

dc_997_15

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

A 2-ES TÍPUSÚ CUKORBETEGSÉG ÉS AZ ENDOPLAZMÁS RETIKULUM

Dr. Csala Miklós

Semmelweis Egyetem

Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Patobiokémiai Intézet

BUDAPEST

2015

dc_997_15

1. BEVEZETÉS	3
1.1. AZ ELHÍZÁSHOZ KAPCSOLÓDÓ ANYAGCSERE-BETEGSÉGEK	3
1.1.1. <i>Inzulinrezisztencia</i>	3
1.1.2. <i>Az emelkedett zsírsavszint hatásai – lipotoxicitás</i>	3
1.1.3. <i>Exogén antioxidánsok és diabetes mellitus</i>	4
1.2. AZ ENDOPLAZMÁS RETIKULUM ÉS A METABOLIKUS SZINDRÓMA	4
1.2.1. <i>Az endoplazmás retikulum legfontosabb funkciói</i>	4
1.2.2. <i>Az endoplazmás retikulum stressz</i>	6
2. CÉLKITŰZÉS	6
3. EGYES MÓDSZEREK RÖVID ÁTTEKINTÉSE	7
3.1. MIKROSZÓMA ÉS MIKROSZOMÁLIS SZUBFRAKCIÓK ELŐÁLLÍTÁSA	7
3.2. MEMBRÁNPERMEABILIZÁLÁS ÉS A LATENCIA MEGHATÁROZÁSA	8
3.3. FEHÉRJETIOLOK FOGYÁSÁNAK VIZSGÁLATA	8
3.4. AZ ASZKORBÁT MENNYISÉGI MEGHATÁROZÁSA	8
3.5. A NAD(P)H FOGYÁSÁNAK ÉS TERMELŐDÉSÉNEK FLUORESZCENS MÉRÉSE	8
3.6. TRANSPORTMÉRÉSEK	9
4. EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK	10
4.1. A TIOL-DISZULFID RENDSZER OXIDÁLT ÁLLAPOTÁNAK FENNTARTÁSA	10
4.1.1. <i>Glutationtranszport az endo/szarkoplazmás retikulumban</i>	10
4.1.2. <i>Aszkorbátszintézis által kiváltott tioloxidáció</i>	10
4.1.3. <i>Fehérjetiolok oxidációja dehidroaskorbát hatására</i>	11
4.1.4. <i>Fehérjetiolok oxidációja askorbát hatására</i>	12
4.1.5. <i>Aszkorbát-oxidáz aktivitás az endoplazmás retikulumban</i>	12
4.1.6. <i>A tokoferol szerepe az askorbát által kiváltott tioloxidációban</i>	13
4.1.7. <i>Az askorbátfüggő fehérjetiol-oxidáció modellje</i>	13
4.1.8. <i>Endoplazmás retikulum stressz skorbutban</i>	15
4.1.9. <i>A glikált hemoglobin szintjének csökkenése askorbát hatására</i>	15
4.2. A PIRIDIN-NUKLEOTID RENDSZER REDUKÁLT ÁLLAPOTÁNAK FENNTARTÁSA ..	15
4.2.1. <i>Az ER NADPH-NADP⁺ készletének elkülönülése</i>	15
4.2.2. <i>A NADPH-NADP⁺ készlet redukált állapotának fenntartása</i>	16
4.2.3. <i>A tiol-diszulfid és a NADPH-NADP⁺ rendszerek elkülönülése</i>	16
4.2.4. <i>Kortizoltermelés fruktóz-6-foszfát felhasználásával</i>	17
4.2.5. <i>A H6PD expressziója különböző szövetekben</i>	17
4.2.6. <i>A H6PD expressziója zsírsejtdifferenciáció során</i>	18
4.2.7. <i>Éhezés és jóllakottság hatása piridin-nukleotid rendszerre</i>	18
4.2.8. <i>Az ER piridin-nukleotidkészlete mint gyógyszertámadáspont</i>	18
4.3. LIPOTOXICITÁS ÉS LIPOAPOPTÓZIS KIVÉDÉSE	19
5. A LEGFONTOSABB EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE	20
6. AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK	24
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	29

1.1. Az elhízáshoz kapcsolódó anyagcsere-betegségek

Az elhízás multifaktoriális, krónikus betegség, amely veleszületett alapokon, környezeti tényezők hatására alakul ki. Számos egyéb kór kialakulásának kockázatát fokozza, melyek közül kiemelendő a 2-es típusú diabétesz. Az elhízott zsírszövetben gyorsul a lipolízis-reszintézis ciklus, ami megemeli a vérben a szabad zsírsavak (FFA) koncentrációját. Ráadásul erősödik a prohormon kortizon átalakulása kortizollá, ami lokális hatásai mellett ugyancsak kihat más szövetekre is. A gyulladásos mediátorok és a szabad zsírsavak plazmaszintjének emelkedése és a glukokortikoid hatás fokozódása egyaránt akadályozza és/vagy antagonizálja a szövetek inzulinra adott válaszát, vagyis inzulinrezisztenciához vezet.

1.1.1. Inzulinrezisztencia

A tápanyag-túlkínálat és a túlsúly leginkább az IRS dokkoló fehérjék működésének akadályozásával csökkenti az inzulin iránti érzékenységet. Ez részben e fehérjék szerin-foszforilációján keresztül valósul meg. Az IRS-szerin-kinázokat (pl. c-Jun N-terminális kináz: JNK) lipidek, gyulladásos mediátorok, illetve különböző stresszhatások stimulálják. Önálló kórképnek tekintjük a metabolikus szindrómát, amikor az elhízás már inzulinrezisztenciával és jellegzetes anyagcsere-rendellenességekkel társul.

A kortizol nem egyszerűen antagonizálja az inzulin hatásait, hanem bizonyos szövetekben akadályozza is annak érvényesülését az inzulin-jelátvitel közvetlen gátlása által. Tartós glukokortikoid-kezelés – a zsírszövet kivételével szinte az egész szervezetben – inzulinrezisztenciát okoz, ezért a kortizol szerepét valószínűsítik a humán metabolikus szindróma kialakulásában és progressziójában is.

1.1.2. Az emelkedett zsírsavszint hatásai – lipotoxicitás

Az elhízásban tartósan emelkedett plazma FFA-szint a legtöbb szövetben gyulladáskeltő és inzulin-deszenzitizáló hatású. Az IRS fehérjék szerin-foszforilációja a β -sejtek regenerációjához és életben maradásához szükséges „túlélési jel” érvényesülésének is gátat szab, ezért szerepe van a β -sejtek funkciózavarában és pusztulásában is.

1.1.3. Exogén antioxidánsok és diabetes mellitus

Az aszkorbát sajátos kapcsolatban van a cukorbetegséggel. A skorbut diabetogén hatására már a múlt század közepén felfigyeltek. A skorbutizált tengerimalacok glukóztoleranciája jelentősen romlik, és hasnyálmirigyük inzulintartalma a töredékére csökken. E mellett az aszkorbát potenciózza is az inzulin hatását. Kimutatták, hogy az alacsony aszkorbát- és tokoferolszintek korrelálnak az elhízással, a gyulladással és az inzulinrezisztenciával. Számos megfigyelés utal a C-vitamin elhízással és diabétesssel szembeni védő hatására, de a háttérben rejlő mechanizmusok még feltárára várnak.

Az emberi táplálkozásban a katekinek elsődleges forrása a zöldtea, amely legnagyobb mennyiségben epigallokatekin-gallátot (EGCG) tartalmaz. Az EGCG elhízás, metabolikus szindróma és 2-es típusú cukorbetegség elleni védő hatását rengeteg humán vizsgálat és állatkísérlet támasztja alá, de a flavanol inzulinrezisztencia kialakulása és fokozódása ellen kifejtett hatásának mechanizmusa nem tekinthető tisztázottnak.

1.2. Az endoplazmás retikulum és a metabolikus szindróma

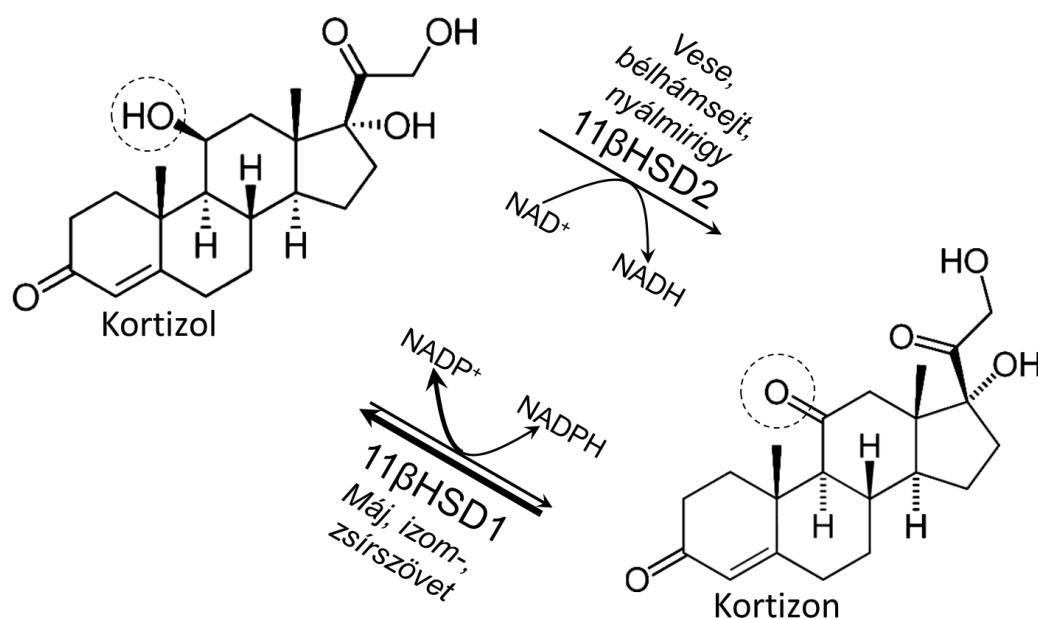
1.2.1. Az endoplazmás retikulum legfontosabb funkciói

Az endoplazmás retikulumban (ER) található a sejt legjelentősebb kalciumraktára. Itt szintetizálódnak az endomembrán rendszer fehérjéi és a szekréciós fehérjék. A glukóz szintézisét és a lipidanyagcsere több lépését is az ER membránjában elhelyezkedő enzimek katalizálják. Az ER vezető szerepet játszik a biotranszformációban, melynek első fázisához tartozik a glukokortikoidok aktiválása/inaktiválása is. Második fázisát pedig az UDP-glukuronozil-transzferázok képviselik, melyek szintén az ER integráns membránfehérjéi.

Az ER lumenében érlelt fehérjék – köztük az inzulin – szerkezetét diszulfid hidak is stabilizálják, melyek a cisteinil tiol-csoportok oxidációjával keletkeznek. Miután a proteindiszulfid-izomeráz (PDI) átvette a fehérje két elektronját, ezeket továbbítania is kell az oxigén felé. Az elektrontranszfer lánc PDI után következő láncszeme fiziológias körülmények között leginkább az Ero1 fehérje. Az Ero1-deficiens egerekben mégis elegendő marad az oxidatív fehérjeérés kapacitása, ami egyértelműen bizonyítja valamilyen alternatív

útvonal(ak) létezését. Az ER-lumenben található glutation jelentős része a fehérje-tiolokkal vegyes diszulfidot képez; és a szabad glutation is a citoplazmainál 20-30-szor oxidáltabb. Kutatásaink megkezdésekor a glutation, illetve egyéb kis molekulájú elektronszállítók diszulfidképzésben betöltött szerepe nem volt tisztázott.

A kortizol lokális (prereceptorális) termelését az 1-es típusú 11β -hidroxiszteroid-dehidrogenáz (11β HSD1) katalizálja. Az enzim a májban, a vázizomzatban, valamint a zsírszövetben van jelen; aktív centruma az ER lumenben helyezkedik el, és a kortizon redukálásához NADP(H)-t használ koenzimként (**1. ábra**). Az 11β HSD1 által katalizált reakció iránya egyértelműen azt mutatja, hogy a legtöbb szövetben, az enzim környezetében magas a $[NADPH]:[NADP^+]$ arány. Számos megfigyelés utalt arra, hogy a lokális NADPH-termelés a luminális hexóz-6-foszfát-dehidrogenáz (H6PD) működésén alapul, de a 11β HSD1 és a H6PD funkcionális kapcsolata még további bizonyításra várt.



1. ábra A kortizol prereceptorális metabolizmusa

A mineralokortikoid-célsejtekben NAD⁺-függő kortizoloxidáció zajlik, amit a 2-es típusú 11β -hidroxiszteroid-dehidrogenáz (11β HSD2) katalizál. Az elhízás és diabétesz szempontjából különösen fontos, glukokortikoid-célsejtekben azonban az 1-es típusú izoenzim (11β HSD1) működik, és jellemzően kortizolt termel, amihez NADPH-t használ redukáló forrásként.

A lokális kortizoltermelésnek – szerepet tulajdonítanak a metabolikus szindróma patogenezisében. A tünetek szinte kivétel nélkül megjelennek a 11β HSD1-et túltermelő, transzgén egerekben; ugyanakkor a 11β HSD1-deficiens knockout egerek látszólag védettek a betegséggel szemben. Ráadásul az enzim gátlása a diabétesz kísérleti állatmodelljeiben is javítja az inzulin iránti érzékenységet és csökkenti a testsúlyt. Mindezek alapján nagy reményeket fűztek a 11β HSD1 szelektív gátlószereihez mint a metabolikus szindróma és a cukorbetegség új, hatékony gyógyszereihez. Az ilyen hatóanyagok fejlesztésére irányuló erőfeszítések nem váltották be maradéktalanul a hozzájuk fűzött reményeket. Az ideális hatóanyag ugyanis az 1-es típusú izoenzimnek csak a reduktáz aktivitását gátolná.

1.2.2. Az endoplazmás retikulum stressz

Az ER működészavarai rendszerint az éretlen fehérjék felhalmozódásához vezet az organelum lumenében. Ez pedig egy speciális adaptív mechanizmus, az „unfolded protein response” (UPR) aktiválódását váltja ki, mely a fehérjeszintézis és a foldingkapacitás felborult egyensúlyát hivatott helyrehozni. Ha azonban az adaptív erőfeszítések eredménytelenek, a programozott sejthalál is aktiválódhat. A pankreász β -sejtek különösen szenzitíven reagálnak az ER-ből érkező stressz-szignálokra. Az UPR kettős („pro-survival” és „pro-death”) funkcióját ráadásul kiválóan példázza az inzulinszekréció kontrollja fiziológias és patológias viszonyok között. A β -sejtek normális stimulálása is kivált ugyanis ER-stresszt (pozitív hatású eustressz), és az erre adott sejtválasz része a megnövekvő inzulinszükséglethez való adaptációnak. Ugyanakkor meggyőzően bizonyították a sejt által már (meg)oldhatatlan ER-stressz (destruktív distressz) fontos szerepét a β -sejtek működészavarában és pusztulásában; és ez különösen érvényes a β -sejt-lipotoxicitásra.

2. CÉLKITŰZÉS

Hipotézisünk szerint a tápanyag-ellátottság érzékelésében és a válasz generálásában kulcsmomentum az ER redox rendszereinek modulálása. Kóros körülmények között az UPR és a kortizoltermelés egyaránt hozzájárulhat az inzulinrezisztencia kialakulásához, illetve a hasnyálmirigy β -sejtek

diszfunkciójához, ezért elméletünk a metabolikus szindróma és a diabétesz patobiokémiája szempontjából is releváns. Az alábbi konkrét kérdések megválaszolását tűztük ki célul:

- **Kisméretű elektronszállítók metabolizmusa, transzportja az ER-ben; ennek szerepe az oxidatív fehérjeérésben. A luminális redox rendszerek kapcsolatai.**
 - a.) *Hogyan alakul ki az oxidált tiol-diszulfid környezet?*
 - b.) *Milyen fiziológias tényezők befolyásolják a piridin-nukleotidok redox állapotát?*
 - c.) *Hogy fér meg egy kompartmentben két eltérő potenciálú redox rendszer?*
- **Az ER-lumen redox homeosztázisa mint az elhízással összefüggő anyagcsere-betegségek megelőzésének és terápiájának lehetséges célpontja. Az oxidatív fehérjeérés zavara és a következményes ER-stressz szerepe a C-vitaminhiány által okozott inzulinrezisztencia kialakulásában. A zsírsavak által okozott β -sejtkárosodás kivédése az ER-stressz csökkentésével. A prerreceptorális kortizoltermelés szelektív gátlása a luminális piridin-nukleotid redox státusz befolyásolása révén.**
 - a.) *Kialakul-e ER-stressz az C-vitaminhiányos tengerimalacok májsejtjeiben?*
 - b.) *Szerepet játszik-e az ER-stressz csökkentése a metformin β -sejt védő hatásában?*
 - c.) *Befolyásolható-e a prerreceptorális kortizoltermelés az ER luminális piridin-nukleotid redox státuszának modulálásával?*

3. EGYES MÓDSZEREK RÖVID ÁTTEKINTÉSE

3.1. Mikroszóma és mikroszomális szubfrakciók előállítása

Az endo/szarkoplazmás retikulumban zajló enzimatikus és transzportfolyamatok *in vitro* tanulmányozásához mikroszómát preparáltunk. A vezikulumok megtartják az organelum eredeti membránorientációját, valamint a luminális fehérjét és a membránon keresztül nem transzportálódó metabolitokat. A mikroszóma előállítása a homogenizált szövetek differenciál-centrifugálásán alapul. A durva és sima felszínű ER-ből származó mikroszóma-

szubfrakciók elválasztásakor az utolsó centrifugálást szacharóz gradiensben végeztük. A preparátumokat felhasználásukig folyékony nitrogénben tároltuk. Tisztaságukról marker enzimek Western blottal történő detektálása segítségével bizonyosodtunk meg. A membrán integritásának ellenőrzésére a mannóz-6-foszfátáz latencia tesztet alkalmaztuk.

3.2. Membránpermeabilizálás és a latencia meghatározása

A biológiai membránok permeabilizálásának olcsó, de kíméletlen módja a lipid-kettősréteg integritásának megszüntetése detergens (pl. Triton X-100) hozzáadásával. Amikor az átjárhatóságot a membránszerkezet megőrzése mellett kellett biztosítani, a pórusképző antibiotikum alameticint használtuk. Luminális aktív centrummal rendelkező enzimek esetében gyakran megfigyelhető a latenciának nevezett jelenség, vagyis hogy a permeabilizált mikroszómában mért aktivitásnak csak egy része detektálható intakt vezikulumokban.

3.3. Fehérjediolok fogyásának vizsgálata

A fehérjediszulfid-képződés tanulmányozásakor a mikroszómához triklórecetsavat adtunk, a fehérjecsapadékot gyors centrifugálással üleptítettük, és reszuszpéndálás előtt a kismolekulájú tioloikat (pl. GSH) a puffer cseréjével eltávolítottuk. Az így nyert szuszpenzió szabad tiolcsoportjainak koncentrációját az Ellman módszerrel határoztuk meg.

3.4. Az aszkorbát mennyiségi meghatározása

Az aszkorbát mennyiségének méréséhez a mikroszómát savas kicsapással fehérjementesítettük, és a felülúszóban oldott aszkorbátot FeCl_3 oldattal reagáltattuk. Az aszkorbát hatására keletkező Fe^{2+} ionok α, α' -dipiridillel képzett, színes komplexét végül fotométerrel detektáltuk. Egyes kísérletekben az aszkorbát és dehidroaszkorbát mennyiségét HPLC-vel határoztuk meg.

3.5. A NAD(P)H fogyásának és termelődésének fluoreszcens mérése

A redukált piridin-nukleotidok (NADH vagy NADPH) mennyiségi változásainak folyamatos nyomonkövetését jellegzetes fluoreszcenciájuk (maximuma 350 nm-es gerjesztési és 460 nm-es kibocsátási hullámhossznál)

tette lehetővé. Ily módon az intakt vezikulumok endogén NAD(P)H-tartalma is detektálható. Ilyenkor azonban a kis mennyiség és a viszonylag alacsony jel/zaj arány miatt kalibrálásra és az eredmények számszerűsítésére nincs lehetőség, csupán a változások iránya és relatív mértéke vehető figyelembe.

3.6. Transzportmérések

A mikroszomális membrán permeabilitásának vizsgálatára bizonyos esetekben jól használható indirekt eljárás a fényszórásos módszer. A hipotóniás pufferben előinkubált mikroszóma fényszórását fluoriméterrel azonos „gerjesztési” és „emissziós” hullámhosszak beállításával detektáljuk. Az ozmózis következtében zsugorodó vezikulumok fényszórása ugrásszerűen megnő, majd ezt a gradiens kiegyenlítődésével párhuzamos, fokozatos csökkenés követi. A membrán adott vegyület iránti permeabilitására a fényszórás-növekedés mértékéből (a csúcs magassága) és a kiindulási értékhez való visszatérés időtartamából (a lejtő meredeksége) következtethetünk.

A mikroszomális transzport közvetlen detektálására az intra- és extravezikuláris folyadékterek elválasztásán (szűrés vagy ülepités) alapuló módszerek alkalmasak. A filteren maradt, illetve kiüledett vegyületek detektálásával meghatározhatjuk a mikroszómához asszociált anyag mennyiségét, amely (nagyobb) részben a vezikulumok belsejében, (kisebb) részben a membránhoz tapadva található. Hogy a valódi luminális tartalmat meghatározzuk, a kísérletet alameticinnel permeabilizált mikroszómával is el kell végezni. Ilyenkor ugyanis csak a membránhoz tapadó vegyületek maradnak a mikroszómához asszociálva, tehát a két mérés eredményének különbsége a luminális tartalommal egyenlő.

A gyors szűrés/ülepítés a fényszórásos módszerhez szükségesnél jóval alacsonyabb koncentrációk mellett is lehetőséget ad a transzport nyomonkövetésére, amennyiben a transzportált vegyület érzékeny és pontos mennyiségi meghatározására lehetőség van. Ez utóbbit legtöbbször radioaktív „tracer”-ek folyékony szcintillációs detektálása biztosítja. A módszer alkalmazását korlátozza a vizsgálandó vegyület radioaktív változatának beszerezhetősége, ezért kidolgoztuk az eljárás radioaktív jelölést nem igénylő változatát. A szűrést követően, a filter folyékony szcintillációs koktélaban való

feloldása helyett, a szűrő által visszatartott vegyületeket extraháljuk, és mennyiségüket HPLC-MS/MS segítségével határozzuk meg, melynek pontossága és érzékenysége meghaladja a szcintilláció számolásán alapuló mérését. A módszert eredetileg glukuronidok transzportjának mérésére fejlesztettük ki, és a leghatékonyabb extrahálási mód megbízhatóságát több vegyület esetén is ellenőriztük.

4. EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

4.1. A tiol-diszulfid rendszer oxidált állapotának fenntartása

4.1.1. Glutationtranszport az endo/szarkoplazmás retikulumban

A glutation transzportját nyúl különböző szöveteiből izolált mikroszómán vizsgáltuk. Várakozásunknak megfelelően, a májmikroszóma membránja csak nagyon lassú GSH- és GSSG-áramlást tett lehetővé. A vázizomból készült szarkoplazmás retikulum eredetű vezikulumok membránja azonban jelentős GSH- és GSSG-átáramlást tett lehetővé. Felvetődött az 1-es típusú RyR kalciumcsatorna (RyR1) szerepe a glutationtranszportban. A RyR1 ismert inhibitorai valóban hatékonyan gátolták a glutationtranszportot. Ráadásul a magnéziumionnal kiváltott gátlás felfüggeszthető volt a RyR1 ismert aktivátoraival. A RyR1-et overexpresszáló transzfektált sejtekből készült mikroszómán további bizonyítékokat szereztünk a csatorna glutationtranszportban játszott szerepére.

Mindezek alapján kijelenthető, hogy a RyR1 kalciumcsatorna nem csak szenzora, hanem alakítója is a transzmembrán tiol-diszulfid-gradiensnek. A szarkoplazmás retikulum membránjának nagyfokú glutationpermeabilitása azonban nem lenne összeegyeztethető a más típusú sejtek ER-jében zajló intenzív luminális fehérjeéréssel.

4.1.2. Aszkorbátszintézis által kiváltott tioloxidáció

A legtöbb állat képes az aszkorbát endogén előállítására; a szintézis utolsó lépését katalizáló gulonolakton-oxidáz (GLO) pedig az ER integráns membránfehérjéje. Gulonolakton hatására fokozott glutationfogyást tapasztaltunk mind a mikroszómában, mind izolált sejtekben, és kimutattuk, hogy a mikroszómához adott glutation elsősorban intraluminálisan oxidálódik.

Az újonnan szintetizált aszkorbát szintén a vezikulumok lumenében jelent meg először. Felvetődött annak a lehetősége, hogy a keletkező aszkorbát is hozzájárulhat a tioloxidációhoz. Gulonolaktonnal kezelt patkány májmikroszómában a fehérjetiolok oxidálódtak, miközben az aszkorbát mellett dehidroaszkorbát is keletkezett.

Az aszkorbátszintézishez kapcsolódó tioloxidáció nagyrészt oxidatív mellékterméknek tekinthető. A jelenség magyarázatul szolgálhat arra, hogy e képesség elvesztése miatt lehetett előnyös bizonyos fajok (pl. ember és tengerimalac) számára. Az a lehetőség azonban, hogy az aszkorbát (illetve C-vitamin) részt vehet a tioloxidációban, az oxidatív fehérjeérés szempontjából humán vonatkozásban is rendkívül fontos.

4.1.3. Fehérjetiolok oxidációja dehidroaszkorbát hatására

A májmikroszóma fehérje-tioljainak oxidációja oxigén jelenlétében végzett hosszabb inkubáció alatt is csak alig detektálható. Ha az intakt mikroszómához dehidroaszkorbátot adtunk, a tioloxidáció a várakozásnak megfelelően jelentősen fokozódott.

Radioaktív izotóppal jelölt dehidroaszkorbát alkalmazásakor diabéteszes állatok májából származó mikroszomális vezikulumok lumenében a radioaktivitás jelentős feldúsulását észleltük. Mivel a dehidroaszkorbát transzportja facilitált diffúzió, és a kísérleti körülmények aktív transzportot egyébként sem tettek lehetővé, a dúsulás arra utal, hogy a felvett dehidroaszkorbátból keletkező aszkorbát a vezikulumok belsejében reked. Korrelációt találtunk a rendelkezésre álló – diszulfiddá oxidálható – tiolok mennyisége és az aszkorbát felhalmozódása között. A spontán diabéteszes BioBreeding/Worcester (BB) patkányok májából készült mikroszóma lényegesen több redukált tiolt tartalmaz, mint a kontroll BB vagy Harlan Sprague-Dawley patkányokból származó, de a PDI mennyisége nem tér el szignifikánsan. A diabéteszes állatokból preparált mikroszómában a több tiolcsoport oxidálódott, és ezzel párhuzamosan az azonos sebességgel történő dehidroaszkorbát-felvétel nagyjából kétszer akkora aszkorbátfelhalmozódást eredményezett, mint a kontrollokban.

4.1.4. Fehérjетиolok oxidációja aszkorbát hatására

Az aszkorbát jelenlétében inkubált mikroszómában egy óra alatt a fehérjетиolok mintegy 50%-a eloxidálódott. Mivel az antioxidáns aszkorbát közvetlenül nem képes a tiolok oxidálására, ez a jelenség csak úgy értelmezhető, ha feltételezzük, hogy az aszkorbát először dehidroaszkorbáttá alakul. Érdekes ugyanakkor, hogy kísérleteinkben a 0,1 mM-os koncentrációjú aszkorbát hatékonyabban oxidálta a fehérjетиolokat, mint az 1 mM-os koncentrációjú dehidroaszkorbát. Megfigyeléseink egy, a májsejt ER-jéhez asszociálódó, aszkorbát-oxidáz jelenlétére és működésére utalnak.

4.1.5. Aszkorbát-oxidáz aktivitás az endoplazmás retikulumban

Az aszkorbát enzim közreműködése nélkül lassan oxidálódik, de a folyamatot patkány májmikroszóma jelentősen meggyorsította. A mikroszomális aszkorbátfogyasztás oxidáció következménye volt, ugyanis a keletkező dehidroaszkorbát már néhány perc után detektálható volt. Emellett sikerült az aszkorbil gyök jelenlétét is kimutatni elektronspin-rezonancia (ESR) spektroszkópia segítségével, és méréseink a fentiekkel összhangban azt mutatták, hogy a mikroszóma az aszkorbil gyök keletkezését is nagymértékben fokozta. A mikroszóma előzetes hőkezelése szinte az autooxidáció szintjére csökkentette az aszkorbát fogyását, illetve az aszkorbil gyök keletkezését. Hasonló hatása volt a natív mikroszóma tripszines előkezelésének is, ami nem csak megerősíti a reakció fehérjefüggését, hanem azt is mutatja, hogy a mikroszomális aszkorbát-oxidáz hozzáférhető kívülről, a citoplazma felől.

Az aszkorbátoxidációt gátló hatóanyagok jelenlétében nem csak az aszkorbátfogyás, illetve dehidroaszkorbát-keletkezés, hanem hasonló mértékben a tioloxidáció is csökkent. Mindez azt bizonyítja, hogy az aszkorbát valóban az aszkorbát-oxidáz által termelt dehidroaszkorbát formájában vehet részt az oxidatív foldingban. Ezek a hatóanyagok májmikroszómában az aszkorbát látszólagos felvételének sebességét is jelentősen csökkentik.

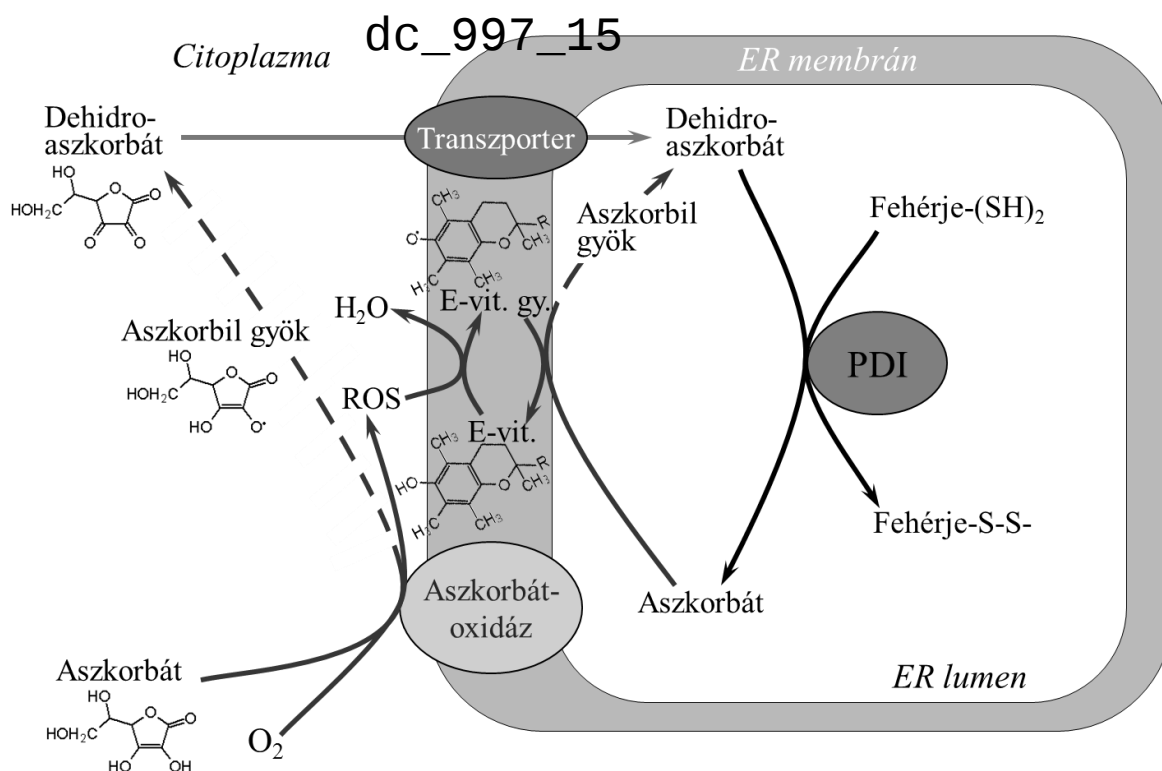
Hipotézisünk szerint az aszkorbát aszkorbil gyökön keresztüli oxidációja során keletkező reaktív oxigén-intermedierek (ROS) képesek hozzájárulni a tioloxidációhoz. Ehhez azonban szükség van egy lipidoldékony elektronszállítóra az ER membránjában, amely összekapcsolja a membrán külső felszínén és a lumenben végbemenő folyamatokat.

4.1.6. A tokoferol szerepe az aszkorbát által kiváltott tioloxidációban

Az E-vitaminhiányos mikroszómában a hozzáadott aszkorbát oxidációja 80%-kal nőtt, a lipidperoxidáció sebessége mintegy háromszorosára fokozódott, ugyanakkor az ezt kísérő diszulfidképződés a felére csökkent. Ezzel összhangban, az E-vitaminhiányos mikroszómához adott gulonolaktonból látszólag kevesebb aszkorbát keletkezett – ami feltehetőleg a nagyobb ütemű aszkorbátfogyás következménye –, és eközben kevesebb fehérjetiolt oxidálódott, mint a kontroll mikroszóma esetén. A változások arra utalnak, hogy részlegesen szétkapcsolódott az extraluminális aszkorbátoxidáció és az intraluminális fehérjetiolt-oxidáció. Valószínűsíthető, hogy az aszkorbát-oxidáz által termelt ROS oxidáló hatását az E-vitamin valahogy átirányítja a membránlipidekről a luminális fehérjék tiolcsoportjaira.

4.1.7. Az aszkorbátfüggő fehérjetiolt-oxidáció modellje

A mikroszómákon tett megfigyeléseink alapján felállítottunk egy modellt, amely összegzi és rendszerbe foglalja a kapott eredményeket (1. ábra).



1. ábra Az aszkorbátfüggő fehérjeteriol-oxidáció modellje

Az ER külső felszínén aszkorbátból dehidroaszkorbát keletkezik, ami ROS képződésével jár. A dehidroaszkorbát bejut a lumenbe, ahol fehérjeteriolokat oxidál. A belőle keletkező aszkorbát nem tud kijutni, de a ROS által, E-vitamin közvetítésével, újraoxidálódhat dehidroaszkorbáttá.

E szerint az ER citoplazma felőli felszínén egy valószínűleg réztartalmú oxidáz alakítja át az aszkorbátot aszkorbil gyökké, majd dehidroaszkorbáttá, miközben ROS termelődik a membrán közvetlen közelében. A dehidroaszkorbát már képes bejutni a lumenbe, ahol a PDI szubsztrátjaként, vagy akár PDI-től független mechanizmusok révén, részt vesz a diszulfidképzésben, és visszaalakul aszkorbáttá. Az aszkorbát nem, vagy csak nagyon kis sebességgel jut ki a lumenből, ezért ott felhalmozódik. A ROS hatására E-vitaminból keletkező α -tokoferil gyök azonban újraoxidálhatja a felhalmozott aszkorbátot, ezáltal újabb diszulfid kötések keletkezéséhez szolgáltat oxidáló ágenszt. A felvázolt reakciólánc nettó eredménye az elektronok folyamatos áramlása a cisztein-tioloktól mint primer elektrondonoroktól az oxigénig mint végső elektronakceptorig.

4.1.8. Endoplazmás retikulum stressz skorbutban

In vivo kísérleteinknél abból indultunk ki, hogy amennyiben az aszkorbát valóban szükséges a diszulfidképződéshez, akkor hiányában a fehérjeérés zavara várhatóan ER-stressz, illetve UPR kialakulását eredményezi, sőt akár ER-eredetű apoptózist is kiválthat. Vizsgálatainkat tengerimalacok májszövetén végeztük, mert a májsejtek bőséges ER-rel rendelkeznek, intenzív fehérjeszintézist, illetve fehérjetiol-oxidációt folytatnak, vagyis várhatóan különösen érzékenyek a folyamatot érintő hatásokra.

A tengerimalacok egyes csoportjait különböző ideig (1-4 hétig) tartottuk aszkorbátmentes diétán, és különböző kontroll állatokkal hasonlítottuk őket össze. Az ER-stressz markereinek tekinthető dajkafehérjék és a PDI indukciója már a C-vitaminhiány kialakulásakor, a skorbut bekövetkezte előtt kimutatható volt, és tovább emelkedett a diéta négy hete során. Az aszkorbátmentes diéta harmadik hetében háromszorosára, a negyedik héten pedig négyszeresére emelkedett az apoptózis index a kontrollhoz viszonyítva.

4.1.9. A glikált hemoglobin szintjének csökkenése aszkorbát hatására

Klinikai kooperációban megvizsgáltuk, hogy a hosszan tartó (40 nap), nagy dózisú (napi egyszer 1000 mg *per os*) C-vitaminbevitel hogyan befolyásolja egészséges és cukorbeteg emberek vérében a glikált hemoglobin arányát mint a vércukorszint-szabályozás és az inzulinhatás elterjedten használt indikátorát. Az eredmények azt mutatták, hogy mindkét csoportban szignifikánsan csökkent a hemoglobin glikációjának %-os aránya. Bár az aszkorbátnak a glukózzal való kompetíciója révén a fehérjeglikációra közvetlenül kifejtett hatását nem lehet kizárni, ennek ellentmond az a megfigyelésünk, hogy a glikáció a legmagasabb vércukorszintek esetén csökkent a legnagyobb mértékben. Eredményeink tehát – másokéval összhangban – leginkább azt valószínűsítik, hogy a C-vitaminkezelés az inzulintermelés és/vagy az inzulinhatás fokozása révén hatott.

4.2. A piridin-nukleotid rendszer redukált állapotának fenntartása

4.2.1. Az ER NADPH-NADP⁺ készletének elkülönülése

Kimutattuk, hogy az intakt mikroszómához adott kortizon egy része exogén redukáló forrás nélkül is kortizollá alakul, míg ugyanez permeabilizált

mikroszóma esetén nem észlelhető, vagyis endogén NADPH található a lumenben. Kidolgoztuk a mikroszóma endogén NADPH-tartalmának fluoreszcens vizsgálatát. Méréseink megerősítették, hogy a mikroszómában detektálható NADPH valóban az intravezikuláris térben helyezkedik el. Fényszórásos és gyors szűrési transzportméréseink szerint az ER membránja piridin-nukleotidokra gyakorlatilag impermeabilis. A NADP^+ és NADPH transzportjának hiánya összhangban van azzal a tapasztalatunkkal, mely szerint mind a H6PD, mind a 11 β HSD1 aktivitása jelentős, szinte 100%-os latenciát mutat, vagyis az intakt membránnal határolt vezikulumokban detektálható aktivitás elhanyagolható a membrán permeabilizálása után mérhetőhöz képest. Mindez azt is megmagyarázza, hogy a preparálás és tárolás során hogyan őrizhették meg NADPH-tartalmukat a vezikulumok.

4.2.2. A NADPH-NADP⁺ készlet redukált állapotának fenntartása

A patkánymájából preparált, intakt mikroszóma kortizoltermelése jelentősen fokozható, és hosszú ideig fenntartható glukóz-6-foszfát hozzáadásával. Ez a megfigyelésünk összhangban van a H6PD luminális elhelyezkedésével és NADP^+ -függő glukóz-6-foszfát-dehidrogenáz aktivitásával. Az effektus felfüggeszthető a glukóz-6-foszfát transzportjának specifikus gátlószerevel (S3483-mal), vagyis a glukóz-6-foszfát bejutását igényli a vezikulumok lumenébe. Mindez bizonyítja a glukóz-6-foszfát-transzporter, a H6PD és a 11 β HSD1 közötti funkcionális kapcsolatot. A NADPH fluoreszcens detektálásával bizonyítottuk, hogy a lumenben elenyésző mennyiségben található NADP^+ . Glukóz-6-foszfát vagy kortizol hozzáadása ugyanis alig eredményez detektálható NADPH-termelést, hacsak előzőleg az endogén NADPH-t kortizonnal nem oxidáljuk.

4.2.3. A tiol-diszulfid és a NADPH-NADP⁺ rendszerek elkülönülése

Feltételeztük, hogy az ER lumenében a két kolokalizált rendszer funkcionálisan elkülönül egymástól. Azt találtuk, hogy a mikroszomális fehérjék tioljait exogén NAD^+ , NADP^+ és kortizon nem képes oxidálni, valamint NADH, NADPH és kortizol nem képes redukálni. A vezikulumok belsejében található piridin-nukleotidok redukáltsági állapota glutathion-tiolok és -diszulfidok hatására nem változik meg, vagyis ebben a kompartmentben sem a NADP^+ -t GSH-val redukálni, sem a NADPH-t GSSG-vel oxidálni nem

lehet. Az intakt mikroszómához adott GSH vagy GSSG nem befolyásolta a kortizon NADPH-oxidáló, illetve a glukóz-6-foszfát NADP^+ -redukáló hatását sem.

Aktivitätsmérésekkel és Western blot módszerrel egyaránt demonstráltuk, hogy a glutation-reduktáz enzim nem található meg az ER lumenében. A permeabilizált mikroszómában a glutationdiszulfid által kiváltott NADPH-fogyás kevesebb mint 5%-a volt a citoplazmában mérhető aktivitásnak. A glutation-dehidrogenáz elleni antitesttel készült Western blot pedig nem mutatta ki a fehérje jelenlétét a mikroszóma frakcióban. Az enzim hiánya piridin-nukleotid és a tiol-diszulfid redox rendszerek elkülönülését biztosíthatja.

4.2.4. Kortizoltermelés fruktóz-6-foszfát felhasználásával

Megvizsgáltuk, hogy a májból, valamint zsírszövetből készült mikroszóma képes-e a fruktóz-6-foszfát felvételére és felhasználására. Bizonyítottuk, hogy a fruktóz-6-foszfát fehérjemediált transzporttal be tud jutni a mikroszóma lumenébe, ahol egy foszfohexóz-izomeráz glukóz-6-foszfáttá alakítja. Mindkét mikroszóma képes felhasználni a fruktóz-6-foszfátot a NADP^+ -redukálás forrásaként, ami azonban gátolható volt az izomeráz inhibitorával. Kimutattuk a fruktóz-6-foszfátból kiinduló 6-foszfo-glukonátkeletkezést is. Meggyőződünk tehát arról, hogy a H6PD szubsztrátjaként az izomerizációval keletkező glukóz-6-foszfát szolgál, amit tisztított enzimen végzett méréseink is megerősítettek.

4.2.5. A H6PD expressziója különböző szövetekben

Patkány és humán szövetmintákban összehasonlítottuk a H6PD aktivitását, illetve mRNS- és fehérjeszintű expresszióját. Várakozásunknak megfelelően a májszövetben észleltük a legnagyobb H6PD aktivitást, de különböző mértékben az összes vizsgált szövet mikroszómája képes volt luminális NADPH-termelésre glukóz-6-foszfát felhasználásával. Minden szövetben jól detektálható volt a H6PD fehérje és mRNS, és ezek mennyisége jól korrelált az enzimaktivitásokkal. Adataink arra utalnak, hogy az enzim „housekeeping” géntermék, amelyre minden sejttípusban szükség van. Valószínűsíthető tehát, hogy a magas, luminális $[\text{NADPH}]:[\text{NADP}^+]$ arány fenntartása az organelum egyéb aktivitásához (pl. hibás fehérjék kitekeredése

és retro-transzlokációja, ^{dc 997-15} -antioxidáns védekezés) és szabályozási mechanizmusaihoz (pl. a rianodin-receptor csatornák nyitási valószínűségének redox kontrollja, az ER tápanyagérzékelő funkciója) is szükséges lehet.

4.2.6. A H6PD expressziója zsírsejtdifferenciáció során

Humán zsírszövetből származó mezenchimális őssejteken (ADMSC), és adipocita irányban differenciálódó 3T3-L1 egér fibroblasztokon vizsgáltuk a kortizon-kortizol átalakulásért felelős enzimek működését és génexpressziójának alakulását. A differenciálatlan sejtek nagyon alacsony kortizonredukciós aktivitása igen jelentős mértékben nő a differenciálódás során. Az aktivitásfokozódás alapja nem a H6PD, hanem a 11β HSD1 fehérje mennyiségének ugrásszerű növekedése volt, aminek háttérében a 11β HSD1 mRNS közel két nagyságrendnyi emelkedését is kimutattuk mindkét sejtes modellünkben.

4.2.7. Éhezés és jóllakottság hatása piridin-nukleotid rendszerre

Az ER tápanyagszenzor működésére vonatkozó hipotézisünket *in vivo* kísérletekkel ellenőriztük. Jóllakott, illetve különböző időtartamon át éheztetett patkányok májából preparált mikroszómában vizsgáltuk a kortizon-kortizol átalakítást, valamint a luminális NADP^+ -NADPH készlet állapotát. Az éhezés előrehaladtával fokozatosan csökkent a kortizonredukció és nőtt a kortizoloxidáció; és ezzel összhangban egyre csökkent az endogén NADPH mennyisége.

4.2.8. Az ER piridin-nukleotidkészlete mint gyógyszerátadáspont

Metirapon 11β HSD1-ra kifejtett hatását vizsgálva azt találtuk, hogy az intakt mikroszómában mérhető gátlás nem reprodukálható permeabilizált membrán esetén. Amikor pedig az intakt mikroszómát kortizol és metirapon jelenlétében inkubáltuk, a metirapon már nem gátlószerként viselkedett, hanem jelentősen fokozta a kortizoloxidációt. A metirapon általi 11β HSD1-inhibíció alapvetően nem közvetlen, kompetitív gátlás, hanem elsősorban a luminális NADPH-utánpótlás akadályozásán keresztül megvalósuló, másodlagos hatás.

Metiraponnal kezelt differenciálódó preadipocitákban csökkent a kortizon redukciója kortizollá, és fokozódott az ellentétes irányú átalakulás. A dexametazonnal kiváltott differenciálódást metirapon nem befolyásolta, és a

kortizollal indukáltat is csak kis mértékben, nem szignifikánsan gátolta. A kortizon adipogén differenciációt kiváltó hatását azonban a metirapon együttes alkalmazása szinte teljesen kivédte, ami tehát a prereceptorális glukokortikoidtermelés akadályozásának tudható be. A prereceptorális kortizoltermelés gátlása tehát a glukokortikoidhatás csökkentésének hatékony módszere lehet.

Az elhízásellenes és antidiabetikus hatású teaflavanol, EGCG szintén gátolja a mikroszomális kortizonredukciót, holott közvetlenül a katalitikus triád (G6PT-H6PD-11 β HSD1) egyetlen tagjának működését sem befolyásolta. Az intakt mikroszóma endogén kortizonredukáló és kortizoloxidáló képességének mérése és a mikroszomális vezikulumok NADPH-tartalmának vizsgálata azt mutatta, hogy az EGCG a metiraphoz hasonlóan a luminális NADPH oxidációját váltja ki.

Eredményeink egyértelműen arra utalnak, hogy az organelum luminális piridin-nukleotidjainak redox státusza ígéretes gyógyszer-támadáspont lehet az elhízással összefüggő metabolikus betegségek vonatkozásában.

4.3. Lipotoxicitás és lipoapoptózis kivédése

A háttérmechanizmusok vizsgálata mellett kutatásunk kiterjedt olyan hatóanyagok keresésére is, amelyek alkalmasak lehetnek a β -sejtek lipotoxicitásának csökkentésére. Az inzulin-szenzitizálóként ismert metformin a RINm5F inzulinóma sejtvonalon a lipotoxicitás és a lipoapoptózis kivédésében is hatékornak bizonyult. A hatás hátterében az ER-stressz, illetve az UPR (ER-chaperonok, -foldázok és CHOP indukciója, eIF2 α és JNK foszforilációja) csillapodását mutattuk ki, és kisebb, de számottevő mértékben csökkent az IRS-1 (Ser307)-foszforiláció is. A jelenség – amennyiben β -sejteken *in vivo* is érvényesül – jelentősen hozzájárulhat a gyógyszer antidiabetikus aktivitásához. Munkacsoportunk pedig célul tűzte ki a modell és a vizsgálati módszerek alkalmazását hasonlóan UPR-gátló és citoprotektív gyógyszerjelölt molekulák tesztelésére.

5. A LEGFONTOSABB EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE

Az utóbbi egy-két évtized kutatásai betegségek hosszú sora esetén bizonyította az ER működészavarának kóroki szerepét. Célunk az ER redox homeosztázisának és metabolikus szindrómával, illetve 2-es típusú diabétesszel összefüggésbe hozható működészavarainak minél alaposabb megismerése volt. A bemutatott, legfontosabb eredmények a következők.

Feltártuk az ER lumenében zajló diszulfidképződés egy eddig ismeretlen elektrontranszfer-láncát. Eredményeink egy koherens modell kidolgozását tették lehetővé, amelyben a C-vitamin fontos szerepet tölt be. A modell helyességét *in vivo* megfigyeléseink is alátámasztották. Kimutattuk ugyanis, hogy az aszkorbáthiány – még az oxidatív stressz kialakulása előtt – ER-stresszt idéz elő, amely összhangban van azzal a következtetésünkkel, hogy a C-vitamin prooxidánsként vesz részt az oxidatív fehérjeérés folyamatában. Az új modell, az aszkorbát-oxidáz révén, akár független alternatív útvonalként is működhet; ugyanakkor a benne főszereplő aszkorbát és tokoferol részt vehet az Ero1 részvételével megvalósuló diszulfidképződésben is. A C- és E-vitamin tehát fontos szerepet játszik az ER lumenében zajló oxidatív fehérjefoldingban; hiányuk csökkentheti az organelum fehérjeérlelő kapacitását, és – amint azt a C-vitamin esetében bizonyítottuk is – elősegítheti az ER-stressz, illetve azzal összefüggő apoptózis fokozódását. Ez az állapot az inzulinhatás kialakulását és az inzulintermelést egyaránt akadályozza, hiszen az UPR az inzulinrezisztenciához és a β -sejtek működészavarához is hozzájárul. Az általunk leírt modell tehát legalább részben magyarázhatja a diabétesz és az aszkorbát-, illetve tokoferolszintek közti összefüggésre utaló humán klinikai megfigyeléseket.

Az ER membránjának jelentéktelen glutationpermeabilitását bizonyító eredményeink alapján kijelenthető, hogy a magas luminális [GSSG]:[GSH] arány nem oka, hanem következménye a diszulfidképződésnek. Kimutattuk ugyanakkor, hogy a RyR1 képes a glutation transzportjára, ami megmagyarázza a vázizom szarkoplazmás retikulum membránjának egyedülállóan magas glutationpermeabilitását. E jelenségnek fontos szerepe lehet a vázizom redox és kalciumhomeosztázisában, ezért további vizsgálatra érdemes.

Megerősítettük azt a feltételezést, mely szerint az ER lumenében elkülönült NADP^+ - NADPH -készlet található; és hogy az itt elhelyezkedő H6PD és $11\beta\text{HSD1}$ e közös piridin-nukleotidkészlet révén funkcionális kapcsolatban áll egymással. Az előbbi enzim „housekeeping” géntermékként van jelen minden sejtben, és rendszerint fenntartja a magas luminális $[\text{NADPH}]:[\text{NADP}^+]$ arányt, amely szükséges az utóbbi által katalizált glukokortikoid-aktiváláshoz. A redukált piridin-nukleotid és az oxidált tiol/diszulfid redox rendszerek azért tarthatók fenn közös kompartmentben, mert itt hiányzik az az enzim, illetve enzimaktivitás (glutation-reduktáz), amely összekapcsolná őket, és redox potenciáljukat egységesítené. Ezzel egyúttal ki is zártuk a piridin-nukleotidok számottevő közreműködését a diszulfidképződésben. Kimutattuk és funkcionálisan jellemeztük az organellum fruktóz-6-foszfát-transzporterét, valamint luminális hexóz-6-foszfát-izomeráz enzimét. A még azonosításra váró fehérjék közreműködése lehetővé teszi, hogy a fruktóz-6-foszfát a glukóz-6-foszfáttal egyenértékű redukáló forrása legyen a lokális kortizolképződésnek. Sikerült *in vivo* kísérlettel alátámasztanunk azt a feltételezésünket, hogy a tápanyagellátottság fontos meghatározója az ER luminális piridin-nukleotid redox státuszának, illetve ezen keresztül a prereceptorális kortizolképződésnek. Eredményeink azt mutatták, hogy éhezésben csökken, jóllakott állapotban pedig nő a máj ER kortizonredukáló képessége. Bizonyítottuk a $11\beta\text{HSD1}$ igen nagymértékű indukcióját (a H6PD konstitutív expressziója mellett) a differenciálódó zsírsejtekben, valamint az így kialakuló pozitív visszacsatolás szükségességét a differenciálódás fenntartásában. Mindez összhangban van azzal a mások által is támogatott elmélettel, mely szerint a lokális kortizolképződés (a $11\beta\text{HSD1}$ aktivitása) fontos szerepet játszik az elhízás és a hozzá kapcsolódó anyagcserezavarok kialakulásában. Az enzim ideális gátlószere csak a kortizonredukációt csökkenti, és a reakció ellentétes irányát inkább fokozza. Ez a hatás pedig csak az ER luminális NADPH -készletének oxidálására képes hatóanyagoktól várható. Bizonyítottuk, hogy ezen a mechanizmuson alapul a metirapon $11\beta\text{HSD1}$ -gátló (mellék)hatása, és kimutattuk, hogy így tolja el kedvező irányba a mikroszomális kortizon-kortizol átalakulást a teaflavanol EGCG is. Megfigyelésünk rámutat az ER elkülönült NADP^+ - NADPH -készletére mint ígéretes, ám eddig figyelmen kívül hagyott gyógyszer-támadáspontra, amely az

dc:997-15
elhízás, a metabolikus szindróma és a diabétesz megelőzésének és gyógyításának új stratégiáját kínálja.

A szóban forgó kórállapotok esetén a gyógyszeres beavatkozás kiemelkedően fontos célja a hasnyálmirigy β -sejtek működő- és életképességének fenntartása. Mivel a β -sejtek diszfunkciójában és pusztulásában fontos szerepet játszik a magas zsírsavszint, a lipotoxicitást kivédeni képes hatóanyagok rendkívül előnyösek. Munkacsoportunk ezirányú kutatása feltárta az inzulinérzékenyítőként már elterjedt antidiabetikum, metformin β -sejtvédő hatását, amelynek hátterében az ER-stressz csillapítását is kimutattuk. A felhasznált vizsgálati modell segítségével további vegyületek tesztelését jelenleg is végezzük.

Az általunk kapott eredmények elméleti, biokémiai és sejtbiológiai szempontból is fontos következtetések levonását teszik lehetővé. Legtöbb megfigyelésünk bővítette arra vonatkozó ismereteinket, hogy milyen anyagforgalmat akadályoz, illetve támogat az ER membránja; hogy hogyan tudja a lumen megőrizni sajátos koncentráció- és redoxviszonyait, miközben szabályozottan együttműködik a citoplazmában és – ezen keresztül – a sejt többi kompartmentjében zajló folyamatokkal. Mások megfigyeléseivel összhangban meggyőzően cáfoltuk azt az időről-időre felvetett elméletet, mely szerint az organellek kismolekulák számára szabadon átjárható membránja csupán hálóként tartja együtt a sejt fehérjéinek egy részét. Ezzel szemben (a membrán elhatároló funkciója mellett) bőséges kísérleti eredmény és megfigyelés szól, melyekhez mi is érdemben hozzájárultunk. A transzport nyilvánvalóan szelektív: egymáshoz nagyon hasonló vegyületek egyikére korlátozódik; számos molekula szinte teljesen ki van zárva az ER lumenéből; vagy éppen be van zárva oda; és sok esetben az átjutás hatékonyan gátolható specifikus vagy általános transzportgátló szerekkel.

A rendelkezésre álló adatok azt támasztják alá, hogy **az ER valódi, a citoplazmától jól elkülönülő metabolikus kompartment**, amelynek működésében éppen a sejt többi részével folytatott „anyag-csere” kulcsfontosságú. A sejt többi részétől ily módon elkülönülő, mégis szorosan összefüggő organellek, amely az anyagcsere minden ágában közreműködik, **a sejt tápanyagszenzoraként is funkcionál**. Luminális redox rendszereinek

állapota érzékenyen reagál az elektrondonoroként szolgáló tápanyagmolekulák mennyiségi ingadozásaira. A fehérjeérést érintő hatások az UPR jelátviteli mechanizmusai révén modulálják a lipidmetabolizmus, az autofágia és az apoptózis szabályozását, illetve a külső jelek (pl. gyulladásos mediátorok, inzulin) továbbítását. A preredeptoriális kortizolképződés egyensúlyának eltolódása pedig az adott sejten belüli glukokortikoidhatást módosítja, ami által kihat a teljes intermedier anyagcsere regulációjára, és szinte az összes egyéb celluláris funkcióra is (beleértve a gyulladást és az inzulinhatást). A fiziológiás működés finom hangolását szolgáló, érzékeny rendszert szélsőséges hatások (pl. egy elektronszállító súlyos hiánya vagy a táplálékfelvétel tartós és súlyos feleslege) annyira elállíthatják, hogy a patomechanizmus meghatározó elemévé válhat. Az ilyen súlyosan károsító hatások kiküszöbölése mellett érdemes tehát olyan tényezőket, hatóanyagokat keresni, amelyek a szenzor működését visszaállíthatják, vagy legalább annak káros mértékű jelzéseit tompítani képesek.

6. AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJAU SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK

43 angol nyelvű tudományos közlemény (ebből 11 első és 12 utolsó szerzős);
összesített impakt faktoruk 153,87.

Bánhegyi, G., Csala, M., Braun, L., Garzó, T. and Mandl, J. Ascorbate synthesis-dependent glutathione consumption in mouse liver. *FEBS Lett* **381**, 39-41 (1996).

Bánhegyi, G., Braun, L., Csala, M., Puskás, F. and Mandl, J. Ascorbate metabolism and its regulation in animals. *Free Radic Biol Med* **23**, 793-803 (1997).

Bánhegyi, G., Braun, L., Csala, M., Puskás, F., Somogyi, A., Kardon, T. and Mandl, J. Ascorbate and environmental stress. *Ann N Y Acad Sci* **851**, 292-303 (1998).

Bánhegyi, G., Csala, M., Nagy, G., Sorrentino, V., Fulceri, R. and Benedetti, A. Evidence for the transport of glutathione through ryanodine receptor channel type 1. *Biochem J* **376**, 807-12 (2003a).

Bánhegyi, G., Csala, M., Szarka, A., Varsányi, M., Benedetti, A. and Mandl, J. Role of ascorbate in oxidative protein folding. *Biofactors* **17**, 37-46 (2003b).

Bánhegyi, G., Benedetti, A., Csala, M. and Mandl, J. Stress on redox. *FEBS Lett* **581**, 3634-40 (2007).

Bánhegyi, G., Mandl, J. and Csala, M. Redox-based endoplasmic reticulum dysfunction in neurological diseases. *J Neurochem* **107**, 20-34 (2008).

Bánhegyi, G., Csala, M. and Benedetti, A. Hexose-6-phosphate dehydrogenase: linking endocrinology and metabolism in the endoplasmic reticulum. *J Mol Endocrinol* **42**, 283-9 (2009).

Bánhegyi, G., Margittai, E., Szarka, A., Mandl, J. and Csala, M. Crosstalk and barriers between the electron carriers of the endoplasmic reticulum. *Antioxid Redox Signal* **16**, 772-80 (2012).

- Czegle, I., Piccirella, S., Senesi, S., Csala, M., Mandl, J., Bánhegyi, G., Fulceri, R. and Benedetti, A. Cooperativity between 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and hexose-6-phosphate dehydrogenase is based on a common pyridine nucleotide pool in the lumen of the endoplasmic reticulum. *Mol Cell Endocrinol* **248**, 24-5 (2006).
- Czegle, I., Csala, M., Mandl, J., Benedetti, A., Karádi, I. and Bánhegyi, G. G6PT-H6PDH-11betaHSD1 triad in the liver and its implication in the pathomechanism of the metabolic syndrome. *World J Hepatol* **4**, 129-38 (2012).
- Csala, M., Braun, L., Mile, V., Kardon, T., Szarka, A., Kupcsulik, P., Mandl, J. and Bánhegyi, G. Ascorbate-mediated electron transfer in protein thiol oxidation in the endoplasmic reticulum. *FEBS Lett* **460**, 539-43 (1999).
- Csala, M., Mile, V., Benedetti, A., Mandl, J. and Bánhegyi, G. Ascorbate oxidation is a prerequisite for its transport into rat liver microsomal vesicles. *Biochem J* **349**, 413-5 (2000).
- Csala, M., Fulceri, R., Mandl, J., Benedetti, A. and Bánhegyi, G. Ryanodine receptor channel-dependent glutathione transport in the sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun* **287**, 696-700 (2001a).
- Csala, M., Szarka, A., Margittai, E., Mile, V., Kardon, T., Braun, L., Mandl, J. and Bánhegyi, G. Role of vitamin E in ascorbate-dependent protein thiol oxidation in rat liver endoplasmic reticulum. *Arch Biochem Biophys* **388**, 55-9 (2001b).
- Csala, M., Fulceri, R., Mandl, J., Benedetti, A. and Bánhegyi, G. Glutathione transport in the endo/sarcoplasmic reticulum. *Biofactors* **17**, 27-35 (2003).
- Csala, M., Staines, A.G., Bánhegyi, G., Mandl, J., Coughtrie, M.W. and Burchell, B. Evidence for multiple glucuronide transporters in rat liver microsomes. *Biochem Pharmacol* **68**, 1353-62 (2004).
- Csala, M., Bánhegyi, G. and Benedetti, A. Endoplasmic reticulum: a metabolic compartment. *FEBS Lett* **580**, 2160-5 (2006).

- Csala, M., Marcolongo, P., Lizák, B., Senesi, S., Margittai, E., Fulceri, R., Magyar, J.E., Benedetti, A. and Bánhegyi, G. Transport and transporters in the endoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta* **1768**, 1325-41 (2007a).
- Csala, M., Margittai, E., Senesi, S., Gamberucci, A., Bánhegyi, G., Mandl, J. and Benedetti, A. Inhibition of hepatic glucose 6-phosphatase system by the green tea flavanol epigallocatechin gallate. *FEBS Lett* **581**, 1693-8 (2007b).
- Csala, M., Margittai, E. and Bánhegyi, G. Redox control of endoplasmic reticulum function. *Antioxid Redox Signal* **13**, 77-108 (2010).
- Csala, M., Kereszturi, E., Mandl, J. and Bánhegyi, G. The endoplasmic reticulum as the extracellular space inside the cell: role in protein folding and glycosylation. *Antioxid Redox Signal* **16**, 1100-8 (2012).
- Gamberucci, A., Konta, L., Colucci, A., Giunti, R., Magyar, J.E., Mandl, J., Bánhegyi, G., Benedetti, A. and Csala, M. Green tea flavonols inhibit glucosidase II. *Biochem Pharmacol* **72**, 640-6 (2006).
- Kereszturi, E., Kálmán, F.S., Kardon, T., Csala, M. and Bánhegyi, G. Decreased prereceptorial glucocorticoid activating capacity in starvation due to an oxidative shift of pyridine nucleotides in the endoplasmic reticulum. *FEBS Lett* **584**, 4703-8 (2010).
- Mandl, J., Mészáros, T., Bánhegyi, G., Hunyady, L. and Csala, M. Endoplasmic reticulum: nutrient sensor in physiology and pathology. *Trends Endocrinol Metab* **20**, 194-201 (2009).
- Mandl, J., Mészáros, T., Bánhegyi, G. and Csala, M. Minireview: endoplasmic reticulum stress: control in protein, lipid, and signal homeostasis. *Mol Endocrinol* **27**, 384-93 (2013).
- Marcolongo, P., Senesi, S., Gava, B., Fulceri, R., Sorrentino, V., Margittai, E., Lizák, B., Csala, M., Bánhegyi, G. and Benedetti, A. Metirapone prevents cortisone-induced preadipocyte differentiation by depleting luminal NADPH of the endoplasmic reticulum. *Biochem Pharmacol* **76**, 382-90 (2008).

- Marcolongo, P., Senesi, S., Giusti, R., Csala, M., Fulceri, R., Bánhegyi, G. and Benedetti, A. Expression of hexose-6-phosphate dehydrogenase in rat tissues. *J Steroid Biochem Mol Biol* **126**, 57-64 (2011).
- Margittai, E., Bánhegyi, G., Kiss, A., Nagy, G., Mandl, J., Schaff, Z. and Csala, M. Scurvy leads to endoplasmic reticulum stress and apoptosis in the liver of Guinea pigs. *J Nutr* **135**, 2530-4 (2005).
- Nardai, G., Braun, L., Csala, M., Mile, V., Csermely, P., Benedetti, A., Mandl, J. and Bánhegyi, G. Protein-disulfide isomerase- and protein thiol-dependent dehydroascorbate reduction and ascorbate accumulation in the lumen of the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **276**, 8825-8 (2001).
- Piccirella, S., Czegle, I., Lizák, B., Margittai, E., Senesi, S., Papp, E., Csala, M., Fulceri, R., Csermely, P., Mandl, J., Benedetti, A. and Bánhegyi, G. Uncoupled redox systems in the lumen of the endoplasmic reticulum. Pyridine nucleotides stay reduced in an oxidative environment. *J Biol Chem* **281**, 4671-7 (2006).
- Puskás, F., Braun, L., Csala, M., Kardon, T., Marcolongo, P., Benedetti, A., Mandl, J. and Bánhegyi, G. Gulonolactone oxidase activity-dependent intravesicular glutathione oxidation in rat liver microsomes. *FEBS Lett* **430**, 293-6 (1998).
- Révész, K., Töttő, A., Margittai, E., Bánhegyi, G., Magyar, J.E., Mandl, J. and Csala, M. Glucuronide transport across the endoplasmic reticulum membrane is inhibited by epigallocatechin gallate and other green tea polyphenols. *Int J Biochem Cell Biol* **39**, 922-30 (2007).
- Révész, K., Tóth, B., Staines, A.G., Coughtrie, M.W., Mandl, J. and Csala, M. Luminal accumulation of newly synthesized morphine-3-glucuronide in rat liver microsomal vesicles. *Biofactors* **39**, 271-8 (2013).
- Senesi, S., Marcolongo, P., Manini, I., Fulceri, R., Sorrentino, V., Csala, M., Bánhegyi, G. and Benedetti, A. Constant expression of hexose-6-phosphate dehydrogenase during differentiation of human adipose-derived mesenchymal stem cells. *J Mol Endocrinol* **41**, 125-33 (2008).

- Senesi, S., Csala, M., Marcolongo, P., Fulceri, R., Mandl, J., Bánhegyi, G. and Benedetti, A. Hexose-6-phosphate dehydrogenase in the endoplasmic reticulum. *Biol Chem* **391**, 1-8 (2010a).
- Senesi, S., Legeza, B., Balazs, Z., Csala, M., Marcolongo, P., Kereszturi, E., Szelényi, P., Egger, C., Fulceri, R., Mandl, J., Giunti, R., Odermatt, A., Bánhegyi, G. and Benedetti, A. Contribution of fructose-6-phosphate to glucocorticoid activation in the endoplasmic reticulum: possible implication in the metabolic syndrome. *Endocrinology* **151**, 4830-9 (2010b).
- Simon-Szabó, L., Kokas, M., Mandl, J., Kéri, G. and Csala, M. Metformin attenuates palmitate-induced endoplasmic reticulum stress, serine phosphorylation of IRS-1 and apoptosis in rat insulinoma cells. *PLoS One* **9**, e97868 (2014).
- Staines, A.G., Burchell, B., Bánhegyi, G., Mandl, J. and Csala, M. Application of high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry to measure microsomal membrane transport of glucuronides. *Anal Biochem* **342**, 45-52 (2005).
- Szaleczky, E., Prechl, J., Ruzicska, E., Fehér, J., Braun, L., Bánhegyi, G., Csala, M., Mandl, J. and Somogyi, A. Reduction of glycated hemoglobin levels by long term, high dose ascorbic acid supplementation in healthy and diabetic patients. *Med Sci Monit* **4**, 241-244 (1998).
- Szarka, A., Stadler, K., Jenei, V., Margittai, E., Csala, M., Jakus, J., Mandl, J. and Bánhegyi, G. Ascorbyl free radical and dehydroascorbate formation in rat liver endoplasmic reticulum. *J Bioenerg Biomembr* **34**, 317-23 (2002).
- Szelényi, P., Révész, K., Konta, L., Töttő, A., Mandl, J., Kereszturi, E. and Csala, M. Inhibition of microsomal cortisol production by (-)-epigallocatechin-3-gallate through a redox shift in the endoplasmic reticulum--a potential new target for treating obesity-related diseases. *Biofactors* **39**, 534-41 (2013).
- Zámbó, V., Simon-Szabó, L., Szelényi, P., Kereszturi, E., Bánhegyi, G. and Csala, M. Lipotoxicity in the liver. *World J Hepatol* **5**, 550-7 (2013).

Ezúton is szeretném kifejezni **Mandl József** iránti hálámat. Utólag visszatekintve semmi kétely nincs bennem, hogy amikor orvosi diplomám megszerzésekor eltérített a kutatás, és azon belül a biokémia felé, akkor nem csak velem, hanem még nagyon sokakkal jót tett. Pályám során mindig bízhattam jóakaratóban és a szakmán túlmutató segítő szándékában.

A Mandl-munkacsoportban a kezdetektől alkalmam adódott együtt dolgozni **Bánhegyi Gáborral**, akit mindig nagyszerű tudósnek tartottam. Közös munkánk meghatározó szerepet játszott tudományos érdeklődésem és kutatási területem alakulásában. Nem tudom, végül sikerült-e olyan sokat tanulnom tőle, amennyit szerettem volna, de biztos, hogy nem rajta múlt.

Mandl József és Bánhegyi Gábor révén kerültem kapcsolatba **Angelo Benedettivel** (Sienai Egyetem, Olaszország) és **Brian Burchell**-lel (Dundee-i Egyetem, Skócia). Benedetti professzorral húsz éve folytatunk gyümölcsöző kooperációt. Részben különleges személyiségének köszönhető, hogy a Sienában tett látogatásaim életre szóló emléket hagytak maguk után. Burchell professzorral két évig tartott az intenzív szakmai együttműködésünk, melyre egy FEBS ösztöndíj adott nekem lehetőséget. Dundee-ban ismerkedtem meg számos molekuláris biológiai módszerrel és a tömegspektrometriával. A második év végére Burchell professzor sikeresen megpályázta a dékáni címet, és visszavonult a kutatómunkától. Őszintén remélem, hogy e döntésében az én ott tartózkodásom nem játszott meghatározó szerepet.

Szénási Béláné, Vali röviddel utánam kezdte pályafutását a munkacsoportban. Hasznos technikai és adminisztrációs segítségénél is többet jelent, hogy igazi háziasszony módjára tart rendet és fegyelmet a gondjaira bízott laboratóriumok és azok személyzetei körében. Erős érzelmi szálakkal átszőtt kapcsolatunk is sok vonatkozásában egy hosszú házasságra emlékeztet, de viszonylag könnyen ki szoktunk békülni egymással.

Hálával tartozom mindazoknak a kutatótársaknak, akik a közleményeim és e dolgozat alapjául szolgáló munkában, akár itthon, akár Olaszországban vagy Skóciában közreműködtek. Saját **publikációim társzerzőiként** mind név szerint szerepelnek az értekezés megfelelő fejezetében, ezért ismételt

felsorolásuk itt szükségtelen. – Közülük csupán két embert szeretnék külön kiemelni, mert ők – Mandl és Bánhegyi professzorok mellett – a doktori értekezés átolvasásával, néhány hiba felfedezésével és hasznos tanácsaikkal is segítségemre voltak. Egyikük **Mészáros Tamás**, aki szerénysége miatt megharagudna, ha itt őszintén méltatnám, és akinek barátságára büszke vagyok. Másikuk **Tóth Blanka** vegyészmérnök, aki nem pusztán mint a kémiai analitika kiváló szakértője vett részt az életemben, hanem hozzám is jött feleségül, és szült nekem két remek fiút, Misit és Marcit.

Köszönet jár az Orvosi Vegytani Intézet működtetésében közreműködő munkatársaknak, akik közül itt **Bombicz Józsefné**, **Gránicz Mária** és **Sonnevend Kinga** nevét szeretném külön megemlíteni.

Ha az MTA doktora címet eddigi munkásságom és jelen értekezésem alapján nekem ítélik, **szüleimet** éppen olyan büszkeséggel fogja eltölteni, mint negyven évvel ezelőtt, amikor szorgalmamat az évzárón igazgatói dicsérettel és könyvjutalommal honorálták. Furcsa, de az ő büszkeségük ma is ugyanolyan fontos nekem, mint akkoriban.

Az értekezésben ismertetett kísérletek az OTKA, az Egészségügyi és az Oktatási Minisztériumok, az NKTH, a Szentágothai János Tudásközpont, a FEBS, a NATO és az Anonymous Fund támogatásával készültek.