

## VÁLASZ

### Dr. Virág László bírálatára

Köszönöm, hogy Professor úr vállalta értekezésem bírálatát. Hálás vagyok az értékelésében foglalt méltató szavakért, és a disszertáció vitára bocsátásának támogatásáért.

A feltett kérdésekre adott válaszaim:

1.) Mikroszomális kísérleteink egyértelmű bizonyítékokkal szolgáltak egy aszkorbát-oxidáz (AO) aktivitás jelenléte mellett, amely a membrán külső felszínén helyezkedik el, hő- és proteázérzékeny, az aszkorbátot aszkorbil gyökön keresztül alakítja dehidroaszkorbáttá, és szerepet játszik az endoplazmás retikulum (ER) lumenében zajló oxidatív fehérjeérésben. Bár az enzimfehérjét nem azonosítottuk, a rézkelátor gátló hatása alapján feltételeztük, hogy réztartalmú fehérje működését észleljük. A multikopper oxidáz (MCO) fehérjecsalád több száz tagja változatos funkciókkal bír baktériumokban, gombákban, növényekben és rovarokban, és e családban növényi AO-okat is ismerünk. Az MCO-k közös jellemzője, hogy szubsztrátjaik oxidációját molekuláris oxigén két vízmolekulává történő redukálása kíséri. Emberben jelenleg három MCO-ról tudunk: a cöruoplazmin, a hefesztin és a „zyklopen”. Mindhárman ferroxidázok, vagyis a ferro ionok ferri ionokká oxidálását végzik, és ez a vas vérben való szállíthatóságának feltétele, ugyanis a transzferrin csak ferri ionokat köt meg. A hefesztin a bélből felszívódó, a „zyklopen” a placentán átjutott, a cöruoplazmin pedig a májból szekretált vasionokat teszi szállíthatóvá. A májban termelődő cöruoplazmin a plazmába szecernálódik, és szabad plazmafehérjeként kering; ugyanakkor az agyban és a herében létezik kívülről a plazmamembránhoz horgonyzott változata is. Kimutatták, hogy a cöruoplazmin nem csak ferroxidázként működhet, hanem NO-oxidáz, kuproxidáz és glutation-peroxidáz aktivitása is van, illetve az enzim képes lehet szerves – köztük biogén – aminok oxidálására is (Vashchenko G. és mtsai. *Nutrients*, 2013;5(7):2289-2313). Igaz, hogy 1964-ben a cöruoplazmin AO aktivitását is leírták (Osaki S. és mtsai. *J Biol Chem*, 1964;239:3570-3575), jellemzően mégsem tartják számon az aszkorbátot az enzim ismert szubsztrátjai között. Lokalizációja, valamint a működésére és funkciójára vonatkozó biokémiai és klinikai megfigyelések alapján nem valószínű tehát, hogy a cöruoplazmin a patkány (vagy ember) májsejtjeinek ER-jében működő AO lenne. Ebből a szempontból érdekes lehet az az 1993-ban leírt cöruoplazmin-szerű fehérje, amely a közlemény szerint patkány májszövetben keletkezik, és nem szekretálódik a vérbe, hanem intracellulárisan a Golgi-apparátus membránjához asszociálódik (Puchkova L.V. *Biull Eksp Biol Med*, 1994;117(1):83-85), de e fehérjéről és funkciójáról további részletek nem állnak rendelkezésre az irodalomban. Amint a kérdésben is szerepel, tavaly kimutatták a rovari MCO1 ortológokról, hogy hatékonyabban oxidálnak aszkorbátot, mint ferro iont vagy difenolokat (Peng Z. és mtsai. *Insect Biochem Mol Biol*, 2015;59:58-71). A cikk szerzőit is meglepő eredményből egyelőre nehéz következtetéseket levonni, és a jelenséget gerincesekben még nem írták le. A rovari MCO1 enzim a középbél és az ahhoz csatlakozó Malpighi-csatornák falában fejeződik ki legnagyobb mennyiségben, és AO aktivitásának leírása óta ismételtelen megerősítették az enzim kulcsszerepét a lárva vas-homeosztázisában (Liu X. és mtsai. *Sci Rep*, 2015;5:14784).

2.) A rézanyagcsere zavarai kapcsán az irodalom nem említi a mikroszomális oxidatív fehérjeérés elégtelenségét, és az ennek következményeként kialakuló ER-stresszt, illetve UPR-t. 2015-ben közöltek először olyan tanulmányt, amelyik ezzel az összefüggéssel foglalkozik. Harcsákban vizsgálták néhány ER-stresszmarker fehérje expressziójának alakulását diétával létrehozott rézhiányos és réz-túladagolós állapotban. Azt állapították meg, hogy a réztöbblet a halak májában emelte a GRP78, a kalretikulin, a PERK, az eIF2 $\alpha$ , az IRE-1 $\alpha$  és az XBP-1 mRNS-ének szintjét, ami ER-stresszre utal, de a rézhiány ilyen hatást nem váltott ki. Azt egyelőre nem lehet tudni, hogy a rézfelesleg érinti-e a diszulfidképződést, illetve hogy milyen mechanizmus révén okoz ER-stresszt a halak májában (Song Y.F. és mtsai. *G3 (Bethesda)*, 2015;5(10):2091-2104). A rézionok transzportereinek defektusán alapuló humán kórképekkel – a kérdésben is említett Menkes-kórral és Wilson-kórral – foglalkozó irodalom sem utal az ER-beli fehérjeérés zavarára, illetve ennek szerepére a betegségek kialakulásában. Mindez nem zárja ki, hogy réztartalmú enzim, például egy – még azonosítatlan – mikroszomális aszkorbát-oxidáz részt vegyen a diszulfidhidak kialakításának folyamatában. A diétával kiváltott, generalizált rézhiány olyan vitális funkciókat érint elsődlegesen, mint a mitokondriális légzési lánc, vagyis várhatóan dominálnak az energiahasznosítás és ATP-termelés zavarai. Az ER fehérjeérlelő teljesítményének csökkenése ilyenkor következmények nélkül maradhat a fehérjetermelés lassúbbodása miatt, de esetleges következményei amúgy is másodlagos jelentőségűek lennének.

A Menkes-kór az ATP7A réz-transzporter mutációján alapul. Ez a pumpa a májban nem fejeződik ki, és a betegség tünetei is leginkább a központi idegrendszerben, erek falában, bőrben, hajban jelentkeznek. A transzporter a transz-Golgi hálózatban helyezkedik el, és olyan réztartalmú enzimek szintézisét segíti elő, amelyek a szekréciós útvonal disztálisabb szakaszán vagy akár extracellulárisan találhatóak. Ebben a kórképben tehát nem is várható az általunk vizsgált májszövet, illetve az ER működésének közvetlen érintettsége. A Wilson-kór az ATP7B réz-transzporter mutációjának következménye. Ez a pumpa éppen a májban fejeződik ki leginkább, és a rézionok epével való ürítéséért felelős. A Wilson-kórosok májában és persze egyéb szöveteiben ezért felhalmozódik a rézion, amitől szintén nem várható a diszulfidképződés elégtelensége. A tünetek egyébként ilyenkor is leginkább központi idegrendszeriek (Telianidis J. és mtsai. *Front Aging Neurosci*, 2013;5:44).

3.) Az általunk leírt mikroszomális aszkorbát-oxidáz aktivitásról jelenleg annyit lehet tudni, hogy az ER-membrán külső felszínéhez kapcsolódik, feltehetőleg réztartalmú fehérjét igényel, az aszkorbátot aszkorbil gyökön keresztül oxidálja, és képes kiváltani a lúminális fehérje- és glutation-tiolok oxidációját. Az aszkorbát egyelektronos oxidációja alapján feltételezzük, hogy oxigénből szuperoxid anion képződhet, de ezt kísérletekkel nem bizonyítottuk. E bizonytalanság miatt szerepel modellünkben, valamint az ezt összegző ábrán a ROS (reaktív oxigénszármazék) kifejezés. A méréseinkhez felhasznált mikroszómában a keletkezett ROS azonnal továbbreagál (például tokoferollal, sőt magával az aszkorbáttal vagy aszkorbil gyökkel is), és végső soron maga is hozzájárul a diszulfidképződéshez. Ez megnehezíti az elsődlegesen keletkezett ROS megbízható azonosítását, amíg az enzim tisztított formában nem áll rendelkezésre. Természetesen reaktív nitrogénszármazékok másodlagos képződése sem kizárható, különösen akkor, ha bebizonyosodik, hogy az aszkorbát-oxidáz egyik terméke valóban a szuperoxid anion.

4.) A skorbutos tengerimalacok májában általunk kimutatott ER-stresszt és apoptózist elsősorban az aszkorbát oxidatív fehérjeérésben betöltött szerepét alátámasztó jelenségként értékeljük. A

vizsgálattal az volt a célunk, hogy az *in vitro* kísérleteinkből kapott eredmények alapján felállított modellünk *in vivo* relevanciáját ellenőrizzük, és ez sikerült is. Természetesen nem állítom, hogy az általunk leírt jelenség nem játszhat fontos szerepet a skorbut patomechanizmusában, de e tekintetben csak visszafogott következtetéseket vonnék le. Egyrészt fontos leszögezni – amit mindig is említettünk –, hogy a C-vitaminnak a diszulfidképzés elősegítése mellett más, jelentős biológiai funkciói is vannak, melyek közül kiemelendő az antioxidáns védelem és a kollagén szintézisében oly fontos prolin- és lizil-hidroxilációban való részvétel. A skorbut tüneteinek nagy része nyilván elsősorban ezek kiesésére vezethető vissza. Nem véletlenül választottuk vizsgálatunkhoz a májszövetet, hiszen az intenzív fehérjeszekréció itt különösen érzékenyvé teheti az ER-t az oxidatív folding teljesítményének csökkenésére. Valószínűleg hasonlóan ER-stresszt vált ki a skorbut más, fehérjét szekretáló szövetekben és sejttípusokban is, és éppen ezért feltételezem például, hogy az aszkorbáthiány a  $\beta$ -sejtek működését és inzulinrezisztenciához való alkalmazkodási képességét is hátrányosan befolyásolhatja, de tény, hogy ez – konkrét kísérleti eredmények nélkül – csak hipotézis. Ami a skorbutos szívelégtelenséget, illetve a betegség gasztrointesztinális és központi idegrendszeri manifesztációit illeti, szintén óvatosan közelíteném meg a foldingzavar és az ER-stressz szerepét. Lehetséges, hogy ez is közrejátszik a jelenségben, de tény, hogy erre utaló adatokról nincs tudomásom. A kérdésben említett lipidperoxidáció viszont az aszkorbát mint antioxidáns hiányából fakad, vagyis az oxidatív stressz indikátora, és ez minden bizonnyal szerepet játszik a skorbut legtöbb szöveti manifesztációjában (Kunert K.J. és mtsai. *Lipids*, 1983;18(4):271-4).

- 5.) Az ER-stressz a zsírsavak által kiváltott toxicitás stabil komponense, amely nem csak a  $\beta$ -sejtekben jelentkezik. A telített zsírsavak a fehérjeérést is megzavarják az ER-ben (leginkább a  $Ca^{2+}$  ionok kiáramlása miatt), de a membrán telítettségének megváltoztatásával közvetlenül is aktiválják az IRE1 $\alpha$  és PERK ER-stresszreceptorokat (Volmer R. és mtsai. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013;110(12):4628-4633). A lipotoxikus ER-stressz mindenképpen együtt jár az UPR részjelenségeivel, de ennek végső eredője sokszor nem az apoptózis indukciója, hanem a gyulladós jelátvitel fokozódása és az IRS-1 szerinfoszforilációja. Kimutatták a jelenséget az egész szervezet metabolizmusa szempontjából legjelentősebb májsejtekben, váz- és szívizomban, valamint adipocitákban, és ezek együttesen közrejátszanak az elhízáshoz kapcsolódó inzulinrezisztencia kialakulásában. Leírták a telített zsírsavak által okozott ER-stressz és apoptózis szerepét a vese podocitáinak pusztulásában, ami a diabéteszes nefropátia részét képezi (Tao J.L. és mtsai. *Chin Med J (Engl)*, 2012;125(17):3137-3142). Érdekes, hogy legújabban a meniszkusz sejtjeiben is észleltek palmitáttal kiváltott ER-stresszt, és ennek jelentőséget tulajdonítanak az elhízás és oszteoarthritisz közti összefüggésben (Haywood J. és mtsai. *Osteoarthritis Cartilage*, In press: pii/S1063458415014065).
- 6.) Bár az UPR részeként közvetlen kaspázaktiválódást (rágcsálóknál kaspáz-12, emberben kaspáz-4) is leírtak, a mitokondriális apoptózis az ER-stressz hatására kialakuló programozott sejthalálnak is fontos részét képezi. Az UPR aktiválódása közvetve is kiválthatja a mitokondriális membránpermeabilitás fokozódását. Egyrészt a CHOP indukciója révén, amely a Bcl-2 fehérjecsalád proapoptotikus tagjainak indukcióját és antiapoptotikus tagjainak csökkent termelődését segíti, ezáltal növelve a Bax-Bak csatorna aktiválódásának valószínűségét. Másrészt a JNK IRE1 $\alpha$  útvonalon keresztüli aktiválódása által, ugyanis a JNK a c-Jun foszforilálásával, az AP1 transzkripció faktor által a p53-függő sejthalál egyik fontos induktora, ráadásul a mitokondriumokhoz transzlokálódva a Bcl-2 család fehérjéinek foszforilálásával szintén erős

apoptózisinduktorként működik (Dhanasekaran D.N. és Reddy E.P. *Oncogene*, 2008;27(48):6245-6251).

A mitokondrium-asszociált ER-membrán (MAM) valóban nem csak normál, fiziológias körülmények között biztosítja a két szervecske közvetlen összeköttetését, de az ER-stressz közvetítésében is kiveszi a részét. Stresszmentes körülmények között az egymástól 10-25 nm távolságot (vagy inkább közelséget) tartó membrán, az ER membránja és a mitokondrium külső membránja, dinamikusan kapcsolódik egymáshoz. A MAM-ok lehetővé teszik a membránlipidek kétirányú átadását,  $Ca^{2+}$  ionok átjutását az ER-ből a mitokondriumba, valamint a sejt proteosztázisának közös szabályozását. Az ER-stressz egyik korai következménye, hogy az ER és a mitokondriumok közötti kontaktus erősödik. A MAM-ban elhelyezkedő szigma-1 receptor (Sig-1R) stabilizálja az IRE-1 $\alpha$  stresszreceptort, amely így tartósabban aktiválódik, és hatékonyabban segíti az adaptációt és túlélést. A szorosabb kontaktus, szintén a Sig-1R közreműködésével fokozza a mitokondrium  $Ca^{2+}$ -felvételét, ami rövidtávon az oxidatív lebontást és mitokondriális ATP-termelést serkenti, de tartós fennállása a mitokondrium kalciummal való túltelítődése miatt a PTP csatornák megnyílásához vezethet, így beindíthatja a mitokondriális apoptózist. Érdekes még, hogy a MAM területén a mitokondriumfúzió egyik fehérjekomponense, az Mfn-2 az ER-membránban is jelen van, és összekapcsolódik a mitokondriális külső membrán Mfn-1 vagy Mfn-2 fehérjéjével. Az ER-membrán Bap31 fehérjéje pedig ugyanitt hozzákapcsolódik a mitokondriumhasadás egyik fehérjekomponenséhez, a Fis-1-hez. A jelenség feltehetőleg nem csupán a két organellum összekapcsolódását biztosítja, hanem a mitokondriális fúzió és hasadás – ezen keresztül pedig a túlélés és sejthalál – ER általi befolyásolását is szolgálja. Megfigyelték, hogy ER-stressz hatására emelkedik a MAM Mfn-2-szintje, az Mfn-2 hiánya pedig fokozza az ER-stresszt. A Fis-1-Bap31 komplexről pedig leírták, hogy az apoptózisindukció egyik lehetséges kiindulópontja, amely kaspáz-8-at aktivál, és felszabadítja a p20Bap31 proapoptotikus fragmentet (összefoglalásként: López-Crisosto C. és mtsai. *Biochim Biophys Acta*, 2015;1852[10 Pt A]:2096-2105). Mivel a lipotoxicitás egyaránt elsődlegesen érinti az ER és a mitokondrium működését, ebben az esetben a két organellum között mindkét irányú kölcsönhatás valószínűsíthető, de ebben a MAM szerepéről még nem áll rendelkezésre adat.

7.) Az ER fiziológias működésére és patológias szerepére irányuló kutatás sok területe tekinthető transzlációs szempontból ígéretesnek, és ezek között van, amellyel magam is foglalkoztam. Első helyen említeném a prereceptorális glukokortikoid-termelés mechanizmusát. Mi is hozzájárultunk a rendszer három fehérjekomponense, a glukóz-6-foszfát-transzporter, a hexóz-6-foszfát-dehidrogenáz és az 1-es típusú 11 $\beta$ -hidroxisteroid-dehidrogenáz (11 $\beta$ -HSD1) közti funkcionális kapcsolat megértéséhez, illetve néhány fontos tulajdonságuk megismeréséhez. Saját megfigyeléseink is megerősítik azt a nézetet, mely szerint a metabolikus szindróma és a diabétesz kezelése szempontjából a három fehérje közül a 11 $\beta$ -HSD1 gátlása a legmegfelelőbb stratégia. Az enzim specifikus gátlószereinek fejlesztése folyamatban van, és kettő közülük (DIO-902 a DiObex Inc.-től és INCB13739 az Incyte Inc.-től) a klinikai fázis 2b vizsgálatig jutott. Nem váltották be a hozzájuk fűzött reményeket, amit a kutatók azzal magyaráznak, hogy nem elég az enzim típusra való szelektivitás, hanem a katalizált reakciónak is csak az egyik irányát kellene gátolni. Ez persze enzimológiai szempontból nehezen megoldható, de mi prezentáltuk azt a módszert, amellyel mégis elérhető, ez pedig az ER luminális piridin-nukleotid redox státuszának eltolása oxidatív irányba. Kimutattuk, hogy ilyen hatást vált ki az éhezés a májban, ami persze nem tekinthető gyógyszernek, de mégis érdekes abból a szempontból, hogy a táplálékbevitel csökkentése milyen

mechanizmusok révén segít a diabétesz megelőzésében. Két hatóanyaggal is sikerült oxidálnunk a luminális piridin-nukleotidokat *in vitro*. Egyikük, a metirapon csak kísérletes szempontból releváns, mert a mellékvesekéreg kortizoltermelését is drasztikusan gátolja. Másikuk, az epigallokatekin-gallát természetes flavanol, amelynek randomizált, kettős vak, placebo-kontrollos klinikai kipróbálásáról legújabbán ígéretes eredményeket közöltek centrális elhízás kapcsán (Chen I.J. és mtsai. Clin Nutr, In press: pii/S026156141500134X). A tanulmányban az észlelt fogyást és koleszterinszint-csökkenést két hormon plazmakoncentrációjának változásával hozták összefüggésbe (a ghreliné alacsonyabb, az adiponektiné pedig magasabb volt), és az elsődleges támadáspont, illetve mechanizmus nem tisztázott, így nem kizárt, hogy az általunk leírt jelenség is hozzájárul az észlelt hatásokhoz.

Szintén ígéretesnek tekinthető transzlációs szempontból a lipotoxikus ER-stressz és a következményes, részben JNK-függő, IRS-1-szerinfoszforiláció tanulmányozása. A JNK kiemelt gyógyszercélpont, és nem csupán az inzulinrezisztenciában, hanem a daganatos betegségekben játszott szerepe miatt is. Mi is létrehoztunk és teszteltünk olyan új hatóanyagokat, amelyek *in vitro* a  $\beta$ -sejtlipotoxicitás sejtes modelljében hatékonyan csökkentették az IRS-1 szerinfoszforilációját, így szóba jöhetnek antidiabetikumok fejlesztésének kiinduló vegyületeiként, és ezzel kapcsolatos szabadalmat is bejegyeztettünk (Simon-Szabó L. és mtsai. Bioorg Med Chem Lett, 2016;26(2):424-8).

Még egyszer köszönöm Professzor úr támogatását, az értekezésem bírálatára fordított idejét és energiáját, valamint a feltett, elgondolkodtató kérdéseket.

Budapest, 2016. március 18.



Dr. Csala Miklós