

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**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

A transzszulfurációs utak szerepe melanóma BRAF V600E inhibitor terápiaira kialakuló rezisztenciában

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az elméleti orvostudományok tudományágban

Írta: Borbényi-Galambos Klaudia okleveles biológus

Készült a Debreceni Egyetem Laki Kálmán doktori iskolája
(Trombózis, hemosztázis és vaszkuláris biológia doktori programja) keretében

Témavezető: Prof. Dr. Nagy Péter, MTA doktora

Az értekezés bírálói:

Dr. Kovácsné Prof. Dr. Bácskay Ildikó Katalin, PhD

Prof. Dr. Szakács Gergely, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Csernoch László, MTA doktora

tagok: Prof. Dr. Virág László, MTA doktora

Prof. Dr. Geiszt Miklós, MTA doktora

Az értekezés védésének helyszíne és időpontja:

Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet, „A” épület tanterme

2025. június 17. 10:30-tól

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	1
I. Bevezetés és célkitűzések.....	3
II. Módszerek.....	5
1. Modellrendszerek	5
1.1. Az <i>in vitro</i> modellek.....	5
1.2. Az <i>in vivo</i> modellek.....	5
1.3. Humán minták vizsgálata	5
2. Génexpressziós változások vizsgálata.....	6
3. Génmódosított sejtvonalak létrehozása	6
4. A cisztinfelvétel jelentőségének vizsgálata	6
5. A különböző metabolitok mérése.....	7
5.1. A szulfán kén vizsgálata.....	7
5.2. Az aminosavak mérése	7
5.3. A kis molekulatömegű kéntartalmú metabolitok mérése	7
5.4. A tiolok mérése mono-bromo-bimán alkilezőszer használatával.....	7
6. A fehérje perszulfidáció mérése	7
III. Új tudományos eredmények	9
7. Az oxidatív stressz ellensúlyozása a kezelés alatt álló sejtekben.....	9
7.1. Oxidatív stressz a MAPK gátlás következtében.....	9
7.2. Enzimszintváltozások a redox védelmi rendszerben.....	9
8. Anyagcsere-változások a MAPK útvonal gátlása következtében	10
8.1. A dabrafenib-trametinib kezelés hatása a sejtek energiatermelésére	10
8.2. A glutamin-anyagcserében bekövetkezett változások.....	11
9. A cisztein-anyagcsere jelentősége rezisztencia kialakulása során	11
9.1. A megemelkedett cisztinszükséglet.....	11

9.2.	A cisztein-anyagcsere átprogramozása.....	12
9.3.	A kis molekulatömegű cisztein-perszulfid termelése.....	13
9.4.	A kénanyagcsere vizsgálata <i>in vivo</i>	13
10.	A perszulfidáció szerepe a kezelés alatt álló melanómasejtek védelmében...	14
10.1.	A fehérje perszulfidáció védő szerepe.....	14
10.2.	Az elektrontranszportlánc működésének támogatása.....	15
11.	A cisztationin-gamma-liáz és a MAPK útvonal együttes gátlása kísérleti a gyógyszer-rezisztencia kialakulását.....	15
11.1.	A cisztationin-gamma-liáz szerepének, mint egy potenciális gyógyszer-célpont vizsgálata génmódosítás által.....	15
11.2.	A cisztationin-gamma-liáz farmakológiai gátlása.....	16
12.	Az új kísérleti eredmények tézispontokban összefoglalva.....	18
IV.	Köszönetnyilvánítás	22

I. Bevezetés és célkitűzések

A bőrmelanóma mai napig az egyik legagresszívabb daganattípus, mely egyre több embert, köztük a fiatalokat is érinti. A bőrmelanómás betegek mintegy 50% hordozza a *BRAF* onkogén V600 aktiváló mutációját, mely általában V600E vagy V600K. A mutáns B-Raf fehérje a MAPK útvonal fokozott aktivitásához és ezáltal kontrollálatlan sejtproliferációhoz vezet. Bár a jelenleg elérhető célzott terápiás ágensek nagy hatékonysággal gátolják a *BRAF* mutációt hordozó melanóma növekedését, a szerzett rezisztencia kialakulása legtöbb esetben elkerülhetetlen (*Robert és mtsai, 2015, N Engl J Med*). Korábbi tanulmányok alapján a rezisztens sejtekre az oxidatív stressz magasabb szintje jellemző, mely egy potenciális gyengepont lehet a rezisztens sejtek célzott elpusztítása szempontjából.

Az elmúlt évek kutatásai azt mutatták, hogy a célzott terápiával szembeni rezisztencia kialakulásában számos útvonal érintett, köztük jelátviteli- és sejttanyagsere-változások. A jelátviteli változások közül a legfontosabbak a MAPK útvonal újra aktiválása különböző receptor tirozin kinázok által, illetve a PI3K-Akt útvonal fokozott aktivitása a MAPK útvonal gátolt működésének ellensúlyozására (*Sun és mtsai, 2014, Nature*). Sejtanyagcsere szempontjából fontos megemlíteni, hogy a melanómasejtekre az aerob glikolízis jellemző, melyet a mutációt hordozó B-Raf is aktivál. Ez a folyamat szükséges a kontrollálatlan sejtproliferáció biztosításához. Korábbi tanulmányok alapján a rezisztencia kialakulása során a rezisztens sejtekben megnő az oxidatív foszforiláció és ehhez köthetően a reaktív oxigén származékok (ROS) szintje (*Corazao-Rozas és mtsai, 2013, Oncotarget; Wang és mtsai, 2018, Cell*). A daganatos sejtekre egyébként is magasabb ROS szint jellemző, ami a fehérjék és a DNS állomány oxidatív károsítása által mutációk kialakulásához, illetve hosszan tartó stressz esetén sejthalálhoz vezet. A fokozott oxidatív terhelés egy megváltozott intracelluláris redox környezet kialakulását vonja maga után, ugyanis a túlélés érdekében a ROS közömbösítése elengedhetetlen. Az emelkedett termelés és fokozott lebontás egy emelkedett ROS fluxust eredményez, ez az állapot azonban növeli a további oxidatív terheléssel szembeni érzékenységet.

Az oxidatív stressz elleni védelemben a cisztein aminosavnak kulcsszerep jut, hiszen ez az aminosav szükséges a redox fehérjék, redox kofaktorok, a glutation és az egyéb kéntartalmú antioxidáns molekulák szintéziséhez. A cisztein intracelluláris szintje a felvétele, a szintézise és a lebontása által szigorúan szabályozott. Szemiesszenciális aminosav révén a sejtek fel tudják venni az extracelluláris térből oxidált formában (cisztin), illetve

amennyiben a cisztin elérhetőség limitált, elő tudják állítani szerinből és a homociszteinen keresztül metioninból. Korábbi tanulmányok során számos daganattípus esetén leírták, hogy a rákos sejtek érzékenyek a cisztin felvételéért felelős transzporter gátlására (*Zhu és mtsai, 2019, Cell Metab; Bonifacio és mtsai, 2021, Br J Cancer*). A cisztin megvonása, illetve a cisztin transzporter gátlása a lipid gyökök felhalmozódásához és ezáltal egy vasfüggő sejthaláltípushoz, a ferroptózishoz vezet.

A különböző kéntartalmú kismolekulák fiziológias szerepe a daganatos sejtek védelmében az utóbbi években egyre jobban feltárt. A hidrogén-szulfid szerteágazó biológiai hatását a metallofehérjék hem csoportjával való reakcióján, a fehérjefunkció perszulfidáció általi szabályozásán, illetve a nitrogén monoxiddal történő kölcsönhatásán keresztül fejt ki. A perszulfidok (R-SSH) számos reakción keresztül szoros biokémiai összeköttetésben állnak a hidrogén-szulfiddal, melyek közül több enzimkatalizált. A perszulfidok kémiai tulajdonságait tekintve jobb nukleofilek, mint a tiolok, és a tiolokkal ellentétben elektrofilként is tudnak viselkedni, ezáltal széleskörben reagálnak más vegyületekkel. A perszulfidok fiziológias szerepei közé tartozik az oxidatív stresszel szembeni védelem, a különböző jelátviteli útvonalak szabályozása poszttranszlációs módosításokon keresztül és a sejtanyagcsere folyamatok regulálása, melyek mind tumorbiológiai jelentőséggel bírnak (*Borbenyi-Galambos és mtsai, 2024, Curr Op Chem Biol*).

Ezekre a megfigyelésekre alapozva célul tűztük ki, hogy a rezisztencia kialakulásában szerepet játszó redox biológiai folyamatokat azonosítsuk, és feltárjuk, hogy a cisztein-anyagcsere, illetve ehhez köthetően a különböző szulfid- és perszulfidszármazékoknak milyen szerep jut a célzott terápia alatt álló melanómasejtekben. Feltételeztük, hogy a MAPK útvonal gátlása, illetve a rezisztens sejtekben korábban bemutatott oxidatív stressz széleskörben kihat a melanómasejtek anyagcsere-folyamataira, köztük a redox védelemben meghatározó szerepet játszó kéntartalmú metabolitokra. Célul tűztük ki, hogy a cisztein és a hozzá köthető kéntartalmú metabolitok szintjét célzott metabolomikai vizsgálattal feltárjuk, illetve a szabályozásukban szerepet játszó fehérjék működését fehérje szinten, és aktivitásukat fluxomikai mérésekkel alátámasztjuk. Munkánk során legfőbb célunk az volt, hogy a rezisztencia háttérben álló folyamatok feltárása mellett olyan gyengepontokat azonosítsunk, melyek célzásával a szerzett rezisztencia kialakulása gátolható, és ezáltal a jelenleg elérhető terápiák által biztosított progressziómentes túlélés növelhető.

II. Módszerek

1. Modellrendszerek

1.1. Az *in vitro* modellek

A MAPK gátlás akut hatásának és a rezisztencia kialakulásának vizsgálatához *BRAF* V600E mutációt hordozó sejtvonalakat használtunk, még hozzá az A375 és az SK-MEL-28 vonalakat. A rezisztens vonalak létrehozásához a sejteket növekvő dózisban kezeltük vemurafenibbel, vagy dabrafenibbel és trametinibbel. A sejtosztódást folyamatosan ellenőriztük és amikor a kezelés alatt álló sejtek osztódási rátája megközelítette a terápia-naiv melanómasejtekre jellemző rátát, a sejteket rezisztensnek tekintettük. A rezisztens sejteket továbbra is a gyógyszerek jelenlétében tenyésztettük. A különböző kezeléseknél átvett sejtek osztódását Sulforhodamine B módszerrel vizsgáltuk.

1.2. Az *in vivo* modellek

A MAPK útvonal gátlásának *in vivo* körülmények között történő vizsgálatához sejtvonal alapú és humán betegminta alapú xenograft egérmockmodelleket hoztunk létre. Ehhez a tumorsejteket vagy a humán tumormintát immunhiányos egerek bőre alá oltottuk. A tumorok szélességét és hosszúságát tolmérővel mérve becsültük a tumorok térfogatát, majd a kezelése megkezdése előtt az egereket randomizáltuk. Az adott kísérlet végeztével az egereket feláldoztuk, a tumorokat eltávolítottuk. A dabrafenib-trametinib kezelés kénanyagcserére gyakorolt hatását célzott metabolomikai vizsgálatokkal néztük, melyhez fagyasztott tumormintát használtunk. A tumorok vaszkularizációját immunhisztokémiával vizsgáltuk.

1.3. Humán minták vizsgálata

A cisztationin-gamma-liáz (CSE) szerepének vizsgálatához az Országos Onkológiai Intézet biobankjából *BRAF* V600E mutációt hordozó betegek mintáit gyűjtöttük. A cisztationin-gamma-liáz szintjét terápia-naiv és dabrafenib-trametinib kezelés alatt álló betegek szövetszövetmintáiban immunhisztokémiával vizsgáltuk.

2. Génexpressziós változások vizsgálata

A dabrafenib-trametinib kezelés akut hatását, illetve a rezisztencia kialakulása során bekövetkezett változásokat a különböző gének expressziójára egyrészt mRNA szintjén vizsgáltuk reverz transzkripció kvantitatív polimeráz láncreakcióval, másrészt a fehérjék szintjén nátrium-dodecil-szulfátos poliakrilamid gélelektroforézist követően Western blot analízissel.

3. Génmódosított sejtvonalak létrehozása

Azzal a céllal, hogy a CSE szerepét a célzott terápia alatt álló melanómasejtekben megvizsgáljuk, Sleeping beauty transzpozon rendszer segítségével létrehoztunk egy olyan A375 sejtvonalat, mely a CSE-t stabilan túltermeli. Emellett CRISPR-Cas9 rendszer használatával létrehoztunk egy-egy CSE-hiányos A375 és SK-MEL-28 sejtvonalat. A CSE génmódosítás hatását a dabrafenib-trametinib kezelés hatását melanómasejtek anyagcseréjére metabolomikai vizsgálattal, míg a sejtosztódásra gyakorolt hatását Sulforhodamine B módszer segítségével vizsgáltuk. Annak érdekében, hogy a perszulfidáció szerepét a dabrafenib-trametinib kezelés alatt álló melanómasejtekben megmutassuk, stabil géncsendesítést hoztunk létre a perszulfidok lebontásában szerepet játszó perszulfid-dioxigenázra (ETHE1) nézve RNS interferencián alapuló lentivírus rendszerrel. Ezt követően megvizsgáltuk a ETHE1 géncsendesítés hatását a kénanyagcserében szerepet játszó fehérjék és metabolitok szintjében, illetve a dabrafenib-trametinib kezelés alatt álló melanómasejtek osztódására.

4. A cisztinfelvétel jelentőségének vizsgálata

A kezelés alatt álló melanómasejtek cisztinszükségletének meghatározásához a terápia-naiv, a kezelés alatt álló kontroll és a rezisztens sejteken lévő tápoldatban mértük a cisztin mennyiségének változását tömegspektrometriai módszer segítségével. Emellett a sejtek médiumát cisztinszegény médiumra cseréltük és vizsgáltuk a sejtosztódást cisztinszegény körülmények között. Továbbá egy másik kísérletben a melanómasejteket a MAPK inhibitorok jelenétében kezdtük tenyészteni úgy, hogy az egyik csoportban a sejtmediumot kiegészítettük a cisztin felvételéért felelős transzporter gátlószerével. A sejtek osztódását két hónapos kezelést követően Sulforhodamine B módszerrel vizsgáltuk.

5. A különböző metabolitok mérése

5.1. A szulfán kén vizsgálata

A dabrafenib-trametinib kezelés intracelluláris szulfán kén mennyiségére kifejtett hatását *Sulfane Sulfur Probe 4* fluoreszcens festékkel mértük élősejtes fénymikroszkópia segítségével.

5.2. Az aminosavak mérése

Az aminosavak mennyiségében bekövetkezett változások vizsgálatához a kereskedelmi forgalomban kapható EZ:faast aminosav analízis készletet használtuk, majd az elválasztást követően az aminosavak szintjét tömegspektrometriai módszerrel mértük.

5.3. A kis molekulatömegű kéntartalmú metabolitok mérése

A méréseinket Akaike és munkatársai által közölt módszer alapján végeztük (*Akaike és munkatársa, 2017, Nature Communications*). Ehhez a sejteket vagy a fagyasztott tumorszövetet metanolban lizáltuk és a metabolitokat β -(4-hidroxi-fenil)-etil-jódacetamiddal alkileztük. Az analitokat folyadékkromatográfiás elválasztást követően tömegspektrometriával mértük. A mért területet a sejtlizátum összfehérje-tartalmával korrigáltuk.

5.4. A tiolok mérése mono-bromo-bimán alkilezőszer használatával

A hidrogén-szulfid és a tioszulfát méréséhez a tiol csoportokat mono-bromo-bimánnal alkileztük, majd a mintaelőkészítést követően a fluoreszcensen jelölt analitokat detektáltuk. A kvantifikáció standard oldatok segítségével felállított kalibrációs egyenes alapján történt. A mért mennyiségeket a lizátumok összfehérje-tartalmával korrigáltuk.

6. A fehérje perszulfidáció mérése

A fehérjék perszulfidációját két megközelítéssel vizsgáltuk. Az első módszer szintén Akaike és munkatársai módszerén alpszik, mely során a β -(4-hidroxi-fenil)-etil-jódacetamiddal alkilezett peptidek elválasztása folyadékkromatográfiával történt, majd a detektálást tömegspektrometriával végeztük. A másik módszer során az alkilezés EZ-Link iodoacetyl-PEG2-biotinnal történt, az elválasztás pedig mágneses gyöngyök segítségével, majd a perszulfidált fehérjék mennyiségének vizsgálatát nátrium-dodecil-szulfátos poliakrilamid gélelektroforézist követően ezüstfestéssel végeztük. A lizátum összfehérje-tartalmát Coomassie festéssel ellenőriztük. A perszulfidált fehérjék azonosítását a gélből

történő kivágást és emésztést követően proteomikai megközelítéssel végeztük. Ezt követően az azonosított fehérjék validációja gélelektroforézist követően Western blottal történt.

III. Új tudományos eredmények

7. Az oxidatív stressz ellensúlyozása a kezelés alatt álló sejtekben

7.1. Oxidatív stressz a MAPK gátlás következtében

A célzott terápiával szembeni rezisztencia kialakulásának mélyebb megértése érdekében létrehoztunk a V600E mutációt hordozó B-Raf-ot gátló dabrafenibre és a MEK1/2 kinázt gátló trametinibre rezisztens melanómasejtvonalat. Munkánk során egyrészt a dabrafenib-trametinib kezelés akut hatását vizsgáltuk a terápiát átvészelő, nem osztódó, úgynevezett perziszter sejtekben, másrészt a szerzett rezisztencia kialakulása során végbement változásokat tanulmányoztuk. A detektált változásokat a terápia-naiv kontroll sejtekhez viszonyítottuk.

Korábbi tanulmányok azt mutatták, hogy a célzott terápiára rezisztens melanómasejtekre az oxidatív stressz magasabb szintje jellemző. Ezzel összhangban mi azt láttuk, hogy a dabrafenib-trametinib kezelés hatására a perziszter sejtekben megemelkedett a fehérjék oxidációja, illetve további oxidatív terhelés hatására a kezelés alatt álló sejtekben felhalmozódik a peroxiredoxinok irreverzibilisen oxidálódott formája. Emellett az oxidatív stressz hatására a kezelés alatt álló sejtekben felhalmozódott a poli-ADP-ribozilált fehérjék mennyisége, mely az oxidatív terhelés által kiváltott DNS károsodásra utal. Ezek az eredményeink alátámasztották a dabrafenib-trametinib terápia hatására bekövetkező oxidatív stresszt. Az emelkedett oxidatív stressz hátterében állhat a citokróm P450 gének fokozott expressziója, ugyanis az általuk kódolt monooxigenázok működésük során gyógyszermolekulákat közömbösítenek miközben reaktív oxigén származékokat termelnek.

7.2. Enzimszintváltozások a redox védelmi rendszerben

Az oxidatív stressz ellensúlyozása elengedhetetlen a túlélés szempontjából, hiszen a hosszútávú terhelés a DNS állomány, a lipidek és a fehérjék károsodásához, és végső soron egy vasfüggő sejthalálhoz, a ferroptózishoz vezet. A dabrafenib-trametinib kezelés alatt álló sejtekben azonban azt találtuk, hogy számos olyan fehérjét túltermelnek, melyek az oxidatív ágensek közömbösítésében játszanak szerepet, és ezáltal biztosítják a perziszter sejtek túlélését. Az általunk azonosított fehérjék között szerepelt a kataláz, glutation-peroxidáz 1 és 4, a szuperoxid-diszmutáz 2, és a tioredoxin-reduktáz 1. Utóbbi két enzim a rezisztens sejtekben is magas expressziót mutatott. Ezen rendszerek működéséhez a redukáló erőt a

sejtek NADPH formájában a pentóz-foszfát úton keresztül biztosítják. Az előző eredményekkel összhangban a pentóz-foszfát út fokozott működését a dabrafenib-trametinib kezelés következtében sikerült alátámasztunk, ugyanis a glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz emelkedett szintjét és a pentóz-foszfát út működését serkető foszfo-frukto-kináz/fruktóz-biszfoszfátáz (PFKFB) 4 fokozott expresszióját találtuk dabrafenib-trametinib kezelés hatására.

8. Anyagcsere-változások a MAPK útvonal gátlása következtében

8.1. A dabrafenib-trametinib kezelés hatása a sejtek energiatermelésére

A melanómasejtek energiatermelő folyamatait vizsgálva azt találtuk, hogy a glikolízis aktivitása és a sejtek glikolitikus kapacitása a dabrafenib-trametinib kezelés hatására lecsökkent. Ennek hátterében egyrészt állhat a mutációt hordozó Braf gátlása, ugyanis terápia-naiv körülmények között a B-Raf fokozza a glikolízis működését. A másik oka a PFKB3 és 4 megváltozott expressziója lehet, melyek a glikolízis és a pentóz-foszfát út közötti fluxust szabályozzák. A dabrafenib-trametinib kezelés következtében mért emelkedés a PFKFB4 szintjében és a mért csökkenés a PFKFB3 esetén a glikolízis alul működésére és a pentóz-foszfát út fokozott aktivitására utal. Ez összhangban áll a védelmi fehérjék fokozott expressziójával, ugyanis az oxidatív stressz ellensúlyozásához a sejteknek NADPH-ra van szüksége.

A sejtek mitokondriális légzését vizsgálva azt találtuk, hogy a dabrafenib-trametinib kezelés hatására nőtt a sejtek mitokondriális reverz kapacitása, míg a rezisztens sejteknek mind a légzési kapacitása mind a bazális légzése magasabb volt, mint a terápia-naiv kontroll sejteké. Az emelkedett mitokondriális légzés az emelkedett citokróm P450 expresszióval együttesen hozzájárulhat a kialakult oxidatív stresszhez. Az emelkedett sejtlégzés támogatásához a sejteknek szüksége van a különböző redukált elektronszállító molekulákra. Az emelkedett sejtlégzéssel összhangban azt találtuk, hogy a dabrafenib-trametinib kezelés hatására megemelkedett azoknak a fehérjéknek az expressziója, melyek a NADH és a FADH₂ termelésében szerepet játszanak, közülük többen a citromsavciklus fehérjei.

8.2. A glutamin-anyagcserében bekövetkezett változások

Mivel a citromsavciklus szoros összeköttetésben áll számos aminosav-anyagcseréjével, a következő kísérletben aminosavanalízisnek vetettük alá a sejteket és megvizsgáltuk a dabrafenib-trametinib hatását. Aminosavanalízisünk során azt találtuk, hogy a dabrafenib-trametinib kezelés hatására megemelkedett a sejtekben a glutamin, az aszparagin és az aszpartát szintje, míg a rezisztens sejtekben az aszpartát enyhén emelkedett szintjét tapasztaltuk. Emellett a sejtek tápoldatából mérve azt találtuk, hogy a kezelés alatt sejteknél megnőtt az aszparagin szintje a sejtmédiumban, míg a rezisztens sejtek esetén mind az aszparagin, mind az aszpartát szintje emelkedett. Továbbá mind a dabrafenib-trametinib kombinációval kezelt sejtek, mind a rezisztensek több glutamint vettek fel, mely összhangban áll korábbi kutatócsoportok észleléseivel, miszerint a MAPK inhibitorokra rezisztens melanómasejteknek megnő a glutaminigénye.

Emellett a glutamin és glutamát egymásba történő alakításáért felelős enzimek expresszióját vizsgálva azt találtuk, hogy a dabrafenib-trametinib kezelés hatására megemelkedett a glutamát termeléséért felelős fehérje expressziója, míg a rezisztens sejtek esetén csökkent a glutamátot fogyasztó fehérje expressziója. Ez az észlelés az emelkedett glutaminigénnyel együtt arra utal, hogy a dabrafenib-trametinib kezelés alatt álló sejtek a felvett glutamint nagy mennyiségben alakítják glutamáttá. A glutamátot a sejtek az alfa-ketoglutarát termelése által használhatják a citromsavciklus táplálására, a redox védelemben fontos glutation termelésére és a cisztin felvételére. Feltételeztük, hogy a fent ismertetett változások révén mindhárom funkciónak fontos szerep juthat a dabrafenib-trametinib kezelés alatt álló sejtek esetén.

9. A cisztein-anyagcsere jelentősége rezisztencia kialakulása során

9.1. A megemelkedett cisztinszükséglet

A cisztein aminosav redox egyensúlyban betöltött szerepe révén elengedhetetlen az oxidatív stresszel szembeni védelemben, hiszen számos kofaktor, kéntartalmú antioxidáns vegyület és redox egyensúlyban szerepet játszó fehérje termeléséhez szolgál szubsztrátként. Korábban más kutatócsoport megmutatta, hogy a cisztin felvételéért felelős transzporter transzkripcionális gátlására a rezisztens sejtek érzékenyek (*Wang és munkatársai, 2018, Cell*). Ezzel összhangban azt találtuk, hogy mind a dabrafenib-trametinib kezelés alatt álló perziszter, mind a rezisztens sejtek több cisztint vettek fel és a rezisztens sejtek a cisztin és a szelenit együttes megvonására érzékenyebbek. Emellett sikerült megmutatnunk, hogy a

cisztin felvételéért felelős transzporter közvetlen gátlásával a rezisztencia kialakulása késleltethető. A sejtek a ciszteint a glutamáttal együtt a glutation szintézisére használják, melynek fontos szerepe van a sejtek oxidatív stresszel szembeni védelmében. A glutation emelkedett szintje a rezisztencia kialakulása során a redox homeosztázis fenntartása mellett a gyógyszermolekulák közömbösítésért felelős glutation-S-transzferáz pi fehérje működéséhez szükséges, így a glutation szerepe a rezisztencia kialakulásában kettős.

9.2. A cisztein-anyagszere átprogramozása

A cisztin a sejtekbe jutva redukálódik a tioredoxin rendszer által, majd számos különböző útvonalon keresztül hasznosításra kerül. Az emelkedett cisztinszükséglet mellett azonban azt találtuk, hogy a cisztein intracelluláris szintje valójában alacsony volt és az oxidált/redukált cisztein aránya magasnak bizonyult a dabrafenib-trametinib kezelésnek köszönhetően. Ennek hátterében részben a fokozott hasznosítás állhat, részben azonban a cisztein katabolizmusáért felelős útvonal. Érdekes módon azt találtuk, hogy a dabrafenib-trametinib kezelés alatt álló sejtekben a cisztein katabolizmus fokozott mértékben történik, mely a magas cisztin felvétellel együtt emelkedett cisztin/cisztein arányhoz vezetett.

A ciszteint a sejtek elő tudják állítani szerinből és a metioninból származó homociszteinből a transzszulfurációs útvonal által. A transzszulfurációs útvonal enzimszintjeit, illetve az egyes reakciólépéseket fluxomikai módszer segítségével vizsgálva azonban azt találtuk, hogy *in vitro* körülmények között a melanómasejtek nem termeltek detektálható mennyiségű ciszteint. Ez valójában nem meglepő, hiszen a sejtmédiumban a cisztin nagy mennyiségben áll rendelkezésre, és a sejteknek sokkal egyszerűbb felvenni az aminosavat oxidált formában, mint több reakciólépésen keresztül előállítani. Egy másik tanulmány keretein belül embrionális vese sejtvonalban szintén fluxomikai mérésekkel megmutattuk, hogy a sejtmédiumban a cisztin koncentrációját csökkentve a transzszulfurációs útvonal kanonikus, ciszteint termelő aktivitása fokozódott. Továbbá ebben a tanulmányban arra is fényt derítettünk, hogy amennyiben a cisztin intracelluláris redukciójában szerepet játszó tioredoxin-szerű 14 kDa-os fehérjét (TRP14) kódoló gént kiütjük, akkor a transzszulfurációs útvonal kanonikus aktivitása tovább fokozódott.

A dabrafenib-trametinib kezelés következtében emelkedést találtunk a cisztationin-gamma-liáz (CSE) expressziójában, mely a fluxomikai mérések alapján nem a cisztein előállítását, hanem a reaktív kén-származékok termelése által fejt ki hatását. A CSE emelkedett expressziója mellett a másik transzszulfurációs enzim, a cisztationin béta-szintáz (CBS)

csökkent expresszióját találtuk dabrafenib-trametinib kezelés hatására. A rezisztens sejtekben ezen enzimek expressziója a terápia-naiv kontroll sejtekhez hasonló szintre állt vissza.

9.3. A kis molekulatömegű cisztein-perszulfid termelése

A kéntartalmú metabolitok szintjét vizsgálva azt találtuk, hogy a dabrafenib-trametinib kezelés hatására megemelkedett a szulfán kén, a hidrogén-szulfid, a cisztein-perszulfid és a glutation-perszulfid szintje, illetve a rezisztens sejtekben a glutation-perszulfid magas maradt. Ezeket az észleléseket más *in vitro* modellrendszerekben is megerősítettük. Emellett génmódosított melanómasejtvonalak használatával megmutattuk, hogy a kis molekulatömegű cisztein-perszulfid termeléséért a CSE felelős, még hozzá a cisztinből közvetlenül cisztein-perszulfidot termelő reakciója által. Ezt az észlelést igazolja, hogy a CSE túltermelés hatására a cisztin (szubsztrát) szintje lecsökkent és a cisztein-perszulfid (termék) megemelkedett, míg a CSE génkiütött sejtvonal esetén a cisztein-perszulfid lecsökkent és a cisztin szintje megnőtt. A CSE-hiányos sejtvonalban a cisztein-perszulfid szintje nem emelkedett dabrafenib-trametinib kezelés hatására, mely azt mutatja, hogy a dabrafenib-trametinib kezelés hatására bekövetkezett emelkedés a cisztein-perszulfid szintjében valóban a CSE-nek köszönhető.

9.4. A kénanyagcsere vizsgálata *in vivo*

A továbbiakban kíváncsiak voltunk arra, hogy a kénanyagcserében *in vitro* körülmények között észlelt változások a dabrafenib-trametinib kezelés hatására *in vivo* is lezajlanak-e. Ennek vizsgálatához sejtvonal eredetű és humán tumorminta alapú xenograft egérmodelleket hoztunk létre. Az egereket a dabrafenibbel és trametinibbel kezeltük, majd az eltávolított tumorok célzott metabolomikai analízisével vizsgáltuk a gyógyszerhatást. A xenograft egerekkel végzett méréseink megerősítették az *in vitro* eredményeinket: a hidrogén-szulfid és a perszulfidok szintje megemelkedett, mely valószínűleg védi az oxidatív stressznek kitett melanómasejteket a károsodástól. Emellett ezek a mérések arra is rámutattak, hogy a CBS aktivitása dabrafenib-trametinib kezelés hatására *in vivo* körülmények között is jelentősen lecsökkent, összhangban az *in vitro* eredményeinkkel.

10. A perszulfidáció szerepe a kezelés alatt álló melanómasejtek védelmében

10.1. A fehérje perszulfidáció védő szerepe

Az emelkedett szulfid és perszulfid szintek megvédik a sejteket az oxidatív stressztől és a lipid peroxidáció által kiváltott ferroptózistól. Emellett a fehérjék tiol oldalláncainak perszulfidációja mint poszttranszlációs módosulat fontos jelátviteli szerepet tölt be a fehérjefunkció szabályozásán keresztül, illetve védi a fehérjéket az irreverzibilis oxidatív módosulatok kialakulásától. Két különböző módszer segítségével sikerült megmutatnunk, hogy a dabrafenib-trametinib kezelés hatására a fehérjék perszulfidációja megemelkedett. Továbbá a fehérje-szulfénsav (fehérje-SOH) és -per-tio-szulfénsav (fehérje-SSOH) módosulatok szintjében is emelkedést találtunk, mely egyrészt igazolja a dabrafenib-trametinib kezelés hatására bekövetkezett oxidatív stresszt, másrészt bizonyíték arra, hogy a perszulfidáció védi a fehérjéket az oxidatív károsodás okozta degradációtól.

A perszulfidált fehérje frakcióból sikerült azonosítanunk néhány fehérjét, melyek között elsősorban stresszválaszban fontos fehérjéket találtunk, például fehérje-diszulfid-izomerázokat, peroxiredoxinokat és a katalázt. Ezek közül a peroxiredoxin-2 emelkedett perszulfidációját immunoblot segítségével sikerült alátámasztanunk. Ezek a vizsgálatok arra utaltak, hogy a dabrafenib-trametinib kezelés következtében létrejövő oxidatív stressz ellen a sejtek a kis molekulatömegű perszulfidok és a hidrogén-szulfid emelkedett szintje mellett a fehérjék perszulfidációval is védekeznek.

A perszulfidok bontásában kulcsszereplő a perszulfid-dioxigenáz. Annak érdekében, hogy a perszulfidáció szerepét a dabrafenib-trametinib kezelés alatt álló sejtek védelmében feltárjuk, stabil géncsendesítést hoztunk létre a perszulfid-dioxigenázra nézve. A géncsendesítés következtében megemelkedett a glutation-perszulfid és a fehérje perszulfidáció szintje. A dabrafenib-trametinib kezelés esetén azok a sejtek, melyekben a perszulfid-dioxigenázt csendesítettük, hamarabb váltak rezisztenssé. Ezzel sikerült közvetlenül igazolnunk a perszulfidok fontos szerepét a dabrafenib-trametinib kezelés alatt álló perziszter túlélésében és ezáltal a szerzett rezisztencia kialakulásában.

10.2. Az elektrontranszportlánc működésének támogatása

A hidrogén-szulfid és a perszulfidok szintje nem csupán termelésük által szabályozott, a mitokondriális lebontó útvonal fontos szerepet játszik a fiziológiai koncentrációjuk fenntartásában. A lebontó útvonal enzimeinek, illetve az útvonal végtermékének a szintjét vizsgálva emelkedést találtunk a dabrafenib-trametinib kezelés hatására mindhárom *in vitro* modellrendszerünk esetén. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a szulfid és perszulfid származékok termelése mellett a lebontásuk is emelkedett, tehát egy megnövekedett szulfid/perszulfid fluxusról beszélhetünk. A hidrogén-szulfid lebontása során elektronokat ad le az elektrontranszportláncnak, így lebontása során stimulálja annak működését, ezáltal hozzájárulva a fokozott sejtlégzéshez. Az emelkedett NADH és FADH₂ termelés mellett ezáltal a hidrogén-szulfid emelkedett fluxusa hozzájárulhat a dabrafenib-trametinib kezelés hatására emelkedett oxidatív foszforilációhoz.

11. A cisztationin-gamma-liáz és a MAPK útvonal együttes gátlása késlelteti a gyógyszer-rezisztencia kialakulását

11.1. A cisztationin-gamma-liáz szerepének vizsgálata génmódosítás által

A jelen dolgozatban bemutatott munka legfőbb célja az volt, hogy a különböző folyamatok szerepének feltárása mellett új potenciális célpontokat azonosítsunk, melyek célzásával a szerzett rezisztencia kialakulása késleltethető. A dabrafenib-trametinib kezelés következtében emelkedést tapasztaltunk a CSE szintjében nem csupán *in vitro* körülmények között, hanem az általunk vizsgált betegminták esetén is. A CSE azért is lehet egy jó célfehérje, mert van a kereskedelmi forgalomban elérhető relatíve szelektív gátlószere. Továbbá a CSE túltermelése mellett a dabrafenib-trametinib kezelés hatására a CBS szintjében csökkenést tapasztaltunk, mely a CSE mellett szintén a hidrogén-szulfid és a perszulfidok termelésében játszik szerepet. A CBS csökkent működése mellett tehát a kezelés alatt álló sejtek feltételezhetően érzékenyebbek a CSE gátlására, hiszen a megnövekedett szulfid/perszulfid igényüket nem tudják kielégíteni.

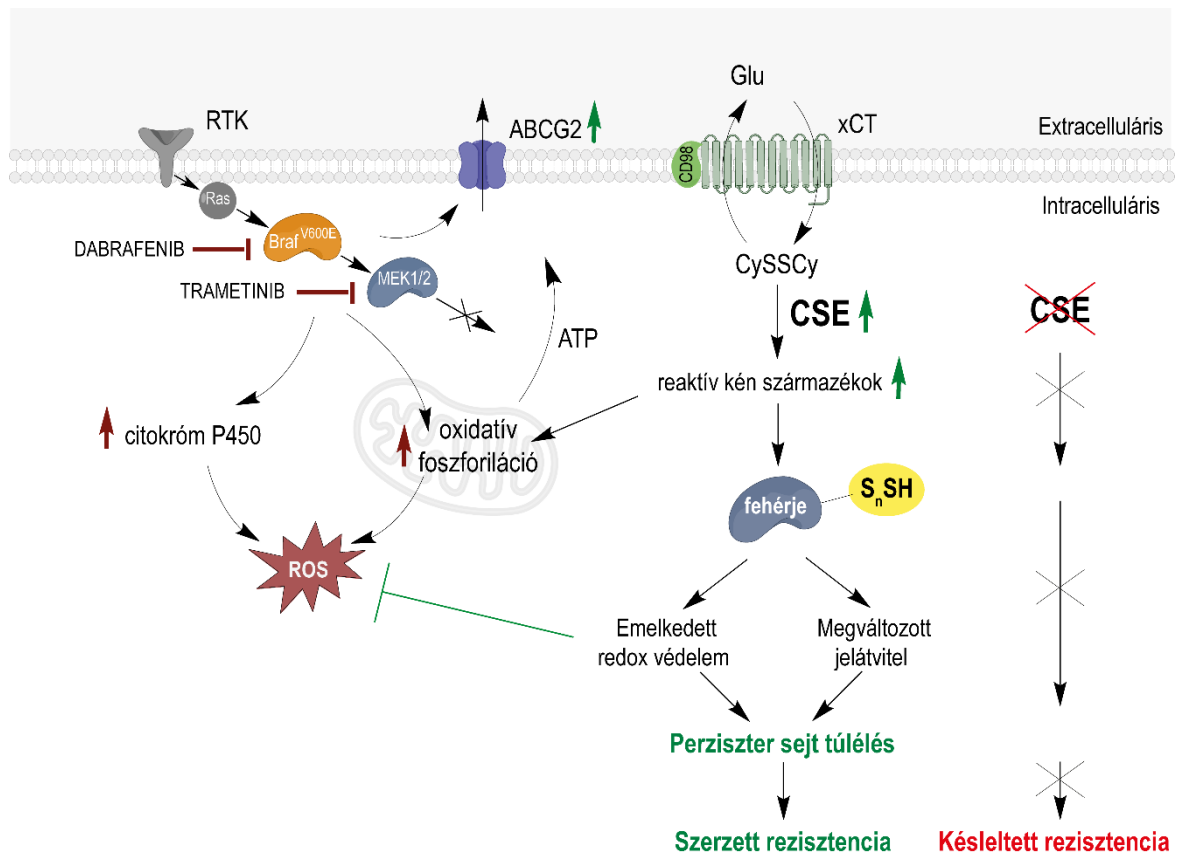
A CSE-t túltermelő sejtvonallal végzett kísérleteink rámutattak arra, hogy a CSE emelkedett expressziója és ezáltal a cisztein-perszulfid fokozott termelése a dabrafenib-trametinib kezelés során előnyös, ugyanis ezek a sejtek gyorsabban váltak rezisztenssé, mint a kontroll társaik. Ehhez hasonlóan az ellentétes kísérletben azt találtuk, hogy a CSE hiányában a melanómasejtek érzékenyebbek voltak a célzott terápiával szemben és a CSE-hiányos

sejtekben a szerzett rezisztencia később alakult ki. Ezek a kísérletek rávilágítottak arra, hogy a CSE és a MAPK útvonal együttes gátlása hatékonyabb terápiás válaszhoz vezethet.

11.2. A cisztationin-gamma-liáz farmakológiai gátlása

In vitro kísérleteink alapján azt találtuk, hogy a MAPK útvonal és a CSE együttes gátlása késleltette a szerzett rezisztencia kialakulását mindhárom modellrendszerünk esetén. Az Akt foszforilációját vizsgálva azt láttuk, hogy azokban a sejtekben, melyekben a MAPK gátlószerek mellett a D,L-propargil-glicin (PAG) nevű CSE gátlószert is alkalmaztuk, csökkent az Akt foszforilációja, mely a PI3K-Akt útvonal csökkent aktivitására utal. Ez azért nagyon fontos, mert a PI3K-Akt útvonal fokozott aktivitása meghatározó szerepet játszik a MAPK gátlószerekkel szembeni szerzett rezisztencia kialakulásában. Ez az észlelés részben állhat a PAG kezelés rezisztenciát késleltető hatása mögött. Bár a mögöttes molekuláris mechanizmusok egyelőre kevésbé 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 változhatnak a különböző jelátviteli útvonalak, például a PI3K/Akt útvonal aktivitása, mely fontos szerepet játszik a szerzett rezisztencia kialakulásában, azonban ennek feltárása további kísérleteket igényel. Fontos kiemelni, hogy kísérleteink során a PAG-ot olyan koncentrációban használtuk, mely nem gátolta a terápia-naiv melanómasejtek osztódását és a xenograft tumorok növekedését.

A dabrafenib-trametinib és PAG kombinációt xenograft egérmodellben vizsgálva azt találtuk, hogy a CSE és a MAPK útvonal együttes gátlása *in vivo* körülmények között is késleltette a szerzett rezisztencia kialakulását és növelte az egerek progressziómentes túlélését. Ezek az eredmények azt mutatják, 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.



1. ábra | A dolgozat legfontosabb eredményeit röviden összefoglaló szemléltető ábra. A B-Raf V600E és a MEK1/2 gátlása következtében nő az oxidatív foszforiláció és a citokróm P450 fehérjék expressziója, melyek emelkedett a reaktív oxigén származékok (ROS) emelkedett termeléséhez vezetnek. Az oxidatív stressz ellensúlyozásához a sejtek több cisztint (CySSCy) vesznek fel, melyből a cisztaionin- γ -liáz (CSE) reaktív kén származékokat termel, melyek tovább fokozzák a mitokondriális sejtlégzés működését. A reaktív kén származékok emelkedett szintje fokozott fehérje perszulfidációhoz vezet, mely védi a sejteket az emelkedett oxidatív stressztől 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 gátlószereivel késlelteti a szerzett rezisztencia kialakulását.

12. Az 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 citokróm P450 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 cisztinfevétellel összhangban a célzott terápiát a cisztin-glutamát antiportert gátló erastin vegyülettel kombinálva a szerzett rezisztencia késleltethető volt.
- Azt találtuk, hogy a B-Raf V600 gátlására 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 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 esetben a cisztein katabolikus út fokozott működésével párosult.

- Metabolomikai és fluxomikai mérésekkel megmutattuk, hogy a dabrafenib-trametinib kezelés alatt álló perziszter sejtekben a CSE emelkedett szintje fokozott hidrogén-szulfid termeléshez vezetett 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, méghozzá 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 B-Raf V600E és a MEK inhibitorokat a CSE gátlószerrel kombinálva az egerek progressziómentes túlélése növelhető.



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., Bártai, I. Z., Sándor, Z., Minnion, 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.



IV. 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. Ditrói Tamásnak**, aki a mesterszakos munkám és a PhD-m során egyaránt segítette munkámat az analitikai mérések kivitelezésével és tanácsaival.

Köszönöm a segítségét **Dr. Garai Dorottyanak** az állatkísérletek kivitelezésében és hogy a PhD képzés során az adminisztratív teendőkből 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 segítettek a mindennapokat. Köszönöm **Dr. Erdélyi Katalinnak**, **Dr. Czikora Ágnesnek**, **Dr. Garai Dorottyanak**, **Szántó Noéminek**, **Jurányi Eszter Petrának**, **Szatmári Réka Zsuzsannának**, **Lénárt Zsuzsannának**, **Ditrói Tamásnak**, **Dr. Ditróiné 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. Liskay 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**.