
- Wang, Z. *et al.* (2012) *Cell*. Elsevier Inc., 148(1–2), pp. 228–243. doi: 10.1016/j.cell.2011.11.030.
- Yang, W. S. and Stockwell, B. R. (2008) *Chemistry and Biology*, 15(3), pp. 234–245. doi: 10.1016/j.chembiol.2008.02.010.
- Zhang, D.-W. *et al.* (2009) *Science (New York, N.Y.)*, 325(5938), pp. 332–6. doi: 10.1126/science.1172308.