MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS

A 2-ES TÍPUSÚ CUKORBETEGSÉG ÉS AZ ENDOPLAZMÁS RETIKULUM

Dr. Csala Miklós

Semmelweis Egyetem Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Patobiokémiai Intézet

> BUDAPEST 2015

Tartalomjegyzék

RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK	3
ÁBRÁK ÉS TÁBLÁZATOK JEGYZÉKE	6
1. ELŐSZÓ	11
2. BEVEZETÉS	14
2.1. Az elhízáshoz kapcsolódó anyagcsere-betegségek	14
2.1.1. Inzulinhatás	15
2.1.2. Inzulinrezisztencia	17
2.1.3. A metabolikus szindróma	18
2.1.4. Kortizol, elhízás és inzulinrezisztencia	19
2.1.5. Az emelkedett glukózszint hatásai – glukotoxicitás	20
2.1.6. Az emelkedett zsírsavszint hatásai – lipotoxicitás, lipoapoptózis	21
2.1.7. Fruktóz és diabetes mellitus	24
2.1.8. Exogén antioxidánsok és diabetes mellitus	25
2.1.8.1. Aszkorbát	26
2.1.8.2. Teaflavanolok	27
2.2. AZ ENDOPLAZMÁS RETIKULUM ÉS KAPCSOLATA A METABOLIKUS SZINDRÓMÁVAL.	28
2.2.1. Az endoplazmás retikulum felépítése és luminális mikrokörnyezete	
2.2.2. Az endoplazmás retikulum legfontosabb funkciói	
2.2.2.1. Kalciumhomeosztázis	34
2.2.2.2. Fehérjeszintézis és -érés	34
2.2.2.2.1. Az endoplazmás retikulum chaperon, foldáz és lektin fehérjéi	35
2.2.2.2. A diszultid hidak kialakulasa	36
2.2.2.2.3. Prolil- es lizitifique de minéségellenérzés	40
2.2.2.4. Felici jeglikoznació es minosegenenoizes	40 /13
2.2.2.3. Diotransztormació	
2.2.2.3.1. A elektron 1.150 enzimendszer 2.2.2.3.2 A 118-hidroxiszteroid-dehidrogenáz izoenzimek	
2.2.2.4. Glukóztermelés	48
2.2.3. Az endoplazmás retikulum redox rendszerei	
2.2.3.1. A citokróm P450 enzimek redox kapcsolatai	50
2.2.3.2. Az oxidatív fehérjeérés redox kapcsolatai	50
2.2.3.3. Piridin-nukleotidok redox ciklusa az endoplazmás retikulumban	52
2.2.3.4. Kis molekulájú antioxidánsok redox kapcsolatai	53
2.2.4. Az endoplazmás retikulum stressz	55
2.2.4.1. Az UPR mechanizmusa	56
2.2.4.2. Az endoplazmás retikulum stressz által indukált apoptózis	58
3. CÉLKITŰZÉS	60
4. AZ ALKALMAZOTT MÓDSZEREK RÖVID ÁTTEKINTÉSE	64
4.1. MIKROSZÓMA ÉS MIKROSZOMÁLIS SZUBFRAKCIÓK ELŐÁLLÍTÁSA	64
4.2. MEMBRÁNPERMEABILIZÁLÁS ÉS A LATENCIA MEGHATÁROZÁSA	65
4.3. Fehérjetiolok fogyásának vizsgálata	66
4.4. Az aszkorbát mennyiségi meghatározása	67
4.5. A NAD(P)H FOGYÁSÁNAK ÉS TERMELŐDÉSÉNEK FLUORESZCENS MÉRÉSE	67
4.6. TRANSZPORTMÉRÉSEK	68
4.6.1. Fényszórásos módszer	
4.6.2. Gyors szűrés és gyors ülepítés	

5. EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK	
5.1. A LUMINÁLIS TIOL-DISZULFID REDOX RENDSZER OXIDÁLT ÁLLAPOTÁNAK FEN	NTARTÁSA
AZ ENDOPLAZMÁS RETIKULUMBAN	74
5.1.1. Glutationtranszport az endo/szarkoplazmás retikulumban	
5.1.2. Aszkorbátszintézis által kiváltott tioloxidáció	
5.1.3. Fehérjetiolok oxidációja dehidroaszkorbát hatására	
5.1.4. Fehérjetiolok oxidációja aszkorbát hatására	83
5.1.5. Aszkorbát-oxidáz aktivitás az endoplazmás retikulumban	84
5.1.6. A tokoferol szerepe az aszkorbát által kiváltott tioloxidációban	
5.1.7. Az aszkorbátfüggő fehérjetiol-oxidáció modellje	
5.1.8. Endoplazmás retikulum stressz skorbutban	
5.1.9. A glikalt hemoglobin szintjenek csökkenese aszkorbatkezeles hatasara	
5.2. A LUMINALIS PIRIDIN-NUKLEOTID REDOX RENDSZER REDUKALT ALLAPOTANA	K 104
FENNIARIASA AZ ENDOPLAZMAS RETIKULUMBAN	104 -
J.2.1. A Chophazma es az endophazmas relikulum NADF 11-NADF - keszlelenek alkülönülása	104
5.2.2 A luminális NADPH-NADP ⁺ készlet redukált állanotának fenntartása	104 108
5.2.2. A tiol-diszulfid és a NADPH-NADP ⁺ redox rendszerek elkülönülése	111
5.2.4. Mikroszomális NADPH- és kortizoltermelés fruktóz-6-foszfát felhasznál	lásával 113
5.2.5. A H6PD expressziója különböző szövetekben	
5.2.6. A H6PD expressziója zsírsejtdifferenciáció során	
5.2.7. Éhezés és jóllakottság hatása az endoplazmás retikulum luminális pirid	in-
nukleotidjainak redox státuszára	127
5.2.8. Az endoplazmás retikulum luminális piridin-nukleotidkészlete mint a	
prereceptoriális kortizoltermelés befolyásolásának támadáspontja	130
5.3. LIPOTOXICITÁS ÉS LIPOAPOPTÓZIS KIVÉDÉSE	141
A LEGFONTOSABB EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA ÉS MEGBES	SZÉLÉSE
IRODALOMJEGYZÉK	153
A SZERZŐ TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEI	185
8.1. AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ SAJÁT KÖZLEMÉNYEK	185
8.2. A SZERZŐNEK AZ ÉRTEKEZÉSBEN NEM TÁRGYALT KÖZLEMÉNYEI	189
ÖSZÖNFTNVIL VÁNÍTÁS	

RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK

AA	aszkorbát
ADMSC	humán zsírszövetből származó mezenchimális őssejt
ATF3, 4, 6	"activating transcription factor 3, 4 and 6"
ATP	adenozil-trifoszfát
BB	BioBreeding/Worcester patkány törzs
BiP (GRP78)	"binding protein" ("78 kDa glucose regulated protein")
BMI	"body mass index" = testtömeg-index
CFTR	cisztás fibrózis transzmembrán konduktancia regulátor
СНОР	"C/EBP homologous protein"
DHA	dehidroaszkorbát
CIT	citoplazma frakcióból
DsbA, B, C	"disulfide bond A, B and C"
DTT	ditio-treitol
EDEM	"ER degradation-enhancing 1,2-mannosidase-like protein"
EGCG	(-)-epigallokatekin-3-gallát
eIF2a	eukarióta (transzlációs) iniciációs faktor 2 alfa alegység
ER	endoplazmás retikulum
ERAD	"endoplasmic reticulum-associated protein degradation"
Ero1	"endoplasmic reticulum oxidoreductase 1"
Erv2	"essential for respiration and vegetative growth 2"
ERp57, 61, 72	"57, 61 or 72 kDa endoplasmic reticulum protein"
ESR	elektronspin-rezonancia
FAD	flavin-adenin-dinukleotid
FFA	szabad zsírsav
FMN	flavin-mononukleotid
FOXO	"forkhead box protein O" transzkripciós faktor
F6P	fruktóz-6-foszfát
GAPDH	glicerinaldehid-3-foszfát-dehidrogenáz
GADD34, 153	"growth-arrest- and DNA-damage inducible gene 34 and 153"
GEF	guanin-nukleotid-kicserélő faktor
GLO	gulonolakton-oxidáz
G6P	glukóz-6-foszfát
G6PD	glukóz-6-foszfát-dehidrogenáz

GPR40	sejtfelszíni zsírsav-receptor a β-sejtekben
GRP78, 94, 170	"78, 94 or 170 kDa glucose regulated protein"
GSD1	"glycogen storage disease type 1" (1-es típusú glikogéntárolási betegség)
GSH	glutation
GSSG	glutationdiszulfid
GTP	guanozil-trifoszfát
HEPES	4-(2-hidroxietil)piperazin-1-etánszulfonsav
HbA _{1c}	glikált hemoglobin
HDL	"high-density lipoprotein"
HFCS	magas fruktóztartalmú kukoricaszirup
H6PD	hexóz-6-foszfát-dehidrogenáz
HPLC	"high performance liquid chromatography"
HPLC-MS/MS	HPLC és tandem tömegspektrometria
11βHSD	11β-hidroxiszteroid-dehidrogenáz
Hsp70	"70 kDa heat shock protein"
ΙκΚ	inhibitor-kappa-kináz
IL-1β, 6	interleukin-1β és -6
IRE1	"inositol-requiring enzyme 1"
IRS	inzulin-receptor-szubsztrát
JNK	c-Jun N-terminális kináz
LXR	"liver X receptor" transzkripciós faktor
MHC	"major histocompatibility complex"
MIT	mitokondrium frakció
MOPS	4-morfolino-propánszulfonsav
MSz	mikroszóma
mTOR	"mammalian target of rapamycin"
NAD^+ , $NADH$	nikotinamid-adenin-dinukleotid és redukált alakja
NADP⁺, NADPH	nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát és redukált alakja
NEFA	nem észteresített zsírsav
ND	nem detektálható
NM	nem mértük
NF-κB	nukleáris faktor-ĸB
PEG	polietilénglikol
PERK	"pancreatic ER kinase (PKR)-like ER kinase"

dc_997_15

PI	propídium-jodid
PIPES	1,4-piperazin-dietánszulfonsav
PI3K	foszfatidil-inozitol 3-kináz
PDI	proteindiszulfid-izomeráz
PDK	foszfatidil-inozitol-függő kináz
РКВ	protein-kináz B
РКС	protein-kináz C
PLC	foszfolipáz C
PMF	posztmitokondriális felülúszó
PPAR	peroxiszóma-proliferátor által aktivált receptor
QSOX	"quiescin sulfhydryl oxidase"
ROS	"reactive oxygen species", reaktív oxigén-intermedierek
RyR	rianodin-receptor Ca ²⁺ -csatornák
SERCA	szarko/endoplazmás retikulum kalcium ATP-áz
SREBP	"sterol response element binding protein" transzkripciós faktor
SRP	"signal recognition particle"
sXBP1	"spliced X box-binding protein 1"
TBARS	"tiobarbituráttal reagáló vegyületek"
TLR	"Toll-like" receptor
TC	terminális ciszterna
TNF-α	tumornekrózis faktor α
TRAF2	"TNF-receptor-associated factor 2"
TUNEL	terminális dezoxinukleotidil transzferáz dUTP "nick-end labeling"
UDP	uridil-difoszfát
UDP-Glc	UDP-glukóz
UGGT	UDP-Glc:glikoprotein glukozil-transzferáz
UPR	"unfolded protein response"

ÁBRÁK ÉS TÁBLÁZATOK JEGYZÉKE

1. ábra Tiol-diszulfid-kicserélődés	37
2. ábra Diszulfidképződés többsejtű, eukarióta szervezetekben	38
3. ábra Minőségellenőrzés az endoplazmás retikulumban	42
4. ábra A kortizol prereceptoriális metabolizmusa	46
5. ábra Az antioxidánsok redox lánca (módosított Halliwell-Asada ciklus)	54
6. ábra Az UPR-ben aktiválódó legfontosabb jelpályák	58
7. ábra A permeabilitás vizsgálatának fényszórásos technikája	69
8. ábra A transzport vizsgálatára alkalmas "gyors szűrés" módszer	70
9. ábra Morfin és morfin-3-glukuronid szimultán mérése HPLC-MS/MS módszerrel	72
10. ábra A mikroszómában keletkező morfin-3-glukuronid luminális felhalmozódása	73
11. ábra Agy-, máj-, szív- és izomeredetű mikroszóma glutationpermeabilitása	74
12. ábra A rianodin-receptor gátló- és aktiválószereinek hatása a vázizom-eredetű mikroszóma glutationpermeabilitására	76
13. ábra Glutationfelvétel vad típusú és RyR1-transzfektált HEK-293 sejtekből készült mikroszómában	77
14. ábra Az újonnan szintetizált aszkorbát megoszlása az intra- és extravezikuláris folyadéktérben	79
15. ábra Aszkorbátszintézist kísérő fehérjetiol-oxidáció és dehidroaszkorbát- termelés májmikroszómában	80
16. ábra Dehidroaszkorbát-felvétel időgörbéje májmikroszómában	82
17. ábra Aszkorbil gyök enzimatikus keletkezése májmikroszómában	85
18. ábra Az aszkorbát fogyásának, illetve a dehidroaszkorbát és az aszkorbil gyök keletkezésének időgörbéje májmikroszómában	86

19. ábra Rézkelátor neokuproin hatása az aszkorbátfüggő fehérjetiol-oxidációra májmikroszómában	90
20. ábra Az aszkorbátoxidáció gátlásának hatása a májmikroszóma látszólagos aszkorbátpermeabilitására	92
21. ábra Aszkorbát és gulonolakton hatása a lipidperoxidációra kontroll és E- vitaminmentes májmikroszómában	95
22. ábra Az aszkorbátfüggő fehérjetiol-oxidáció modellje	97
23. ábra Az endoplazmás retikulum chaperon és foldáz fehérjéinek expressziója a C-vitaminhiányos tengerimalacok májában	100
24. ábra Fokozott apoptózis a C-vitaminhiányos tengerimalacok májában	101
25. ábra Endoplazmás retikulum foldázok redox állapota C-vitaminhiányos tengerimalacok májában	102
26. ábra A glikált hemoglobin aránya egészséges, illetve cukorbeteg emberek vérében aszkorbátkezelés előtt és után	103
27. ábra Kortizonredukció intakt májmikroszómában	104
28. ábra A mikroszóma endogén, luminális NADPH-tartalmának fluoreszcens detektálása	105
29. ábra A mikroszomális membrán piridin-nukleotidok számára nem permeábilis	107
30. ábra A H6PD és a 11βHSD1 aktivitások jelentős latenciája patkány májmikroszómában	108
31. ábra <i>A mikroszóma lumenében magas a [NADPH]:[NADP⁺] arány</i>	110
32. ábra A glutation nem befolyásolja a luminális NADPH-NADP ⁺ redox rendszer állapotát	112
33. ábra A glutation-reduktáz fehérje nincs jelen a májmikroszómában	113
34. ábra Fruktóz-6-foszfát mint a NADPH-termelés forrása májból és zsírszövetből készült mikroszómában	116

35. ábra 6-Foszfoglukonát keletkezése fruktóz-6-foszfátból májból és zsírszövetből készült mikroszómában	117
36. ábra A mikroszomális hexóz-foszfát-izomeráz aktivitás luminális elhelyezkedése	118
37. ábra Tisztított, rekombináns, humán H6PD vizsgálata	119
38. ábra A H6PD aktivitása különböző patkány és humán szövetekben	121
39. ábra A H6PD mRNS-szintek patkány és humán szövetekben	122
40. ábra A H6PD fehérjeszintek patkány és humán szövetekben	123
41. ábra Kortizonredukció és kortizoloxidáció a 3T3-L1 sejtekből induló adipogenezis során	124
42. ábra H6PD és 11βHSD1 fehérjeszintek a zsírsejt irányba differenciálódó ADMSC, illetve 3T3-L1 sejtekben	125
43. ábra A H6PD és a 11βHSD1 mRNS-ének mennyiségi változása a zsírsejt irányba differenciálódó ADMSC, illetve 3T3-L1 sejtekben	126
44. ábra Patkány májmikroszóma endogén kortizonredukáló és kortizoloxidáló kapacitása	128
45. ábra Patkány májmikroszóma luminális NADPH-tartalma	129
46. ábra A patkány májmikroszóma luminális NADPH-készletének oxidációja metiraponnal	131
47. ábra A 11βHSD1 gátlása metiraponnal intakt és permeabilizált májmikroszómában	132
48. ábra Metiraponfüggő kortizoloxidáció intakt májmikroszómában	133
49. ábra Metirapon hatása a kortizon-kortizol átalakulásra zsírsejtekben	134
50. ábra Metirapon hatása a 3T3-L1 sejtek adipogén differenciálódására	135
51. ábra EGCG hatása a kortizoltermelésre intakt májmikroszómában	136
52. ábra A mikroszomális glukuronidtranszport gátlása EGCG-vel	137
53. ábra EGCG hatása a glukóz-6-foszfát felvételére májmikroszómában	138

54. ábra EGCG hatása a májmikroszóma endogén kortizonredukáló és	139
kortizoloxidáló kapacitására	
55. ábra A patkány májmikroszóma luminális NADPH-készletének oxidációja	140
metiraponnal	
56. ábra RINm5F inzulinóma sejtek lipoapoptózisának kivédése metforminnal	142
57. ábra Az endoplazmás retikulum egyes chaperonjainak indukciója	143
lipotoxicitásban	
58. ábra Az eIF2α foszforilációja lipotoxicitásban	144
59. ábra Az UPR proapoptotikus részjelenségei lipotoxicitásban	145
60. ábra JNK-aktiválódás és IRS-1-Ser-foszforiláció lipotoxicitásban	146

1. táblázat Gulonolakton-oxidáz aktivitással összefüggő glutationoxidáció GSH- val feltöltött májmikroszómában	79
2. táblázat Dehidroaszkorbát-reduktáz aktivitás és azzal összefüggő fehérjetiol- oxidáció kontroll és diabéteszes patkányok májából preparált mikroszómában	81
3. táblázat Aszkorbátoxidációval összefüggő fehérjetiol-oxidáció patkány, tengerimalac és humán májmikroszómában	84
4. táblázat Az aszkorbát-oxidáz aktivitás topológiája	87
5. táblázat Az aszkorbát-oxidáz aktivitás gátlása	88
6. táblázat Az aszkorbát-oxidáz gátlásának hatása a mikroszomális fehérjetiol- oxidációra	89
7. táblázat Aszkorbil gyök keletkezése gulonolaktonból	91
8. táblázat A gulonolaktonból termelt aszkorbát által kiváltott fehérjetiol-oxidáció	91
9. táblázat E-vitaminmentes diéta hatása patkányokban	94
10. táblázat Az E-vitaminhiány hatása az aszkorbát, illetve gulonolakton által kiváltott fehérjetiol-oxidációra patkány májmikroszómában	94
11. táblázat Antioxidáns enzimek és egy gyökfogó hatása az aszkorbát által kiváltott fehérjetiol-oxidációra	96
12. táblázat C-vitaminmentes diéta hatása tengerimalacokban	99
13. táblázat Különböző oxidáló és redukáló szerek hatása a mikroszomális fehérjék tioljaira	111
14. táblázat Glukóztermelés és kortizonredukció glukóz-6-foszfát, illetve fruktóz-6- foszfát mellett patkány májmikroszómában	115

dc_997_15

1. ELŐSZÓ

Az elmúlt másfél-két évtizedben évről-évre egyre nagyobb ütemben emelkedik az endoplazmás retikulummal (ER-rel) foglalkozó tudományos közlemények száma, ami az organellum iránti tudományos érdeklődés (gyorsuló) élénkülését jelzi. Az egyre intenzívebb kutatások következtében az ER működésével kapcsolatos ismereteink napjainkban rohamosan gyarapodnak. A változás azonban nem pusztán mennyiségi – az ER-ről alkotott nézeteink gyökeres átalakulása zajlik, és régóta ismert tények is merőben új megvilágításba kerülnek. Nyilvánvalóvá vált, hogy ez a sejtalkotó nem csupán néhány fontos sejtbiológiai és biokémiai folyamat helyszíne, hanem az intracelluláris homeosztázis integrálásának kulcsszereplője, amely alapvető szabályozási mechanizmusok kiindulópontjaként és modulátoraként a sejt egészének működését befolyásolja. Ahogy a főleg lebontó és ATP-termelő folyamatokra specializálódott mitokondriumról, úgy a leginkább fehérjeszintézisre és biotranszformációra szakosodott ER-ről is kiderült, hogy meghatározó intracelluláris jelforrás is egyben.

Az endo-. illetve szarkoplazmás retikulum kiemelkedő szerepe a kalciumhomeosztázisban, illetve a kalcium-jel létrejöttében régóta ismert. Ugyanilyen fontos az organellum ligandmetabolizáló funkciója: a hozzá kapcsolódó biotranszformációs reakciók ugyanis hormonokat, neurotranszmittereket aktiválnak, inaktiválnak vagy reaktiválnak. Az ER a működését érintő stresszhatásokról kifinomult jelzőrendszeren keresztül tájékoztatja a sejtet; és a jelzések alapján a sejt kísérletet tesz a dinamikus egyensúly helyreállítására. Ha azonban ezeket a jelzéseket a sejt úgy értékeli – nyilván máshonnan érkező jelekkel összevetve –, hogy hátterükben az egész szervezetet veszélyeztető károsodás húzódik meg, akkor az apoptózis végrehajtása mellett is dönthet. Az organellumra irányuló tudományos érdeklődés említett fokozódása elsősorban az ER-stressz által beindított jelátviteli útvonalak és az általuk kontrollált túlélési, vagy éppen programozott sejthalálhoz vezető mechanizmusok egyre intenzívebb vizsgálatával függ össze.

Az ER jelgeneráló, -némító és -moduláló tevékenységében jól tetten érhető a külső és belső környezethez való szimultán alkalmazkodás, vagyis a külső és belső stimulusokra együttesen kialakuló válasz megkomponálása. A sejt oxigén- és tápanyagellátása, illetve az energiakinyerés hatékonysága, az oxidatív vagy reduktív stressz az ER-ben integrálódik a sejthez vagy a sejtbe érkező hormonok és neurotranszmitterek hatásaival. Mindezt befolyásolja, hogy itt zajlik rengeteg kívülről érkező gyógyszer és méreg metabolizmusa,

valamint számos – esetleg kóros – fehérje szintézise és érése. Mindezek a tényezők egymásra hatva és önmagukra visszahatva bonyolult egységet alkotnak.

Folyamatosan bővül azon patológiás állapotok listája, amelyek kialakulásában az ER zavara, közvetve vagy közvetlenül, szerepet játszik. Olyan jelentős betegségek említhetők példaként, mint a metabolikus szindróma, a cukorbetegség, a rosszindulatú daganatok vagy egyes neurodegeneratív kórképek. A patomechanizmus jobb megértése mellett a bővülő ismeretek új terápiás beavatkozások – köztük az ER működésére ható szerek – kifejlesztéséhez is hozzájárulnak.

Nem vitatható tehát, hogy rendkívül fontos az ER működésének, és a citoplazmával kialakított kapcsolatainak minél alaposabb megismerése. A két kompartment közötti, vagyis az ER membránján keresztül történő anyagáramlás viszonylag kevéssé feltárt terület. Az organellum transzportereiről lényegesen kevesebb ismerettel rendelkezünk, mint az enzimeiről, holott nyilvánvaló, hogy ezek működése szorosan összekapcsolódik. A transzport kutatását technikai akadályok hátráltatják; míg egy enzimaktivitás észlelését rendszerint hamarosan követi (akár meg is előzi) az enzimfehérje és az azt kódoló gén azonosítása, addig a legtöbb transzportfolyamat megreked a funkcionális jellemzés szintjén. Bár tagadhatatlan, hogy a fenomenológiai megközelítés is fontos ismeretekkel szolgál, az érintett fehérjék és gének azonosítása mindenképpen szükséges lépés, ami ráadásul lökést ad a további funkcionális kutatásoknak is.

Az ER membránjának határoló funkciója és a rajta keresztül folyó transzport szelektivitása következtében а luminális mikrokörnyezet számos vonatkozásban karakterisztikusan citoplazmától. eltér а А több nagyságrenddel magasabb kalciumkoncentráció mellett kiemelendő a meghatározó redox rendszerek (tiol-diszulfid és piridin-nukleotidok) státuszában és kölcsönhatásaiban megfigyelhető jelentős különbség. A sejt többi részétől elkülönült luminális redox viszonyok fenntartása az organellum enzimeinek folyamatos aktivitását igényli, és táplálkozási tényezőkre érzékenyen reagál. Ezen a ponton jól tetten érhető az ER tápanyagszenzor funkciója, amely a fiziológiás szabályozás mellett valószínűleg patológiás folyamatokban is kiemelkedő szerepet játszik.

Jelen értekezés bevezetésként áttekinti az ER néhány fontos, a szerző kutatásának tárgyát képező funkcióját, különös hangsúlyt fektetve a redox homeosztázisra és a membránon keresztüli transzportra. Ezután bemutatja azokat a saját tudományos megfigyeléseket, amelyek egyrészt demonstrálják, hogy az organellum jól körülhatárolt

12

metabolikus kompartment, amelynek elkülönült redox rendszerei érzékenyen reagálnak a tápanyag-ellátottság változásaira, másrészt bizonyítékul szolgálnak arra, hogy e rendszerek zavara fontos szerepet játszik a metabolikus szindróma és a 2-es típusú diabétesz patogenezisében, egyúttal ígéretes gyógyszer-támadáspontként is szolgál e kórképek megelőzése és kezelése számára.

2. BEVEZETÉS

Az értekezésben ismertetett kutatás arra irányult, hogy táplálkozási tényezők (pl. tápanyag-túlkínálat és C-vitaminhiány) hogyan befolyásolják az ER alapvető funkcióit, és hogy ez miként járul hozzá a metabolizmus sejt- és szervezetszintű szabályozásának felborulásához, azaz a metabolikus szindróma és a 2-es típusú cukorbetegség kifejlődéséhez. Ezért az itt összefoglalt irodalmi háttér az elhízáshoz kapcsolódó, említett anyagcserebetegségek bemutatására, valamint az ER tulajdonságainak, metabolikus és jelátviteli funkcióinak ismertetésére fókuszál.

2.1. Az elhízáshoz kapcsolódó anyagcsere-betegségek

A normális vagy ideális testsúlytól való eltérés mértékét rendszerint a testtömeg-index (BMI = testsúly (kg) / magasság² (m²)) segítségével számszerűsítik. Az általánosan elfogadott besorolás szerint 30-as BMI-nél vonjuk meg a határt a túlsúly (25 kg/m² \leq BMI) és az obezitás vagy elhízás (30 kg/m² \leq BMI) között [1]. A WHO adatai szerint 2008-ban világszerte több mint 1,4 milliárd túlsúlyos felnőtt élt, akik közül több mint 200 millió férfi és 300 millió nő volt elhízott. Ugyanekkor Európában a túlsúlyos felnőtt lakosok aránya 55% körül volt, és fokozatosan növekszik. 2009-10-ben az Amerikai Egyesült Államok (vegyes etnikumú) felnőtt lakosságának 69%-a volt túlsúlyos, illetve 36%-a obez [2]; és a legfrissebb felmérések hasonló adatokat mutatnak 2012-13-ra vonatkozóan is [3]. Az elhízás jogosan nevezhető tehát korunk népbetegségének.

Az elhízás multifaktoriális, krónikus betegség, amely veleszületett (genetikailag meghatározott) alapokon, környezeti tényezők hatására alakul ki. Az obezitáshoz vezető szociális, kulturális, viselkedési, életmódbeli, élettani, biokémiai, valamint genetikai tényezők nem teljesen tisztázottak, és egyre intenzívebb kutatás tárgyát képezik. A kór valódi orvosi jelentőségét az adja, hogy fennállása számos egyéb betegség (pl. magas vérnyomás, szív- és érrendszeri betegségek, depresszió, bizonyos daganatok stb.) kialakulásának kockázatát fokozza [1]. Jelen értekezés szempontjából különösen kiemelendő a túlsúly és a 2-es típusú cukorbetegség ok-okozati kapcsolata.

A tápanyag-túlkínálat közvetlenül is előnytelenül befolyásolja a sejtek anyagcseréjét, de az elhízással járó káros hatások nagy része a túlnövekvő zsírszövet közvetítésével alakul ki. A zsírszövet felszaporodása az adipociták hiperpláziájának (preadipociták proliferációja,

illetve differenciálódása) és hipertrófiájának (meglévő adipociták térfogatnövekedése) eredője [4]. Prospektív klinikai kutatások azt mutatják, hogy az adipocita-hipertrófia a 2-es típusú cukorbetegség független rizikófaktora [5, 6]. Az elhízott zsírszövetben fokozódik a lipolízisreszintézis ciklus intenzitása, ami megemeli a vérben keringő szabad zsírsavak (FFA) koncentrációját (lásd 2.1.6. fejezet). A leptin-adiponektin arány az előbbi javára tolódik el. A meggyötört és nagyobb arányban pusztuló zsírsejtek, illetve a zsírszövetet ezek hatására infiltráló makrofágok és limfociták gyulladásos mediátorokat szekretálnak, amelyek szintén bekerülnek a keringésbe [7]. Ráadásul erősödik a glukokortikoid prohormon kortizon átalakulása kortizollá (lásd 2.1.4. fejezet), ami lokális hatásai mellett ugyancsak kihathat más szövetekre is. Számos tanulmány bizonyítja a centrális elhízás, azaz a hasüregi (viszcerális) és hasfali szubkután zsírdepó felszaporodásának kiemelt kóroki szerepét az anyagcserebetegségekben. A jelenség magyarázata részben az eltérő topológiájú zsírszövetek metabolikus és hormonális eltéréseiben, részben a hasi szövetek portális keringéssel való összeköttetésében keresendő. A centrálisan elhelyezkedő zsírszövetből nagy mennyiségben kikerülő zsírsavak és hormonok ugyanis a portális keringéssel közvetlenül a májba jutnak [8].

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.

2.1.1. Inzulinhatás

Jóllakott állapotban, a tápanyag-molekulák – elsősorban a glukóz – emelkedett szérumszintjének hatására a β -sejtek fokozzák a már vezikulumokban tárolt inzulin szekrécióját, illetve a peptid hormon további termelését [9]. A szervezet szinte minden sejtje rendelkezik inzulin-receptorral, és ennek közvetítésével működését adaptálni tudja a megváltozott metabolikus állapothoz. Az adaptáció részben gyors és rövidtávú (a sejtek tápanyagfelvételének, -felhasználásának és -raktározásának azonnali fokozása, valamint a vércukortermelés és a tápanyagraktárak mozgósításának visszaszorítása, ameddig a bélből való felszívódás tart), részben tartós alkalmazkodás, vagyis metabolikus hozzászokás (a tápanyag-felvételi, -felhasználási és -raktározási kapacitás növelése, valamint a vércukortermelési és a raktármobilizálási kapacitás csökkentése). A hosszú távú adaptáció a génexpresszió komplex módosítását igényli, amiben kiemelkedő szerepe van a "forkhead box protein O" (FOXO), "liver X receptor" (LXR), "sterol response element binding protein" (SREBP) és Sp1 transzkripciós faktoroknak [10].

Inzulin kötődésekor aktiválódik a receptor intracelluláris protein-tirozin-kináz doménje, és a fehérje autofoszforilálódik. Az ilyenkor beinduló jelátviteli mechanizmusok zöme az inzulin-receptor-szubsztrát (IRS) fehérjék tirozin-foszforilációjával inicializálódik, és jellemzően valamely SH2-doménnel rendelkező fehérje P-Tyr-IRS-hez történő asszociációját igényli [11]. Jelenleg hat, eltérő szöveti eloszlású IRS izoforma ismert (IRS-1-6). Közülük az IRS-5 és IRS-6 előfordulása és jelátviteli szerepe elhanyagolható, az IRS-3 a rágcsálók zsírés agyszövetében, az IRS-4 pedig elsősorban embrionális szövetekben található [12]. Kiemelendő tehát a széles szöveti reprezentációval rendelkező IRS-1 és IRS-2, amelyek egyaránt központi szerepet játszanak az inzulin hatásainak közvetítésében a legtöbb sejttípus, így a májsejtek [13], az izomsejtek [14], a zsírsejtek [15], valamint a hasnyálmirigy β-sejtek [16, 17] esetén.

Az IRS fehérjék inzulin-receptor általi Tyr-foszforilációja két fő jelátviteli útvonalon keresztül továbbítja az immár intracelluláris szignált: a MAP kinázok, illetve a protein-kináz B (PKB) aktiválódása révén. Egy adapter fehérje által a P-Tyr-IRS-hez rögzített guanin-nukleotid-kicserélő faktor (GEF) "bekapcsolja" a Ras kis GTP-kötő fehérjét, amely egy fehérjefoszforilációs láncolatot (a MAP kináz kaszkádot) indít el. A foszfatidil-inozitol 3-kináz (PI3K) gátló regulátor alegységének P-Tyr-IRS-hez dokkolása pedig lehetővé teszi, hogy az enzim speciális kötőhelyet alakítson ki a foszfatidil-inozitol-függő kináz (PDK) és az általa aktivált PKB számára plazmamembrán belső rétegében [18]. Az inzulin hatására működésbe lépő MAP kinázok (ERK1/2) a sejtnövekedést és proliferációt stimulálják, ugyanakkor a PKB az apoptózis gátlásával "túlélési jel"-et szolgáltat, így a hormon okkal tekinthető a szervezet általános növekedési faktorának. Fontos megjegyezni, hogy növekedési faktor jellegű (proliferációt, sejtnövekedést és túlélést támogató) aktivitását az inzulin magukra az inzulintermelő β-sejtekre is kifejti [19, 20], és ebben a hatásban az IRS-1 és IRS-2 fehérjék szerepét szintén számos megfigyelés támasztja alá [16, 21].

A PKB aktiválódásához köthetők az inzulin által kiváltott metabolikus (anabolikus és vércukorszint-csökkentő) hatások is [18]. Ide tartozik a glikogén-, koleszterin-, zsírsav-, triglicerid-, valamint fehérjeszintézis fokozása, illetve a glukóztermelés és lipolízis gátlása. Szintén az IRS tirozin-foszforilációján keresztül – és részben a PKB közvetítésével – tudja kiváltani az inzulin a GLUT4 glukóztranszporter plazmamembránba való kihelyeződését [22], aminek kulcsszerepe van az izom- és zsírszövet posztprandiális cukorfelvételében, és ezáltal a normális glukóztolerancia fenntartásában.

16

Az inzulinhatás bizonyos negatív visszacsatolásokat is magában foglal, és ezek jellemzően az IRS fehérjék szintjén, azok működésének, illetve mennyiségének módosításával valósulnak meg. Az inzulin által (is) indukált SREBP transzkripciós faktorok például lipogén hatásaik mellett – az IRS-1 és IRS-2 génexpresszióját is csökkentik [23, 24]. Ugyanilyen hatást vált ki az S6K protein-kináz, amely az inzulin jelátvitel részeként (is) stimulálódó "mammalian target of rapamycin" (mTOR) [25] közvetítésével aktiválódik [26]. Legnagyobb jelentősége azonban valószínűleg az IRS kovalens módosításának van. A jelátviteli funkció elidegeníthetetlen részének tekinthető – tirozin-foszforiláció mellett ugyanis az IRS izoformák szerin oldalláncokon is foszforilálhatók. Ilyen típusú kovalens módosítást pedig számos protein-kináz végezhet, és rendszerint gátolja a dokkoló fehérje jelátviteli funkcióját, sőt néha a polipeptid lebontásához is vezet. Az IRS-1 egyik legielentősebb, és leginkább vizsgált foszforilációja a 307-es (egér), illetve 312-es (humán) szerin oldalláncon történik [27], és ez akadályozza az inzulin-receptorral való kölcsönhatást [28]. Negatív visszacsatolásnak tekinthető tehát, hogy az IRS-1 különböző szerin oldalláncait a PKB [29], az mTOR [30], és az általuk aktivált S6K [26], az ERK1/2 [31], illetve atípusos PKC-k [32] egyaránt foszforilálják. Az inzulin jelátvitelének az IRS génexpressziója és kovalens módosítása révén megvalósuló modulálása nem csak "feedback" funkcióval bír, hanem lehetővé teszi egyéb hormonális vagy anyagcsere hatások integrálását is. Patológiás körülmények között mindez vészesen károsíthatja a sejtek inzulin iránti érzékenységét, ami önerősítő szabályozási hurkok miatt az anyagcsere súlyos zavaraihoz vezet.

2.1.2. Inzulinrezisztencia

Szemben a cukorbetegség 1-es típusával, amelynek alapját a pankreász Langerhansszigeteiben az inzulintermelő β-sejtek pusztulása képezi, és ezért abszolút inzulinhiány alakul ki, a 2-es típusú diabéteszben a szervezet inzulinra adott válasza elégtelen, és az inzulinhiány eleinte csak relatív. Mivel az elhízás gyakran vezet inzulinrezisztenciához, ez tekinthető a túlsúly és a 2-es típusú cukorbetegség közti láncszemnek.

Számos tanulmány támasztja alá, hogy a tápanyag-túlkínálat és a túlsúly leginkább az IRS dokkoló fehérjék működésének akadályozásával csökkenti az inzulin iránti érzékenységet. Ez részben az IRS-1 és IRS-2 génexpressziójának gátlását jelenti, hiszen az SREBP-1c aktivitását glukóz és zsírsavak [33], az mTOR-ét pedig általában a magas energiaellátottság és a tápanyagok közül az aminosavak fokozzák [34]. *In vivo* kísérletekben bizonyították, hogy patkány izomszövetben a magas zsírsavszint hatására kialakuló

inzulinrezisztenciáért jelentős részben az IRS-1 SREBP-1c általi repressziója felelős [24]. Az aminosav-túlkínálat okán aktivált mTOR azonban nem csupán a génexpresszió szintjén interferál az IRS aktivitásával, mivel közvetlenül és az S6K közvetítésével is foszforilálja a fehérje egyes szerin oldalláncait [35].

Nem meglepő, hogy az IRS – különösen az IRS-1 – szerin-foszforilációja a diabétesz molekuláris mechanizmusaira irányuló kutatás homlokterébe került. Az elmúlt évek vizsgálatai olyan protein-kinázok IRS-szerin-kináz aktivitását is kimutatták, amelyek nem inzulin hatására aktiválódnak, tehát nem negatív visszacsatolást biztosítanak, hanem egyéb külső és belső, hormonális és metabolikus hatások integrálásával járulhatnak hozzá az inzulinrezisztencia kialakulásához [ezek áttekintését lásd: 27]. Az inzulintól független (heterológ) IRS-szerin-kinázokat lipidek, gyulladásos mediátorok, illetve különböző stresszhatások stimulálják. Jelen értekezés szempontjából – és az ER-stresszhez fűződő kapcsolata miatt (lásd 2.2.4. fejezet) – külön kiemelendő közülük a c-Jun N-terminális kináz (JNK).

Az inzulinrezisztencia az ún. nem inzulinfüggő diabétesz patomechanizmusának legfontosabb eleme, de nem azonos magával a cukorbetegséggel. Az elhízás során és következtében súlyosbodó inzulinrezisztenciát a hiperinzulinémia hosszabb-rövidebb ideig kompenzálhatja. Egyéni prediszpozíció (genetikai alkat és környezeti tényezők) függvénye, hogy a hasnyálmirigy β -sejtek képesek-e az inzulinszekréció fokozásával fenntartani a szükséges hormonhatást, vagy maguk is áldozatul esnek az eltolódott egyensúlynak, és kialakul a diabétesz. Önálló kórképnek tekintjük, és metabolikus szindrómának nevezzük azt az állapotot, amikor az elhízás már inzulinrezisztenciával és jellegzetes anyagcsererendellenességekkel társul.

2.1.3. A metabolikus szindróma

A glukóz-intolerancia, magas vérnyomás, diszlipidémia és törzs körüli elhízás, illetve az ezek hátterében meghúzódó inzulinrezisztencia együttesét metabolikus szindrómának nevezi az orvostudomány [36]. A betegség egységes definíciója [37] óta két és fél évtized telt el, de még napjainkban sincs teljes egyetértés a diagnózis egységes klinikai kritériumai tekintetében. Az ajánlások rendszerint magukban foglalják a derék körfogatát (hasi elhízás), a szérum triglicerid- és "high-density lipoprotein" (HDL) koleszterinszintjét (diszlipidémia), a vérnyomás értékét (hipertenzió), valamint a vércukorszintet, illetve a cukorterhelésre adott választ (glukóz-intolerancia és inzulinrezisztencia). Teljes az egyetértés abban a tekintetben,

hogy a metabolikus szindróma számos szív- és érrendszeri betegség kiemelkedő rizikófaktora. A 2-es típusú diabétesszel való kapcsolata azonban annyira szoros, hogy vannak, akik a nem inzulinfüggő cukorbetegséget a metabolikus szindróma részének tekintik, ugyanakkor a legújabb ajánlás szerint a cukorbetegség inkább a metabolikus szindróma legfőbb kimenetele [36]. Nem meglepő, hogy a betegség előfordulása éppúgy rohamosan növekszik a nyugati és ázsiai országokban, mint az elhízásé és a cukorbetegségé.

Régóta ismert az a tünetegyüttes, amely törzs körüli elhízást, magas vérnyomást, magas trigliceridszintet (és alacsony HDL-szintet), illetve inzulinrezisztenciát foglal magában. Cushing-kórra utal, ha mindezek az eltérések emelkedett plazma-kortizolszinttel, illetve fokozott kortizolszekrécióval (nyál, vizelet) társulnak. A Cushing-szindróma mindazon kórállapotok gyűjtőneve, amelyek a tartósan fokozott glukokortikoid hormonhatás következtében alakulnak ki. Ha ezt idejében nem szüntetik meg, következményként szinte minden esetben 2-es típusú cukorbetegség is kifejlődik [38]. Szembetűnő a metabolikus szindróma és a Cushing-szindróma tünetei közti hasonlóság, illetve nagymértékű átfedés [39]. A két betegséget alapjában véve az különbözteti meg, hogy a Cushing-kór diagnózisához alkalmazott határérték feletti plazma-kortizolszintet a metabolikus szindrómában nem lehet megfigyelni. Sőt, bizonyos esetekben az elhízott egyének vérében alacsonyabb koncentrációt mértek, mint a sovány testalkatúakéban [40-42]. Azonban a hipotalamusz-hipofízismellékvese tengely bizonyos rendellenességeit (emelkedett vizelet-kortizol, diurnális kortizolszint-ingadozás hiánya, a szabályozás stimulálás iránti hiperreszponzivitása, ugyanakkor a dexametazon szupresszív hatásának csökkenése) a metabolikus szindrómában több megfigyelés is alátámasztja [43]. Ezek alapján egyes szakértők felvetették, hogy a metabolikus szindróma a Cushing-kór enyhe változatának tekintendő [44]. Mindez erősen valószínűsíti a glukokortikoid hormonhatás, illetve hormon-homeosztázis zavarának patológiás szerepét az elhízással összefüggő inzulinrezisztencia kialakulásában is.

2.1.4. Kortizol, elhízás és inzulinrezisztencia

Emberben a kortizol a legfontosabb glukokortikoid hormon. Fiziológiás körülmények között a kortizol (cirkadián ritmusban változó) plazmaszintje, illetve a mellékvesekéreg által szekretált hormon mennyisége a hipotalamusz és az agyalapi mirigy kontrollja alatt áll. Különböző stresszhatások (testi vagy pszichés trauma, fertőzés, gyulladás, éhezés stb.) a vér kortizolszintjét jelentősen megemelik, ami szükséges az adott stresszhez való hosszú távú alkalmazkodáshoz. Mivel a hormon magi receptorhoz, ligand által szabályozott transzkripciós

faktorhoz kötődik, effektusa elsősorban génexpressziós szintű változásokon alapul. A kortizol által a szervezet működésére gyakorolt sokrétű hatás kapcsán kiemelendő az energiaraktárak mobilizálása. Serkenti például a lipolízis [45] és a glukoneogenezis enzimeinek expresszióját [46, 47], ami az inzulin hatásaival ellentétes. A glukokortikoid hormonhatás azonban nem egyszerűen antagonisztikus az inzulin hatásával, hanem bizonyos szövetekben akadályozza is annak érvényesülését az inzulin-jelátvitel közvetlen gátlása által [48]. Vázizomzatban például kimutatták az inzulin-receptor csökkent tirozin-foszforilációját [49], valamint az IRS-1 gátló szerin(307)-foszforilációjának fokozódását és ennek következtében az inzulinfüggő glukózfelvétel csökkenését dexametazon vagy lokálisan termelődő kortizol hatására [50]. Hasonló eredményeket kaptak patkány hippokampuszban, ahol a glukokortikoid-kezelés az inzulin-receptor tirozin-foszforilációjának gátlásával redukálta a PKB-aktiválódást, illetve GLUT4-kihelyeződést [51]. Tartós glukokortikoid-kezelés ezért – a szervezet egészét tekintve – inzulinrezisztenciát okoz [52]; ami alól azonban a zsírszövet fontos kivételt képez [53].

A glukokortikoidok humán preadipocitákban – a többi sejttípus esetében megfigyeltektől eltérően – dózis- és időfüggő módon, tartósan fokozzák az inzulin iránti érzékenységet [54, 55]. A jelenség hátterében az IRS-2 közvetlen, valamint az inzulin-receptor és az IRS-1 FOXO transzkripciós faktorok közbeiktatásával kiváltott indukcióját [56], valamint az IRS-1 fokozott tirozin-foszforilációját [54] is kimutatták. A glukokortikoidok által felerősített inzulinhatás szükséges az adipocita-differenciálódáshoz [57], amelyet *in vitro* is rutinszerűen a kétféle hormon kombinációjával szokás kiváltani. Emellett, a szinergisztikus hatás a zsírsejtek triglicerid-raktározását is serkenti [58]; és a két jelenség együttes eredője a kortizolkezelés vagy -túltermelődés által kiváltott zsírfelhalmozódás, amely elsősorban a hasi/viszcerális zsírszövetre jellemző.

A glukokortikoid hormonhatás és az elhízás, illetve az inzulinrezisztencia egyértelmű összefüggései a kortizol szerepét valószínűsítik a humán metabolikus szindróma kialakulásában és progressziójában. Ez persze csak akkor releváns felvetés, ha a túlzott hormonhatás a plazma kortizolszintjének emelkedése nélkül is kialakulhat. Mivel a glukokortikoid-célsejtek helyi kortizolmetabolizmusa szorosan kapcsolódik az ER működéséhez, ezt a kérdést a 2.2.2.3.2. fejezet tárgyalja tovább.

2.1.5. Az emelkedett glukózszint hatásai – glukotoxicitás

A glukóz a szervezet minden sejtje számára felhasználható, sőt bizonyos (pl. az anaerób anyagcserét folytató vagy zsírsavakat felvenni nem képes) sejtek számára

nélkülözhetetlen tápanyag. A túltáplálás – majd később az inzulinrezisztencia – következtében megemelkedett vércukorszint, azaz glukóz-túlkínálat viszont károsítja a sejteket és ez a glukotoxicitás a metabolikus szindróma, illetve a cukorbetegség patomechanizmusának fontos tényezője. A glukózdömping alapvetően reduktív stresszt jelent, hiszen a glukóz oxidatív lebontása emeli a [NADH]:[NAD⁺] arányt. Ez azonban bizonyos alternatív anyagcsereútvonalak felerősítése révén, paradox módon oxidatív stresszhez vezet [59]. E reaktív oxigénintermedier- (ROS-) képződést fokozó, menekülőutak közé sorolható a poliol útvonal, melynek során a glukóz szorbitolon keresztül fruktózzá alakulhat [60]; a hexózamin útvonal, amely a glikolízis fruktóz-6-foszfát intermedierjéből kiinduló reakciósorozat, és aminocukrokat termel [61], valamint a glicerinaldehid-3-foszfát autooxidációja [62]. Kiemelhető az a régóta ismert jelenség, hogy hiperglikémiában fokozódik a fehérjeglikáció [63]. A jelenség felhasználható az átlagos vércukorszint hosszabb időtartamra visszatekintő becsléséhez is a glikált hemoglobin (HbA_{1c}) százalékos arányának meghatározásával [64]. A digliceridek hiperglikémiában fokozódó termelése részben már a lipotoxicitás témakörébe tartozik, ezért ezt a következő fejezet tárgyalja.

2.1.6. Az emelkedett zsírsavszint hatásai – lipotoxicitás, lipoapoptózis

A táplálékkal felvett lipidekből származó zsírsavak zömükben észtereikké (trigliceridek, foszfolipidek, koleszteril-észterek) újraszintetizálódva és kilomikronba csomagolva szívódnak fel a bélből a nyirok-, majd vérkeringésbe [65]. A plazma zsírsavtartalma, pontosabban szabad (FFA), más néven nem észteresített (NEFA) zsírsavtartalma a zsírsejtekben tárolt trigliceridek hidrolíziséből származik. Normális körülmények között a zsírsavszint hosszan tartó éhezésben emelkedik, amikor a zsírraktár mobilizálását az ilyenkor felszaporodó hormonok (pl. glukagon, adrenalin és kortizol) stimulálják, mert a szervezetnek energiaforrásként szüksége van a zsírsavakra [66]. Ezzel szemben elhízásban a zsírdepó túlzott felhalmozódása a zsírsavszint tartós (nem az éhezés idejére korlátozott) és szükségtelen (a tápanyaggal ellátott sejtek által nem igényelt) emelkedésével jár, aminek kiemelkedő szerepe van az inzulinrezisztencia kialakulásában [67].

A zsírsavak nem csupán tápanyag molekulák, hanem jelmolekulák is. A sejtek működését ezért nem csak aerób energiaforrásként és minden komplex lipid obligát építőelemeként, hanem hormonszerűen is befolyásolják. A telítetlen zsírsavak és származékaik tulajdonképpen a peroxiszóma-proliferátor által aktivált receptorok (PPAR-ek) endogén ligandjai [68]. Ezeken keresztül fejtik ki – sejttípusonként és receptortípusonként

eltérő – fiziológiás effektusaikat, amelyek összességében a zsírsavfelhasználás és -raktározás serkentésére, a glukózfelvétel fokozására, valamint az inzulin jelátvitelének erősítésére és a gyulladásos jelátvitel gátlására irányulnak. A PPAR-ek aktiválása tehát alapvetően előnyös, a szabad zsírsavszint és a vércukorszint csökkenése irányába hat, sőt a pozitív visszacsatolás fő komponenseit is fékezi. Éppen ezért váltak a szintetikus PPAR-agonisták a diszlipidémia (pl. fibrátok, a PPARα ligandjai) vagy a diabetes mellitus (pl. thiazolidin-dionok, PPARγ ligandjai) vezető gyógyszertípusaivá [68]. Érdemes itt megjegyezni, hogy a szabad zsírsavak fiziológiás stimulusként (mérsékelt koncentrációban, korlátozott ideig adva) a pankreász β-sejtjeinek inzulintermelését és -szekrécióját is fokozzák, ami feltehetőleg a β -sejtek általános tápanyagérzékelő funkciójába illeszkedik [9]. A zsírsavaknak itt saját sejtfelszíni receptorát (GPR40) is azonosították [69], amely a foszfolipáz C (PLC) aktiválása által erősíti a citoplazmai Ca²⁺-jelet és így az inzulinkiürítést [70].

A zsírsavak, és különösen a telített zsírsavak, kórosan megemelkedett koncentrációban viszont eltérő receptorokhoz kötődve, valamint az anyagcseréjük dömpingszerű felgyorsulása és emiatt részben eltorzulása révén dominánsan gyulladáskeltő és inzulin-deszenzitizáló aktivitással bírnak. Ezért az emelkedett szérum-zsírsavszint az elhízásban kialakuló és metabolikus betegséggé kulminálódó ördögi körök egyik központi eleme. A szabad zsírsavszint megemelkedését ugyanis egyrészt a zsírszövet felszaporodása, másrészt a zsírszövetben kialakuló gyulladás és inzulinrezisztencia okozza; káros hatásai között szerepel ugyanakkor mind a gyulladásos folyamatok felerősödése, mind az inzulinrezisztencia fokozódása, és magát a túlzott zsírraktározást sem csökkenti. A szabad zsírsavak által a különféle sejtekre gyakorolt káros hatásokat összességében lipotoxicitásnak szokás nevezni. Ha az okozott defektus a sejt halálához, jellemzően programozott halálához vezet, akkor lipoapoptózisról beszélünk.

Az utóbbi időszakban egyre több bizonyíték támasztja alá a "Toll-like" receptorok (TLR) lipotoxicitásban betöltött patológiás szerepét [71]. Az alapvetően patogénfelismerő receptorcsalád bizonyos tagjai (TLR2 és TLR4) telített zsírsavakkal is stimulálhatók, így elhízásban fokozódik a nukleáris faktor- κ B (NF- κ B) aktivitása és a gyulladásos mediátorok (pl. IL-6, IL-1 β , TNF- α és monocita kemotaktikus protein-1) termelése. E két TLR közreműködését a β -sejtek lipotoxicitása során kialakuló működészavarokban és sejtpusztulásban is kimutatták [72]. Magukról a TLR-ekről induló, illetve a gyulladásos mediátorok által, saját receptoraikon beindított jelátviteli utak során olyan kinázok aktiválódnak, amelyek az IRS szerin-foszforilációjával gátolják az inzulinhatás kialakulását.

22

Ide tartoznak például a JNK, a p38 MAP kináz, valamint az NF-κB aktiválásban közreműködő inhibitor-kappa-kinázok (IκK-k) [73].

sejtekbe fehérjemediált transzporttal [74] bekerülő А szabad zsírsavak metabolizmusának kötelezően első lépése a koenzim-A-val (KoA) történő konjugáció. Az energia- (ATP-) befektetés árán keletkezett acil-KoA jellemzően eloxidálódik, és energia-(ATP-) termelésre használódik fel. Az ATP-termelő lebontás, vagyis a β-oxidáció a mitokondriumban és részben a peroxiszómában, majd a citrátkör a mitokondriumban zajló oxidatív, aerób folyamat. A magas zsírsavszint esetén kialakuló intracelluláris acil-KoAtúlkínálat egyrészt a kapacitása határáig gyorsítja a lebontást, és ezen belül növeli a peroxiszóma kontribúcióját, másrészt – menekülő útvonalként – kikényszeríti olyan komplex lipidek szintézisét, amelyek az adott sejtben nem, vagy csak sokkal kisebb intenzitással termelődnének. Az előbbi hatás következménye a fokozódó oxidatív stressz [75, 76], míg az utóbbié a di- és trigliceridek, valamint a ceramid felgyülemlése a sejtben [77]. Az oxidatív kiváltott JNK-aktiváció önmagában is IRS-szerin-foszforilációt és stressz által inzulinrezisztenciát okoz [78]. Ehhez adódik a digliceridek és ceramid hatására működésbe lépő protein-kináz C-teta (PKC-Θ), valamint az általa aktivált JNK és IKK ugyanilyen hatása [67, 79]. Maga a triglicerid valószínűleg nem járul hozzá az inzulinrezisztencia kialakulásához, ezért – a korábban elterjedt szemlélettől eltérően – az ektópiás trigliceridfelhalmozódás (máj-, izom- stb. szteatózis) nagy valószínűséggel inkább protektív mechanizmusnak, mint a patomechanizmus részének tekintendő [80].

A lipotoxicitás fogalma magában foglalja a zsírsavak által kiváltott összes sejtműködészavart, amelyek változatos következményekkel járnak, és nyilvánvalóan jelentősen hozzájárulnak a helytelen táplálkozás, az elhízás, a metabolikus szindróma és a diabétesz szövődményeihez. A toxicitás szerteágazó elemei közül itt kiemelendő a legkülönbözőbb sejttípusokban (főleg májban és izomban) kialakuló inzulinrezisztencia [67], valamint a hasnyálmirigy β-sejtekben kiváltott működészavar, csökkent regenerációs készség és fokozott sejthalál [81, 82]. Az inzulinrezisztencia – amelyről e fejezetben sok szó esett – a zsírsavszint (és a vércukorszint) további emelkedését is okozza, így ördögi kört kialakítva nehezíti az anyagcsere-egyensúly kialakulását. Az új egyensúly az inzulinszekréció fokozásával érhető el, ezért egyre nagyobb terhelés hárul a β-sejtekre. Világos tehát, hogy a metabolikus zavar sikeres kompenzálása vagy végzetes progressziója szempontjából a β-sejtekben érvényesülő lipotoxicitás és lipoapoptózis kulcsfontosságú [82, 83]. Az inzulin iránt érzékenyítő ("insulin sensitizer") gyógyszerként már széles körben alkalmazott metforminról

nemrég kimutatták, hogy HepG2 humán hepatóma sejteken és humán Langerhans szigeteken egyaránt véd a lipotoxicitás ellen [84, 85].

A (telített) zsírsavak által a β-sejtekben okozott működési zavar háttere viszonylag alaposan ismert [81]; ugyanakkor kevéssé egyértelműen tisztázottak a programozott sejthalálhoz vezető út elemei [82]. Az inzulin-jelátvitel akadályoztatása egyben az inzulinreceptorról kiinduló és a PKB által közvetített "túlélési jel" érvényesülésének is gátat szab. A PKB ugyanis több ponton is gátolja a mitokondriális apoptózist (vagyis az apoptózis "intrinzik" útvonalát). Szubsztrátjai között szerepelnek például a Bcl-2 fehérjecsalád pro- és antiapoptotikus tagjai (pl. a Bad és a Bax), melyek foszforilációja végső soron gátolja a citokróm c, az Omi, az AIF és egyéb proapoptotikus fehérjék kiáramlását a citoplazmába. A emellett a kaszpáz-9 foszforilációja, valamint számos szabályozó fehérje PKB génexpressziójának befolyásolása révén is anti-apoptotikus hatású [86]. Nem vitás, hogy az IRS fehérjék megfelelő működése a β-sejtek regenerációjához és életben maradásához is szükséges [87, 88]. Az inzulin-receptor azonban nem az egyetlen forrása a "túlélési jel"-nek, tehát a zsírsavak által kiváltott inzulinrezisztencia önmagában nem indokolja a β-sejtek számának jelentős csökkenését. A kurrens elméletek leginkább a már korábban említett ceramid mellett - azzal összefüggésben - a nitrogén-monoxid, illetve az ebből oxidatív stresszben keletkező peroxinitrit szerepét valószínűsítik [89]. Az utóbbi évek kutatásai világítottak rá, hogy az ER-stressz és az organellumból kiinduló jelátviteli mechanizmusok szintén lényegi elemét képezik a lipotoxicitás és lipoapoptózis folyamatainak (lásd 2.2.4. fejezet).

2.1.7. Fruktóz és diabetes mellitus

Az elhízás és a hozzá kapcsolódó anyagcsere-betegségek egyértelműen összefüggenek a "nyugati életmód" terjedésével, ami leegyszerűsítve a túlzott táplálékfelvétel és a kevés mozgás kombinációját jelenti. Az emberi táplálkozás azonban nem csak mennyiségi, hanem minőségi szempontból is jelentős változáson ment/megy keresztül, és az elfogyasztott élelmiszerek összetétele legalább akkora kihívást jelent a metabolizmus számára, mint a felesleges energiaforrás izommunka nélküli felhasználása. A minőségi szempont egyik fontos, és az értekezés szempontjából is releváns példája az egyre fokozódó fruktózfogyasztás.

A gyümölcscukor hatszénatomos monoszacharid, az aldohexóz glukóz ketohexóz izomere. A természetes emberi táplálékban is megtalálható, de fogyasztása az utóbbi évtizedekben rohamosan növekedett, aminek elsősorban az az oka, hogy maga a fruktóz és

annak glukózzal képzett diszacharidja, a szacharóz élelmiszeripari szempontból kiváló és gazdaságos édesítőszer. Az 1960-as évektől számos élelmiszer, különösen üdítőitalok édesítésére előszeretettel használják a magas fruktóztartalmú kukoricaszirupot (HFCS) [90]. A statisztikai adatok pedig egyértelműen arra utalnak, hogy a gyümölcscukor növekvő fogyasztása összefüggésben áll az elhízás, a cukorbetegség, valamint egyes szív- és érrendszeri betegségek előfordulási gyakoriságával [91].

A fruktóz, a glukóztól eltérően, Na⁺-tól független, passzív transzporttal (GLUT5 és GLUT2 transzporterek közreműködésével) szívódik fel a bélből a portális keringésbe, azzal pedig a májba (GLUT2 segítségével) [92]. A bélhámsejtek és a májsejtek hasonló módon használják fel e monoszacharidot; ennek megfelelően előnytelen metabolikus hatásait is egyaránt elszenvedik. A fruktózt először a nagy kapacitású fruktokináz segítségével fruktóz-1-foszfáttá alakítják, ez pedig több lépés után, végül gliceraldehid-3-foszfát, illetve dihidroxiaceton-foszfát formájában csatlakozik a glikolízishez. Ez a lebontó folyamat tehát kikerüli a glikolízis kezdeti szakaszát, benne a szabályozott foszfofruktokináz 1 enzim által katalizált lépést is. A fruktóz lebontása ezért független az inzulinhatástól, és nem érvényesül benne a sejt energiatöltöttségén alapuló, főleg citrát és ATP által közvetített negatív visszacsatolás sem. A fruktóz intenzív és szabályozatlan lebontása a glicerin-3-foszfát, az acetil-KoA és NAD(P)H folyamatos termelődését eredményezi, ami fokozza a májban és a bélhámsejtekben a lipogenezist [93]. Ez a jelenség hozzájárul a viszcerális zsírszövet felhalmozódásához, a diszlipidémiához és az inzulinrezisztenciához, vagyis a metabolikus szindróma és a 2-es típusú diabétesz kialakulását segíti elő [91].

A bélfalban és a májban nem metabolizált, szisztémás keringésben megjelenő fruktóz az extrahepatikus szövetekbe (elsősorban a zsírszövetbe) kerül, ahol a hexokináz alternatív szubsztrátjaként közvetlenül fruktóz-6-foszfáttá alakulva kapcsolódik a glikolízishez. A zsírsejtekben tehát a foszfofruktokináz 1 által katalizált lépéstől kezdve szabályozott a fruktóz lebontása, és nem okoz a fent leírtakhoz hasonló eltolódást a sejt anyagcseréjében. Fontos azonban megjegyezni, hogy a fruktózfogyasztás a glikolízis kezdeti intermedierjeinek (glukóz-6-foszfát és fruktóz-6-foszfát) koncentrációját a máj- és bélhámsejtekhez hasonlóan a zsírsejtekben is megemelheti [94].

2.1.8. Exogén antioxidánsok és diabetes mellitus

A diabétesz (akár inzulinfüggő, akár nem) olyan komplex metabolikus zavart jelent, amelynek részét képezi a fokozott oxidatív terhelés és csökkent antioxidáns védekezés is. A

ROS-felhalmozódás egyrészt fontos kiváltója a betegség szövődményeinek (neurológiai, nefrológiai, kardiovaszkuláris komplikációk, látászavarok stb.), másrészt jelentősen hozzájárulhat a 2-es típusú cukorbetegség progressziójához, amennyiben fokozza a gyulladásos jelpályák és stresszkinázok aktivitását, így súlyosbítja az inzulinrezisztenciát. A jelenséget már régen felismerték, és éppen ezért javallott a különböző antioxidánsok fokozott bevitele cukorbetegségben is [95, 96]. A ROS-befogásra alkalmas exogén vegyületek igen széles repertoárjából, a diabétesszel való különleges kapcsolatuk miatt, részletesebben tárgyaljuk az aszkorbátot és a teaflavanolokat.

2.1.8.1. Aszkorbát

A legismertebb és talán legfontosabb exogén, vízoldékony antioxidáns, a C-vitamin (aszkorbát vagy aszkorbinsav) sajátos kapcsolatban van a cukorbetegséggel. A skorbut (aszkorbáthiány) diabetogén hatására már a múlt század közepén - vagyis az aszkorbát felfedezése után alig másfél évtizeddel – felfigyeltek. Banerjee és munkatársai kimutatták, hogy mesterségesen skorbutizált tengerimalacok glukóztoleranciája jelentősen romlik, és hasnyálmirigyük inzulintartalma mintegy nyolcadrészére csökken [97]. Ezzel összhangban, később a skorbutos állatok hasnyálmirigyének Langerhans-szigeteiben kialakuló morfológiai elváltozásokat is kimutatták [98]. Későbbi, fejlettebb technikával végzett mérések is megerősítették, hogy a normális aszkorbátellátottság elengedhetetlen a hasnyálmirigy β-sejtek optimális inzulinszekréciójához, illetve annak megfelelő szabályozásához [99, 100]. Másfelől az is igaz, hogy túlságosan magas aszkorbátszintek már gátolják a hormon kiürítését [101]. A C-vitamin hiánya azonban nem csak az inzulin termelésének és szekréciójának csökkentése, illetve az inzulintermelő sejtek károsítása révén játszik közre a cukorbetegség kialakulásában. Szintén korai megfigyelés ugyanis, hogy az aszkorbát potencírozza az inzulin hatását, vagyis adott dózisú hormon effektusát növeli, és ugyanazt a hatékonyságot kisebb mennyiségű hormonnal is elérhetővé teszi [102, 103].

Az aszkorbinsav Na⁺-függő, másodlagos aktív transzporttal, a vitamin oxidált származéka, a dehidroaszkorbát pedig GLUT által mediált passzív diffúzióval jut a sejtekbe [104]. Számos tanulmány támasztja alá a hiperglikémia gátló, illetve (bizonyos sejtekben) az inzulin stimuláló hatását a felvételre [105, 106]. A magas vércukorszint és egyidejű inzulinrezisztencia által akadályozott aszkorbátfelvétel, valamint a fokozott intracelluláris aszkorbátoxidáció együttesen magyarázhatja a diabéteszben kialakuló ún. "szöveti skorbut"-ot, és ez is indokolja az egészséges szervezet számára általában javasoltnál magasabb C-vitaminbevitelt cukorbetegségben [107]. A szisztémás vagy a szövetekben kialakuló

aszkorbáthiány azonban nem csak az antioxidáns kapacitás csökkenését jelenti, hiszen az aszkorbát szerepe ennél szélesebb körű. A szöveti skorbut többek között az ER működését is megzavarhatja, ami szintén visszahathat az inzulin-jelátvitelre (lásd 2.2. fejezet). Különösen érdekes ebből a szempontból az a friss tanulmány, amelyben iskoláskorú gyermekek mikronutriens-státuszának összefüggését vizsgálták az elhízással és inzulinrezisztenciával. Korábbi (felnőtteken kapott) eredményekkel [108, 109] összhangban kiderült ugyanis, hogy az alacsony aszkorbátszint (szubklinikai skorbut) korrelál az elhízással (testtömeg-index, testzsír, hasi zsír, derékkörfogat), a gyulladással és az inzulinrezisztenciával [110].

Számos megfigyelés valószínűsíti tehát a C-vitamin elhízással és diabétesszel szembeni védő hatását, de a háttérben rejlő mechanizmusok még nem teljesen tisztázottak, ezért mindenképpen további vizsgálatokat érdemelnek.

2.1.8.2. Teaflavanolok

Nehezen magyarázható a kiemelt táplálkozási és életmódbeli rizikófaktorok különbözőségével az elhízás, a diabétesz, a kardiovaszkuláris betegségek és egyes daganatok távol-keleti népeknél megfigyelhető, viszonylag alacsony incidenciája. Ezt az "ázsiai paradoxon"-nak nevezett jelenséget sokan a zöldtea rendszeres fogyasztásával hozzák kapcsolatba; a távol-keleti teafogyasztás ugyanis messze felülmúlja az európait és észak-amerikait [111]. Nem meglepő, hogy a tea ital és az alapjául szolgáló tea növény (*Camellia sinensis*) biológiailag aktív összetevői és azok szervezetre gyakorolt hatásai intenzív kutatás tárgyát képezik. Mivel a tea bioaktív molekuláinak körülbelül egyharmadát polifenolok, azon belül is flavonoidok alkotják, ezekről rendelkezünk a legtöbb ismerettel [112].

A tea flavonoidjai főként katekinek, és a növény levelében, illetve annak főzeteiben legnagyobb mennyiségben az (-)-epikatekin, az (-)-epikatekin-3-gallát, az (-)-epigallokatekin és az (-)-epigallokatekin-3-gallát (EGCG) fordul elő [113]. Az emberi táplálkozásban a katekinek elsődleges forrása a zöldtea, melynek előállítási technológiája megakadályozza, hogy a polifenol-oxidáz enzim működésbe lépjen. Az ily módon prezervált katekinek, a teaflavanolok az összes flavonoidtartalom kb. 80%-át teszik ki (míg a fekete teákban csupán 20-30%-át). Számottevő, bár a zöldteánál kisebb mennyiségű katekint tartalmaz a vörösbor, a kékszőlő, az alma és a csokoládé is [114, 115]. A teaflavanolok között kiemelt jelentőségű a szárított tea teljes tömegének több mint 10%-át kitevő EGCG. Ezt a hatóanyagot vizsgálták a legkiterjedtebben, ezért róla rendelkezünk a legtöbb adattal, és a rendszeres teafogyasztás jótékony hatásainak túlnyomó részét is neki tulajdonítják [116]. Előnyös élettani és biokémiai

hatásaival számtalan tanulmány foglalkozik. A többi polifenolhoz hasonlóan hatékony antioxidáns [117], de az *in vivo* észlelt tumorellenes és antidiabetikus hatásai hátterében az *in vitro* vizsgálatok számos specifikus molekuláris mechanizmust is feltártak [118].

Jelen tanulmány szempontjából legfontosabb az EGCG elhízás, metabolikus szindróma és 2-es típusú cukorbetegség elleni, sokszorosan alátámasztott, védő hatása. A jelenséget rengeteg humán vizsgálat és állatkísérlet támasztja alá, és magyarázatára különböző molekuláris célpontokat azonosítottak [119, 120]. Az EGCG által az inzulinrezisztencia kialakulása és fokozódása ellen kifejtett hatás mechanizmusa nem tekinthető tisztázottnak, és ebben a vonatkozásban az ER esetleges szerepe különösen érdekes, feltáratlan terület.

2.2. Az endoplazmás retikulum és kapcsolata a metabolikus szindrómával

A sejtmaggal rendelkező humán sejtekben kisebb-nagyobb ER is található, és ebben az intermedier anyagcsere és a biotranszformáció (a jelmolekulák – hormonok, neurotranszmitterek, neurohormonok – anyagcseréje, illetve méregtelenítés) rendkívül fontos folyamatai zajlanak. Az utóbbi évek kutatásai rohamosan gyarapodó ismeretanyaggal támasztják alá az ER megváltozott működésének kiemelt szerepét a rosszindulatú daganatoktól a neurodegeneratív betegségekig a legtöbb humán kórképben. Mára kétséget kizáróan bizonyítottnak tekinthető, hogy az organellum funkciózavarai a jelen értekezés fókuszában lévő anyagcsere-betegségek kialakulásában és progressziójában is rendkívül fontosak, és a megelőzés vagy gyógyítás ígéretes molekuláris célpontjait kínálják. E fejezet tehát az ER működésének különösen a metabolikus szindróma és a diabetes mellitus szempontjából releváns vonatkozásait összegzi, illetve kiemel néhány táplálkozási tényezőt, amely az organellum normális működéséhez szükséges, vagy éppen annak felborulásához vezethet.

2.2.1. Az endoplazmás retikulum felépítése és luminális mikrokörnyezete

Az ER az endomembrán rendszer központjaként és forrásaként minden eukarióta sejtben jelen van. Mérete az adott sejt típusától és aktuális állapotától függően igen változatos lehet. Vannak olyan sejtek, amelyekben az ER alig különül el a sejtmagburoktól, de szekréciós fehérjéket nagy mennyiségben termelő, intenzív lipidanyagcserét és/vagy biotranszformációt folytató sejtekben akár a citoplazma nagy részét kitöltheti. Májsejtekben például az ER membránja a mitokondriális membránokat leszámítva az összes membránnak

körülbelül 90%-át teszi ki [121]. Előfordul, hogy az organellum egy specializált funkció ellátása érdekében sajátos morfológiai tulajdonságokra tesz szert, amire jó példa a harántcsíkolt izomrostokban található szarkoplazmás retikulum.

Az ER, méretétől függetlenül, egyetlen, folytonos membránnal, és – ennek megfelelően – egyetlen, a citoplazmátol teljesen elkülönült lumennel rendelkezik [122, 123]. A membrán alapstruktúrája a biológiai membránokra általában jellemző, integráns és perifériás fehérjéket tartalmazó lipid-kettősréteg. Összetétele annyiban sajátságos, hogy a plazmamembránhoz és más intracelluláris membránokhoz képest rendkívül magas fehérje:lipid arány és alacsony koleszterintartalom jellemzi [124]. Az organellum funkcióinak nagy része a membránhoz és az abban elhelyezkedő fehérjék aktivitásához kötődik, ezért nem meglepő, hogy az ER membránja a felszínéhez képest viszonylag csekély térfogatú luminális kompartmentet fog közre.

Az organellum két legismertebb része/típusa, a durva, illetve a sima felszínű ER morfológiai jegyek alapján jól megkülönböztethető egymástól [125], de a fentieknek megfelelően egy egységbe tartoznak, hiszen membránjuk és lumenük folytonos egymással. Ahogy a sima felszínű domén egybeolvad a durva felszínűvel, úgy folytatódik a struktúra a sejtmagburokban, amely így voltaképpen az ER harmadik fő részének is tekinthető. Nem kérdéses azonban, hogy jellegzetes szerkezeti elemei és a sejtmag funkcióihoz inkább kötődő működése miatt e domén a másik kettőtől határozottan elkülönül [126].

Az ER, elektronmikroszkópos felvételen szembetűnő, durva felszíne a jellemzően lemezes, lamellás alakzatban hajtogatott membrán külső (citoplazma felőli) oldalához tapadó riboszómáknak köszönhető. A riboszómáktól mentes, így sima felszínű ER bonyolult csőhálózatot alkotó, tubuláris felépítést mutat. E jól definiált morfológiai eltérések kevésbé egyértelmű funkcionális különbségekkel járnak együtt. Nyilvánvaló, hogy az organellum egyik kiemelt feladata, a fehérjeszintézis a durva felszínű ER-ben zajlik, és joggal feltételezhető, hogy az itt polimerizált peptidláncok érése is elsősorban e részhez köthető. Logikus következtetés, hogy a sejtszervecske egyéb, a szénhidrát- és lipid-anyagcserével, illetve biotranszformációval kapcsolatos feladatai viszont főként a sima felszínű ER-re hárulnak. Az organellum fehérjéi – a transzlokon csatornák (és a hozzájuk kapcsolódó riboszómák) kivételével – ugyanakkor általában egyaránt megtalálhatók a durva és sima felszínű részekben. A fehérje-szubkompartmentáció ilyetén hiánya megkérdőjelezi a funkciók határozott elkülönülését.

Az ER finomabb szerkezetének tanulmányozása rávilágított bizonyos dinamikus "szubdomének" létezésére is. Az ER közvetlen kapcsolatot létesít a sejt szinte minden organellumával, valamint a plazmamembránnal. Az így kialakult kapcsolódási régiók sajátos összetétellel és tulajdonságokkal rendelkeznek, azonban – a sejt változó igényeihez való folyamatos alkalmazkodás részeként – állandó átstrukturálódás jellemzi őket [127].

Az ER az endomembrán rendszer kiindulópontjaként membránlipid és -fehérje gyárként üzemel, valamint saját metabolikus funkcióinak jelentős része is magában a membránban zajlik. Ez magyarázhatja, hogy az organellum membránfelszínéhez viszonyított luminális térfogata rendkívül alacsony – a körülzárt, belső tér még kiterjedt ER hálózattal bíró sejtekben is csupán a sejt teljes térfogatának nagyjából 10-15%-át adja [121]. A kis belső volumen megkönnyíti egy jellegzetes belső mikrokörnyezet kialakítását és fenntartását. Aktív transzport és enzimatikus folyamatok, valamint az ER membrán barrier funkciója következtében ugyanis az organellum lumenében a citoplazmától karakterisztikusan eltérő miliő jön létre, amelyre jellemző a viszonylag magas kalcium-, proton- és aszkorbát/dehidroaszkorbát-koncentráció, valamint az alacsony [tiol]:[diszulfid] arány.

Az extracelluláris tér viszonyaihoz hasonló, a citoplazmainál mintegy négy nagyságrenddel magasabb Ca²⁺-koncentráció a szarko/ER kalcium ATP-áz (SERCA) pumpa aktivitásának köszönhető. Az így kialakuló, dinamikus Ca²⁺-raktár alapvető fontosságú a jellegzetes citoplazmai kalciumjel létrehozása szempontjából. Nem elhanyagolható következménye azonban, hogy számos, az ER lumenében elhelyezkedő és a különleges környezethez adaptálódott fehérje csak mM-os nagyságrendű Ca²⁺-koncentráció esetén működik megfelelően. Az újonnan szintetizált fehérjék érésében közreműködő chaperonok és foldázok zömét például nagyfokú kalciumfüggés jellemzi [128]. Ezzel magyarázható, hogy a luminális kalciumraktárak depléciója fehérjeérési zavarhoz és ER-stresszhez is vezet [129].

A fehérjeszekréciós pálya organellumaiban jellegzetes pH-gradiens alakul ki, melynek fontos szerepet tulajdonítanak az érési és célba juttatási folyamatokban. A szekréciós pályán az ER-től a sejtmembrán felé haladva fokozatosan nő a protongradiens, vagyis jellemzően egyre savasabb a luminális környezet. Élő sejtekben molekuláris pH-szenzorokkal végzett mérésekkel kimutatták, hogy a lumen savasodása valóban már az ER-ben elkezdődik; habár itt a citoplazmainál még csak néhány tizeddel alacsonyabb, közel semleges pH detektálható [130, 131].

Az élő sejtek ER-jében uralkodó aszkorbát/dehidroaszkorbát-koncentrációkról sajnos – közvetlen mérési adatok hiányában – nem áll rendelkezésünkre adat, de a szekréciós pálya néhány jobban megközelíthető komponensében magas (mM-os) szinteket észleltek. Közvetett bizonyítékok támasztják tehát alá az aszkorbát felhalmozódását az ER-ben és a szekréciós pálya egyéb vezikulumaiban [132-134]. Ez a megfigyelés összhangban van az itt található bizonyos Cu⁺-tartalmú monooxigenázok (pl. peptidil-glicin α -amidáló monooxigenáz, dopamin β -hidroxiláz), valamint Fe²⁺-tartalmú dioxigenázok (pl. peptidil prolil-/lizilhidroxiláz) jelentős aszkorbátfüggésével [135].

Az aszkorbát feltételezett luminális felhalmozódása a redukált glutation (GSH) lokális hiánya következtében jelentősen meggyengült antioxidáns védelem megerősítése szempontjából is előnyös, illetve szükséges lehet. A citoplazmától eltérően ugyanis az ER belsejében elhelyezkedő tiol csoportok – akár a fehérjék, akár a glutation ciszteiniloldalláncának részét képezik – túlnyomórészt oxidált állapotban (diszulfidként) vannak jelen. Nagy mennyiségben található itt fehérje-glutation vegyes diszulfid [136]; a szabad glutationnak pedig körülbelül fele-negyede oxidált diszulfid (GSSG) [136, 137], míg a sejt összes glutationjára vonatkoztatva a GSSG mennyisége csupán alig több mint egy-két százalék [137]. Jól szemléltethető a luminális tiol redox státusz sajátos volta a glutation redox potenciáljával is, amelynek szenzorral mért, illetve számított értéke -118 és -180 mV, vagyis lényegesen magasabb a citoplazmai -240 mV-nál [137, 138]. A lumen tehát tioloxidáló környezetnek tekinthető, ami nélkülözhetetlen az itt zajló, oxidatív fehérjeéréshez (lásd 2.2.2.2.2 fejezet), ugyanakkor jelentősen csökkenti az egyik legfontosabb, vízoldékony antioxidáns (a GSH) protektív működését.

Az, hogy egy reakció az ER membránjának külső (citoplazma felőli) felszínén vagy belső (luminális) oldalán zajlik, több egyszerű topológiai kérdésnél. A külső felszínen működő enzimek ugyanis minden akadály nélkül hozzájutnak a szubsztrátjaikhoz, és közvetlenül befolyásolják őket a citoplazmai környezet változásai. Ezek tehát lényegében a citoplazmához tartoznak, az ER membránja csupán vázat szolgáltat számukra, ahol funkcionális komplexeket alkothatnak, és hidrofób fázist, amely szükséges szubsztrátjaik megkötéséhez és továbbadásához. Azok az enzimek azonban, amelyek a membrán belső felszínén vagy szabadon a lumenben működnek, csak transzportfolyamatok révén tarthatnak kapcsolatot a sejt többi részével. A membránban elhelyezkedő transzporterek szabják meg, hogy mely szubsztrátokhoz és milyen sebességgel férhetnek hozzá, és a transzporterek

működésén múlik, hogy milyen miliő veszi őket körül. Ezek tehát az ER elkülönült enzimei/enzimrendszerei, melyek az organellumot valódi metabolikus kompartmentté teszik.

Az ER membránjának korábban említett sajátos összetételével is összefügghet a sokszor megfigyelt, kismértékű, általános permeabilitás [139]. Azt azonban nem lehet kijelenteni, hogy a kis molekuláknak szabad átjárása van a citoplazma és az ER lumene között. Az általános permeabilitás kritikával kezelendő, ugyanis a membránon keresztüli diffúzió sebessége általában lényegesen kisebb, mint a lumenben zajló enzimatikus reakcióké, tehát nem hárulhat rá a lokális enzimek szubsztrátellátása. Számos bizonyíték támasztja alá a specifikus transzporterek szükségességét és jelenlétét az ER membránjában.

A szubsztrátok és termékek transzportjának szerepét jól mutatja a latencia jelensége. A luminális aktív centrummal rendelkező enzimek mért aktivitása függ az ER membránjának épségétől. Legnagyobb enzimaktivitás akkor mérhető, ha a membránt permeabilizáló ágenssel (pl. Triton X-100, deoxi-kolát, glicerin stb.) vagy pórusképző antibiotikummal (alameticin) átjárhatóvá tettük kismolekulák számára. A latencia számszerűsítése céljából rendszerint megadjuk, hogy ép membrán esetén a teljes aktivitás hány százaléka látens. Ha pl. egy enzim aktivitása permeabilizálás nélkül csak egy negyede annak, amit permeabilizálás után mérünk, akkor a latencia 75%-os.

A jelenség egyaránt megfigyelhető preparált ER-eredetű membránvezikulumokban (mikroszómában) és az ER-ben *in situ* [140]. Mértéke enzimenként széles határok között változó; vannak olyan luminális enzimek, amelyek nem mutatnak latenciát, de előfordul 97-98%-os latencia is. Sőt, van olyan – kevéssé szelektív – luminális enzim, amely az egyik szubsztrátjára nézve közel 100%-os, míg egy másik szubsztrát vonatkozásában alig 40%-os latenciát mutat (lásd 2.2.2.4. fejezet). Mindezt legjobban azzal magyarázhatjuk, hogy a szubsztrát (esetleg termék) transzportja sebességmeghatározó lépése az enzimatikus folyamatnak. Vagyis, ha az enzim szabadon hozzáférhet a szubsztrátjához (és szabadon eltávolíthatja a termékét), akkor az enzim nagyobb sebességgel tud működni.

2.2.2. Az endoplazmás retikulum legfontosabb funkciói

A durva és sima felszínű ER számos sejtbiológiai és biokémiai folyamatban vesz részt. Itt található a sejt legjelentősebb belső kalciumraktára, amely alapvető szerepet játszik a sejt szabályozási mechanizmusaiban [141]. Itt szintetizálódnak és érnek azok a fehérjék, amelyek funkciójukat ER-ben, a Golgi apparátusban, a lizoszómában vagy a plazmamembránban látják el, esetleg szekretálódnak a sejtből [142]. Ide kerülnek és itt kapcsolódnak a "major

histocompatibility complex" (MHC) fehérjéihez azok a peptidek, amelyeket a sejt mint antigéneket a felszínen prezentál [143]. A szénhidrát-anyagcsere egyik alapvető folyamatát, a glukóz szintézisét az ER enzime katalizálja [144], de a glukóz-6-foszfát oxidálódik is ebben az organellumban, amelynek a lokális redox homeosztázisban van fontos szerepe [145]. A lipidanyagcsere több enzimrendszere az ER membránjához kapcsolódik [146]: itt zajlik a koleszterin, a foszfolipidek és a trigliceridek szintézisének legtöbb lépése, itt jönnek létre a koleszterin acil-észterei, itt hosszabbodnak meg, illetve kapnak kettős kötéseket a zsírsavláncok, és itt történik azon módosítások javarésze, amelyek során a koleszterin epesavakká vagy szteroid hormonokká válik. Ez utóbbi folyamatok egyben a biotranszformáció első (ún. előkészítő) fázisához is tartoznak, amelynek legfontosabb enzimei, a citokróm P450 monooxigenázok az ER membránjának integráns fehérjéi [147]. Ezek rendkívül változatos endogén és exogén szubsztrátok (endobiotikumok, illetve xenobiotikumok) átalakítását végzik, melyek közül a koleszterin csak egy – bár igen fontos – példa. A biotranszformáció első fázisához tartoznak a 11β-hidroxiszteroid-dehidrogenáz izoenzimek is, amelyek a glukokortikoidok oxidoredukcióját, és ezáltal prereceptoriális aktiválását vagy inaktiválását katalizálják az ER-ben [148]. A biotranszformáció második (ún. konjugációs) fázisának legfontosabb enzimei, az UDP-glukuronozil-transzferázok szintén az ER integráns membránfehérjéi [149]. Ráadásul az ellentétes, dekonjugációs reakciók egy része is ehhez a kompartmenthez kötődik.

Természetesen az ER nem lenne képes ellátni ezeket a feladatokat anélkül, hogy a sejt többi kompartmentjével állandó kapcsolatban állna. A kapcsolatok részben abban nyilvánulnak meg, hogy a luminális enzimek szubsztrátja és termékei szelektíven átjutnak az ER membránján, mely folyamatok az enzimaktivitás és szubsztrátspecificitás alapvető meghatározói lehetnek. Azonban ugyanilyen fontos, hogy az ER jelzéseket fogad és jelzéseket generál, vagyis részt vesz a sejt működésének szabályozásában is. Az ER működési zavarairól – az ER-stresszről – speciális jelátviteli útvonalak révén értesül a sejt (lásd. 2.2.4. fejezet). E jelzések alapvetően meg tudják változtatni a génexpressziót mind transzkripciós, mind transzlációs szinten; a sejt ugyanis mindent elkövet, hogy az ER létfontosságú funkcióit fenntartsa. Mi sem bizonyítja ezt jobban, mint az a tény, hogy amennyiben nem sikerül az ER-stresszt kivédeni, a helyzetet normalizálni, aktiválódik az apoptotikus kaszkád, és a sejt megsemmisül.

2.2.2.1. Kalciumhomeosztázis

Bár az értekezés téziseihez csak közvetve kapcsolódik, kiemelendő az ER funkciói közül a sejtek kalciumhomeosztázisában, és ezen keresztül a külső ingerekre adott sejtszintű válasz kialakításában betöltött szerep. Az ER lumenében, az extracelluláris térhez hasonlóan, a citoplazmára jellemzőnél nagyjából 10000-szer magasabb a kalciumkoncentráció. Ez aktív transzportfolyamatnak, a SERCA pumpák folyamatos működésének köszönhető [150]. Nem csupán az itt tárolt Ca²⁺ mennyisége, hanem elsősorban annak szabályozott és gyors mobilizálhatósága teszi az ER-t a legfontosabb intracelluláris kalciumraktárrá. Az IP₃-receptor Ca²⁺-csatornák a legkülönfélébb sejtek ER membránjában megtalálható, és változatos sejtfelszíni receptorokból kiinduló jelátviteli folyamatokban vesznek részt [151]. A rianodin-receptor Ca²⁺-csatornák (RyR) pedig elsősorban a harántcsíkolt és szívizom, valamint a neuronok intracelluláris válaszreakcióinak kialakításában fontosak [152].

Az ER-ben tárolt kalcium különböző kinetikával, illetve dinamikával juthat a citoplazmába, és kialakíthatja a rövid, tüskeszerű szignált vagy a tartós kalciumjelet. Ez utóbbinak a programozott sejthalál szabályozásában is kiemelt szerep jut, amely egyre intenzívebb kutatás tárgya [153, 154]. Amikor a citoplazmában kalciumszignál alakul ki, azaz megemelkedik a szabad Ca²⁺ ion koncentrációja, ez együtt jár az ellentétes irányú változással az ER lumenében, hiszen a kalcium jelentős része innen származik. E tekintetben különösen fontos, az organellum luminális enzimeinek, különösen chaperon és foldáz fehérjéinek korábban is említett kalciumfüggése [128]. A rendszer összetettségét és sebezhetőségét jól mutatja, hogy az ER-stressz kalciumkiáramlást okoz [129], a luminális kalciumszint csökkenése pedig (további stresszként) rontja az organellum működését [155].

2.2.2.2. Fehérjeszintézis és -érés

A riboszómákon szintetizálódó polipeptidek egy része olyan, N-terminális szignál szekvenciáját tartalmaz, amely a létrejövő fehérjét az ER-be irányítja. Ilyen esetben, a szignál megjelenésekor, vagyis a polimerizáció kezdetén egy "signal recognition particle" (SRP) nevű ribonukleoprotein komplex leállítja a transzlációt, és hozzákapcsolja a riboszómát az ER (emiatt durva) felszínéhez. Ezután a továbbszintetizálódó fehérje a transzlokon peptidcsatornán keresztüli kotranszlációs transzporttal az ER lumenébe, illetve membránjába kerül [156]. A lumenbe került fehérjék és fehérjedomének itt nyerik el natív konformációjukat, és itt történnek ko-, illetve poszttranszlációs módosulásaik. Végül egy
részük itt is marad, többségük azonban vezikuláris transzporttal jut rendeltetési helyére, és útközben még további módosulásokon mehet keresztül.

A transzlokon peptidcsatornán a lumenbe jutó fehérjét bizonyos enzimek már a szintézis közben átalakítják, és a folyamat addig tart, amíg a fehérje el nem éri végső, natív konformációját.

- A szignál szekvenciát egy erre specializált peptidáz hasítja le.
- A polipeptidláncot dajkafehérjék veszik gondjaikba, és elősegítik a helyes hajtogatást.
- Ahol a másodlagos szerkezet ezt megkívánja, a peptidil-prolil cisz-transz-izomeráz enzim a megfelelő peptid kötéseket cisz konfigurációjúvá alakítja.
- Egyes fehérjék prolil vagy lizil oldalláncai hidroxilálódnak.
- Néhány fehérje glutamil oldalláncai γ-karboxilálódnak.
 A sajátos mechanizmusú karboxiláció a májsejtek ER-jében zajló K-vitamin ciklus részét képezi, és a hemosztázis egyes fehérjéire jellemző.
- Kialakulnak a láncon belüli, illetve láncok közötti diszulfid hidak.
- A fehérjékhez oligoszacharid csoport kapcsolódik, így glikoproteinek jönnek létre.

2.2.2.2.1. Az endoplazmás retikulum chaperon, foldáz és lektin fehérjéi

Az intenzív fehérjeszintézis és -érés megkívánja, hogy az ER-ben nagy mennyiségben jelen legyenek a molekuláris chaperonok (dajkafehérjék), illetve a hajtogatást (foldingot) elősegítő fehérjék (foldázok). Ide tartoznak azok a – következő fejezetben tárgyalt – enzimek is, amelyek a diszulfidhidak kialakítását és izomerizációját katalizálják.

Az ER számos klasszikus dajkafehérjét tartalmaz, amilyen a BiP (GRP78) [157], a GRP94 [158] és a GRP170 [159]. Ezeknek a fehérjéknek és a később bemutatott proteindiszulfid-izomeráznak az expressziója glukózéhezésben vagy ER-stresszben (amikor hibásan hajtogatott fehérjék halmozódnak fel a lumenben) megemelkedik, ami növeli az organellum fehérjeérlelő kapacitását [160].

Az ER két rendhagyó dajkafehérjéje a kalnexin [161] és a kalretikulin [162]. A kalnexin integráns membránfehérje, amely nagy és kis affinitású Ca^{2+} -kötőhelyekkel rendelkezik [163]; a kalretikulin pedig hasonló Ca^{2+} -kötő tulajdonságokkal jellemezhető, szabad, luminális fehérje [164]. Mindkettőjük lektinszerű tulajdonsággal bír, azaz képesek megkötni a monoglukozilált-N-glikoproteineket [165] (lásd 2.2.2.2.4. fejezet). Kémiai keresztkötéses vizsgálatok azt mutatják, hogy a kalnexin és a kalretikulin egy lazán

összekapcsolt heterogén fehérjehálózat része, amelyben a BiP, a GRP94, és néhány egyéb ER-fehérje is részt vesz [166].

2.2.2.2.2. A diszulfid hidak kialakulása

Az ER lumenében natív konformációjukat elért fehérjék harmadlagos és negyedleges szerkezetét rendszerint diszulfid hidak stabilizálják [167, 168]. Az értekezés szempontjából külön kiemelendő, hogy az érett, humán inzulin is három diszulfid hidat tartalmaz, melyek közül kettő a két peptidláncot köti össze [169]. A diszulfid kötés a ciszteinil oldalláncok tiol csoportjainak oxidációjával keletkezik, ami két hidrogénatom elvonását jelenti. A natív fehérje tioljait a tiol-diszulfid-oxidoreduktázok diszulfidjai oxidálják; a folyamatot tioldiszulfid-kicserélődésnek nevezzük (1. A ábra). A folyamat során minden esetben kimutatható az átmenetileg jelen lévő kevert diszulfid a két molekula között, majd végeredményként az eredetileg oxidált állapotban lévő tiol csoportok redukálódnak, a redukáltak pedig oxidálódnak. Ez a kicserélődési reakció a két résztvevő fehérje redox állapotától függően eredményezheti a natív fehérje tioljainak oxidációját, rossz helyen képződött diszulfidjainak redukcióját vagy átrendeződését (izomerizációját) (1. B ábra). A szubsztrátfehérjékkel közvetlenül érintkező tiol-diszulfid-oxidoreduktázok a tioredoxin fehérjecsalád tagjai. A bennük található közös motívumot ("thioredoxin fold") először az E. coli tioredoxin nevű fehérjéjében írták le, és ez tartalmazza a Cys-X-X-Cys szekvenciát, ahol a tiol-diszulfid-kicserélődés történik [170].

A prokariótákban a natív fehérjék diszulfid kötéseit a periplazmában található DsbA ("disulfide bond A") nevű tiol-diszulfid-oxidoreduktáz alakítja ki [171, 172]. A DsbA tioljait a belső membránban elhelyezkedő DsbB enzim oxidálja, amely az elektronokat két úton tudja továbbítani: aerób körülmények között ubikinon részvételével molekuláris oxigénre, illetve anaerób viszonyok esetén menakinon közreműködésével különböző oxidált vegyületekre, pl. nitrátra vagy fumarátra. A rossz helyen kialakult diszulfid hidak redukcióját, illetve a diszulfidizomerizációt szintén tiol-diszulfid-oxidoreduktáz enzimek katalizálják. A natív fehérjékkel közvetlenül reagáló DsbC tiol csoportjainak redukált állapotát a membránban elhelyezkedő DsbD tartja fenn. Ez az elektronokat a citoplazma felől tioredoxintól kapja, amelyet a tioredoxin reduktáz redukál NADPH felhasználásával.



1. ábra Tiol-diszulfid-kicserélődés

A: A natív fehérje (fekete) tioljait egy tioredoxinszerű fehérje (szürke) diszulfidja oxidálja. A folyamat intermedierjeként kialakul a két fehérje vegyes diszulfidja.

B: A két résztvevő fehérje redox állapotától függően a tiol-diszulfid-kicserélődés eredményezheti a natív fehérje tioljainak oxidációját, rossz helyen képződött diszulfidjainak redukcióját vagy átrendeződését (izomerizációját).

Az eukarióta sejtek ER-jében zajló diszulfidképzés és -izomerizáció mechanizmusának egyes elemei szintén ismertek. A folyamat, és az azonosított fehérjék sok hasonlóságot mutatnak a prokarióta periplazmában leírtakkal. A proteindiszulfid-izomeráz (PDI), amely közvetlenül reagál a natív fehérjékkel, nélkülözhetetlen eleme a tioloxidációnak, a diszulfidredukciónak és a diszulfidizomerizációnak egyaránt (1. B ábra). Azonosítottak három tiol-oxidáz flavoproteint (Erol: "endoplasmic reticulum oxidoreductase 1", Erv2: "essential for respiration and vegetative growth 2" és QSOX: "quiescin sulfhydryl oxidase") – közülük kettő (Erol és QSOX) emberben is megtalálható -, amelyek részt vesznek a natív fehérje vagy a PDI tioljainak oxidációjában, és az elektronokat - közvetve vagy közvetlenül végül oxigénre juttatva hidrogén-peroxid keletkezését eredményezik (2. ábra).





2. ábra Diszulfidképződés többsejtű, eukarióta szervezetekben
A: A natív fehérje tioljairól flavoproteinek (Ero1 vagy QSOX) által katalizált reakció során kerül két elektron (hidrogén) az oxigénmolekulára. A reakcióban a PDI közvetítő szerepet játszik. Feltételezhető, hogy a fehérjetiolok más úton is oxidálódhatnak.
B: A tiol-oxidáz flavoproteinek (Ero1, Erv2 és QSOX) által katalizált reakció. Erv2 és QSOX esetében közvetlenül, Ero1 esetében még nem tisztázott módon kerülnek az elektronok az oxigénre

Ero1: "endoplasmic reticulum oxidoreductase 1"; Erv2: "essential for respiration and vegetative growth 2"; PDI: proteindiszulfid-izomeráz; QSOX: "quiescin sulfhydryl oxidase".

A PDI negyven évvel ezelőtti izolálása világított rá, hogy a fehérjékben található ciszteinil-diszulfidok létrejötte enzimatikus folyamat [173, 174]. Ez az enzim képes katalizálni а tiolok oxidációját (diszulfidképződés), а diszulfidok redukcióját (diszulfidhasítás), valamint átrendeződését (diszulfidizomerizáció); sőt még chaperon funkcióval is bír. A PDI alapvető szerepét nyilvánvalóvá teszi, hogy az egyik legnagyobb mennyiségben előforduló enzim az emlős és élesztő sejtek ER-jének lumenében; a sejt teljes fehérjetartalmának mintegy 0,8 %-át teszi ki [175]. Funkciója nélkülözhetetlen, így nem véletlen, hogy fajspecifikus változatai nagyfokú konzervativitást mutatnak [176]. Az 55 kDaos fehérje C-terminális része egy típusos "ER-ben tartó" szignál szekvenciát hordoz. A PDI a tioredoxin szupercsalád tagja; az aktív enzim öt doménjéből négy ún. "tioredoxinszerű domén". Az ER lumenében kimutattak más hasonló szerkezetű fehérjéket is, pl. ERp72 [177], P5 [178], ERp57 (vagy ERp61) [179] stb., melyeknek feltehetőleg szintén szerepük van a diszulfid hidak képződésében és izomerizációjában.

Miután a PDI átvette az érlelődő fehérje két ciszteinil oldalláncának egy-egy elektronját, ezeket továbbítania is kell az oxigén felé. A diszulfidképződéshez kapcsolódó elektrontranszfer lánc PDI után következő láncszeme fiziológiás körülmények között leginkább az Ero1 fehérje [180], melyet először élesztőben azonosítottak [181, 182]. Az Ero1hiányos mutánsok ER-jében felhalmozódnak a nem kellően oxidált fehérjék, ami hasonlít a vad típusú sejtek redukálószeres (ditio-treitol: DTT) kezeléssel kiváltható foldingzavarához. Ráadásul a mutáns sejtek működése és életképessége helyreállítható tioloxidáló-szer (diamid) hozzáadásával. Mindez jól mutatja, hogy az Ero1 legfontosabb szerepe az ER-ben lévő oxidatív környezet fenntartása.

Szemben az emlős sejtekkel, élesztőben az Ero1 nélkülözhetetlen a fehérjeéréshez és a sejt életben maradásához. Az Erol-deficiens sejtek életképességét a PDI túltermeltetése nem állítja helyre [182], mert a két fehérje között funkcionális kapcsolat áll fenn, amennyiben a PDI elektronjait az Ero1 veszi át, így biztosítva a PDI diszulfidképződéshez szükséges oxidált állapotát [183]. Egérben és emberben egyaránt két Ero1-paralóg található [184, 185]. Az Erol β a hasnyálmirigy β -sejtjeinek ER-jében segíti a proinzulin érését [186], és egyéb sejtekben – ahol az Ero1α állandóan jelen van – csak ER-stressz esetén termelődik, ami által jelentősen növeli az organellum oxidatív foldingkapacitását [185]. Az Ero1 közreműködésével a natív fehérje tioljairól származó elektronok végül az oxigénhez mint végső akceptorhoz jutnak. Az enzim két FAD-kötőhelye közül, az egyik kovalensen, a másik gyenge kölcsönhatások révén köti a koenzimet, így a szabad FAD-nak is fontos szerepe van az elektrontranszfer lebonyolításában [187, 188].

Az a megfigyelés, hogy a hibásan feltekeredett fehérjék által kiváltott ER-stressz fokozza az Erol gén expresszióját [189], összhangban van azzal az elvvel, hogy az ERstresszválasz egyik legfontosabb feladata a fehérjefolding helyreállítása. Fontos azonban megjegyezni, hogy az Erol α -Erol β kettős mutáns egér fenotípusa alig tér el a csak Erol β deficiensétől, és mindkét esetben elegendő marad az oxidatív fehérjeérés kapacitása, ami egyértelműen bizonyítja valamilyen alternatív / helyettesítő útvonal(ak) létezését az emlős sejtekben [186]. Az említett (és lejjebb részletezett) QSOX fehérjék mellett ilyen a peroxiredoxin IV és a glutation-peroxidáz 7/8 aktivitása, amelyek H₂O₂-t tudnak a PDI elektronjaival redukálni, illetve bizonyos megfigyelések a K-vitamin ciklus egyik enzime, a K-vitamin-epoxid-reduktáz ilyetén szerepét is alátámasztják [190].

Élesztőben, ahol az Ero1 működése esszenciális, azonosítottak még egy olyan fehérjét, amely a PDI tioljait képes oxidált állapotban tartani [191, 192]. Az Erv2-nek nevezett fehérje

túltermeltetése kivédi az Ero1-deficiencia okozta fehérjeérési zavart, és fenntartja a sejtek életképességét. Az Erv2 eltávolítható (nem kovalensen kötött) FAD-ot tartalmaz. A tiolok oxidációja FADH₂ termelődésével jár, amit molekuláris oxigén alakít vissza FAD-dá. Úgy tűnik azonban, hogy ennek az útvonalnak normális körülmények között elhanyagolható szerepe van, mivel az ERV2 gén deléciója nem okoz károsodást a fehérjediszulfidok kialakulásában. Az Erv2 homológját emlős sejtekben még nem sikerült kimutatni.

Különböző fajokban azonosítottak egy enzimcsaládot, melynek tagjai az Ero1-től és Erv2-től eltérően, közvetlenül (PDI közbeiktatása nélkül) oxidálják a tiol csoportokat diszulfiddá, miközben molekuláris oxigénből hidrogén-peroxid keletkezik. A QSOX enzimek, melyek közül kettő (QSOX1 és QSOX2) található emberben, FAD-kötőhellyel és tioredoxin doménnel rendelkeznek [193]. Kis és nagy "splice"-variánsaik közül az utóbbi transzmembrán hélixet is tartalmaz, amely biológiai membránokhoz horgonyozhatja a fehérjét. Legnagyobb mennyiségben olyan sejtekben vannak jelen, amelyek intenzív fehérjeszekréciót folytatnak. Mivel a QSOX enzimek jelenlétét sikerült az ER-ben is kimutatni, szerepük az oxidatív fehérjehajtogatásban feltételezhető, bár erre közvetlen bizonyítékok még nincsenek [194].

2.2.2.3. Prolil- és lizilhidroxiláció

A prolil- és lizilhidroxilációt katalizáló enzimek dioxigenázok, melyek szubsztrátként a polipeptid mellett α -ketoglutarátot és oxigént, kofaktorként pedig aszkorbátot igényelnek. Az oxigén molekula egyik atomja a prolil vagy lizil oldalláncba, a másik az α -ketoglutarátba épül be, és ez utóbbi ennek hatására szukcináttá dekarboxilálódik. Az ilyen típusú enzimek közül legalaposabban a prolil-4-hidroxilázt jellemezték [195]. Az ER lumenében elhelyezkedő enzim a proteindiszulfid-izomerázzal együtt alkot tetramer szerkezetű komplexet [195, 196]. Az enzim aktív centrumában lévő ferro ion hajlamos ferri ionná oxidálódni, ami inaktiválódásához vezet, ezért a maximális aktivitáshoz antioxidánsra van szükség. Ezt a szerepet tölti be fiziológiás körülmények között az aszkorbát [197, 198].

Mindez összhangban van azzal a ténnyel, hogy C-vitamin (aszkorbát) hiányában a kollagén szintézise jellegzetesen az elégtelen prolil- és lizilhidroxiláció miatt károsodik, ami a skorbut néhány tünetét meg is magyarázza.

2.2.2.2.4. Fehérjeglikoziláció és minőségellenőrzés

Az ER-ben szintetizálódó fehérjék nagy része kovalensen kötött oligoszacharid láncokkal is kiegészül. A folyamat alapvető tulajdonságait már az 1980-as években ismerték

[199], de valódi jelentőségére, a minőségellenőrzésben betöltött szerepére csak az elmúlt két évtizedben derült fény.

A 9-14 monoszacharid alegységből álló terjedelmes és erősen hidrofil jellegű struktúra jellemző módon N-glikozidos kötéssel kapcsolódik a polipeptid kitüntetett aszparaginil oldalláncainak amid csoportjához. Ez egyrészt segít a hajtogatódó fehérjét oldatban tartani, másrészt befolyásolja a natív konformációt azáltal, hogy az aszparagin közelében lévő aminosav-oldalláncokat a glikoprotein-víz határfelületre kényszeríti. Ráadásul az oligoszacharid lánc meghatározza a natív fehérjének az ER lektinjeihez való kötődését, ami tovább javítja a hajtogatás hatékonyságát, és lehetővé teszi a fehérjék minőségellenőrzését.

Az N-glikoziláció során először egy Glc₃Man₉GlcNAc₂ összetételű elsődleges glikán [200] helyeződik át a lumenbe kerülő natív fehérjére [201], amelyről a három glukóz egység az érés során lehasad. Az oligoszacharid lánc átalakítása a transzfer után azonnal megkezdődik. A perifériás glukózt a membránhoz kötött glukozidáz I távolítja el [199], majd a két maradék glukózt a luminális glukozidáz II hasítja le [202-204]. A továbbiakban különböző mannozidázok közreműködésével néhány mannóz is lehasadhat a fehérjéről [205]. Az említett reakciókon kívül az ER-ben már csupán egy reakció történik az N-glikoproteinek oligoszacharid láncával, mégpedig az átmeneti reglukoziláció az UDP-Glc:glikoprotein glukozil-transzferáz (UGGT) közreműködésével [206]. Az N-glikoproteinek glikán csoportja további – itt nem részletezendő – változásokon megy keresztül a Golgi apparátusban, ahol újabb mannozidázok és N-acetil-glukózaminil-transzferázok találhatók [207].

Az ER-ben összetett rendszer ügyel arra, hogy az újonnan szintetizált fehérjék ne haladhassanak tovább végső rendeltetési helyükre, amíg el nem nyerték natív konformációjukat. Az elsődleges minőségellenőrzés árulkodó tulajdonságaik – mint a hozzáférhető hidrofób szakaszok, a szabad cisztein tiolok vagy az aggregációs tendencia – alapján ismeri fel az éretlen polipeptidláncokat. A Hsp70 család ER-ben működő tagja, a BiP (GRP78) "co-chaperon"-ok ("DnaJ-like protein" és a "GRPE-like protein") segítségével megköti és visszatartja az ilyen fehérjéket, amivel időt és segítséget ad nekik a konformáció kijavításához [208]. A BiP dajkafehérje általános minőségellenőrző funkciója mellett számos egyéb protein is részt vesz az ER fehérjeérési folyamatainak kontrolljában.



3. ábra Minőségellenőrzés az endoplazmás retikulumban Az érett fehérjékről a glukozidáz II lehasítja az utolsó glukóz egységet, az éretlenekre az UDP-glukóz:glikoprotein glukoziltranszferáz visszahelyezi. A monoglukozilált éretlen fehérjéket a kalretikulin vagy kalnexin köti, a deglukozilált érett fehérjék továbbhaladhatnak a szekréciós pályán. A kijavíthatatlan fehérjék a citoplazmában ubikvitinálódnak és lebomlanak.

CNX: kalnexin; CRT: kalretikulin; ER: endoplazmás retikulum; ERAD: "endoplasmic reticulum-associated protein degradation"; GI: glukozidáz I; GII: glukozidáz II; OST: oligoszacharil-transzferáz; SERCA: szarko/endoplazmás retikulum kalcium-ATP-áz; UGGT: UDP-glukóz:glikoprotein-glukoziltranszferáz; (A Sec61, Derlin és E3Ubl transzlokációs, illetve retro-transzlokációs peptidcsatornák).

Az egyik legjobban feltárt és részleteiben ismert elsődleges minőségellenőrző rendszer, melynek legfontosabb szereplői a glukozidáz II, az UGGT, valamint a kalnexin és a kalretikulin, közvetlen összefüggésben áll az N-glikozilációval [209]. Az UGGT felismeri és glukozilálja a hibásan hajtogatott fehérjéket, vagyis aktivitása következtében az ilyen visszatartandó és korrigálandó fehérjék mint monoglukozilált glikoproteinek meg vannak jelölve a lumenben. Az ER két lektinje, a kalnexin és a kalretikulin éppen az ilyen fehérjék oligoszacharid láncára specifikus, ezért az éretlen fehérjéket megköti. A kötés egyrészt megakadályozza a fehérje célba juttatását, másrészt a lektinek dajkafehérjeként segítik a

hajtogatást, harmadrészt a komplexhez társuló ERp57 igyekszik a megfelelő diszulfid hidakat kialakítani. A glukozidáz II azonban idővel megfosztja a fehérjét a jelzéstől, vagyis a ciklus kezdődik elölről. Ha a fehérje már natív konformációjú, kilép a ciklusból, és távozhat az ERből is, ha nem, akkor újra glukozilálódik, és a lektinek megint próbálkozhatnak a kijavításával (**3. ábra**) [210].

Természetesen előfordul, hogy a fehérje hosszú próbálkozás ellenére sem képes helyesen hajtogatódni, és a sejtnek, illetve az ER-nek le kell mondania róla. Az ilyen reménytelen fehérjéket az α -1,2-mannozidáz I enzim megfosztja az egyik perifériás mannóz egységüktől, ami kitéríti őket a glukozilációs-deglukozilációs ciklustól, mert megnöveli affinitásukat az EDEM ("endoplasmic reticulum degradation-enhancing 1,2-mannosidase-like protein") nevű lektinhez. A kalnexinhez és EDEM-hez egyaránt tartósan kötődő hibás fehérjék retrográd transzlokációval – feltehetőleg a transzlokon csatornán keresztül – visszajutnak a citoplazmába (**3. ábra**). Ezeket a kifelé jövő fehérjéket azonban rögtön ubikvitinálja az ER külső felszínén található ubikvitin-ligáz, így hamarosan a proteaszóma áldozatává esnek és lebomlanak [211]. A folyamat, melyet összefoglalóan ERAD-nak ("endoplasmic reticulum-associated protein degradation") neveznek, nagyon fontos szerepet tölt be az ER tehermentesítésében, és segít elkerülni a hibás konformációjú fehérjék felhalmozódását a lumenben.

2.2.2.3. Biotranszformáció

A szervezetbe állandóan bekerülnek (xenobiotikumok), illetve a szervezetben folyamatosan keletkeznek (endobiotikumok) olyan vegyületek, amelyeket a sejtek nem képesek az intermedier anyagcserében lebontani. Közöttük számos olyan anyag van, amely hidrofób jellege miatt nehezen távolítható el a szervezetből, ezért átalakítás nélkül felszaporodna, és nem kívánatos – vagy nem kívánatos mértékű – biológiai hatást (toxicitás) fejtene ki. Az endobiotikumok között talán legfontosabbak a koleszterin, különböző hormonok (pl. szteroid, tiroid, eikozanoid) és a hem, illetve annak porfírin váza. A xenobiotikumok egy része természetes eredetű, az elfogyasztott – elsősorban növényi – táplálék normális alkotója, és az adott szervezetben szabályozott biológiai funkcióval bír(t). Napjainkban azonban fokozódik azon xenobiotikumok bejutása a szervezetbe, amelyek a civilizáció akart vagy akaratlan termékei; ilyenek a gyógyszerek, tartósítószerek, színezékek, aromák, növényvédő vegyszerek, környezetszennyező anyagok stb. Toxicitásuk rendkívül változatos, de sejtbiológiai és orvosi szempontból legfontosabb a gyakran előforduló mutagén, karcinogén, illetve teratogén hatás.

A biotranszformáció azon folyamatok összessége, amelyek az endo- és xenobiotikumokat átalakítják, illetve a szervezetből kiürítik. E reakciók leginkább a májsejtekben zajlanak, de a biotikumok be- és visszajutási kapui (a tüdő, a bél és a vese sejtjei) szintén jelentős mértékben részt vesznek a biotranszformációban. A folyamatnak rendszerint három fázisát szokás megkülönböztetni, amelyeken tipikus esetben végigmegy a vegyület, bár egyes fázisok gyakran kimaradhatnak. Az első (előkészítő) fázisban a vegyületen olyan funkciós csoport (főleg alkoholos vagy fenolos hidroxil, karboxil, amino vagy tiol) alakul ki, amelyhez a következő fázisban egy csoportot hozzá lehet kapcsolni. A második (konjugációs) fázisban endogén vegyületek, illetve csoportok kovalensen kapcsolódnak az előkészített – vagy erre eleve alkalmas – biotikumhoz. A harmadik (eliminációs) fázis során a konjugált végtermék rendszerint aktív transzport segítségével távozik a sejtből, majd főként a széklettel és vizelettel a szervezetből.

A "ligandmetabolizmus" elmélet [212] szerint a biotranszformáció alapvető biológiai funkciója a ligandok létrehozása, aktiválása, majd inaktiválása és kiürítése. Az első fázis szabályozó molekulákat, receptorok ligandjait hozza létre, amelyek hormonként, neurotranszmitterként vagy neurohormonként fejtik ki hatásukat. Koleszterinből például monooxigenálások és dehidrogenálások révén keletkeznek a különböző szteroid hormonok. Az első fázisban vannak olyan kétirányú átalakítások is, amelyek ide-oda végbemenve lényegében ki-bekapcsolják a hormon által közvetített jelet (lásd a 11β-hidroxiszteroiddehidrogenáz rendszer esetében). A második fázis pedig ezeket a biológiailag aktív vegyületeket inaktívvá és kiüríthetővé teszi. A szteroid hormonok hatástalanítása például szulfatálás, illetve glutationnal vagy glukuronsavval való konjugáció révén történik. A biotranszformációs enzimekre jellemző korlátozott specificitás, azaz a szubsztrátok széles köre teszi lehetővé, hogy a xenobiotikumokat is átalakítsák. Ilyen idegen molekulák azonban gyakran módosítás nélkül is aktívak (toxikusak), és az első fázis hol csökkenti, hol növeli ezt az aktivitást. A füstben, kátrányban található benzo[a]pirén például monooxigenálások révén válik mutagén, karcinogén epoxiddá. A második fázis terméke viszont általában inaktív (nem toxikus) konjugátum, függetlenül attól, hogy endogén vagy exogén eredetű. Jelen értekezés nem foglalkozik az ER-ben zajló konjugációs (glukuronidáció [213]) és dekonjugációs (glukuronid- [214] és szulfát- [215] hidrolízis) reakciókkal, ezért itt csupán a biotranszformáció első fázisához tartozó (redox) reakciókat tárgyaljuk.

A konjugációra alkalmas funkciós csoportok kialakítása vagy felszabadítása mono-, dioxigenálás, oxidáció, redukció, valamint hidrolízis segítségével történik. Ennek megfelelően

az előkészítő fázis enzimei mono- és dioxigenázok, oxidázok, dehidrogenázok, illetve hidrolázok. Az ER két enzimrendszere, a citokróm P450 rendszer és a 11β-hidroxiszteroiddehidrogenáz (11βHSD) rendszer az előkészítő fázis fontos reakcióit katalizálja.

2.2.2.3.1. A citokróm P450 enzimrendszer

A citokróm P450 monooxigenázok, az első fázis mennyiségileg legjelentősebb reakcióját katalizáló enzimek. A számos azonosított P450-izoenzimet szekvenciahomológia alapján családokba és alcsaládokba sorolják [216]. Az izoenzimeket először az ER-ben mutatták ki, de később kiderült, hogy a szteroid hormonokat termelő endokrin sejtek, sőt a máj és a vese sejtjei mitokondriumának membránjában is előfordulnak. A mitokondriális izoenzimek a szteroid hormonok (endokrin sejtek) és az epesavak (májsejtek) szintézisében, illetve a D-vitaminok aktív hormonná alakításában játszanak kulcsszerepet [217]. Nagyfokú szubsztrátspecificitásuk miatt vitatott, hogy részt vesznek-e exogén vegyületek biotranszformációjában.

A mikroszomális citokróm P450 izoenzimek az ER integráns membránfehérjéi; aktív centrumuk a külső (citoplazma felőli) felszínen helyezkedik el [218]. A membrán jelentősen megkönnyíti a hidrofób szubsztrátok elérését; ráadásul kitűnő mátrixként is szolgál egy ún. mikroszomális elektrontranszfer-lánc fehérje komponensei számára. A citoplazmában termelődő NADPH két elektront ad át a membránhoz kötött citokróm-reduktáz FAD csoportjának, ezek továbbadódnak az enzim FMN csoportjára, majd onnan két lépésben – esetleg még egy citokróm (citokróm b5) közbeiktatásával [219] – a citokróm P450 hem csoportjára [220]. A két elektron segítségével egy oxigén molekula egyik atomja vízzé redukálódik, miközben másik atomja beépül a szubsztrát biotikumba. Bár a monooxigenálás változatos szerkezeti módosulásokat (köztük dealkilálást és epoxidkeletkezést is) eredményezhet, leggyakrabban hidroxil csoport kialakulásaként manifesztálódik [216], ezért a citokróm P450 enzimeket hidroxilázoknak is szokták nevezni.

2.2.2.3.2. A 116-hidroxiszteroid-dehidrogenáz izoenzimek

A glukokortikoid hormon kortizol (11β-hidroxi-szteroid) és a prohormon kortizon (11oxo-szteroid) egymásba alakítását a perifériás szövetekben két – egymástól jelentősen eltérő – dehidrogenáz katalizálja (**4. ábra**). A 2-es típusú izoenzim (11βHSD2) leginkább a vesében, a bélhámsejtekben, a nyálmirigyekben és a placentában fejeződik ki. Az ER membránjának citoplazmai felszínén található, és NAD(H)-ra specifikus [148]. Az aerób metabolizmusú sejtek citoplazmai redox állapotainak megfelelően NAD⁺ koenzim felhasználásával oxidálja a

kortizolt kortizonná, vagyis a hormon inaktivációját katalizálja. Prereceptoriális ligandspecificitást biztosító szerepe a mineralokortikoid-célszövetekben kulcsfontosságú. Itt ugyanis inaktiválni kell a kortizolt, hogy a nem-szelektív mineralokortikoid receptorokhoz kötve ne válthasson ki aldoszteronszerű hatásokat [221].

Az 1-es típusú izoenzim (11βHSD1) azonban a glukokortikoid-célszervekben, azaz a májban, a vázizomzatban, valamint a zsírszövetben van jelen. Szubcelluláris lokalizációja és kofaktorigénye is eltér a 11βHSD2-étől, ugyanis aktív centruma az ER lumenben helyezkedik el [222], és NADP(H)-t használ koenzimként [223]. Ez általában azt eredményezi, hogy a 11βHSD1 – megintcsak a 2-es típusú izoenzimtől eltérően – a kortizol lokális termelődését katalizálja [221, 223], ami alól kivételnek tűnik a bőr alatti (de nem a viszcerális) zsírszövet, mert itt a kortizol 11βHSD1 által katalizált oxidációját írták le *in vivo* [224]. A 11βHSD1 más biotranszformációs enzimekhez hasonlóan exogén szubsztrátokat is redukál [225, 226]. Jelentőséget tulajdonítanak továbbá annak is, hogy az enzim redukálja a koleszterin egyik fő oxidációs termékét, a 7-keto-koleszterint, amely nagy mennyiségben található az ateroszklerotikus plakkokban [227].



4. ábra A kortizol prereceptoriális metabolizmusa

A mineralokortikoid-célsejtekben NAD⁺-függő kortizoloxidáció zajlik, amit a 2-es típusú 11β-hidroxiszteroid-dehidrogenáz (11βHSD2) katalizál. Az elhízás és diabétesz szempontjából különösen fontos, glukokortikoid-célsejtekben azonban az 1-es típusú izoenzim (11βHSD1) működik, és jellemzően kortizolt termel, amihez NADPH-t használ redukáló forrásként.

Az oxoszteroid (kortizon):hidroxiszteroid (kortizol) és NAD(P):NAD(P)H redox párok közötti elektrontranszfer *in vitro* egyensúlyra vezető reverzibilis reakció. A két izoenzim azonban – a fentiek szerint – jellemzően két, egymással ellentétes irányban zajló folyamatot katalizál, ami csak az eltérő redox viszonyokkal magyarázható (**4. ábra**). A 2-es típusú izoenzim esetében oxoszteroidok és a NADH keletkeznek, míg az 1-es típusú izoenzim a hidroxiszteroidok és NADP⁺ keletkezését mediálja. A 11βHSD1 legfontosabb fiziológiás szubsztrátjai között szerepel a kortizon és a 11-dehidro-kortikoszteron, amelyek tehát kortizollá és kortikoszteronná redukálódnak. Mivel a termékek glukokortikoid hatása lényegesen erősebb a szubsztrátokénál, ez a reakció egyben a glukokortikoidok ún. "prereceptoriális aktiválása" is [221, 223].

Korábban említettük, hogy a glukokortikoidok – az inzulinnal szinergisztikusan – serkentik az adipociták differenciálódását, ami az elhízás egyik fontos eleme. E jelenség, valamint a glukokortikoidok inzulinéval ellentétes, illetve inzulinrezisztenciát előmozdító hatásai (pl. a máj glukóztermelésének fokozása és az inzulin-jelátvitel akadályozása) miatt (lásd 2.1.4. fejezet), a 11BHSD1 által mediált lokális kortizolaktiválásnak szerepet tulajdonítanak a metabolikus szindróma patogenezisében [228]. A tünetek szinte kivétel nélkül megjelennek a 11\betaHSD1-et túltermelő, transzgén egerekben [229, 230]; ugyanakkor a 11BHSD1-deficiens knockout egerek látszólag védettek a betegséggel szemben [231, 232]. Ráadásul az enzim szelektív gátlása a diabetes mellitus különböző kísérleti állatmodelljeiben is javítja az inzulin iránti érzékenységet [233] és csökkenti a testsúlyt [234]. Mindezek alapján nagy reményeket fűztek a 11BHSD1 szelektív gátlószereihez mint a metabolikus szindróma és a cukorbetegség új, hatékony gyógyszereihez. Az ilyen hatóanyagok fejlesztésére irányuló erőfeszítések folyamatban vannak, de eleddig nem váltották be maradéktalanul a hozzájuk fűzött reményeket [235]. Ennek egyik valószínű magyarázata, hogy az 1-es típusú izoenzim iránti szelektivitás még nem jelent önmagában a kortizolképződés iránti specificitást, hiszen – mint korábban szóba került – a 11βHSD1 a kortizoloxidáció irányában működik a szubkután zsírszövetben [224]. Az izoenzim mindkét irányú aktivitásának gátlása tehát a teljes glukokortikoid hatás szempontjából csak korlátozott hatékonyságot biztosíthat, és felboríthatja a szervek közötti hormon-prohormon újrahasznosítási ciklust. Az ideális hatóanyag tehát nem csupán a 11BHSD1-2 relációban szelektálna, hanem az 1-es típusú izoenzimnek is csak a reduktáz aktivitását gátolná – a dehidrogenáz aktivitását esetleg még fokozná is [236].

2.2.2.4. Glukóztermelés

Lassan nyolc évtizede ismert, hogy a glikogén sejten belüli lebontásának mechanizmusa az emésztéstől eltérően nem hidrolízis, hanem foszforolízis, tehát glukóz-1foszfát keletkezik [237]. Nyilvánvaló volt tehát, hogy lennie kell egy enzimnek, amely glukóz-foszfátból glukózt tud felszabadítani. A glukóz-6-foszfatáz aktivitást 1949-ben sikerült kimutatni májban [238], és hamarosan bebizonyosodott, hogy az enzim az ER-hez asszociálódik [239]. Bár az enzimfehérjét máig nem sikerült olyan mértékben megtisztítani, ami a térbeli szerkezet vizsgálatához szükséges, indirekt bizonyítékok támasztják alá, hogy az integráns membránfehérje aktív centruma a lumenben helyezkedik el [144]. A glukóz-6foszfatáz az egyetlen enzim, amely éhezésben a vércukorszint fenntartásához kellő sebességgel képes glukózt előállítani. Az általa hidrolizált glukóz-6-foszfát származhat a glikogénből (glukóz-1-foszfáton keresztül), kisebb glukoplasztikus molekulákból (a glukoneogenezis révén) vagy akár a galaktózmetabolizmusból (szintén glukóz-1-foszfáton keresztül). A szénhidrát-anyagcsere szempontjából nyilvánvalóan kitüntetett szerepe van a glukóz-6-foszfatáz aktivitással rendelkező sejteknek. Legnagyobb glukóztermelő kapacitása a májsejteknek van, a bőséges ER, a sok glikogén és a glukoneogenetikus, illetve galaktózmetabolizáló enzimek jelenléte miatt. Az is bebizonyosodott már a XX. század közepén, hogy a leggyakoribb glikogenózis, az 1-es típusú glikogéntárolási betegség (GSD1) oka a glukóz-6-foszfatáz aktivitás elégtelensége [240], ami jelentősen hozzájárult ahhoz, hogy ez lett az ER legalaposabban tanulmányozott enzimrendszere.

A glukóz-6-foszfatáz aktív centrumának luminális elhelyezkedése és (40% körüli) latenciája alapján feltételezték, hogy működéséhez még három membránfehérje szükséges, T1: glukóz-6-foszfát-transzporter, T2: foszfát-transzporter és T3: glukóztranszporter [241, 242]. Az enzimtől független glukóz-6-foszfát-transzporter létezését meggyőzően alátámasztotta, amikor kimutatták az elégtelen glukóz-6-foszfatáz aktivitáson alapuló 1-es típusú glikogéntárolási betegségnek azt az altípusát (GSD1b), amelyben az enzim ugyan ép, de aktivitása intakt mikroszómában szinte teljesen látens [243, 244], amit a glukóz-6-foszfát transzportjának károsodása okoz [245]. A feltételezés akkor vált bizonyossággá, amikor azonosították az ER glukóz-6-foszfát transzporterét [246]. A molekuláris azonosításhoz bakteriális transzporter fehérjék szekvenciájából indultak ki, és ezekhez kerestek humán homológot, majd bizonyították a humán gén mutációját GSD1b betegekben. A glukóz-6foszfát transzportja kétirányú, nagy kapacitású és kis affinitású facilitált diffűzió [247, 248]. Számos gátlószere közül viszonylagos specificitásuk és nagy hatékonyságuk (Ki $\leq 1 \mu M$)

miatt kiemelendők a klorogénsav származékai (pl. S3483) [249, 250], amelyek a terület kutatásának fontos eszközévé váltak.

A viszonylag kevéssé szelektív glukóz-6-foszfatáz enzim – amely permeabilizált ERmembrán esetén a glukóz-6-foszfáton kívül egyéb hexóz-foszfátokat is (pl. mannóz-6foszfátot) meglehetősen nagy affinitással hidrolizál – *in situ* vagy intakt mikroszómában szigorúan specifikus a glukóz-6-foszfátra. Ez más szavakkal úgy is megfogalmazható, hogy glukóz-6-foszfatáz aktivitása lényegesen kevésbé látens, mint pl. mannóz-6-foszfatáz aktivitása (95% feletti latencia). Nyilvánvaló, hogy ez a transzporter specificitásának köszönhető; vagyis a transzport nem csupán a katalízis sebességét, hanem az átalakítható vegyületek körét is meghatározza.

Érthető, hogy a glukóz-6-foszfát transzlokáz veleszületett defektusa ugyanúgy akadályozza a glukóztermelést, mint magának a glukóz-6-foszfatáz enzimnek a hiánya. A transzporterdefektus azonban egyéb negatív következményekkel is jár, ugyanis a súlyos neutropénia, valamint a polimorfonukleáris és monocita sejtek működési zavarai, amelyek a GSD1b betegek legsúlyosabb tünetei, az enzimdefektussal született GSD1a betegekben nem jelentkeznek [144]. Ez azzal magyarázható, hogy a transzporter, amelynek expressziója nem korlátozódik a glukóztermelő sejtekre, feltehetőleg más luminális enzimek, pl. a hexóz-6-foszfát-dehidrogenáz (H6PD) szubsztrátellátásához is szükséges [248].

A lumenben keletkezett glukóz kijutását biztosító transzporter még nem ismert, sőt, az a kérdés sem dőlt el minden kétséget kizáróan, hogy valóban ki kell-e jutnia a glukóznak a citoplazmába, vagy vezikuláris transzporttal szecernálják a sejtek [251, 252]. Az előbbi mellett szól, hogy kimutatták és funkcionálisan jellemezték a mikroszomális membránon keresztüli facilitált glukóztranszportot [253, 254]; sőt modern nanoszenzoros eljárással *in situ* bizonyították, hogy a plazmamembránban és az ER membránjában különböző mechanizmusok felelnek a glukóz átjutásáért [255].

2.2.3. Az endoplazmás retikulum redox rendszerei

Az ER két fontos funkciója, az oxidatív fehérjefolding és a biotranszformáció előkészítő fázisának folyamatai redox reakciókon alapulnak, amelyek az antioxidánsok anyagcseréjével is kapcsolatban állnak/állhatnak. Az értekezés szempontjából fontos ezeket a funkciókat ilyen szempontból külön is áttekinteni.

2.2.3.1. A citokróm P450 enzimek redox kapcsolatai

A membrán külső felszínén működő citokróm P450 monooxigenázok az egyik mikroszomális elektrontranszfer-lánc záróelemét képezik. Ez a lánc sok hasonlóságot mutat a nála jóval összetettebb és egészen más funkcióval bíró mitokondriális légzési lánccal. A mitokondrium belső membránjához kötött oxidoreduktázok (flavoproteinek, Fe-S fehérjék és citokrómok) több lépésben elektronokat szállítanak (NADH-ról vagy a metabolizmus egyes intermedierjeiről) a végső elektronakceptor oxigén molekula számára, amely így vízzé redukálódik. Az ER membránjához kötött oxidoreduktázok (egy flavoprotein és egy citokróm) elektronokat szállítanak (NADPH-ról) az oxigén molekula egyik atomja számára, amely így vízzé redukálódik, miközben a citokróm enzim a másik oxigénatomot beépíti egy szubsztrát molekulába [256]. Bár kézenfekvőnek tűnik, hogy a citokróm P450 rendszerhez tartozó mikroszomális elektrontranszfer lánc a citoplazmában termelődő NADPH-t használja, egyes megfigyelések alapján felvetődött az ER lumenében termelődő NADPH esetleges hozzájárulása is [257]. Fontos tehát egyértelműen tisztázni, hogy ez a nagy kapacitású redox folyamat valóban kapcsolódik-e az ER luminális redox rendszereihez, vagy teljesen elkülönül attól. A citokróm P450 enzimek monooxigenált terméküket a membránon keresztül átadhatják ugyan a lumenben működő UDP-glukuronozil-transzferázoknak [258], de arra nem utalnak adatok – és nem is igen valószínűsíthető –, hogy ez érdemben befolyásolná az organellum belső redox viszonyait.

2.2.3.2. Az oxidatív fehérjeérés redox kapcsolatai

A fehérjék ciszteinil tiol csoportjainak túlnyomó része diszulfiddá oxidálódik, valamint bizonyos fehérjék prolil vagy lizil oldalláncai hidroxilálódnak az ER lumenében. A kétféle fehérjeoxidáció mechanizmusa lényegesen eltér egymástól.

Amint azt a 2.2.2.2.2. fejezet részletesen ismerteti, a frissen szintetizált fehérjék ciszteinil tioljainak elektronjai egy újabb mikroszomális elektrontranszfer láncon keresztül jutnak a végső akceptorra, amely humán sejtekben mindig az oxigén molekula. Bár a folyamat összes részlete nem ismert, annyit lehet tudni, hogy a lánc kezdetén tiol-diszulfid-kicserélődések követik egymást, amelyben a PDI és az Ero1 fehérjék szerepét bizonyították, valamint a QSOX szerepét feltételezik. A folyamatos elektrontranszfer következtében a lumenre általában jellemző a tiolok szempontjából oxidatív környezet, amely a fehérje tiol csoportjaihoz hasonlóan a glutationra is érvényes. Az itt található glutation jelentős része (nagyjából fele) ugyanis a fehérje-tiolokkal vegyes diszulfidot képez [136]; és a szabadon

maradt glutation is (melynek összkoncentrációja a citoplazmaihoz hasonlóan néhány mM-os) a citoplazmainál hozzávetőleg 20-30-szor oxidáltabb: a [glutation]:[glutationdiszulfid] ([GSH]:[GSSG]) arány itt 1-3:1, szemben a citoplazmára jellemző 30-100:1értékkel [136, 137, 259]. Mivel a glutation szintézisét végző enzimek a citoplazmában találhatók, az ER-ben lévő glutationkészlet csak a GSH és/vagy a GSSG importálásával hozható létre és tartható fenn. Kezdetben azt feltételezték, hogy a GSSG kizárólagos befelé irányuló transzportja biztosítja az ER-ben a fehérjék diszulfid hídjainak kialakulásához szükséges oxidatív környezetet [137]. Májmikroszómán végzett kísérletek azonban ezzel ellentétes eredményt hoztak: míg a glutationdiszulfid gyakorlatilag nem jutott át a membránon, addig a glutation kétirányú, telíthető és klasszikus aniontranszport-inhibitorokkal gátolható transzportját bizonyították [260]. Ez a megfigyelés inkább olyan modellt valószínűsít, amely szerint a glutation a lumenben oxidálódik, és a keletkező glutationdiszulfid nem képes visszajutni a citoplazmába, így kialakul a viszonylag alacsony lokális [glutation]:[glutationdiszulfid] ([GSH]:[GSSG]) arány. Meggyőző bizonyítékok támasztják alá, hogy a glutation-tiolok oxidációja nem feltétele, hanem inkább elkerülhetetlen velejárója a fehérjék oxidatív érésének. Olyan mutáció, amely képtelenné teszi a sejtet a glutation szintézisére, nem hátráltatja [182], sőt bizonyos esetekben kifejezetten elősegíti [261] a fehérjék diszulfidjainak kialakulását. Ez azt mutatja, hogy a fehérjék és a glutation tiol csoportjai valójában kompetálnak egymással az oxidáló enzimekért; vagyis a glutation redukáló ágensként hat az ER lumenében. A glutation oxidációja in vitro végbemehet a luminális fehérjék diszulfid kötéseinek redukálása révén. Ez egyben azt is jelzi, hogy a glutationnak fontos szerepe lehet a diszulfid redukálásában, és ezáltal később hibás hidak а részletezendő diszulfidizomerizációban. Mivel ez éppen olyan fontos része a fehérjék helyes hajtogatásának, mint maga a tioloxidáció, a glutation - amellett, hogy véd az oxidatív stressz ellen mégiscsak lényeges szerepet tölt be az oxidatív fehérjefolding folyamatában. Kutatásaink megkezdésekor sem az érésben lévő fehérjékről származó és végül az oxigén által felvett elektronok lehetséges útja, sem a glutation, illetve a folyamatban feltételezhetően résztvevő egyéb kis molekulájú elektronszállító komponensek pontos szerepe nem volt tisztázott.

A citoplazma és az ER lumene közötti tiol redox gradiensnek egyes megfigyelések szerint szabályozó szerepe is van. A RyR kalciumcsatorna ugyanis tartalmaz olyan tiol csoportokat, amelyek rendkívül érzékenyen reagálnak a tiol-diszulfid redox potenciál változásaira, és módosítják a csatorna aktivitását [262-265]. Az oxidáció (reaktív oxigén intermedierek vagy glutationdiszulfid hatására) növeli, míg a redukció (ditiotreitol, merkapto-

etanol vagy glutation által) csökkenti a csatorna nyitvatartási valószínűségét. A harántcsíkolt izom szarkoplazmás retikulumában található 1-es típusú csatornáról azt közölték, hogy a membrán két oldala között fennálló redox gradiensre érzékeny. Ha a tiol-diszulfid redox rendszer oxidáltsági állapotában normálisan megfigyelhető különbség megszűnik, akkor nyílik a csatorna [266].

Az aszkorbátot antioxidánsként használó prolil-4-hidroxiláz (lásd 2.2.2.2.3. fejezet) közös komplexet alkot a proteindiszulfid-izomerázzal, amely a dehidroaszkorbátot – diszulfidképzés kapcsán – aszkorbáttá tudja redukálni [267]. Ez arra enged következtetni, hogy végső soron a fehérje-, illetve glutationtiolok szolgáltatnak redukáló erőt a prolil-4hidroxiláz számára [268]; ami egyben azt is jelenti, hogy ezen a ponton összekapcsolódik a diszulfidképződés és az oldallánchidroxiláció rendszere, és a két rendszer közötti kapocs az aszkorbát.

A proteindiszulfid-izomeráz egyébként egy sajátos poszttranszlációs módosításhoz, a glutamil-γ-karboxilációhoz is szolgáltathat elektronokat [269]. A K-vitamin ciklusként ismert folyamat, amely a hemosztázis májban szintetizált fehérjéinek egy részét érinti, nem jár a glutamil oldallánc oxidációjával; a K-vitamin redox reakciói csak energetikai szempontból kapcsolódnak a karboxilációhoz. Azonban, mivel a proteindiszulfid-izomeráz közreműködésével redukált K-vitamin az oxigénnel reagál, ez az útvonal az oxidatív fehérjeérés alternatív elektrontranszfer lánca is, hiszen az újonnan szintetizált fehérjék tioljairól továbbítja az elektronokat végső céljukhoz.

2.2.3.3. Piridin-nukleotidok redox ciklusa az endoplazmás retikulumban

Az ER lumenében találhatók piridin-nukleotidokkal (NAD(P)(H)) működő dehidrogenázok [145, 270-273]. Az 11βHSD1 által katalizált reakció (lásd 2.2.2.3.2. fejezet) iránya egyértelműen azt mutatja, hogy a legtöbb szövetben, az enzim környezetében magas a [NADPH]:[NADP⁺] arány. Fontos – és az értekezésben leírt saját kutatások kezdetekor tisztázatlan – kérdés, hogy a citoplazma piridin-nukleotidjai – átjutva az ER membránján – táplálják a reakciót [274], vagy az ER lumene elkülönült piridin-nukleotidkészlettel rendelkezik [275]. Ez utóbbi esetben ugyanis két újabb kérdés is megválaszolandó: (1) milyen enzim(ek) termeli(k) a NADPH-t és tartják fenn a magas arányt ebben a kompartmentben, valamint (2) hogyan fér meg egymás mellett az oxidált tiol-diszulfid és a redukált piridin-nukleotid redox rendszer. Számos megfigyelés utalt arra, hogy a lokális NADPH-termelés a

luminális hexóz-6-foszfát-dehidrogenáz (H6PD) működésén alapul [276, 277], de a 11βHSD1 és a H6PD funkcionális kapcsolata még további bizonyításra várt.

2.2.3.4. Kis molekulájú antioxidánsok redox kapcsolatai

Az ER lumenére jellemző viszonylag oxidált glutationkészlet, amely a lokális tioloxidáció velejárója, nyilván jelentősen gyengíti az organellum antioxidáns kapacitását, de nem jelenti annak teljes hiányát. Számos megfigyelés valószínűsíti, hogy a másik legfontosabb vízoldékony antioxidáns, az aszkorbinsav a citoplazmára jellemzőnél magasabb koncentrációban van jelen a lumenben [132-134] a legjelentősebb lipidoldékony antioxidáns, a tokoferol pedig nagy mennyiségben található az ER membránjában [278].

Szemben az endogén glutationnal, amely aminosavakból szintetizálódik az emberi szervezetben, az aszkorbát (C-vitamin) és a tokoferol (E-vitamin) exogén antioxidánsok, amelyeket humán sejtek nem képesek előállítani. Érdekes, hogy a legtöbb állat képes az aszkorbát UDP-glukuronátból kiinduló szintézisére, és az utolsó lépést katalizáló gulonolakton-oxidáz az ER membránjában található. Emberben és aszkorbát szintézisére képtelen állatokban (pl. tengerimalacban) éppen ez az enzim hiányzik [279].

Az aszkorbát felfedezéséért Szent-Györgyi Albert, szerkezetének és bioszintézisének kutatásáért Sir Walter Norman Haworth kapott Nobel-díjat a múlt század közepén. A kiváló antioxidáns vegyület szabad gyökkel reagálva egy elektron leadása által viszonylag stabil aszkorbil-gyökké alakul [280], amely diszproporcionálódhat redukált aszkorbáttá és oxidált dehidroaszkorbáttá [281]. Az aszkorbát tehát hatékony gyökfogó, és alkalmas a gyökös láncreakció terminálására. Képes bizonyos fémionokat pl. ferro iont is megvédeni az oxidációtól, ezért alkalmazható a methemoglobinémia kezelésére, és ezzel magyarázható kofaktor funkciója egyes vastartalmú dioxigenázok (pl. prolil-hidroxilázok, lásd 2.2.2.2.3. fejezet) esetében. A C-vitamin hiánya által okozott skorbut napjainkban inkább csak az általános alultápláltság részeként jelentkezik, de a földrajzi felfedezések korában gyakran megtizedelte a hajók legénységét. Az általános gyengeséggel, levertséggel, csökkent immunitással, különböző bőrtünetekkel, és jellegzetesen a fogíny vérzésével, illetve foghullással járó állapot [282] patomechanizmusa csak részben magyarázható az aszkorbát antioxidáns és kofaktor funkcióinak kiesésével.

A tokoferol elsősorban a membránok antioxidáns védelméért felelős [283]. Hidrofób része a membrán apoláros rétegében helyezkedik el, fenolos hidroxil csoportja érintkezik a vizes fázissal. Ha a membránlipidek – elsősorban a többszörösen telítetlen zsírsavláncok –

gyökkel (pl. hidroxil gyökkel) reagálnak, maguk is gyökké alakulnak, amely rendszerint oxigénnel egyesül, és peroxil gyököt (ROO•) képez [284]. A peroxil gyök újabb lipidet oxidál, és az így kialakuló láncreakció súlyos károkat okoz a membránban. A tokoferol elősegíti a láncreakció terminálását azáltal, hogy az aszkorbát felé tereli azt. A tokoferolból keletkező, viszonylag stabil tokoferil gyököt [285] ugyanis a membrán felszínén az aszkorbát redukálhatja [286], a keletkező aszkorbil gyök pedig a fent említett diszproporcionálódás révén véget vet a folyamatnak. A C- és E-vitamin együttműködése különösen fontos az ER membránjában, ahol a citokróm P450 izoenzimek sok reaktív intermediert termelnek.



5. ábra Az antioxidánsok redox lánca (módosított Halliwell-Asada ciklus) A lipid kettősrétegbe ágyazott tokoferol (E-vitamin) változatos gyökökkel (pl. hidroxil, alkil, alkoxil, peroxil) reagál. A keletkezett tokoferil gyököt aszkorbát (C-vitamin) redukálhatja, miközben aszkorbil gyök keletkezik. Az aszkorbil gyök újabb gyökkel (akár aszkorbil gyökkel) reagálva dehidroaszkorbáttá oxidálódik. Az aszkorbát glutation segítségével regenerálható; a keletkező glutationdiszulfidot a glutation-reduktáz NADPH felhasználásával alakítja újra antioxidáns glutationná.

A redoxpárok tagjai közé írt számok az intracelluláris redox potenciál értékeket mutatják irodalmi adatok alapján.

Az aszkorbát tehát állati és emberi szervezetekben egyrészt reaktív intermedierek eliminálásakor (közvetlenül vagy tokoferolon keresztül), másrészt oxigenázok kofaktoraként működve dehidroaszkorbáttá oxidálódik. Növényekben ismertek aszkorbát-oxidáz enzimek, amelyek oxigén segítségével képeznek aszkorbil gyököt és ezáltal dehidroaszkorbátot aszkorbátból [287]. Állati és emberi szervezetben azonban ilyen enzimet eddig nem azonosítottak; az aszkorbát és oxigén közti oxidoredukciót általában nem enzimatikus reakcióként tartják számon, melyet pl. fémionok vagy szabad gyökök katalizálhatnak.

A dehidroaszkorbát egy része óhatatlanul lebomlik, de újrahasznosítására is lehetőség van, ugyanis glutationnal reagálva visszaalakulhat aszkorbáttá. Ezt a reakciót katalizáló dehidroaszkorbát-reduktáz aktivitással a glutaredoxin és a proteindiszulfid-izomeráz is rendelkezik [267]. A glutationdiszulfid visszaredukálásáról pedig a NADPH-t fogyasztó glutation-reduktáz gondoskodik. Az antioxidánsok így – redox potenciáljuknak megfelelően – egy redox láncot alkotnak, amelyben a reaktív intermedierek, köztük a szabadgyökök bármelyik láncszemmel reagálhatnak, de végső soron a metabolizmus által szolgáltatott NADPH-t oxidálják (**5. ábra**).

2.2.4. Az endoplazmás retikulum stressz

Az ER működése szorosan kapcsolódik a sejt egészének tápanyag- és oxigénellátásához, energia- és redoxstátuszához; és rendkívül érzékenyen reagál ezek változásaira. Ha valamely tényező akadályozza az organellum optimális működését, kialakul az ER-stressz, amely közvetve vagy közvetlenül előidézi a fehérjeérés zavarát. A külső és/vagy belső környezet változásai könnyen felborítják a lumenbe kerülő fehérjék mennyisége és az organellum fehérjeérlelő kapacitása közötti dinamikus egyensúlyt. Az ER-t érő legfontosabb stresszhatások a következők:

• Ca²⁺-homeosztázis megváltozása

A luminális Ca²⁺-szint csökkenése gátolja a chaperonok / foldázok működését; ezáltal zavart okoz a fehérjeérésben és -minőségellenőrzésben.

- redox státusz változása

 A luminális tiol-diszulfid redox pár oxidáltsági állapotának eltolódása a diszulfid hidak képződését vagy a hibás diszulfid hidak izomerizációját akadályozza meg.
- szénhidrát-anyagcsere változása

A glukóz szintjének csökkenése a glikoproteinek érését gátolja (ráadásul a fehérjeérés és a minőségellenőrzés számos komponense maga is glikoprotein).

• fehérjetúltermelés pl. vírussal fertőzött sejtben.

Az ER-stressz különböző okokra visszavezethető eseteiben rendszerint megnő a "magára hagyott", vagyis dajkafehérjék által nem kísért fehérjemolekulák száma az organellum 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. Az UPR négy legfontosabb eleme a következő: 1. az ER foldázainak és dajkafehérjéinek indukciója; 2. az ER méretének megnövelése a foszfolipidek és integráns fehérjék fokozott szintézisével; 3. a proteinszintézis általános gátlása mind transzkripciós, mind transzlációs szinten; 4. az ER-asszociált degradáció (ERAD) stimulálása. Ezek a változások elősegítik, hogy a hibásan hajtogatott fehérjék elérjék natív konformációjukat a lumenben, vagy onnan kijutva megsemmisüljenek. Ha azonban az adaptív erőfeszítések eredménytelenek – a stressz túl súlyos vagy túl sokáig elhúzódik –, a programozott sejthalál is aktiválódhat, ami a sejt apoptózisához vezet.

Az ER-stressz iránti érzékenység sejttípusonként jelentős eltéréseket mutat. Az utóbbi évek kutatásai azt mutatják, hogy a pankreász β -sejtek különösen szenzitíven reagálnak az ER-ből érkező stressz-szignálokra [288, 289]. Az UPR kettős ("pro-survival" és "pro-death") funkcióját ráadásul kiválóan példázza az inzulinszekréció kontrollja fiziológiás és patológiás 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 [290]. Ugyanakkor meggyőzően bizonyították a sejt által már (meg)oldhatatlan ER-stressz (destruktív distressz) fontos szerepét a β -sejtek működészavarában és pusztulásában [291]; és ez különösen érvényes a β -sejt-lipotoxicitásra [292, 293]. Fontos az a nemrégiben közölt megfigyelés, mely szerint a lipotoxicitásal szemben is protektív metformin a tapszigarginnal kiváltott ER-stresszben antiapoptotikus hatásúnak bizonyult egy egér β -sejtvonalon [294].

2.2.4.1. Az UPR mechanizmusa

Azok a fehérjék, amelyek képesek az ER-stressz érzékelésére és az UPR beindítására, sok hasonlóságot mutatnak a plazma membrán hormon- vagy neurotranszmitter-receptoraival. Ezek is integráns membránfehérjék, melyeknek a citoplazmába nyúló doménje továbbítja azt a jelet, amelyet a luminális (az extracellulárissal analóg) domén érzékel. Az ER

stresszreceptorai ("inositol-requiring enzyme 1": IRE1, "pancreatic ER kinase (PKR)-like ER kinase": PERK és "activating transcription factor 6": ATF6) azonban jellemzően nem egy ligand kötődésekor, hanem egy fehérje leválásakor aktiválódnak. A legelfogadottabb modell szerint ugyanis az IRE1-et, a PERK-et és ATF6-ot a luminális doménjükhöz kötődő BiP (GRP78) dajkafehérje tartja inaktív állapotban [295], és akkor szabadulnak fel a gátlás alól, ha a lumenben felhalmozódó éretlen vagy hibás konformációjú fehérjék miatt a BiP leválik róluk (**6. ábra**) [160].

<u>Az IRE1</u> citoplazmai doménje Ser/Thr protein-kináz és endo-RN-áz aktivitással rendelkezik. A BiP leválása a luminális dimerizációs doménről (és feltételezések szerint éretlen fehérjék közvetlen kapcsolódása ugyanitt) az IRE1 oligomerizáció és autofoszforiláció általi aktiválódásához vezet [296]. Endonukleázként valószínűleg hozzájárul az ER fehérjeterhelésének csökkentéséhez azáltal, hogy mRNS-eket hasít a citoplazmában [297]. Van azonban egy különleges szubsztrátja, az XBP1-mRNS, amelyből specifikusan kihasít egy 26 nukleotid hosszúságú intron szakaszt, és az így éretté vált mRNS az sXBP1 ("spliced X box-binding protein 1") transzkripciós faktor szintéziséhez szolgálhat mintául [298]. Az sXBP1 a DNS "UPR elemei"-hez kötődik, és indukálja többek között az ER chaperonjait (pl. BiP, PDI), valamint az ERAD és a foszfolipidszintézis komponenseit.

<u>Az ATF6</u> egyik Golgi-lokalizációs szekvenciáját a BiP takarja, ezért csak a BiP leválásakor jut a Golgi apparátusba, ahol proteolízissel szabadul fel a transzkripciós faktorként működő citoplazmai doménje [299]. Az ATF6 transzkripciós faktor a DNS "ATF/CRE elemei"-hez, illetve "ER stress response" elemeihez kötődik, és ezáltal indukálja az ER chaperonjait, a foszfolipidszintézis enzimeit, a CHOP/GADD153 ("C/EBP homologous protein"/"growth-arrest- and DNA-damage inducible gene 153") fehérjét (ld. 2.2.2. fejezet), és fokozza az XBP1 mRNS szintézisét is, amely az UPR felerősítését eredményezheti [300].

<u>A PERK</u> az IRE1-hez hasonlóan autofoszforilálódik, amikor luminális doménje felszabadul. Az aktív PERK-dimer a transzláció egyik iniciációs faktorát (eIF2α) foszforilálja, ami – rendszerint az ER-stresszre leghamarabb (néhány percen belül) kialakuló reakcióként – a fehérjeszintézis általános csökkenését eredményezi [301]. A transzláció általános gátlása együtt jár bizonyos mRNS-ek fokozott transzlációjával, amennyiben azok megfelelő speciális olvasási kereteket ("upstream open reading frames"; uORFs) tartalmaznak. Így például gyorsabban szintetizálódik az ATF4 transzkripciós faktor, amely egyebek között a CHOP/GADD153 és az ATF3 ("activating transcription factor 3") fehérjéket indukálja [302].



6. ábra Az UPR-ben aktiválódó legfontosabb jelpályák

A Grp78 (BiP) dajkafehérje leválása aktiválja a PERK, ATF6 és IRE1 fehérjéket. Az eIF2α PERK általi foszforilációja csökkenti a fehérjeterhelést, és az ATF4 transzkripciós faktor szintézisének kedvez. Az ATF6 Golgiban történő hasítása aktív transzkripciós faktort szabadít fel. Az IRE1 által végrehajtott RNS-szerkesztés az XBP1 transzkripciós faktor szintézisének feltétele. Mindhárom mechanizmus az ER-stressz leküzdéséhez vagy apoptózishoz vezető génexpressziós változásokat eredményez.

ATF4 és 6: "activating transcription factor 4 and 6"; Bak/Bax: A Bcl-2 fehérjecsalád multidomén, proapoptotikus tagjai; CHOP: "C/EBP homologous protein"; eIF2α: eukarióta (transzlációs) iniciációs faktor 2 alfa alegység; ER: endoplazmás retikulum; IRE1: "inositolrequiring enzyme 1"; JNK: c-Jun N-terminális kináz; Pc12-C12: prokaszpáz-, illetve kaszpáz-12 (emberben valószínűleg a prokaszpáz- és a kaszpáz-4 helyettesíti); PERK: "pancreatic ER kinase (PKR)-like ER kinase"; XBP1: "X box-binding protein 1"; XBP1s: "spliced" XBP1 mRNS.

2.2.4.2. Az endoplazmás retikulum stressz által indukált apoptózis

Az ER-stressz éppen olyan súlyos működési zavart és vészhelyzetet jelent a sejt számára, mint a DNS halmozott károsodása vagy az ATP-termelés elégtelensége. Nem meglepő tehát, hogy a sejt eltávolítására ilyenkor is szükség lehet, vagyis az ER-stressz is kiválthatja, illetve támogathatja az apoptózist (**6. ábra**) [303, 304]. Az ER stresszreceptorairól

nem csupán az adaptációt és túlélést szolgáló "pro-survival" reakciók indulnak ki, hanem apoptózist indukáló "pro-death" szignálok is inicializálódnak. Ezekhez járul hozzá az ER membránjának permeabilitásfokozódása, ami nem csak a tartós Ca²⁺-kiáramlás, hanem bizonyos fehérjék kiszabadulása révén is serkenti a programozott sejthalált [305].

A szerteágazó proapoptotikus mechanizmusok közül kiemelendő a korábban már említett CHOP/GADD153 transzkripciós faktor, amelynek termelődését az ER-stresszben aktiválódó három fő transzkripciós faktor (az önálló ATF6, a PERK-függő ATF4 és az IRE1függő XBP-1) szimultán fokozza [306]. A CHOP legismertebb hatásai közé tartozik, hogy a p53-mal kooperálva proapoptotikus irányban befolyásolja az apoptózis központi szabályozó fehérjéinek, a Bcl-2 család különböző tagjainak (Bcl-2 [307], Bim, PUMA [308] és NOXA [309]) expresszióját. Emellett CHOP hatására indukálódik a GADD34 ("growth-arrest- and DNA-damage inducible gene 34"), a protein-foszfatáz-1 szabályozó alegysége, amely az eIF2α defoszforilációját, vagyis a transzláció általános fokozódását váltja ki [310], és ezzel – részben a ROS-termelődés erősödése által – az apoptózis felé tereli a folyamatokat [311].

Az apoptózis indukciójából az IRE1 is kiveszi a részét. Egyrészt valószínűsíthető, hogy az IRE1 által katalizált mRNS-lebontás kétélű fegyver, mert nem csak az ER fehérjeterhelését, hanem annak fehérjeérlelő kapacitását is csökkentheti [312]. Kimutatták továbbá, hogy az IRE1 általi RNS-hasítás mikroRNS-ek közvetítésével is fokozza a sejt apoptóziskészségét [313, 314]. Ráadásul az aktivált IRE1 részvételével kialakult fehérjekomplex olyan stresszkinázok aktivációját is beindítja, mint a JNK [315], a p38 és az ERK [316] vagy az IĸK [317], amelyek a sejt programozott halálához vezethetnek, és közreműködik a prokaszpáz-12 (emberben a prokaszpáz-4) hasításában is [318, 319].

A CHOP által indukált Ero1 aktivitás az inozitol-1,4,5-trifoszfát-receptor (IP3R) nyitási valószínűségét fokozza, így kalciumkiáramlást eredményez [320]. Ehhez hozzájárul, hogy a Bcl-2 fehérjecsalád proapoptotikus multidomén tagjai (Bak és Bax) által képzett pórusok [321] nem csak a mitokondrium, hanem az ER membránját is átjárhatóvá teszik az Ca²⁺ ionok számára [322]. Sőt e csatornákon keresztül luminális fehérjék (pl. BiP és PDI) is kijutnak a citoplazmába, és feltételezhetően ez is az apoptózis irányába hat [323]. A citoplazma tartósan emelkedett kalciumkoncentrációja egyrészt a prokaszpáz-12 (prokaszpáz-4) hasításában közvetlenül is résztvevő kalpaint stimulálja, és elősegíti a stresszkinázok (p38 MAPK, JNK) aktiválódását [324, 325]. Másrészt a mitokondriális "permeability transition pore" (PTP) nyitásához is hozzájárul, így előidézheti a mitokondriális elektrokémiai gradiens összeomlását is [326].

3. CÉLKITŰZÉS

Mivel az ER szerteágazó funkciói az anyagcsere minden ágát érintik, valamint az organellumban zajló hormonátalakítás és az innen kiinduló jelátvitel a sejt működését alapvetően képes befolyásolni, egyre inkább körvonalazódott az ER intracelluláris tápanyagszenzor funkciója, amely fiziológiás szerepe mellett az anyagcsere-betegségek kialakulásában is közreműködhet. Hipotézisünk szerint a tápanyag- (elektrondonor-) ellátottság érzékelésében és a válaszként keletkező jelek generálásában kulcsmomentum az ER lumenében elhelyezkedő, két redox rendszer modulálása. Azok a tényezők, amelyek a luminális tiol-diszulfid egyensúlyt torzítják, és ezáltal az oxidatív fehérjeérést akadályozzák, alapvetően az UPR jelátviteli útvonalain keresztül hatnak a celluláris funkciókra. Azok pedig, amelyek a luminális piridin-nukleotid redox státuszt ([NADPH]:[NADP⁺] arány) módosítják, elsősorban a kortizol prereceptoriális keletkezésének fokozása vagy gátlása révén fejthetik ki lokális hatásaikat. Mivel kóros körülmények között mindkét mechanizmus hozzájárulhat az inzulinrezisztencia kialakulásához, súlyosbodásához, illetve a hasnyálmirigy β -sejtek diszfunkciójához vagy pusztulásához, elméletünk a metabolikus szindróma és a diabétesz patobiokémiája szempontjából is releváns.

Fenti elméletünk szem előtt tartásával, célul tűztük ki az ER-ben zajló, oxidatív fehérjeérés jobb megismerését, különös tekintettel a kismolekulájú elektronszállítók (glutation, aszkorbát és tokoferol) közreműködésének tisztázására. Tisztázni kívántuk továbbá a lokális kortizoltermelésben résztvevő fehérjék együttműködését különböző sejtekben, illetve azt, hogy hogyan módosul ez a funkció a tápanyagellátás hatására vagy a zsírsejtdifferenciálódás során. Magyarázatot kerestünk arra is, hogy miképp létezhet a két, rendszerint összefüggő, redox rendszer lényegesen eltérő redox állapotban egyazon kompartmentben (az organellum lumenében). Felvázolt célkitűzéseink eléréséhez elengedhetetlen volt az ER membránja elkülönítő ("barrier") funkciójának megerősítése és a luminális kompartment valódi elkülönülésének ismételt bizonyítása. A rendszer működésének megfigyelése és hipotézisünk tesztelése mellett a beavatkozás lehetőségeit is vizsgáltuk, hiszen modellünk új és ígéretes támadáspontokat is kínál az elhízással kapcsolatos anyagcsere-betegségek megelőzésére és terápiájára, melyek iránt e kórállapotok rohamos terjedése egyre növekvő igényt generál. Az alábbi konkrét célokat tűztük ki:

 A kisméretű elektronszállítók ER-ben zajló metabolizmusának és transzportjának jellemzése; oxidatív fehérjeérésben betöltött szerepük tisztázása. A luminális redox rendszerek kapcsolatai.

Az ER lumenében fiziológiás körülmények között a tiol-diszulfid redox rendszer jellemzően oxidált, a piridin-nukleotid (NADP⁺-NADPH) redox rendszer viszont a jelek szerint redukált állapotban van. Három fontos kérdés megválaszolásához kívántunk hozzájárulni.

a.) Hogyan alakul ki az oxidált tiol-diszulfid környezet?

A tiolok oxidációját lehetővé tevő mikroszomális elektrontranszfer alternatív útjait, illetve hiányzó láncszemeit kerestük. A fehérje természetű komponensek mellett feltételeztük a membránon átjutó (glutation, dehidroaszkorbát), valamint a membránban elhelyezkedő (tokoferol) elektronszállító kismolekulák szerepét.

b.) Milyen fiziológiás tényezők befolyásolják a piridin-nukleotidok redox állapotát?

A hexóz-6-foszfát-dehidrogenáz és az 1-es típusú 11β-hidroxiszteroiddehidrogenáz génexpressziójának, valamint szubsztrátellátásának moduláló szerepét kívántuk tanulmányozni, különös tekintettel a szövetek közti különbségekre, a zsírsejt-differenciálódás, illetve az éhezés-jóllakottság váltakozása kapcsán bekövetkező változásokra,

c.) Hogy fér meg egy kompartmentben két eltérő potenciálú redox rendszer?

Hipotézisünk szerint az ER lumenében hiányoznak azok az enzimatikus kapcsolatok a két redox rendszer között, amelyek a sejt egyéb részeiben megtalálhatók, és megakadályozzák a redox potenciálok ilyen mértékű disszociációját.

 Az ER luminális környezetét meghatározó redox homeosztázis mint az elhízással összefüggő anyagcsere-betegségek megelőzésének és terápiájának lehetséges célpontja. Az oxidatív fehérjeérés zavara és a következményes ER-stressz feltételezett szerepe a C-vitaminhiány által okozott inzulinrezisztencia kialakulásában. A zsírsavak által kiváltott β-sejtkárosodás kivédése az ER-stressz csökkentésével. A prereceptoriális kortizoltermelés szelektív gátlása a luminális piridin-nukleotid redox státusz befolyásolása révén.

Az ER alapvető funkcióinak zavara organellum stresszt idéz elő, amely különböző jelátviteli útvonalakon keresztül szöveti diszfunkciót, és többek között inzulinrezisztenciát vagy β -sejtpusztulást is okozhat. A lokális kortizoltermelés tartós erősödése pedig az elhízásban és a metabolikus szindrómában játszik fontos szerepet. Fontosnak tartottuk tehát megvizsgálni, hogy e rendszerek hogyan módosulnak táplálkozási tényezők hatására, és hogyan befolyásolhatók kedvező irányban. Az alábbi konkrét kérdésekre kerestünk választ.

a.) Kialakul-e ER-stressz az C-vitaminhiányos tengerimalacok májsejtjeiben?

Az aszkorbát fehérjeérésben betöltött, feltételezett szerepe alapján azt vártuk, hogy a vegyület hiánya akadályozza az intenzív fehérjeszintézist és -szekréciót folytató sejtek ER-jének működését. Ha a kapacitáscsökkenés eléri azt a mértéket, hogy az UPR jelátviteli mechanizmusai is aktiválódnak, ez hozzájárulhat az inzulinrezisztencia kialakulásához is. Kísérleteinket olyan állaton (tengerimalacon) kellett elvégeznünk, amelyik – az emberhez hasonlóan – nem képes az aszkorbát endogén előállítására.

b.) Szerepet játszik-e az ER-stressz csökkentése a metformin β -sejt-lipotoxicitással szembeni védő hatásában?

Bár a metformin alapvetően inzulinérzékenyítő antidiabetikum, annak lipotoxicitás elleni védő hatását is leírták HepG2 sejteken, valamint humán Langerhans szigeteken. Ráadásul nemrégiben kiderült, hogy tapszigarginnal kiváltott ER-stresszben csökkenti az apoptózist. A β -sejtvédő hatás különösen fontos a diabétesz progressziójának megakadályozása szempontjából, ezért elhatároztuk, hogy egy inzulinóma sejtvonalon megvizsgáljuk, befolyásolja-e a metformin a lipotoxicitás által indukált ER-stresszel összefüggő proapoptotikus folyamatokat.

c.) Befolyásolható-e a prereceptoriális kortizoltermelés az ER luminális piridinnukleotid redox státuszának modulálásával?

A 11βHSD1 aktivitás metabolikus szindrómában játszott szerepének megismerése szelektív gátlószerek kifejlesztését indukálta. A kipróbált hatóanyagok korlátozott hatékonysága azonban rávilágított, hogy az enzim által katalizált reakció gátlása helyett inkább annak eltolása volna kívánatos. Az ER redox homeosztázisának ismerete alapján ez a [NADPH]:[NADP⁺] arány

csökkentésével lenne elérhető. Olyan hatóanyagokat kerestünk tehát, amelyek az organellum lumenében képesek a NADPH oxidálására, és szóba jöhetnek akár gyógyszerfejlesztés kiinduló molekulájaként is.

4. AZ ALKALMAZOTT MÓDSZEREK RÖVID ÁTTEKINTÉSE

E dolgozat műfaja és terjedelmi korlátai az elvégzett munka során alkalmazott összes anyag és módszer részletes ismertetését sem szükségessé, sem lehetővé nem teszik. A biokémiai, molekuláris és sejtbiológiai kutatás során rutinszerűen végzett eljárások (pl. fotoés fluorimetriás mérések, sejttenyésztés, Western blot, RT-PCR, kvantitatív PCR, restrikciós DNS-hasítás stb.) aktuális részletei (pl. fény-hullámhossz, sejttípus, médium, gélösszetétel, antitestek, kemilumineszcens előhívás, denzitometria, polimerázok, oligonukleotidok, endonukleázok stb.) vonatkozásában az értekezés alapjául szolgáló saját közlemények szolgálnak információval. Ahol ez szükséges, a kísérletek fontosabb módszertani adatai természetesen fel vannak tüntetve az eredmények bemutatásánál. Ez a fejezet csupán az itt leggyakrabban előforduló, és talán kevésbé közismert, speciális metodikák bemutatására szorítkozik az ezekkel végzett kísérletek minél érthetőbbé tétele céljából.

4.1. Mikroszóma és mikroszomális szubfrakciók előállítása

Az endo/szarkoplazmás retikulumban zajló enzimatikus és transzportfolyamatok in vitro tanulmányozásához a szövetekből mikroszómát preparáltunk. A zárt vezikulumok megtartják az organellum eredeti membránorientációját, valamint a luminális fehérjéket és a membránon keresztül nem transzportálódó metabolitokat, kofaktorokat. А mikroszómapreparálás a homogenizált szövet differenciál-centrifugálásán alapul, és különböző szövetek esetén hasonlóan történik. A kísérleteinkben leggyakrabban használt, patkány májmikroszómát frissen kioperált májakból állítottuk elő. A májszövetet apróbb darabokra vágtuk, majd szacharóz-HEPES pufferben (0,3 M szacharóz és 0,02 M 4-(2hidroxietil)piperazin-1-etánszulfonsav, pH 7,2) üveg-teflon potter készülék segítségével homogenizáltuk. Az így létrehozott homogenátumból az esetleges szövetmaradványokat rövid centrifugálással (10 perc, 1000 x g) távolítottuk el, majd a felülúszóból kiülepítettük (10 perc, 12000 x g) a sejtmagot és mitokondriumot tartalmazó frakciót. A "poszt-mitokondriális felülúszó" soron következő ultacentrifugálása (60 perc, 100000 x g) után eltávolítottuk a felülúszót (citoplazma frakció), és az üledéket (mikroszóma) MOPS pufferben (100 mM KCl, 20 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, és 20 mM 4-morfolino-propánszulfonsav, pH 7,2) újraszuszpendáltuk. Ezután a mikroszómát ismételten ülepítettük (60 perc, 100000 x g centrifuga) és szuszpendáltuk MOPS pufferben, majd alikvotokat képeztünk, melyeket gyorsan lefagyasztottunk, és folyékony nitrogénben tároltunk a felhasználásig. A preparátum fehérjekoncentrációját (40-70 mg/ml) rendszerint BioRad reagenssel mértük albumin standardhoz viszonyítva.

A mikroszomális preparátum "tisztaságáról", vagyis ER-eredetéről marker enzimek (pl. mitokondrium: citokróm-c-oxidáz, ER: glukóz-6-foszfatáz és citoplazma: 5'-nukleotidáz) Western blottal történő detektálása segítségével bizonyosodtunk meg [327, 328]. A mikroszomális membrán integritásának ellenőrzésére a mannóz-6-foszfatáz latencia tesztet alkalmaztuk [329]. A latencia minden esetben 90%-os, vagy annál nagyobb volt.

A durva és sima felszínű ER-ből származó mikroszóma-szubfrakciók elválasztása céljából a "poszt-mitokondriális felülúszó"-t szacharóz gradiens (0,7 ml 0,6 M szacharóz és 3 ml 1,3 M szacharóz, mindkettőben 15 mM CsCl) fölé rétegeztük, majd centrifugáltuk (120 perc, 80000 x g). A sima felszínű mikroszómát a két szacharóz fázis közül, a durva felszínűt pedig az üledékből gyűjtöttük [327]. Ezeket, a fent leírtakhoz hasonlóan, MOPS pufferben újraülepítettük, végül MOPS pufferben szuszpendáltuk, és frissen használtuk vagy folyékony nitrogénben tároltuk a felhasználásig. A szubfrakciók tisztaságát Sec61 (transzlokon peptidcsatorna alegysége) elleni antitesttel végzett immunoblot segítségével ellenőriztük. A teljes mikroszómához képest a Sec61-jel intenzitásának másfélszeres emelkedését észleltünk a durva, és ötszörös csökkenését a sima felszínű vezikulumok esetén.

A szarkoplazmás retikulumból származó vázizom-mikroszóma, illetve a terminális ciszterna frakció preparálásához "Új-zélandi Fehér" nyulak hátsó végtagjának, dominánsan fehér rostokat tartalmazó izmait használtuk a Saito és munkatársai által leírt eljárás szerint [330]. A vezikulumok membránjának integritását fényszórásos permeabilitásmérések mellett az ATP-függő Ca²⁺-akkumuláció detektálásával is ellenőriztük [331]. A terminális ciszternából származó preparátum tisztaságát mutatta, hogy koffeinnel majdnem teljes kalciumkiáramlást tudtunk rajtuk kiváltani [331].

4.2. Membránpermeabilizálás és a latencia meghatározása

A biológiai membránok permeabilizálásának olcsó, de kíméletlen módja a lipidkettősréteg integritásának megszüntetése detergens (pl. Triton X-100) hozzáadásával. Bizonyos esetekben (pl. transzportmérések vagy érzékeny membránfehérjék aktivitásának mérésekor) olyan eljárásra van szükség, amely a membránszerkezet megőrzése mellett biztosítja az átjárhatóságot kismolekulák számára. Ilyenkor a pórusképző antibiotikum alameticint [332] használtuk, mert ez nem szünteti meg a lipid-kettősréteget, valamint a

vezikulum struktúrát, így feltehetőleg nem okoz jelentős konformációváltozást az integráns membránfehérjékben sem. Az alameticincsatornák belső átmérőjét 10 Å körülire becsülik, így átjárást biztosítanak ionok és kis molekulasúlyú vegyületek számára, de másodlagos-harmadlagos szerkezettel rendelkező fehérjék már nem képesek átjutni rajtuk [333]. Sejteken végzett kísérleteknél a plazmamembrán szelektív permeabilizálásához szaponint vagy digitonint alkalmaztunk [334].

Az enzim lokalizációja és a szubsztrátok, illetve termékek transzportja szempontjából érdemes összehasonlítani a mikroszomális enzimek aktivitását – azonos körülmények között – intakt vezikulumokban és a membrán permeabilizálása után. Luminális aktív centrummal rendelkező enzimek esetében gyakran megfigyelhető, hogy a permeabilizált mikroszómában mért aktivitásnak csak egy része detektálható intakt vezikulumokban. A jelenséget latenciának hívják; számszerű jellemzésére az alábbi képletet alkalmazzuk.

$$latencia(\%) = \frac{v_{\text{permeabilizált}} - v_{\text{intakt}}}{v_{\text{permeabilizált}}} \times 100$$

(v_{permeabilizált}: a permeabilizált mikroszómában mért aktivitás, v_{intakt}: az intakt mikroszómában mért aktivitás azonos körülmények között)

4.3. Fehérjetiolok fogyásának vizsgálata

A mikroszomális fehérjék tiolcsoportjainak diszulfiddá oxidálódása az ER-ben zajló ún. oxidatív fehérjeérés (oxidatív folding) kulcsmozzanata. E reakció tanulmányozásakor az intakt vagy permeabilizált mikroszómát (rendszerint 1 mg protein/ml) 37 °C-on MOPS pufferben inkubáltuk, majd a reakciót a fehérjék savas kicsapásával (0,05 térfogat 100%-os triklórecetsav (W/V) hozzáadása) állítottuk le. A fehérjecsapadékot gyors centrifugálással (20000 x g, 5 perc, 4 °C) ülepítettük, és reszuszpendálás előtt a kismolekulájú tiolokat (pl. GSH) a puffer cseréjével eltávolítottuk. Az így nyert szuszpenzió szabad tiolcsoportjainak koncentrációját az Ellman módszerrel [335] határoztuk meg, melynek lényege az 5,5'-ditiobisz-(2-nitrobenzoesav)-ból diszulfidkicserélődéssel felszabaduló tio-nitrobenzoát fotometriás mérése. A kiindulási értéktől való eltérés alapján számítottuk a fehérje-tioloxidáció sebességét, melyet rendszerint (pmol vagy nmol/perc/mg fehérje) egységben fejeztünk ki.

4.4. Az aszkorbát mennyiségi meghatározása

A mikroszómához kívülről hozzáadott vagy (GLO enzimmel rendelkező mikroszóma esetén) helyben keletkező aszkorbát mennyiségét legtöbbször Omaye és munkatársai módszerével mértük [336]. Az intakt vagy permeabilizált mikroszómát (rendszerint 1 mg protein/ml) 37 °C-on MOPS pufferben inkubáltuk, majd a reakciókat a fehérjék savas kicsapásával (0,05 térfogat 100%-os (W/V) triklórecetsav hozzáadása) állítottuk le. A fehérjecsapadéktól gyors centrifugálással (20000 x g, 5 perc, 4 °C) szabadultunk meg, és a felülúszóban oldott aszkorbátot FeCl₃ oldattal reagáltattuk. Az aszkorbát hatására keletkező Fe²⁺ ionok α, α '-dipiridillel képzett, színes komplexét végül fotométerrel detektáltuk.

Az aszkorbát és dehidroaszkorbát HPLC-vel történő meghatározásakor a mikroszóma szuszpenziójához 0,3 térfogat 25%-os (W/V) metafoszforsavat (dehidroaszkorbát visszaredukálásához 10 mM ditiotreitollal kiegészítve) adtunk. A májak aszkorbáttartalmának mérésekor pedig a szövetdarabokat 0,05 M metafoszforsavat, 0,005 M Na₂EDTA-t és 1,7 g/l K₂O₅S₂-t tartalmazó oldatban homogenizáltuk. A mintákat a kromatográfiás eljárás előtt minden esetben centrifugálással (20000 x g, 10 perc, 4 °C) fehérjementesítettük. A C18-as oszlopon végzett izokratikus (1 ml/perc) elválasztáshoz 0,1 M NaH₂PO₄, 0,2 mM EDTA, pH 3,1 eluenst használtunk, és az aszkorbát mennyiségét az UV-detektálással (254 nm hullámhosszon) kapott csúcs alatti terület alapján számszerűsítettük [337].

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

Mikroszomális kísérleteink során a redukált piridin-nukleotidok (NADH vagy NADPH) mennyiségi változásainak folyamatos ("real time") nyomonkövetését jellegzetes fluoreszcenciájuk (maximuma 350 nm-es gerjesztési és 460 nm-es kibocsátási hullámhossznál) tette lehetővé. A módszer alkalmazásakor figyelembe kell venni, hogy 1.) az ER membránja nem áteresztő a piridin-nukleotidok számára, és 2.) a mikroszomális vezikulumok külső felszínén elhelyezkedő oxidáz és oxigenáz enzimek a velük érintkező NADH-t és NADPH-t azonnal eloxidálják (lásd 5.2.1. fejezet). Ez utóbbi jelenség legegyszerűbben az oxidált nukleotid (pl. NADP⁺) nagy koncentrációjú (1-2 mM) alkalmazásával védhető ki. A lumenben elhelyezkedő dehidrogenázok (H6PD, 11βHSD) aktivitását ezért ezzel a módszerrel csak a membrán permeabilizálása után, és csak NADPH-keletkezés irányában lehet megmérni. Ezeknél a kísérleteknél a mikroszómát (0,5-1 mg fehérje/ml) 1-2 mM NADP⁺-t tartalmazó MOPS pufferben inkubáltuk állandó keverés és a

fluoreszcencia folyamatos detektálása mellett. A szubsztrát (pl. glukóz-6-foszfát, fruktóz-6foszfát vagy kortizol) hozzáadása után a membránt Triton X-100 vagy alameticin segítségével permeabilizáltuk, és néhány percig rögzítettük a fluoreszcencia egyenletes emelkedését. A kísérletek befejezéseként kalibráció céljából ismert mennyiségű NADPH-t adtunk az elegyhez.

Kellően érzékeny és pontos műszer alkalmazásával (és a mikroszomális fehérjekoncentráció emelése után) 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.

4.6. Transzportmérések

4.6.1. Fényszórásos módszer

A mikroszomális membrán permeabilitásának vizsgálatára bizonyos esetekben jól használható indirekt eljárás a fényszórásos módszer [338]. A mérés előtt a vezikulumok duzzadásának eléréséhez a mikroszómát hipotóniás pufferben (5 mM 1,4-piperazindietánszulfonsav – PIPES, pH 7,0) kihígítjuk (50-100 µg/ml) és hosszú ideig (60-120 perc) inkubáljuk. A mérés során a szuszpenziót állandó keverés mellett a spektrofluoriméter küvettájában tartjuk. A mikroszomális vezikulumok által okozott fényszórás mértékét azonos "gerjesztési" és "emissziós" hullámhosszak beállításával folyamatosan detektáljuk.

A duzzadt vezikulumok viszonylag nagy átlagos átmérőjük következtében csak kis mértékben szórják a 400-550 nm hullámhosszúságú fényt. Ha azonban egy membránon áthatolni képtelen anyagot viszonylag magas koncentrációban (20-25 mM) adunk a szuszpenzióhoz, az ozmózis következtében zsugorodó vezikulumok fényszórása ugrásszerűen megnő. A fényszórás mindaddig magas marad, ameddig permeabilizáló ágenssel (alameticin) lehetővé nem tesszük a koncentrációk kiegyenlítődését az intra- és extravezikuláris folyadéktér között. Ha a membrán integritását detergenssel megszüntetjük, a fényszórás gyakorlatilag nulla szintre csökken (**7. ábra**).

dc_997_15



7. ábra A permeabilitás vizsgálatának fényszórásos technikája
A hipotóniás pufferben duzzadt vezikulumok viszonylag alacsony fényszórása ozmolit hozzáadásakor a zsugorodás következtében gyorsan emelkedik. A koncentrációk kiegyenlítődésekor a vezikulumméret és a fényszórás a kezdeti értékhez tér vissza. Az ehhez szükséges idő a vizsgált anyag iránti permeabilitástól függ – impermeábilis anyagok (pl. szacharóz, citrát) esetén pórusképző alameticinnel kiváltható. Detergens (pl. Triton X-100) hatására a membrán integritása, a vezikulumszerkezet és a fényszórás megszűnik.

Olyan vegyületek hozzáadásakor, amelyek a víznél lényegesen lassabban haladnak át a mikroszomális membránon, az ugrásszerű fényszórás-növekedést fokozatos csökkenés követi, míg végül – a hígulástól eltekintve – visszaáll az eredeti alap fényszórás érték. A membrán adott vegyület iránti permeabilitására a fényszórás-növekedés mértékéből (a csúcs magassága) és a kiindulási értékhez való visszatérés időtartamából (a lejtő meredeksége) következtethetünk. Amennyiben a vizsgált vegyület olyan sebességgel – vagy akár gyorsabban – jut át a membránon, mint a vízmolekulák, akkor a kezdeti fényszórás-növekedés el is maradhat, és csupán a hígulás által okozott fényszórás-csökkenés látható.

4.6.2. Gyors szűrés és gyors ülepítés

A mikroszomális transzport közvetlen detektálására olyan módszerek alkalmasak, amelyek az intra- és extravezikuláris folyadékterek elválasztásán alapulnak. Az elválasztást – a vezikulumokat visszatartó – kis pórusú (0,22-0,45 µm) cellulóz-nitrát/cellulóz-acetát filteren keresztüli szűrés [338] vagy a vezikulumok ülepítését elősegítő polietilénglikol (PEG) jelenlétében végzett centrifugálás [339] teszi lehetővé. Mindkét esetben lehetőség van az elkülönített vezikulumok "mosására", vagyis a szűrő átöblítésére vagy az újraszuszpendált mikroszóma ismételt ülepítésére. A mosásnál rendszerint jéghideg puffert használunk, amely gyakran a vizsgált transzport gátlószerét is tartalmazza, hogy a luminális anyag veszteségét minimalizáljuk. A vizsgált vegyület filteren maradt, illetve kiülepedett mennyiségét kellően érzékeny és pontos módszerrel mérve 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. Akár szűrjük, akár ülepítjük a mikroszómát, a veszteség mértéke kevesebb mint 5%, és ezt az alameticinkezelés nem befolyásolja (8. ábra).



8. ábra A transzport vizsgálatára alkalmas "gyors szűrés" módszer A szűrés és mosás után csak az intakt vezikulum belsejében elhelyezkedő és membránjához tapadó anyag marad a szűrőn. Permeabilizált vezikulumok esetén a luminális molekulák is lemoshatók, így a szűrő csak a membránhoz tapadó anyagot tartja vissza. Az intravezikuláris tartalom tehát a két mérés eredményének különbségeként meghatározható.

A befelé irányuló transzport (felvétel) mérésekor a szükséges koncentrációgradienst egyszerűen a mikroszóma és a vizsgált anyag összekeverésével hozzuk létre. Kifelé irányuló
transzport (leadás) mérésekor a mikroszómát előzőleg kis térfogatban feltöltjük a vizsgált anyaggal (hozzáadás után hosszasan előinkubáljuk vagy többször fagyasztjuk és olvasztjuk), majd a szükséges koncentrációgradienst többszörös térfogatra való hígítással állítjuk elő. Mindkét esetben a transzport beindításától számítva különböző időpontokban határozzuk meg a luminális anyagmennyiséget.

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 analógok ("tracer"-ek) alkalmazásával biztosítjuk, és a szűréssel elkülönített vezikulákban folyékony szcintillációs módszerrel detektáljuk a kérdéses vegyületet. A módszer alkalmazását korlátozza, hogy sok esetben a vizsgálni kívánt vegyület radioaktívan jelölt változata nem, vagy csak nagyon drágán beszerezhető. E problémával mi is szembesültünk saját kutatásaink során, ezért kidolgoztuk az eljárás alternatív, radioaktív jelölést nem igénylő változatát. A szűrést követően, a filter folyékony szcintillációs koktélban való feloldása helyett, a szűrő által visszatartott vegyületeket extraháljuk, és mennyiségűket tandem tömegspektrometriával kombinált HPLC-s módszer (HPLC-MS/MS) segítségével határozzuk meg. A HPLC-MS/MS detektálás pontossága és érzékenysége eléri, sőt meg is haladja a radioaktív jelölésen és szcintilláció számolásán alapuló mérését. A módszert először különböző glukuronidok transzportjának mérésére fejlesztettük ki, és a leghatékonyabb extrahálási eljárás megbízhatóságát több vegyület esetén is ellenőriztük [Staines *et al.*, 2005].

Az ösztradiol-glukuronid mikroszomális transzportját az új és a hagyományos, radioaktív jelölésen alapuló módszerrel mérve azonos időfüggést, kezdeti sebességet és egyensúlyi viszonyokat detektáltunk, ami megerősíti a metodika alkalmazhatóságát [Csala *et al.*, 2004]. Amennyiben MS/MS technika nem áll rendelkezésre, a módszer fluoreszcens és abszorbanciás detektorral felszerelt HPLC felhasználásával is kivitelezhető. Igaz, hogy ilyenkor valamivel magasabb – de számos jól detektálható vegyület esetén a fényszórásos technikához szükségesnél még mindig jóval alacsonyabb – koncentrációkat (1-2 mM) kell alkalmazni [Révész *et al.*, 2007].

Amellett, hogy a HPLC-alapú mérés szükségtelenné teszi a költséges radioaktív analógok alkalmazását, és ezáltal lehetővé teszi az eddigieknél lényegesen többféle vegyület transzportjának mérését, alkalmazása számos egyéb előnnyel is jár. Míg a radioaktivitás detektálása nem ad információt a vizsgált vegyület épsége felől (hiszen az izotópot tartalmazó, esetleg lehasadt molekularészlet éppúgy sugároz, mint az eredeti molekula), az új

módszerrel a kísérlet során folyamatosan nyomon tudjuk követni a szubsztrát esetleges bomlását. Ráadásul egyszerre több vegyület transzportját is megfigyelhetjük, amire eddig nem volt lehetőség (**9. ábra**) [Staines *et al.*, 2005].



9. ábra Morfin és morfin-3-glukuronid szimultán mérése HPLC-MS/MS módszerrel [Staines et al., 2005]

Az aglikont és glukuronidját párhuzamosan detektáltuk a tömegspektrométer két különböző eljárását alkalmazva. A vízszintes tengelyen a HPLC-s eluálási időt, a függőlegesen a tömegspektrométerben detektált jel nagyságát (a maximum %-ában) tüntettük fel. A magasabb csúcs a glukuronidnak, az alacsonyabb az aglikonnak felel meg. Nagyszámú mérés egy jellemző regisztrátuma látható az ábrán.

Az általunk beállított új módszert sikerrel alkalmaztuk a glukuronid-transzporterek funkcionális jellemzéséhez és szubsztrátspecificitásának vizsgálatához [Csala *et al.*, 2004; Révész *et al.*, 2007], valamint a mikroszómában újonnan keletkező morfin-3-glukuronid luminális akkumulálódásának kimutatásához [Révész *et al.*, 2013]. Ez utóbbi esetben már nem csupán klasszikus értelemben vett transzportmérés történt, ugyanis a kísérlet során végbemenő reakció egyik termékének lokalizációját tudtuk nyomon követni, ami radioaktív jelöléssel szintén nem volna megoldható (**10. ábra**). A módszer fejlesztése tehát olyan lehetőségeket kínál, amelyeket az ER működésének vizsgálatára változatos módon ki lehet aknázni.



10. ábra *A mikroszómában keletkező morfin-3-glukuronid luminális felhalmozódása* [Révész et al., 2013]

Intakt (•) és alameticinnel permeabilizált (○) patkány májmikroszómát (1 mg/ml fehérje) inkubáltunk UDP-glukuronsav (2 mM) és morfin (100 µM) jelenlétében 37 °C-on. A morfin-3-glukuronid keletkezése több mint 10-szer gyorsabb volt a permeabilizált vezikulumokban (458,80 ± 61,97 vs. 44,85 ± 4,08 pmol/perc/mg fehérje; P < 0,001; n=3). A mikroszómához asszociált (luminális és felszínhez tapadt, illetve permeabilizált mikroszómában csak felszínhez tapadt) morfin-3-glukuronod mennyiségét a jelzett időpontokban gyors szűrést követő HPLC-MS/MS méréssel határoztuk meg.

Átlag \pm szórás, n=3.

5. EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

5.1. A luminális tiol-diszulfid redox rendszer oxidált állapotának fenntartása az endoplazmás retikulumban

5.1.1. Glutationtranszport az endo/szarkoplazmás retikulumban

A citoplazma és az ER lumene közötti GSH/GSSG redox potenciálkülönbséget korábban az oxidatív folding, vagyis a diszulfidképződés feltételének, újabban pedig inkább melléktermékének tekintik. Központi kérdés azonban, hogy a luminális oxidált és a citoplazmai redukált tiol-diszulfid rendszerek milyen kapcsolatban állnak egymással. A kérdés megválaszolása szempontjából kiemelkedően fontos a glutation ER-membránon keresztüli transzportjának megismerése. A lumenben magasabb GSSG- és alacsonyabb GSH-szintek fenntarthatósága nagymértékben múlik azon, hogy a membrán mekkora permeabilitást mutat a glutation redukált és oxidált alakja iránt. A kérdés jelentőségét tovább növeli glutationgradiens közreműködése a RyR kalciumcsatorna szabályozásában.



11. ábra Agy-, máj-, szív- és izomeredetű mikroszóma glutationpermeabilitása [Csala et al., 2001a]

Nyúl különböző szöveteiből preparált mikroszóma glutation iránti áteresztőképességét mértük fényszórásos módszerrel. A nyilak a GSH (**A**) és GSSG (**B**) adásának időpontját mutatják. A vizsgált preparátumok közül csupán az izom mikroszóma – különösen annak terminális ciszterna frakciója (TC) – mutatott jelentős glutationpermeabilitást. Hat-tíz analízisből származó, jellemző regisztrátumok láthatók az ábrán.

Nyúl különböző szöveteiből (máj, szívizom, agy, vázizom) izolált mikroszómán (lényegében a sejt többi részétől izolált endoplazmás, illetve szarkoplazmás retikulumban) vizsgáltuk a glutation transzportját "gyors szűréses" és fényszórásos módszerrel (**11. ábra**). Várakozásunknak megfelelően, a májmikroszóma membránja csak nagyon lassú GSH- és GSSG-áramlást tett lehetővé [Csala *et al.*, 2001a]. Ez összhangban van a patkányok májából preparált mikroszóma esetében kapott eredményekkel, bár ott a GSSG transzportja még a GSH-énal is lassabbnak bizonyult [260].

A szívizomból és agyból izolált mikroszóma a májból izolálthoz hasonlóan kis glutationpermeabilitást mutatott, azonban a vázizomból készült szarkoplazmás retikulum eredetű vezikulumok membránja jelentős GSH- és GSSG-átáramlást tett lehetővé. Ebben a mikroszómában a GSH-transzport kezdeti sebessége csaknem hatszor nagyobb volt a májból preparálthoz képest. Mivel a vázizom szarkoplazmás retikuluma 1-es típusú RyR kalciumcsatornában (RyR1) gazdag, felvetődött ennek szerepe a glutationtranszportban. Ezt a feltételezést az is alátámasztotta, hogy a tisztított terminális ciszterna (TC) vezikulumok, amelyekben a RyR1 feldúsul, még a vázizom mikroszómánál is lényegesen gyorsabban vették fel a glutationt. A RyR1 ismert inhibitorai (ruténiumvörös, Mg²⁺, La³⁺ és magas koncentrációjú rianodin) mind izom mikroszómában, mind TC vezikulumokban hatékonyan gátolták a glutationtranszportot. Ráadásul a magnéziumionnal kiváltott gátlás felfüggeszthető volt a RyR1 ismert aktivátoraival (AMP, ADP, ATP, acil-KoA) (**12. ábra**) [Csala *et al.*, 2001a; Bánhegyi *et al.*, 2003a].

Megfigyeltük továbbá, hogy a RyR1 redox szabályozása nem csak a Ca²⁺, hanem a glutation transzportjában is megmutatkozik, azaz GSH-előkezelés után ruténiumvörössel sem a Ca²⁺-kiáramlást, sem a glutationbeáramlást nem tudtuk gátolni [Bánhegyi *et al.*, 2003a]. A RyR1-et overexpresszáló transzfektált sejtekből készült mikroszómán további bizonyítékokat szereztünk a csatorna glutationtranszportban játszott szerepére. Ezekben a mikroszómákban ugyanis – a vad típusú sejtekből preparálttal ellentétben – a GSH transzportja gátolható volt a RyR1 inhibitoraival (**13. ábra**) [Bánhegyi *et al.*, 2003a].





Nyúl vázizomból preparált mikroszóma glutation iránti áteresztőképességét mértük fényszórásos módszerrel. A nyilak a GSH (**A** és **C**), valamint GSSG (**B** és **D**) adásának időpontját mutatják.

A és B: A RyR gátlószerei csökkentik a glutationpermeabilitást. C és D: A RyR aktiválószerei fokozzák a (magnéziummal gátolt) glutationpermeabilitást. Hat-tíz analízisből származó, jellemző regisztrátumok láthatók az ábrán.



13. ábra Glutationfelvétel vad típusú és RyR1-transzfektált HEK-293 sejtekből készült mikroszómában [Bánhegyi et al., 2003a]

Radioaktív izotóppal jelzett GSH-t felhasználva 3 perces inkubálás után gyors szűréssel mértük a mikroszómába jutott glutation mennyiségét. A kontroll (előkezelés nélküli) értékeket a világos oszlopok mutatják. A RyR-gátló ruténium vörös (RR), rianodin (Ri) és magnéziumion hatását a RyR1-et termelő sejtekből preparált mikroszómában (jobb oldali oszlopok) és vad típusúból származó mikroszómában (bal oldali oszlopok) egyaránt megvizsgáltuk. Átlag + hiba, n=3-5.

Mindezek alapján kijelenthető, hogy a RyR1 kalciumcsatorna glutation számára is átjárást tud biztosítani a vázizom szarkoplazmás retikulum membránján keresztül, vagyis nem csak szenzora, hanem alakítója is a transzmembrán tiol-diszulfid-gradiensnek [Csala *et al.*, 2003]. A jelenség fiziológiás szerepe további vizsgálatokat igényel. Az általunk észlelt és leírt jelenség nem példa nélkül álló, ugyanis már korábban bebizonyosodott, hogy a RyR csatorna nem kizárólag Ca²⁺, hanem más – viszonylag kis molekulatömegű – kationok (kolin és tris) vagy neutrális vegyületek (glukóz, xilóz és glicin), sőt bizonyos körülmények között akár a nagyméretű neomicin áteresztésére is képes [340]. Ráadásul a glutation más iontranszporteren (pl. cisztás fibrózis transzmembrán konduktancia regulátor, CFTR) keresztüli átjutását is megfigyelték [341].

Fontos megjegyezni, hogy a vázizom szarkoplazmás retikulum membránjának nagyfokú glutationpermeabilitása, amely akár meg is szüntetheti a luminális tioloxidáló környezetet, nem egyeztethető össze az egyes szövettípusokra jellemző intenzív luminális fehérjeéréssel, velejáró diszulfidképződéssel. Jól és а értelmezhetők tehát а májmikroszómában kapott eredményeink, melyek alapján ugyanakkor az is kizárható, hogy az oxidált glutationdiszulfid szelektív befelé irányuló transzportja biztosítaná a lumen oxidáló környezetét. Megfigyeléseink azt a modellt támasztják alá, mely szerint a lumenben folyamatosan zajló glutationoxidációt passzívan követi a GSH lassú be-, illetve a GSSG még lassabb kiáramlása, ami nem képes elmosni a gradienseket.

A továbbiakban azokat a mechanizmusokat vizsgáltuk, amelyek a luminális tioloxidációért tehetők felelőssé.

5.1.2. Aszkorbátszintézis által kiváltott tioloxidáció

A legtöbb állat képes az aszkorbát endogén előállítására. Az UDP-glukuronátból kiinduló aszkorbátszintézis utolsó lépését katalizáló gulonolakton-oxidáz (GLO) enzim pedig az ER integráns membránfehérjéje [Bánhegyi et al., 1997; Bánhegyi et al., 1998]. A γ-Lgulonolakton oxigénnel reagál, ami aszkorbát és hidrogén-peroxid keletkezésével jár. Feltételezésünket, mely szerint ez a reakció a glutation oxidációjához vezethet, egér és patkány májmikroszómán, valamint izolált egér májsejteken végzett kísérletekkel igazoltuk. Gulonolakton hatására fokozott glutationfogyást tapasztaltunk mind a mikroszómában, mind izolált sejtekben, és kimutattuk, hogy a mikroszómához adott glutation elsősorban intraluminálisan oxidálódik (1. táblázat) [Puskás et al., 1998]. Az újonnan szintetizált aszkorbát méréseink szerint szintén a vezikulumok lumenében jelent meg először. Gulonolakton hozzáadása után ugyanis az intravezikuláris aszkorbátkoncentráció gyorsan emelkedett, néhány másodperc alatt megközelítette, és egy percen belül elérte az egyensúlyt; az extravezikuláris aszkorbátkoncentráció viszont lassabban és a kísérlet időtartama alatt folyamatosan emelkedett, de végig alacsonyabb volt az intravezikulárisnál (14. ábra). Mindkét eredmény azt valószínűsíti, hogy a membránban található gulonolakton-oxidáz aktív centruma az ER lumenében helyezkedik el. A glutationtiolok oxidációja katalázzal 87%-ban kivédhető volt, ami azt mutatja, hogy annak nagy részéért a keletkező hidrogén-peroxid felelős [Bánhegyi et al., 1996]. Felvetődött ugyanakkor annak a lehetősége, hogy valamilyen módon a keletkező aszkorbát is hozzájárulhat a tioloxidációhoz.

	intravez	zikuláris	extravezikuláris		
	GSH (mM) GSSG (mM)		GSH (mM)	GSSG (mM)	
0 perc	4,19	0,65	3,28	0,15	
5 perc gulonolakton nélkül	3,59 ± 0,71	1,63 ± 0,63	$5,20 \pm 0,10$	0,16 ± 0,12	
5 perc 10 mM gulonolaktonnal	$2,03 \pm 0,33$	$2,69 \pm 0,43$	$5,33 \pm 1,06$	$0,75 \pm 0,11$	

1. táblázat Gulonolakton-oxidáz aktivitással összefüggő glutationoxidáció GSH-val feltöltött májmikroszómában

[Puskás et al., 1998]

A patkány májmikroszómát 5 mM GSH-val töltöttük fel, majd 5 perces inkubálás előtt és után PEG-precipitációval választottuk el az intra- és extravezikuláris folyadéktereket.

Mindkettőben megmértük a GSH és a GSSG mennyiségét és kiszámítottuk a koncentrációkat. Átlag \pm szórás; n=2-6.



14. ábra Az újonnan szintetizált aszkorbát megoszlása az intra- és extravezikuláris folyadéktérben

[Puskás et al., 1998]

Patkány májmikroszómát (10 mg fehérje/ml) inkubáltunk gulonolakton (10 mM) jelenlétében, és különböző időpontokban PEG-precipitációval választottuk el az intra- és extravezikuláris folyadéktereket. Mindkettőben megmértük az aszkorbát mennyiségét és kiszámítottuk az intra- (•) és extravezikuláris (○) aszkorbátkoncentrációkat. (A néhány másodpercet igénybe vevő elválasztás miatt az intravezikuláris koncentráció gyors, kezdeti növekedése nem látható.) Átlag + szórás, n=4-8.

Ha a patkány májmikroszómát (hozzáadott glutation nélkül) kezeltük gulonolaktonnal, akkor a fehérjetiolok oxidálódtak, miközben az aszkorbát mellett dehidroaszkorbát is keletkezett (**15. ábra**) [Csala *et al.*, 1999]. Természetesen a gulonolaktonnak ilyen hatása nem volt tengerimalac mikroszómában, ahol a GLO enzim hiányzik.



15. ábra Aszkorbátszintézist kísérő fehérjetiol-oxidáció és dehidroaszkorbát-termelés májmikroszómában [Csala et al., 1999]

 A: Patkány (●) és tengerimalac (▲) májmikroszómát 1 mM gulonolakton jelenlétében inkubáltunk 37 °C-on, és különböző időpontokban megmértük a fehérjetiolok mennyiségét, majd kiszámítottuk a tioloxidáció mértékét. Az ábrán 8-16 mérés eredményeiből kapott átlagok vannak feltüntetve; a szórás mindenütt kisebb volt az átlag 10%-ánál.

B: Aszkorbát (■) és dehidroaszkorbát (●) mennyiségének alakulása patkány májmikroszómában 1 mM gulonolakton hozzáadása után. Átlag ± szórás, n=3.

Az aszkorbátszintézishez kapcsolódó tioloxidáció nagyrészt oxidatív mellékterméknek tekinthető; és kizárólag olyan állatok anyagcseréje szempontjából fontos, amelyek a GLO enzimet – és ezzel aszkorbátszintetizáló képességüket – az evolúció során megőrizték. A jelenség magyarázatul szolgálhat arra, miért lehetett előnyös bizonyos fajok (pl. ember és tengerimalac) számára ennek a képességnek az elvesztése a GLO mutációja következtében. Az a lehetőség azonban, hogy az aszkorbát (illetve C-vitamin) részt vehet a tioloxidációban, az oxidatív fehérjeérés szempontjából humán vonatkozásban is rendkívül fontos, ezért további vizsgálataink erre irányultak.

5.1.3. Fehérjetiolok oxidációja dehidroaszkorbát hatására

A májmikroszómában a fehérjék tiol csoportjainak (általában 40-50 nmol/mg fehérje) oxidációja oxigén jelenlétében végzett hosszabb (60 perc, 37°C) inkubáció alatt is csak alig detektálható (patkány, tengerimalac és humán májból származó preparátumokban, a fajtól függően 2-18 pmol/perc/mg fehérje) [Csala *et al.*, 1999]. Ez azt valószínűsíti, hogy valamilyen citoplazmában megtalálható vegyület(ek) szükséges(ek) ahhoz, hogy az ER az egyik alapfunkciójának tekinthető oxidatív fehérjeérést biztosítani tudja. Ha az intakt mikroszómához dehidroaszkorbátot adtunk – amelyről ismert, hogy képes bejutni a lumenbe, és ott a PDI egyik lehetséges szubsztrátja –, a tioloxidáció a várakozásnak megfelelően jelentősen fokozódott (**2. táblázat**) [Nardai *et al.*, 2001].

BB patkány	mikroszomális fehérjetiol- tartalom	dehidroaszkorbát- reduktáz aktivitás (GSH mellett)	dehidroaszkorbát- reduktáz aktivitás (GSH nélkül)	fehérjetiol- oxidáció	
	nmol/mg fehérje	nmol/perc/mg fehérje	nmol/perc/mg fehérje	nmol/perc/mg fehérje	
kontroll	$52,9 \pm 1,2$	$4,98 \pm 1,71$	$0,228 \pm 0,030$	$0,183 \pm 0,036$	
diabéteszes	$65,1 \pm 3,0$	$6,32 \pm 0,73$	$0,555 \pm 0,129$	$0,310 \pm 0,156$	

2. táblázat Dehidroaszkorbát-reduktáz aktivitás és azzal összefüggő fehérjetiol-oxidáció kontroll és diabéteszes patkányok májából preparált mikroszómában [Nardai et al., 2001]

Kontroll és spontán diabéteszes BioBreeding/Worcester (BB) patkányok májából preparált mikroszómához 1 mM dehidroaszkorbátot adtunk, majd megmértük a dehidroaszkorbát redukcióját, illetve a fehérjetiolok fogyását. A dehidroaszkorbát redukcióját 2 mM glutation jelenlétében is megvizsgáltuk.

Átlag \pm szórás; n=3.

Radioaktív izotóppal jelölt dehidroaszkorbát alkalmazásával a radioaktivitás jelentős feldúsulását észleltük a diabéteszes állatok májából származó mikroszomális vezikulumok lumenében. A kontroll BB és Harlan Sprague-Dawley patkányokból származó mikroszómában 5-10 perc alatt kiegyenlítődött a koncentrációgradiens, és beállt az egyensúly, a lumenben a dehidroaszkorbát szintje elérte az extravezikuláris koncentrációt. A diabéteszes állatokból származó mikroszómában azonban a dehidroaszkorbát látszólag az extravezikuláris

koncentráció kétszereséig halmozódott fel a lumenben. 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 (**16. ábra**).



16. ábra *Dehidroaszkorbát-felvétel időgörbéje májmikroszómában* [Nardai *et al.*, 2001]

Kontroll (○) és diabéteszes (●) BB, valamint Harlan Sprague-Dawley (□) patkányok májából készült mikroszómához 1mM dehidroaszkorbátot és annak radioaktív izotóppal jelölt analógját adtuk, majd a gyors szűrés módszerrel nyomon követtük a luminális radioaktivitás alakulását, amiből kiszámítottuk a luminális dehidroaszkorbát mennyiségét. Átlag ± szórás, n=3; illetve átlag, n=2.

Különböző mennyiségű fehérjetiolt tartalmazó mikroszóma preparátumokat összehasonlítva korrelációt találtunk a rendelkezésre álló – diszulfiddá oxidálható – tiolok mennyisége és az aszkorbát felhalmozódása között, míg a dehidroaszkorbát beáramlásának kezdeti sebessége nem mutatott eltérést. 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 tiol csoportból dehidroaszkorbát hatására több oxidálódott (**2. táblázat**), és ezzel párhuzamosan az azonos sebességgel történő dehidroaszkorbát-felvétel nagyjából kétszer akkora aszkorbátfelhalmozódást eredményezett, mint a kontrollokban [Nardai *et al.*, 2001].

A dehidroaszkorbáttal kiváltott luminális fehérjetiol-oxidáció csak akkor bírhat fiziológiás jelentőséggel, ha aszkorbátból az ER-ben vagy annak közelében dehidroaszkorbát keletkezik, ugyanis a citoplazma elsősorban aszkorbátot tartalmaz. További kísérleteinkben tehát arra kerestük a választ, vajon aszkorbáttal is kiváltható-e a dehidroaszkorbátéhoz hasonló effektus.

5.1.4. Fehérjetiolok oxidációja aszkorbát hatására

Szemben a kontroll (kezeletlen) patkány májmikroszómával – ahol a fehérjetiolok fogyása alig detektálható –, a fiziológiás koncentrációjú (0,1 mM) aszkorbát jelenlétében inkubált mikroszómában egy óra alatt a fehérjetiolok mintegy 50%-a elfogyott. Két óra inkubálással ez 70%-ig (28,8 \pm 5,1 nmol/mg fehérje; átlag \pm szórás, n=6) fokozódott, de ezután – hiába volt még aszkorbát jelen a médiumban – a fehérjetiol-fogyás már nem folytatódott tovább. A tiolfogyás oxidáció, pontosabban diszulfidképződés következménye volt, ugyanis az inkubálás végén a tiolokat merkaptoetanollal regenerálni tudtuk. Az eredeti hipotézisünknek megfelelően a mikroszomális fehérjetiol-oxidációt patkány, tengerimalac és humán eredetű májmikroszómában egyaránt sikerült beindítanunk aszkorbát hozzáadásával [Csala *et al.*, 1999]. Mivel az antioxidáns aszkorbát alacsony redox potenciálja miatt közvetlenül nem képes a tiolok oxidálására, ez a jelenség csak úgy értelmezhető, ha feltételezzük, hogy az aszkorbát először dehidroaszkorbáttá alakul, ami a PDI szubsztrátjaként diszulfidokat generál. Valóban kimutatható volt kísérleteinkben az aszkorbát tioloxidációhoz hasonló ütemű fogyása (**3. táblázat**).

Fontos különbség az aszkorbát szintézisét kísérő glutationfogyás (lásd 5.1.3. fejezet) és az exogén aszkorbát hatására bekövetkező fehérjetiol-oxidáció között, hogy az utóbbit nem tudtuk kivédeni katalázzal (**11. táblázat**, 5.1.6. fejezet) [Csala *et al.*, 2001b]; és – ezzel összhangban – nem tudtuk kiváltani aszkorbát helyett hidrogén-peroxiddal (**3. táblázat**) [Csala *et al.*, 1999]. Mindez egybecseng azzal a feltételezésünkkel, mely szerint a fehérjetiolok oxidációját nem reaktív oxigén intermedierek, hanem az aszkorbátból keletkező

dehidroaszkorbát váltja ki közvetlenül. Érdekes ugyanakkor, hogy kísérleteinkben a 0,1 mMos koncentrációjú aszkorbát hatékonyabban oxidálta a fehérjetiolokat, mint az 1 mM-os koncentrációjú dehidroaszkorbát (**3. táblázat**).

	patkány májmikroszóma		tengerimalac májmikroszóma		humán májmikroszóma	
	fehérjetiol aszkorbát- -oxidáció fogyás		fehérjetiol aszkorbát- fehérjetiol aszkorbát- -oxidáció fogyás -oxidáció fogyás		fehérjetiol -oxidáció	aszkorbát- fogyás
			pmol/perc/	mg fehérje		
kontroll	12 ± 34	30 ± 14	18 ± 23	ND	2 ± 2	ND
1 mM H ₂ O ₂	26 ± 43	NM	52 ± 5	ND	7 ± 16	ND
0,1 mM AA	332 ± 40	362 ± 68	135 ± 81	149 ± 59	149 ± 35	407 ± 128
0,1 mM AA + 10 mM H ₂ O ₂	325 ± 15	762 ± 63	164 ± 34	1653 ± 137	217 ± 49	1541 ± 271
1 mM DHA	259 ± 10	-410 ± 163	82 ± 4	-295 ± 34	101 ± 26	-294 ± 55

3. táblázat Aszkorbátoxidációval összefüggő fehérjetiol-oxidáció patkány, tengerimalac és humán májmikroszómában

[Csala et al., 1999]

A mikroszómát a bal oldali oszlopban feltüntetett vegyületek jelenlétében inkubáltuk, és mértük az aszkorbát és a fehérjetiolok fogyását. AA: aszkorbát; DHA: dehidroaszkorbát. ND: nem detektálható; NM: nem mértük.

Átlag \pm szórás; n=3-8.

Megfigyeléseink egy, a májsejt ER-jéhez asszociálódó, aszkorbát-oxidáz jelenlétére és működésére utalnak. Mivel aszkorbát-oxidázt eddig csak növényi sejtekben azonosítottak, a jelenséget tovább tanulmányoztuk.

5.1.5. Aszkorbát-oxidáz aktivitás az endoplazmás retikulumban

A citoplazmára jellemző koncentrációban (0,1 mM) 37°C-on inkubált aszkorbát lassan oxidálódik enzim közreműködése nélkül. Azt tapasztaltuk, hogy ezt a folyamatot patkány májból preparált mikroszóma jelentősen meggyorsította [Csala *et al.*, 1999; Szarka *et al.*, 2002]. Az aszkorbát koncentrációjának folyamatos csökkenése, vagyis a mikroszomális aszkorbátfogyasztás oxidáció következménye volt, amit azzal bizonyítottunk, hogy 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 (**17. ábra a és b spektrum**). Ez az aktivitás a májhomogenátum frakcionálásakor leginkább a mikroszómában koncentrálódott, lényegesen kisebb mértékben jelentkezett a mitokondriumot és sejtmagot tartalmazó frakcióban, és szinte teljesen hiányzott a citoplazmából (**4. táblázat**).



17. ábra Aszkorbil gyök enzimatikus keletkezése májmikroszómában [Szarka et al., 2002]

Az aszkorbátot 0,1 mM-os koncentrációban inkubáltuk mikroszóma nélkül (a), illetve mikroszóma (b), hőkezelt mikroszóma (c), mikroszóma és rézkelátor neokuproin (d), valamint tripszinnel kezelt mikroszóma jelenlétében (e). Az aszkorbil gyök jelenlétét elektronspin-rezonancia (ESR) spektroszkópia segítségével detektáltuk.
 Négy-tizenhat analízisből származó jellemző ESR spektrumok láthatók az ábrán.

Mind az aszkorbil gyök, mind a dehidroaszkorbát szintje állandó maradt egészen addig, amíg az aszkorbát el nem fogyott (**18. ábra**). Mivel az általunk alkalmazott fiziológiás

pH-jú közegben mindkét vegyület rendkívül instabil, nyilván "steady state" koncentrációkról van szó: az állandó aszkorbátoxidáció folyamatosan termeli az aszkorbil gyököt, amely diszproporcionálódva alakul részben dehidroaszkorbáttá, ami viszont az adott körülmények között viszonylag gyorsan bomlik [Szarka *et al.*, 2002].



18. ábra Az aszkorbát fogyásának, illetve a dehidroaszkorbát és az aszkorbil gyök keletkezésének időgörbéje májmikroszómában [Szarka et al., 2002]

 A patkány májmikroszómát 0,1 mM aszkorbát jelenlétében inkubáltuk. Az aszkorbát (●) és a dehidroaszkorbát (■) szintjét HPLC-vel mértük, és mindkettőt az inkubálás elején mért aszkorbátkoncentráció százalékaként tüntettük fel. Az aszkorbil gyök (▲) koncentrációját ESR spektroszkópiával határoztuk meg és a kezdeti érték százalékában mutatjuk. Átlag ± szórás, n=6.

Az aszkorbát oxidációját szervetlen katalizátorok is meggyorsíthatják, ezért több módon is meggyőződtünk arról, hogy a megfigyelt jelenség valóban fehérjemediált, enzimatikus folyamat. A mikroszóma előzetes hőkezelése szinte a mikroszóma nélküli

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 (**17. ábra e spektrum, 4. táblázat**). Mivel a membrán permeabilizálása pórusképző alameticinnel csak kis mértékben fokozta az aktivitást (**4. táblázat**), valószínűsíthető, hogy az enzim a membrán külső felszínén helyezkedik el.

	aszkorbil gyökre utaló ESR jel mérete (mesterséges egységben kifejezve)
csak aszkorbát	152 ± 11 (6)
+ teljes májhomogenátum	460 ± 75 (4)
+ mitokondrium frakció	253 ± 10 (4)
+ citoplazma frakció	176 ± 96 (4)
+ natív mikroszóma	548 ± 69 (13)
+ tripszinnel kezelt mikroszóma	207 ± 44 (4)
+ alameticinnel permeabilizált mikroszóma	670 ± 41 (4)

4. táblázat *Az aszkorbát-oxidáz aktivitás topológiája* [Szarka *et al.*, 2002]

Az aszkorbátot önmagában, vagy a májhomogenátum különböző frakciói jelenlétében (1 mg/ml fehérjekoncentráció mellett) inkubáltuk, és ESR spektroszkópiával mértük az aszkorbil gyök mennyiségét. Az eredményeket mesterséges egységekben fejeztük ki átlag ± szórás alakban; a zárójelben foglalt számok a párhuzamos mérések számát mutatják.

A gátlószerek vizsgálata további bizonyítékokkal támasztotta alá az enzim jelenlétét (**5. táblázat**). Különböző fémion-kelátorok (dipiridil, 1,10-fenantrolin és neokuproin) ugyanis csak aktív, vagyis hővel nem inaktivált mikroszóma jelenlétében voltak hatékonyak [Szarka *et al.*, 2002].

Sem a gyökfogók (mannitol, dimetil-szulfoxid), sem az antioxidáns enzimek (szuperoxid-dizmutáz, kataláz) nem befolyásolták az aszkorbil gyök képződését. Ugyancsak hatástalannak bizonyult a flavoproteineket gátló difenilén-jodónium és a hemoproteineket gátló nátrium-azid. Ezzel szemben a citokróm P450 izoenzimek általunk vizsgált gátlószerei (ekonazol és quercetin) jelentősen gátolták az aszkorbil gyök képződését, de az autooxidációt

	aszkorbil gyökre utaló ESR (mesterséges egységben kifeje		
	mikroszóma nélkül	mikroszóma jelenlétében	
kontroll	152 ± 11 (6)	548 ± 69 (13)	
hőkezelt mikroszóma		235 ± 65 (4)*	
1% dimetil-szulfoxid	_	608 ± 74 (3)	
0,1 mM ekonazol	48 ± 32 (3)*	240 ± 52 (10)*	
0,1 mM quercetin	68 ± 26 (3)*	125 ± 44 (4)*	
5 mM mannitol	_	443 ± 57 (7)	
600 U/ml szuperoxid-dizmutáz	—	498 ± 129 (5)	
900 U/ml kataláz		509 ± 69 (4)	
0,1 mM difenilén-jodónium	—	441 ± 74 (3)	
10 mM nátrium-azid		394 ± 32 (3)	
0,1 mM dipiridil	144 ± 36 (3)	198 ± 55 (3)*	
hőkezelt mikroszóma + 0,1 mM dipiridil		143 (2)	
0,1 mM 1,10-fenantrolin	264 ± 21 (4)*	202 ± 11 (4)*	
hőkezelt mikroszóma + 0,1 mM 1,10-fenantrolin	_	164 (2)	
0,1 mM neokuproin	192 ± 18 (4)	200 ± 16 (4)*	
hőkezelt mikroszóma + 0,1 mM neokuproin	_	214 (2)	

(mikroszóma nélkül) is (**5. táblázat**), így feltehetőleg nem az enzimre hatnak, hanem közvetlenül reagálnak az aszkorbil gyökkel (redukálják azokat).

5. táblázat *Az aszkorbát-oxidáz aktivitás gátlása* [Szarka *et al.*, 2002]

Az aszkorbátot önmagában, vagy patkány májmikroszóma (1 mg fehérje/ml) jelenlétében inkubáltuk, és ESR spektroszkópiával mértük az aszkorbil gyök mennyiségét. Az eredményeket mesterséges egységekben fejeztük ki átlag ± szórás alakban; a zárójelben foglalt számok a párhuzamos mérések számát mutatják. Önmagában (mikroszóma nélkül) csak azokat az ágenseket vizsgáltuk, amelyek a mikroszóma jelenlétében szignifikánsan hatottak.

*P < 0,05, szignifikáns eltérés a kontrolltól.

Valószínűsíthető tehát, hogy hemo- és flavoproteinek nem vesznek részt a folyamatban, valamint hogy az aszkorbátoxidáció nem reaktív oxigén intermedierek által kiváltott másodlagos folyamat. Mivel a növényekben leírt aszkorbát-oxidáz enzim rezet tartalmaz [342], különösen érdekes az a megfigyelésünk, hogy a megvizsgált kelátorok közül legerősebb gátlást a rézionra specifikus neokuproin váltott ki, amely csaknem az autooxidáció szintjére csökkentette az aszkorbil gyök keletkezését (**17. ábra d spektrum, 5. táblázat**) [Szarka *et al.*, 2002].

	fehérjetiol-oxidáció	aszkorbátfogyás			
	pmol/perc/mg fehérje				
kontroll	325 ± 58 463 ± 32				
ekonazol	$181 \pm 19^{*}$	131 ± 8*			
proadifen	$62 \pm 5^{*}$	6 ± 11*			
quercetin	$119 \pm 28^{*}$	$137 \pm 17*$			
dipiridil	< 10*	NM			
1,10-fenantrolin	< 10*	$243 \pm 39 *$			
neokuproin	25 ± 16*	$270 \pm 8*$			
hőkezelt mikroszóma	NM	$191 \pm 36^{*}$			

6. táblázat Az aszkorbát-oxidáz gátlásának hatása a mikroszomális fehérjetiol-oxidációra [Csala et al., 1999]

Aszkorbát (0,1 mM) adása után mértük a patkány májmikroszóma (1 mg fehérje/ml) aszkorbátfogyasztását és a mikroszomális fehérjetiolok oxidációját. A bal oldali oszlopban feltüntetett vegyületeket szintén 0,1 mM-os koncentrációban alkalmaztuk. NM: nem mértük. Átlag ± szórás, n=3-6; *P < 0,05, szignifikáns eltérés a kontrolltól.

Az aszkorbátoxidációt gátló citokróm-P450-inhibitor ekonazol, proadifen és quercetin, illetve fémion-kelátor dipiridil, 1,10-fenantrolin és neokuproin jelenlétében nem csak az aszkorbátfogyás, illetve dehidroaszkorbát-keletkezés, hanem hasonló mértékben a tioloxidáció is csökkent (**6. táblázat, 19. ábra**). Az aszkorbátoxidációt oly erősen gátló rézkelátor, neokuproin a tioloxidációt is hatékonyan kivédi. Maximális hatását már 10 μM-os

koncentráció körül kifejti (**19. ábra**). Mindez azt bizonyítja, hogy az aszkorbát valóban az aszkorbát-oxidáz által termelt dehidroaszkorbát formájában vehet részt az oxidatív foldingban [Csala *et al.*, 1999].



19. ábra Rézkelátor neokuproin hatása az aszkorbátfüggő fehérjetiol-oxidációra májmikroszómában [Csala et al., 1999]

A patkányok májából preparált mikroszómát 0,1 mM aszkorbát és különböző koncentrációjú neokuproin jelenlétében inkubáltuk, majd megmértük a fehérjék tiolcsoportjainak fogyását és kiszámítottuk a reakció sebességét.

 $\text{ Åtlag} \pm \text{szórás}, n=3-6.$

A mikroszómához adott aszkorbáttal kapott eredményeinket alátámasztják azok az adatok is, amelyeket gulonolakton adásakor észleltünk. A gulonolakton-oxidáz aktivitással rendelkező patkány májmikroszómában gulonolakton hatására is megjelenik az aszkorbil

gyök jelenlétére utaló ESR spektrum. A jel fokozatosan erősödik, és fél órán belül eléri maximumát, amely az aszkorbát adásánál megfigyelt mérték 60%-ának felel meg (**7. táblázat**) [Szarka *et al.*, 2002].

inkubálás időtartama	aszkorbil gyök által okozott jel mérete (mesterséges egységben kifejezve)				
5 perc	152 ± 31				
30 perc	285 ± 8				
60 perc	274 ± 22				

7. táblázat *Aszkorbil gyök keletkezése gulonolaktonból* [Szarka *et al.*, 2002]

A patkány májmikroszómát különböző ideig 0,1 mM gulonolakton jelenlétében inkubáltuk, és ESR spektroszkópiával mértük az aszkorbil gyök mennyiségét. Az eredményeket mesterséges egységekben fejeztük ki átlag ± szórás alakban; öt párhuzamos mérés alapján. A fél órán belül elért maximum az aszkorbát által kiváltott érték 60%-a.

A helyben keletkező aszkorbát is gyökképződéssel oxidálódik tovább a mikroszómában. Ráadásul az aszkorbátoxidáció gátlása látszólag fokozza az aszkorbáttermelést – ami nyilván az aszkorbátfogyás csökkenésének következménye –, és

csökkenti a gulonolaktonnal kiváltott fehérjetiol-oxidációt (8. táblázat) [Csala et al., 1999].

	fehérjetiol-oxidáció	aszkorbáttermelés		
kezelés	pmol/perc/mg fehérje			
-	12 ± 34	-30 ± 14		
gulonolakton	249 ± 18	1854 ± 153		
gulonolakton + ekonazol	50 ± 22	2014 ± 27		

8. táblázat A gulonolaktonból termelt aszkorbát által kiváltott fehérjetiol-oxidáció [Csala et al., 1999]

Patkány májmikroszómában (1 mg fehérje/ml) 1 mM gulonolakton adása után mértük az aszkorbáttermelést és a mikroszomális fehérjetiolok oxidációját.

Átlag \pm szórás, n=5-8.

Az ER külső felszínén aszkorbátból keletkező dehidroaszkorbát tehát bejut a lumenbe, ahol fehérje- vagy glutation-tiolokat oxidál, a keletkező aszkorbát pedig a lumenben felhalmozódik [Nardai *et al.*, 2001] (lásd 5.1.3. fejezet), ami jól mutatja, hogy a dehidroaszkorbáttal szemben az aszkorbát nem vagy alig képes áthaladni az ER membránján. Ezt a fényszórásos permeabilitásméréseink eredményei is alátámasztják, ugyanis kimutattuk, hogy patkány májmikroszómában az aszkorbát látszólagos felvételének sebességét (a fényszórás csökkenésének meredekségét) az aszkorbátoxidáció vizsgált gátlószerei jelentősen csökkentik (**20. ábra**). Hasonló adatokat kaptunk gyors szűréses transzportmérésekkel is. Az aszkorbátfelvétel kezdeti sebessége ugyanis ekonazol, proadifen és quercetin hatására a kontroll érték negyedére csökkent [Csala *et al.*, 2000].



20. ábra Az aszkorbátoxidáció gátlásának hatása a májmikroszóma látszólagos aszkorbátpermeabilitására [Csala et al., 2000]

Patkány májmikroszóma aszkorbát iránti áteresztőképességét mértük fényszórásos módszerrel. A nyilak az aszkorbát adásának időpontját mutatják.
A: kontroll; B: ekonazollal kezelt; C: proadifennel kezelt mikroszóma.
Négy-négy analízisből származó jellemző regisztrátumok láthatók az ábrán.

A fehérjetiolok oxidációja közvetlenül a dehidroaszkorbát hatásának tekinthető, hiszen a tiol csoportok elektronjait az veszi át a PDI által katalizált reakcióban. Patkány májmikroszómán végzett kísérleteinkben azonban, várakozásunktól eltérően, a 0,1 mM-os koncentrációban adott aszkorbát hatékonyabban oxidálta a tiolokat, mint az akár 1 mM-os

koncentrációban adott dehidroaszkorbát (332 ± 40 vs. 259 ± 10 pmol/min/mg fehérje) (**3.** táblázat, 5.1.4. fejezet). Ez esetleg magyarázható azzal, hogy a gyorsan degradálódó dehidroaszkorbát utánpótlás nélkül hamar elfogy. Ugyanakkor az a lehetőség is felvetődik, hogy az aszkorbát oxidációja a dehidroaszkorbát keletkezése mellett valamilyen más módon is kifejti hatását. 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.

5.1.6. A tokoferol szerepe az aszkorbát által kiváltott tioloxidációban

Azok közül a lipofil elektronszállítók közül, amelyek alkalmasak a membrán két oldala közti redox láncszem szerepére, a K- és E-vitamin jelentős mennyiségben található az ER membránjában. Az előbbi a májban a glutamát-γ-karboxiláció (K-vitamin ciklus) fontos résztvevője, melynek kapcsolatát a diszulfidképződéssel már korábban felvetették [343]. Az E-vitamin pedig az ER legnagyobb mennyiségben előforduló membránhoz kötött antioxidánsa, amely együttműködik az aszkorbáttal a ROS eliminálásában, ezért ennek szerepét vizsgáltuk meg az oxidatív foldingban.

Tizenkét hétig tartó diétával E-vitaminhiányossá tett, illetve normál tápon tartott patkányok májából preparált mikroszómán végeztük kísérleteinket. Kimutattuk, hogy a diéta hatására a mikroszóma szinte teljesen E-vitaminmentes lett (**9. táblázat**), azonban *in vitro* körülmények között E-vitamin adásával a mikroszóma α -tokoferol-tartalma szinte teljesen normalizálható volt (164,1 ± 20,9 pmol/mg fehérje). Az állatok testtömege, májtömege és a májból preparálható mikroszomális fehérje mennyisége nem változott jelentős mértékben a diéta hatására, ami összhangban van azzal, hogy az E-vitaminhiány klinikailag tünetszegény állapot.

Az E-vitaminhiányos mikroszómában a hozzáadott aszkorbát oxidációja 80%-kal nőtt, 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 fehérjetiol oxidálódott, mint a kontroll mikroszóma esetén (**10. táblázat**). A változások arra utalnak, hogy részlegesen szétkapcsolódott az extraluminális aszkorbátoxidáció és az intraluminális fehérjetiol-oxidáció [Csala *et al.*, 2001b].

93

dc_997_15

	kontroll	E-vitaminhiányos
testtömeg (g)	375 ± 29	385 ± 21
májtömeg (g)	$11,\!91\pm0,\!85$	$10,87 \pm 1,47$
relatív májtömeg (%)	$3,18 \pm 0,13$	$2,82 \pm 0,28$
mikroszomális fehérje (mg/g máj)	$15,8 \pm 1,7$	$18,7 \pm 2,2$
mikroszomális α-tokoferol (pmol/mg fehérje)	$378,2 \pm 59,7$	$6,1 \pm 1,4$

9. táblázat E-vitaminmentes diéta hatása patkányokban

Hím Wistar patkányok egy-egy csoportját tizenkét hétig standard patkánytápon, illetve Evitaminmentes tápon tartottunk.

 \dot{A} tlag ± szórás, n=6.

kezelés	hatás (pmol/perc/mg fehérje)	kontroll	E-vitaminhiányos	E-vitaminhiányos + E-vitamin
_	fehérjetiol-oxidáció	4 ± 6	3 ± 5	8 ± 5
	aszkorbátfogyás	26 ± 12	34 ± 10	31 ± 16
aszkorbát	fehérjetiol-oxidáció	283 ± 54	143 ± 33^{a}	216 ± 33^{b}
	aszkorbátfogyás	519 ± 125	925 ± 136^a	682 ± 104^{b}
gulonolakton	fehérjetiol-oxidáció	248 ± 36	126 ± 50^a	NM
	aszkorbáttermelés	2359 ± 423	1259 ± 107^a	NM

10. táblázat Az E-vitaminhiány hatása az aszkorbát, illetve gulonolakton által kiváltott fehérjetiol-oxidációra patkány májmikroszómában

[Csala et al., 2001b]

Standard patkánytápon, illetve E-vitaminmentes tápon tartott patkányok májából preparáltunk mikroszómát, és az E-vitaminhiányos mikroszóma egy részében a tokoferolt utólag pótoltuk. A mikroszómát 0,1 mM aszkorbát vagy 1 mM gulonolakton jelenlétében inkubáltuk, és megmértük az aszkorbátfogyást (vagy -termelést) és a fehérjetiolok oxidációját. Átlag ± szórás, n=6. NM: nem mértük.

^aP < 0,005 a kontrollhoz képest, ^bP < 0,005 az E-vitaminhiányoshoz képest

Az E-vitamin membránvédő, antioxidáns funkciójának megfelelően, az aszkorbáttal vagy glutationnal kezelt E-vitaminhiányos májmikroszómában mintegy háromszorosára fokozódott a lipidperoxidáció kezdeti sebessége a kontroll mikroszómában mérthez képest

(**21. ábra**). Kétségtelen tehát, hogy nem csak a gulonolakton-oxidáz, hanem az aszkorbátoxidáz működése is reaktív oxigén intermedierek (ROS) keletkezésével jár.



21. ábra Aszkorbát és gulonolakton hatása a lipidperoxidációra kontroll és E-vitaminmentes májmikroszómában [Csala et al., 2001b]

A patkányok májából preparált mikroszómát 0,1 mM aszkorbát (■) vagy 1 mM gulonolakton (□) jelenlétében, illetve kontrollként, reagensek hozzáadása nélkül (x) inkubáltunk. A lipidperoxidáció mértékét a hatvan perc alatt termelődött "tiobarbituráttal reagáló vegyületek" (TBARS) mennyisége alapján határoztuk meg.

A: Standard patkánytápon tartott patkányok májából preparált mikroszóma.

B: E-vitaminmentes tápon tartott patkányok májából preparált mikroszóma.

 $Atlag \pm szórás, n=5-6.$

Az eredményeket összegezve valószínűsíthető, hogy az aszkorbát-oxidáz által termelt ROS lipidkörnyezetben, a membrán közvetlen közelében keletkezik, és az E-vitamin valahogy átirányítja az oxidáló hatást a membránlipidekről a luminális fehérjék tiolcsoportjaira. Az E-vitamin tehát – amellett, hogy megvédi a membránlipideket az oxidatív károsodástól – a diszulfidkötés kialakulásához szükséges elektrontranszfer egyik láncszemét is képezi.

A reaktív oxigén intermedierek lipidkörnyezetben való termelődése mellett szól az a megfigyelésünk, hogy az aszkorbáttal kiváltott fehérjetiol-oxidációt antioxidáns enzimekkel (kataláz, szuperoxid-dizmutáz) nem, vízoldékony gyökfogóval (mannitol) pedig csak kis mértékben lehetett gátolni. A mannitol hatásának hátterében az aszkorbát-oxidáz gátlása is lehet, mivel hasonló mértékben csökkentette az aszkorbát fogyását is (**11. táblázat**).

	fehérjetiol-oxidáció	aszkorbátfogyás
	a kontroll érte	ék százaléka
kontroll	100 ± 19	100 ± 24
mannitol (5 mM)	$76 \pm 10^{*}$	82 ± 6
szuperoxid-dizmutáz (300 U/ml)	98 ± 17	NM
kataláz (1000 U/ml)	116 ± 11	NM

11. táblázat Antioxidáns enzimek és egy gyökfogó hatása az aszkorbát által kiváltott fehérjetiol-oxidációra

[Csala *et al.*, 2001b]

Patkány májmikroszómában (1 mg fehérje/ml) 0,1 mM aszkorbát adása után mértük a mikroszomális fehérjetiolok oxidációját és az aszkorbátfogyást. Az eredményeket a kontroll értékek százalékaként mutatjuk – melyek a 10. táblázatban szerepelnek. Átlag ± szórás, n=5-6. NM: nem mértük. *P < 0,05 a kontroll értékhez képest.

Kísérleteinkben a mikroszóma α-tokoferol-tartalmának utólagos pótlása után az értékek a kontrollok közelben voltak, vagyis az aszkorbát- és tioloxidáció kapcsolata helyreállt, és a lipidperoxidáció mértéke is csökkent, ami bizonyítja, hogy a részleges redox szétkapcsolás az E-vitamin hiányának közvetlen következménye volt [Csala *et al.*, 2001b]. Nem zárható ki azonban, hogy más lipidoldékony antioxidánsok, mint a K-vitamin vagy az ubikinon, az E-vitaminhoz hasonló funkciót töltenek be az ER-membránban. Érdekes, hogy az elhízás és az inzulinrezisztencia nem csak a C-vitamin hiányával korrelál [110], amint azt a 2.1.8.1. fejezetben tárgyaltuk, hanem az E-vitamin csökkent mennyiségével is, ami új megvilágításba kerül a tokoferolnak az aszkorbátfüggő fehérjetiol-oxidációban játszott és általunk kimutatott közreműködése fényében.

5.1.7. Az aszkorbátfüggő fehérjetiol-oxidáció modellje

A májból preparált mikroszómákon tett megfigyeléseink alapján felállítottunk egy modellt, amely összegzi és rendszerbe foglalja a kapott eredményeket [Bánhegyi *et al.*, 2003b; Csala *et al.*, 2006]. 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 [Csala *et al.*, 2012]. 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 szolgáltathat oxidáló ágenst. A felvázolt reakciólánc nettó eredménye az elektronok folyamatos áramlása a ciszteintioloktól mint primer elektrondonoroktól az oxigénig mint végső elektronakceptorig (**22. ábra**).



22. ábra Az aszkorbátfüggő fehérjetiol-oxidáció modellje

Az ER-membrán külső felszínén aszkorbátból aszkorbil gyökön keresztül dehidroaszkorbát keletkezik, ami reaktív oxigén intermedierek (ROS) képződésével jár. A dehidroaszkorbát bejut a lumenbe, ahol részben a proteindiszulfid-izomeráz (PDI) szubsztrátjaként, részben ettől független mechanizmusokkal fehérjetiolokat oxidál. A belőle keletkező aszkorbát nem tud kijutni, de a ROS által, E-vitamin közvetítésével, újraoxidálódhat dehidroaszkorbáttá.

Az általunk megalkotott és saját eredményeinken alapuló modell mások által is megerősítést nyert, és az oxidatív fehérjeérés egyik elfogadott útvonalaként tartják nyilván [344-347]. A dehidroaszkorbát és a fehérjetiolok közti elektronátvitel gondos tanulmányozása azt mutatta, hogy a reakciót a PDI meglehetősen kis sebességgel katalizálja, de a tioredoxin szupercsalád egyéb mikroszomális elhelyezkedésű tagjai is mutatnak ilyen tiolfüggő dehidroaszkorbát-reduktáz aktivitást. Ráadásul a dehidroaszkorbát enzim közreműködése nélkül is viszonylag nagy sebességgel reagál az éretlen fehérjék tiol-csoportjaival [348]. Összességében tehát e vizsgálatok is alátámasztották a protein-diszulfidképződés általunk körülírt mechanizmusának relevanciáját. Mivel azonban az aszkorbát részvétele a fehérjetioloxidációban döntően *in vitro* megfigyeléseken alapul, és ez nem ad kellő támpontot az aszkorbátfüggő mechanizmus relatív súlyának megítéléséhez, a továbbiakban kísérletes bizonyítékot akartunk szerezni a jelenség *in vivo* relevanciájár is.

5.1.8. Endoplazmás retikulum stressz skorbutban

In vivo kísérleteinknél abból indultunk ki, hogy amennyiben – hipotézisünknek megfelelően – 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. Tehát az UPR és az apoptózis kimutatása aszkorbáthiányos állatokban a fehérjeérés zavarára utalna, és alátámasztaná a C-vitamin szerepét az oxidatív foldingban. 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, 2, 3, ill. 4 hétig) tartottuk aszkorbátmentes diétán, és a diéta kezdetén feldolgozott (azaz 0 hétig skorbutizált), vagy négy hétig normál táppal etetett (kontroll), illetve két hét diéta után két további hétig újra aszkorbátot kapott ("2+2") állatokkal hasonlítottuk őket össze. A C-vitaminmentes diétán tartott állatok májában az aszkorbát szintje gyorsan csökkent, 1 hét alatt kb. a kiindulási érték felére, a második héttől pedig már nem volt HPLC-s módszerünkkel kimutatható mennyiségű aszkorbát a májban, vagyis szintje 10 nmol/g szövet alá csökkent (**12. táblázat**) [Margittai *et al.*, 2005].

	kontroll	0	1	2	3	4	2 + 2
máj aszkorbát (µmol/g szövet)	1,91 ± 0,08	1,86±0,05	1,07 ± 0,07*	ND*	ND*	ND*	2,69 ± 0,01*
TBARS (µmol/g fehérje)	119 ± 14	114 ± 11	128 ± 11	121 ± 15	117 ± 9	194 ± 9*	83 ± 6
testtömeg (g)	728 ± 32	550 ± 40	588 ± 25	627 ± 22	670 ± 17	612 ± 78	725 ± 21
máj tömege (g)	25,8 ± 0,9	19,8 ± 1,0	23,5 ± 2,4	21,1 ± 0,8	21,2 ± 0,4	20,5 ± 1,1	$26,1 \pm 0,7$

A skorbutizáló diéta időtartama (hét)

12. táblázat *C-vitaminmentes diéta hatása tengerimalacokban* [Margittai *et al.*, 2005]

Tengerimalacok egy-egy csoportját négy hétig standard tengerimalac-tápon (kontroll), illetve a jelzett ideig C-vitaminmentes tápon tartottunk. Egy csoport két hetes C-vitaminmentes diéta után két hétig C-vitaminpótlásban részesült (2 + 2). A májak aszkorbátkoncentrációját HPLCvel, a lipidperoxidációt a "tiobarbituráttal reagáló vegyületek" (TBARS) mennyisége alapján határoztuk meg. ND: nem detektálható (kevesebb mint 10 nmol aszkorbát/g szövet). Átlag ± hiba, n=4, *P < 0,001 a kontrollhoz viszonyítva.

A lipidperoxidáció a diéta első három hete alatt nem változott, a negyedik héten azonban jelentősen emelkedett. Az állatok testsúlya a harmadik hétig növekedett, majd a negyedik héten visszaesést észleltünk, ami a skorbut manifesztációjának jeleként értékelhető (**12. táblázat**). Az ER-stressz markereinek tekinthető dajkafehérjék (GRP78 és GRP94) indukciója már a C-vitaminhiány kialakulásakor, a skorbut bekövetkezte előtt kimutatható volt, és tovább emelkedett a diéta négy hete során. Megvizsgáltuk két foldáz (PDI és ERp72) expressziójának alakulását is, és azt találtuk, hogy a PDI mennyisége – a GRP családhoz tartozó ER-chaperonokéhoz hasonlóan – a diéta során egyre emelkedett, ezzel szemben az ERp72 szintjében az aszkorbátmegvonás nem váltott ki lényeges változást (**23. ábra**) [Margittai *et al.*, 2005].



23. ábra Az endoplazmás retikulum chaperon és foldáz fehérjéinek expressziója a Cvitaminhiányos tengerimalacok májában [Margittai et al., 2005]

Tengerimalacok egy-egy csoportját négy hétig standard tengerimalac-tápon (K), illetve a jelzett számú hétig C-vitaminmentes tápon tartottunk. Egy csoport két hetes C-vitaminmentes diéta után két hétig C-vitaminpótlásban részesült (2 + 2). A májakból preparált mikroszómában western blot módszerrel vizsgáltuk két dajkafehérje (GRP94 és GRP78), valamint két foldáz (PDI és ERp72) mennyiségét. Egy-egy jellemző Western blot eredmény látható az ábrán. A csoportonként négy blot denzitometriás eredményeit átlag + hiba formájában mutatjuk.

*P < 0,05 a kontrollhoz viszonyítva.

A diéta elkezdése előtt vizsgált, illetve kontroll tengerimalacok májában, várakozásunknak megfelelően, igen kevés apoptotikus testet találtunk. Ugyanilyen alacsony maradt az apoptózis index (1000 sejtre jutó apoptotikus sejtek/testek száma) az aszkorbátmentes diéta első két hetében is. A diéta harmadik hetében azonban háromszorosára, a negyedik héten pedig négyszeresére emelkedett az apoptózis index a kontrollhoz viszonyítva (**24. ábra**) [Margittai *et al.*, 2005].





Tengerimalacok egy-egy csoportját négy hétig standard tengerimalac-tápon (K), illetve a jelzett számú hétig C-vitaminmentes tápon tartottunk. Egy csoport két hetes C-vitaminmentes diéta után két hétig C-vitaminpótlásban részesült (2 + 2). Az apoptózis gyakoriságát hematoxilin-eozinos festés után szövettani metszetekben tanulmányoztuk. A kapott eredményeket a terminális dezoxinukleotidil transzferáz dUTP "nick-end labeling" (TUNEL) módszerrel is megerősítettük (be nem mutatott adatok). A bal oldali képek három különböző kezelés után kapott reprezentatív szövettani metszetet mutatnak; az apoptotikus testeket nyilak jelzik. A jobb oldali diagram az 1000 sejtre jutó apoptotikus testek számának (apoptózis index) alakulását mutatja.

Átlag + hiba, n=4. *P < 0.05 a kontrollhoz viszonyítva.

Azok a tengerimalacok, amelyek két hetes diéta után két hétig újra kapták a Cvitamint, a kontrollokéhoz hasonló testsúllyal rendelkeztek. Májszövetükben magas aszkorbátszintet mértünk; nem emelkedett jelentősen a lipidperoxidáció; sem chaperon-, sem foldázindukciót, sem szignifikánsan emelkedett apoptózist nem észleltünk.

Eredményeink azt mutatják, hogy C-vitamin hiányában – még a skorbut tüneteként értékelhető testsúlycsökkenés előtt – bekövetkezik a fehérjeérés zavara az ER-ben, és kialakul az UPR, valamint az apoptózis a májsejtekben. Bár a foldázok redox állapotának eltolódását nem sikerült kimutatnunk (**25. ábra**), ami a kompenzációs mechanizmusok következménye is lehetett, *in vitro* eredményeink alapján feltételezhető, hogy a jelenség hátterében a diszulfidképződés elégtelensége áll.



25. ábra Endoplazmás retikulum foldázok redox állapota C-vitaminhiányos tengerimalacok májában [Margittai et al., 2005]

Tengerimalacok egy-egy csoportját négy hétig standard tengerimalac-tápon (K), illetve a jelzett számú hétig C-vitaminmentes tápon tartottunk. A redukált és oxidált tiolokat tartalmazó fehérjéket AMS reagenssel történő kezelés után gél-elektroforézissel különítettük el, majd PDI és ERp72 elleni antitestekkel mutattuk ki a megfelelő foldázokat. Az eljárást *in vitro* oxidált (ox) és redukált (red) fehérjemintákkal is elvégeztük. Négy analízis egyik jellemző eredménye látható az ábrán.

5.1.9. A glikált hemoglobin szintjének csökkenése aszkorbátkezelés

hatására

Mivel az aszkorbát oxidatív fehérjeérésben betöltött szerepe *in vivo* is megerősítést nyert, okkal feltételezhető, hogy a specifikus tüneteket még nem okozó, szubklinikai C-vitaminhiány is csökkentheti az ER fehérjeérlelő kapacitását. Ennek a metabolikus szindróma és a 2-es típusú cukorbetegség szempontjából is jelentősége lehet, hiszen ezáltal akadályozhatja a szekréciós fehérjék (pl. inzulin) termelődését, illetve fokozhatja a sejtek ER-stressz iránti érzékenységét. Ez a feltételezés összhangban van a 2.1.8.1. fejezetben bemutatott irodalmi adatokkal.

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 (**26. ábra**), és a csökkenés mértéke jól korrelált a kiinduló értékkel [Szaleczky *et al.*, 1998]. 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 [99] és/vagy az inzulinhatás [349] fokozása révén hatott.





[Szaleczky et al., 1998]

A vizsgálatban résztvevő 17 egészséges (Kontroll) és 19 cukorbeteg (Diabetes) személy 40 napon át részesült napi 1000 mg aszkorbátkezelésben. Vérükben a HbA1c %-os arányát a kezelés előtt és után egyaránt meghatároztuk.

Átlag + hiba, n=17/19. Korreláció és szignifikancia az ábrán jelezve.

5.2. A luminális piridin-nukleotid redox rendszer redukált állapotának fenntartása az endoplazmás retikulumban

5.2.1. A citoplazma és az endoplazmás retikulum NADPH-NADP+ készletének elkülönülése

Mivel a luminális aktív centrummal rendelkező 11βHSD1 a legtöbb sejttípusban (pl. máj, viszcerális zsírszövet, izom) fiziológiás körülmények között a kortizont kortizollá redukálja, valószínűsíthető, hogy környezetében a NADPH-NADP⁺ redox rendszer dominánsan redukált állapotban van. Ugyanakkor a sejtek citoplazmájára is általában jellemző a magas [NADPH]:[NADP⁺] arány, ez a tény tehát önmagában nem segít eldönteni, hogy az ER-ben luminálisan elhelyezkedő dehidrogenázok hozzáférnek-e a citoplazma piridin-nukleotidjaihoz, vagy esetleg elkülönült készletet használnak. Patkány májmikroszóma felhasználásával végzett kísérleteinkből az utóbbi lehetőséget alátámasztó bizonyítékokat szereztünk. Kimutattuk, hogy az intakt mikroszómához adott kortizon egy része exogén redukáló forrás nélkül is kortizollá alakul, míg ugyanez permeabilizált mikroszóma esetén nem észlelhető (**27. ábra**), vagyis endogén NADPH található a lumenben [Piccirella *et al.*, 2006].



27. ábra Kortizonredukció intakt májmikroszómában
 [Piccirella et al., 2006]
 Az intakt (•) és alameticinnel permeabilizált (○) patkány májmikroszómát kortizon (10 µM) jelenlétében inkubáltuk, és mértük a keletkező kortizol mennyiségét.
 Átlag ± szórás, n=4.

Kidolgoztunk egy módszert a mikroszóma endogén, luminális NADPH-tartalmának fluoreszcens detektálására. Bár a vezikulumok kis térfogata miatt igen kis mennyiség kimutatására van szükség, a fluoreszcencia intenzitása lehetővé teszi a változások nyomon követését.



28. ábra *A mikroszóma endogén, luminális NADPH-tartalmának fluoreszcens detektálása* [Piccirella *et al.*, 2006]

A: A NADPH-ra jellemző fluoreszcencia folyamatos detektálása mellett a nyíl által jelzett időpontban alameticinnel permeabilizáltuk a patkány májmikroszómát (2-essel jelzett regisztrátum).

B: Az ábra A részén "a" és "b" betűvel jelölt pontokban felvett fluoreszcens emissziós spektrumok (350 nm gerjesztési hullámhosszon) összehasonlítása. A beillesztett diagram a két görbe közti különbséget mutatja (ez egybeesik a NADPH emissziós spektrumával).
C: A NADPH-ra jellemző fluoreszcencia folyamatos detektálása mellett a nyíl által jelzett időpontokban NADPH-t vagy NADH-t adtunk a mikroszómához. A számozott nyilak NADPH (1: 1 μM; 2: 2 μM; 6: 5 μM) vagy NADH (3: 1 μM; 4: 2 μM; 5: 1 μM; 7: 5 μM) adását mutatják. A pórusképző alameticin hozzáadását (membránpermeabilizálás) üres nyílhegyek jelzik.

Négy-hat kísérletből származó jellemző regisztrátumok láthatók az ábrán.

Méréseink egyben megerősítették, hogy a mikroszómában detektálható NADPH valóban a luminális (intravezikuláris) térben helyezkedik el. A preparátumhoz kívülről hozzáadott NADPH vagy NADH ugyanis a májmikroszóma külső felszínén – az ott elhelyezkedő oxidoreduktázok hatására – azonnal eloxidálódik, és ugyanez történik a luminális piridin-nukleotidokkal is, ha a membránt átjárhatóvá tesszük számukra, és hozzáférnek a külső felszín enzimeihez (**28. ábra**) [Piccirella *et al.*, 2006]. További vizsgálataink szerint a luminális piridin-nukleotidokat hatékonyan oxidálja, illetve redukálja a H6PD és a 11βHSD1 (lásd később). E két enzim NADPH-specificitása alapján valószínűsíthető, hogy a mikroszómában túlnyomórészt NADPH és NADP⁺ található.

Fontos megjegyezni, hogy a vezikulumokban lévő NADPH a preparálás és tárolás során a többszöri pufferváltás és hígulás ellenére sem veszett el. Radioaktív NADPH jelenlétében végzett mikroszómapreparálással kizártuk azt a lehetőséget, hogy a lumenben található NADPH esetleg a homogenizálás során műtermékként került volna a vezikulumok belsejébe, vagyis valóban az ER endogén piridin-nukleotidjáról van szó.

Fényszórásos transzportméréseink szerint a mikroszóma membránja nem permeábilis a NADP⁺ és a NADPH számára [Piccirella *et al.*, 2006]. Ugyanolyan nagymértékű és hosszan tartó fényszórás-fokozódást váltanak ki a mikroszómaszuszpenzióban, mint a szacharóz, amelyről ismert, hogy gyakorlatilag nem képes átjutni az ER membránján (**29. ábra A,B,C és D**).

Ezzel egybecsengő eredményeket kaptunk gyors szűréses transzportméréssel is, amely igazolta a NADP⁺ rendkívül lassú bejutását a mikroszomális vezikulumokba. Mivel az extraés intavezikuláris koncentrációk még egy óra inkubálás alatt sem egyenlítődtek ki, könnyen belátható, hogy a membránon való átjutás nem tarthat lépést a luminális enzimaktivitásokkal, vagyis az ER membránja piridin-nukleotidokra gyakorlatilag impermeábilisnak tekinthető (**29. ábra E**) [Piccirella *et al.*, 2006].


29. ábra *A mikroszomális membrán piridin-nukleotidok számára nem permeábilis* [Piccirella *et al.*, 2006]

A-D: A fényszórás folyamatos detektálása mellett a nyilak által jelzett időpontban a NADP⁺
(A) és a NADPH (B) kis térfogatú, nagy koncentrációjú oldatát adtuk a mikroszómához.
Kontrollként az ismerten nem transzportálódó szacharóz (C), illetve a vezikulumok lumenébe bejutó glukóz-6-foszfát (D) szolgált. A nyílhegy az alameticin alkalmazásának időpontját jelzi. Négy-négy kísérletből származó jellemző regisztrátumok láthatók az ábrán.
E: A mikroszóma NADP⁺-felvételét a gyors ülepítés módszerével is megmértük. A vezikulumokat 0,2 mM NADP⁺ és annak radioaktív nyomjelzője jelenlétében inkubáltuk, majd a jelzett időpontokban elválasztottuk, és megmértük a luminális mennyiséget. Átlag ± hiba, n=4.

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 (30. ábra) [Szelényi et al., 2013]. Mindez azt is megmagyarázza, hogy a preparálás és tárolás során hogyan őrizhették meg NADPH-tartalmukat a vezikulumok [Piccirella et al., 2006].



30. ábra A H6PD és a 11βHSD1 aktivitások jelentős latenciája patkány májmikroszómában [Szelényi et al., 2013]

A NADPH-ra jellemző fluoreszcencia folyamatos detektálása mellett a nyilak által jelzett időpontban a feltüntetett vegyület kis térfogatú, nagy koncentrációjú oldatát adtuk a mikroszómához. A H6PD (bal oldal) és a 11BHSD1 (jobb oldal) aktivitását a G6P, illetve a kortizol oxidációjához kapcsolt NADPH-keletkezés jelzi.

Négy-négy kísérletből származó jellemző regisztrátumok láthatók az ábrán.

Kijelenthetjük tehát, hogy az ER lumenében a citoplazmától izolált NADPH-NADP⁺ készlet áll az itt működő dehidrogenázok rendelkezésére. Ennek redox állapotát elkülönült, lokális folyamatok határozzák meg, ezért további kísérleteinkkel a H6PD enzim működését, luminális NADPH-termelésben betöltött szerepét, illetve a 11BHSD1-val fennálló funkcionális kapcsolatát kívántuk felderíteni.

5.2.2. A luminális NADPH-NADP+ készlet redukált állapotának fenntartása

A patkánymájból preparált, intakt mikroszóma rendelkezik endogén kortizonredukáló kapacitással, ahogy ezt a 27. ábra is mutatja. Glukóz-6-foszfát (10 µM) hozzáadásával ugyanakkor a kortizoltermelődés sebessége jelentősen növelhető (290 ± 75 pmol/mg protein/10 perc a kontroll 75 ± 20 pmol/mg protein/10 perc értékhez képest; átlag \pm szórás, n = 4; p < 0.01), és hosszú ideig fenntartható [Czegle *et al.*, 2006]. Ez a megfigyelésünk összhangban van a H6PD luminális elhelyezkedésével és NADP⁺-függő glukóz-6-foszfát-

dehidrogenáz aktivitásával. A leírt redox kapcsolat a mikroszómában kölcsönösen fennáll: izotóppal jelzett glukóz-6-foszfát jelenlétében kortizon hatására fokozódik a luminális radioaktivitás akkumulációja, ami a glukóz-6-foszfát felgyorsult oxidációjára utal [Czegle *et al.*, 2006]. Mindkét effektus felfüggeszthető a glukóz-6-foszfát transzportjának specifikus gátlószerével (S3483-mal), vagyis a glukóz-6-foszfát bejutását igényli a vezikulumok lumenébe. A glukóz-6-foszfát jelenlétében mérhető kortizoltermelődés sebességét például 50 μ M S3483 gyakorlatilag a glukóz-6-foszfát nélküli kontroll szintjére, 80 ± 32 pmol/mg protein/10 min (átlag ± szórás, n = 3) értékre csökkentette. Mindez bizonyítja a glukóz-6foszfát-transzporter, a H6PD és a 11βHSD1 közötti funkcionális kapcsolatot [Czegle *et al.*, 2006].

A megfigyelés nem csak a luminális piridin-nukleotid redox státusz, hanem a GSD1b (a glukóz-6-foszfát transzlokáz veleszületett defektusa) patobiokémiája szempontjából is érdekes. Az ilyen betegekben ugyanis súlyos neutropénia alakul ki, ami összefügghet a luminális NADPH-termelés elégtelenségével is. Mivel a glukokortikoidokról kimutatták, hogy gátolják a neutrofil sejtek apoptózisát, így meghosszabbítják e sejtek élettartamát [350], feltételezhető, hogy a glukóz-6-foszfát transzportjának defektusa a prereceptoriális kortizolaktiválás hiánya miatt csökkenti a granulociták életképességét. A glukóz-6-foszfát transzporter jelenlétét a granulocita sejtek ER-jében már kimutatták [351], de a triád másik két tagjának jelenléte, és a funkcionális kapcsolatok bizonyítása még további vizsgálatokat igényel. Fontos azonban megjegyezni, hogy a granulociták egy sajátos – a májban találhatótól eltérő – glukóz-6-foszfatáz izoformát (glukóz-6-oszfatáz- β vagy G6PC3) tartalmaznak, szintén az ER-ben, és ennek defektusa ugyancsak zavart okoz a granulocita-differenciálódás folyamatában [352].

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 (**31. ábra**) [Piccirella *et al.*, 2006; Czegle *et al.*, 2006].



31. ábra *A mikroszóma lumenében magas a [NADPH]:[NADP⁺] arány* [Piccirella *et al.*, 2006]

A NADPH folyamatos, fluoreszcens detektálása mellett a nyilak által jelzett időpontban a feltüntetett vegyületeket adtuk az intakt mikroszómához. A függőleges tengely a NADPH-nak megfelelő fluoreszcencia mértékét mutatja mesterséges egységekben.
A: glukóz-6-foszfát (G6P) NADP⁺-redukáló hatása; B: kortizon NADPH-oxidáló hatása, és ennek visszafordítása glukóz-6-foszfáttal, illetve a glukóz-6-foszfát NADP⁺-redukáló hatásanak kivédése a transzportot gátló S3483 segítségével (b görbe); C: kortizol NADP⁺-redukáló hatása; D: kortizon NADPH-oxidáló hatása, és ennek visszafordítása kortizollal. Négy-hat kísérletből származó jellemző regisztrátumok láthatók az ábrán.

Az általunk vizsgált patkány májmikroszómában tehát a NADPH-NADP⁺ redox rendszer döntően redukált állapotban volt, ami arra utal, hogy a kísérleteinkhez felhasznált állatok májsejtjeiben az ER lumenében is magas a [NADPH]:[NADP⁺] arány. Megfelelő enzim jelenlétében (pl. glutation-reduktáz a citoplazmában) ez maga után vonja a tioldiszulfid redox rendszer redukált állapotának fenntartását, ami fontos az antioxidáns védelem szempontjából. Az organellum lumenében azonban a diszulfidok redukciója az oxidatív fehérjeérést tenné lehetetlenné, és a mérések is azt igazolják, hogy a tiol-diszulfid redox rendszer oxidált állapotban van.

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

Feltételeztük tehát, hogy az ER lumenében a két kolokalizált rendszer funkcionálisan elkülönül egymástól. Megvizsgáltuk az esetleges kölcsönhatásokat, és azt találtuk, hogy a mikroszomális fehérjék tioljait exogén NAD⁺, NADP⁺ és kortizon nem képes oxidálni, valamint NADH, NADPH és kortizol nem képes redukálni (**13. táblázat**).

mikroszómához adott reagens	fehérjetiolok mennyisége a kontroll %-ában		
semmi (kontroll)	$100,0 \pm 9,2$		
NAD ⁺ (500 μM)	$97,2 \pm 5,0$		
NADP ⁺ (500 μM)	$91,9 \pm 8,1$		
NADH (500 μM)	$95,3 \pm 9,2$		
NADPH (500 μM)	$94,6 \pm 6,8$		
ditiotreitol (500 µM)	116,9 ± 3,1*		
FAD (500 μM)	$76,3 \pm 14,2*$		
kortizon (10 µM)	$98,8 \pm 1,4$		
metirapon (10 μM)	$99,4 \pm 0,8$		
kortizol (10 μM)	$101,9 \pm 2,2$		

13. táblázat Különböző oxidáló és redukáló szerek hatása a mikroszomális fehérjék tioljaira [Piccirella et al., 2006]

A patkány májból izolált mikroszómát a feltüntetett vegyület jelenlétében inkubáltuk, majd megmértük a fehérjék tiolcsoportjának mennyiségét. A kontroll mikroszómában ez 56,0 ± 5,2 nmol/mg fehérje volt. Átlag ± szórás; n=3-6; * P < 0,05

Az endogén, luminális NADPH fluoreszcens detektálásával azt is demonstráltuk, hogy a vezikulumok belsejében található piridin-nukleotidok redukáltsági állapota glutation-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 nem befolyásolta a kortizon NADPH-oxidáló, illetve a glukóz-6-foszfát NADP⁺redukáló hatását sem (**32. ábra**). Ugyanilyen negatív eredményeket kaptunk GSSG-vel is. [Piccirella *et al.*, 2006].



32. ábra *A glutation nem befolyásolja a luminális NADPH-NADP*⁺ *redox rendszer állapotát* [Piccirella *et al.*, 2006]

A NADPH folyamatos, fluoreszcens detektálása mellett a nyilak által jelzett időpontban a feltüntetett vegyületeket adtuk az intakt mikroszómához. A függőleges tengely a NADPH-nak megfelelő fluoreszcencia mértékét mutatja mesterséges egységekben.

Az "a"-val jelölt görbe 1 mM GSH jelenlétében, a "b"-vel jelölt kontroll pedig GSH nélkül készült.

Négy kísérletből származó jellemző regisztrátumok láthatók az ábrán.

A két redox rendszer függetlenségének egyik lehetséges magyarázata lenne az organellumon belüli különböző szubkompartmentáció, vagyis az egyik redox pár (tioldiszulfid) szinte kizárólagos jelenléte a durva, míg a másik (NADPH-NADP⁺) jelenléte a sima felszínű ER-ben. Bár az organellum két részének membránja és lumene folytonos egymással, valamint a transzlokon csatornákon és riboszómákon kívül más komponensek egyértelmű szubkompartmentációját eddig nem bizonyították, ezt a lehetőséget is indokolt volt ellenőrizni. Ezért tisztítva előállítottuk a durva és sima felszínű mikroszóma (szub)frakciót, majd mindkettőben külön-külön megvizsgáltuk a kortizon NADPH-szintekre gyakorolt hatását. Méréseink a fluoreszcencia hasonló mértékű csökkenését, és a változás glukóz-6foszfáttal való egyöntetű visszafordíthatóságát mutatták (a 30. ábrán láthatóhoz hasonló módon). Ezzel összhangan azt találtuk, hogy a kétféle mikroszómában sem a 11βHSD1 és H6PD aktivitása, sem a prereceptoriális kortizoltermelés katalitikus triádját alkotó három fehérje (glukóz-6-foszfát transzporter, H6PD és 11βHSD1) Western blottal detektálható szintje között nincs szignifikáns különbség [Piccirella *et al.*, 2006].

Aktivitásmérésekkel 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 ($0,8 \pm 0,3$ vs. $16,8 \pm 1,6$ nmol/perc/mg fehérje). A glutation-dehidrogenáz elleni antitesttel készült Western blot pedig nem mutatta ki a fehérje jelenlétét a mikroszóma frakcióban (**33. ábra**). Az enzim hiánya piridin-nukleotid és a tiol-diszulfid redox rendszerek elkülönülését biztosíthatja.



33. ábra A glutation-reduktáz fehérje nincs jelen a májmikroszómában [Piccirella et al., 2006]

A patkány májból differenciál-centrifugálással előállított posztmitokondriális felülúszóból (PMF), mitokondrium frakcióból (MIT), citoplazma frakcióból (CIT) és mikroszómából (MSz) azonos mennyiségű fehérjét (50 μg) futtattunk gél elektroforézissel, majd vizsgáltunk western blot módszerrel. A glutation-reduktáz elleni antitest a fehérje méretének megfelelő magasságban mutatta ki a fehérjét a mikroszóma kivételével az összes vizsgált mintában. Négy analízisből származó jellemző kép látható az ábrán.

Az ER lumenében elhelyezkedő NADPH-NADP⁺ készlet eredményeink szerint mind a citoplazmai NADPH-NADP⁺ készlettől, mind a luminális tiol-diszulfid redox rendszertől elkülönül. A kortizoltermeléshez szükséges luminális NADPH-utánpótlást saját megfigyeléseink és mások eredményei szerint is a H6PD enzim tevékenysége biztosítja [Senesi *et al.*, 2010a]. Mivel a lokális kortizoltermelés intenzitása egyértelműen fontos meghatározója a sejt anyagcseréjének, hormonokra adott válaszreakciójának és differenciálódásának, vizsgálatokat folytattunk a H6PD génexpressziójának és működésének alaposabb megismerése érdekében.

5.2.4. Mikroszomális NADPH- és kortizoltermelés fruktóz-6-foszfát felhasználásával

Hasonlóan az ER egyéb luminális enzimeihez, a H6PD tényleges szubsztrátspecifitását is szűkíti, illetve meghatározza a membránon keresztüli transzport szelektivitása. A glukóz-6foszfát bejutását facilitáló, azonosított transzporterről kezdetben csak azt bizonyították, hogy

a glukóztermelésre képes sejtekben szükséges a glukóz-6-foszfatáz működéséhez. Később derült ki róla, hogy a H6PD számára is szubsztrátot biztosít, és a H6PD alapvető működésének azt tartjuk, hogy a NADP⁺ redukálásához glukóz-6-foszfátot oxidál 6-foszfoglukonáttá. Ugyanakkor elképzelhető, hogy a citoplazma felől a szénhidrát-anyagcsere egyéb intermedierei is táplálhatják az ER luminális NADPH-termelését, illetve ezen keresztül a lokális kortizoltermelést. Ez a lehetőség különösen érdekes a fruktóz és az elhízás kapcsolata szempontjából. A zsírsejtek ugyanis intenzív prereceptoriális glukokortikoid-metabolizmust folytatnak, és e sejtekben a fruktóz fruktóz-6-foszfátként kapcsolódik a glikolízisbe.

Megvizsgáltuk tehát, hogy a májból, valamint zsírszövetből készült mikroszóma képes-e a fruktóz-6-foszfát felvételére és felhasználására. Elsőként arra voltunk kíváncsiak, hogy átalakulhat-e a fruktóz-6-foszfát glukóz-6-foszfáttá az ER belsejében, ezért összevetettük a patkány májmikroszómában zajló glukóztermelés sebességét a kétféle hexóz-6-foszfát jelenlétében. Azt találtuk, hogy a fruktóz-6-foszfát is kiváló forrása a glukóztermelésnek, vagyis hatékonyan izomerizálódik (14. táblázat) [Senesi et al., 2010b]. Ugyanakkor elképzelhető, hogy az izomerizáció – legalábbis részben – a vezikulumok külső felszínéhez esetleg asszociálódott citoplazmatikus foszfohexóz-izomeráz működésének tudható be. Annak eldöntésére, hogy luminális enzim aktivitását észleljük-e, először megvizsgáltuk, hogyan hat a glukóztermelés sebességére a vezikulumok ismételt mosása, vagyis a hozzájuk tapadó fehérjék eltávolítása a vezikulumok ülepítésével és puffercserével. Az első mosás kilenced részére csökkentette a fruktóz-6-foszfátból, és csak kisebb mértékben befolyásolta a glukóz-6-foszfátból kiinduló glukóztermelés sebességét (14. táblázat) [Senesi et al., 2010b]. Az észlelt izomerizáció nagy részét tehát valóban a vezikulumokhoz lazán kötődő, citoplazmai izomeráz végezte. A maradék aktivitás azonban már többszöri mosással sem volt eltávolítható, ami erősen tapadó extravezikuláris vagy luminális enzim jelenlétére utal. A fruktóz-6-foszfát esetében észlelt, lényegesen nagyobb latencia (85% szemben a glukóz-6-foszfátnál mért 40%-kal) viszont egy közbeiktatott, lassúbb transzportfolyamatot jelez.

dc_997_15

			Mosások száma			
	Szub- sztrát	Mikro- szóma	0	1	2	3
Glukóztermelés (nmol/perc/mg feh)	G6P	Intakt	80,15 ± 4,37	45,56 ± 3,82*	41,60 ± 5,19	40,31 ± 4,73
		Permeab.	156,23 ± 9,37	72,74 ± 5,82*	$70,14 \pm 7,02$	71,54 ± 3,91
	F6P	Intakt	30,11 ± 5,12	3,58 ± 1,31*	3,35 ± 0,95	3,22 ± 1,06
		Permeab.	54,28 ± 4,73	23,39 ± 2,70*	21,74 ± 1,99	20,83 ± 2,12
Kortizon-kortizol átalakulás (pmol/perc/mg feh)	G6P	Intakt	$50,58 \pm 0,37$	44,80 ± 1,60*	45,77 ± 1,99	43,05 ± 1,00
	F6P	Intakt	51,98 ± 1,31	35,16 ± 1,60*	36,15 ± 0,81	33,98 ± 1,72

14. táblázat Glukóztermelés és kortizonredukció glukóz-6-foszfát, illetve fruktóz-6-foszfát mellett patkány májmikroszómában

[Senesi et al., 2010b]

A patkány májból izolált mikroszóma (0,5 mg fehérje/ml) extravezikuláris fehérjéit a jelzett számú mosással (ülepítés és puffercsere) távolítottuk el. A membrán permeabilizálásához alameticint (0,05 mg/mg fehérje) használtunk. A hexóz-foszfátokat (glukóz-6-foszfát: G6P és fruktóz-6-foszfát: F6P) a glukóztermelés mérésekor 2 mM-os, a kortizon (5 μM) redukciójának vizsgálatakor 50 μM-os koncentrációban alkalmaztuk. Hexóz-foszfátok hozzáadása nélkül egyik aktivitás sem volt detektálható az adott kísérleti felállásban. Átlag ± szórás; n=4; * P < 0,005 (az előtte álló oszlophoz viszonyítva)

Ezután összehasonlítottuk a májból preparált mikroszómában zajló kortizonredukció sebességét a kétféle hexóz-6-foszfát jelenlétében. Itt az első mosás csak kisebb csökkenést eredményezett (32 és 11% fruktóz-6-foszfát, illetve glukóz-6-foszfát esetén), és a továbbiak már nem jártak szignifikáns változással (**14. táblázat**) [Senesi *et al.*, 2010b]. A májból preparált mikroszóma tehát rendelkezik el nem távolítható, saját hexóz-6-foszfát-izomeráz aktivitással, amely lépést tud tartani a H6PD és 11βHSD1 enzimek működésével. A jelenség megismerésére végzett, további kísérleteket mosott mikroszómán végeztük.



34. ábra Fruktóz-6-foszfát mint a NADPH-termelés forrása májból és zsírszövetből készült mikroszómában

[Senesi *et al.*, 2010b]

Májból (A és B), illetve zsírszövetből (C és D) készült mikroszómához (0,5 mg fehérje/ml) a NADPH-ra jellemző fluoreszcencia folyamatos detektálása mellett 2 mM NADP⁺-t (N), majd 50 μM hexóz-6-foszfátot (G6P/F6P) adtunk, végül a membránt Triton X-100-zal (T) permeabilizáltuk. A (+) jelzés 10 mM fruktóz-1,6-biszfoszfát, izomerázgátló jelenlétét jelzi. Öt analízisből származó jellemző kép látható az ábrán.

Megmértük a fruktóz-6-foszfáttal táplált NADPH-termelés sebességét májból és zsírszövetből izolált mikroszómában. Mindkét preparátum képes felhasználni a fruktóz-6-foszfátot a NADP⁺-redukálás forrásaként, és mindkettőben látens ez az aktivitás is (**34. ábra**) [Senesi *et al.*, 2010b]. Valószínűsíthető azonban, hogy a fruktóz-6-foszfátnak ez esetben is először glukóz-6-foszfáttá kell alakulnia, amit az is megerősít, hogy fruktóz-1,6-biszfoszfát, a foszfohexóz-izomeráz ismert gátlószere, ami glukóz-6-foszfát esetén hatástalan, hatékonyan gátolta a fruktóz-6-foszfát-függő NADPH-termelést (**34. ábra**) [Senesi *et al.*, 2010b].

Hasonló kísérleti felállásban kimutattuk a fruktóz-6-foszfátból kiinduló 6-foszfoglukonátkeletkezést is a kétféle szövetből készült mikroszómában. A reakcióelegyhez hozzáadott 6-foszfoglukonát-dehidrogenáz ugyanis további, jelentős NADPH-termelést váltott ki, ami szubsztrátjának jelenlétére utal (**35. ábra**) [Senesi *et al.*, 2010b]. Mivel a fruktóz-6-foszfát által kiváltott NADPH-termelés gátolható volt fruktóz-1,6-biszfoszfáttal, és együtt járt a 6-foszfoglukonát keletkezésével, meggyőződtünk arról, hogy a H6PD szubsztrátjaként az izomerizációval keletkező glukóz-6-foszfát szolgál.



35. ábra 6-Foszfoglukonát keletkezése fruktóz-6-foszfátból májból és zsírszövetből készült mikroszómában [Senesi et al., 2010b]

Májból (**A**), illetve zsírszövetből (**B**) készült mikroszómához (0,5 mg fehérje/ml) a NADPHra jellemző fluoreszcencia folyamatos detektálása mellett 2 mM NADP⁺-t (N), majd 10 μM fruktóz-6-foszfátot (F6P) adtunk, végül a membránt Triton X-100-zal (T) permeabilizáltuk. A 6-foszfoglukonát jelenlétét az 1 U/ml 6-foszfoglukonát-dehidrogenáz (Enz) hozzáadása hatására keletkező NADPH alapján mutattuk ki. A mérés végén 5 μM NADPH-t adtunk az elegyhez kalibrálásként.

Három analízisből származó jellemző kép látható az ábrán.

Továbbra is megválaszolandó kérdés volt azonban, hogy az izomerizációt luminális vagy a felszínhez erősen tapadó enzim katalizálja. Ennek eldöntése céljából megvizsgáltuk, hogy a fruktóz-6-foszfát glukóz-6-foszfáttá alakulását hogyan befolyásolja a membrán permeabilizálása. Más szavakkal, arra voltunk kíváncsiak, hogy az intakt mikroszóma képes-e kívülről hozzáférhető glukóz-6-foszfát előállítására fruktóz-6-foszfátból. Kihasználva, hogy a

H6PD NADP⁺-specifikus, így igen kis affinitást mutat NAD⁺ iránt, a glukóz-6-foszfát keletkezését NAD⁺-specifikus (L. mesenteroides-ből származó) glukóz-6-foszfatáz hozzáadása után, a keletkező NADH detektálásával mutattuk ki.



36. ábra *A mikroszomális hexóz-foszfát-izomeráz aktivitás luminális elhelyezkedése* [Senesi *et al.*, 2010b]

Májból (**A** és **C**), illetve zsírszövetből (**B** és **D**) készült mikroszómához (0,5 mg fehérje/ml) a NADH-ra jellemző fluoreszcencia folyamatos detektálása mellett 500 μM NAD⁺-ot (N), majd 50 μM fruktóz-6-foszfátot (F6P) adtunk. A mikroszomális membránt Triton X-100-zal (T) permeabilizáltuk (**A** és **B**), vagy intakt állapotát megőriztük (**C** és **D**). A (-) jel a fruktóz-1,6biszfoszfát hiányára, a (+) jel a megadott koncentrációjú jelenlétére utal. Az izomerizáció (glukóz-6-foszfát keletkezése) kimutatására L. mesenteroides-ből származó, NAD⁺-függő glukóz-6-foszfát-dehidrogenázt (1 U/ml - G6PD) adtunk a reakcióelegyhez, és követtük a glukóz-6-foszfát által kiváltott NADH-termelést. Három analízisből származó jellemző kép látható az ábrán.

Azt találtuk, hogy intakt mikroszóma – akár máj, akár zsírszövet eredetű – jelenlétében nem termelődik jelentős mennyiségű glukóz-6-foszfát fruktóz-6-foszfátból; ugyanakkor permeabilizált membrán esetén mindkét mikroszómában nagy izomeráz aktivitás észlelhető, amely gátolható fruktóz-1,6-biszfoszfáttal (**36. ábra**) [Senesi *et al.*, 2010b].

Az általunk vizsgált mikroszómapreparátumok tehát rendelkeznek luminális foszfohexóz-izomeráz aktivitással. Közvetlen, gyors szűréses transzportmérésekkel bizonyítottuk, hogy a fruktóz-6-foszfát valóban fehérjemediált mechanizmussal be is tud jutni a máj- és zsírmikroszóma lumenébe. A transzport sebessége máj esetén nagyjából egy nagyságrenddel, de zsírszövetből készült mikroszómában alig 30%-kal kisebb a glukóz-6-foszfáténál. Megállapítottuk azt is, hogy a két hexóz-6-foszfát különböző fehérjék közvetítésével jut át a membránon, így a fruktóz-6-foszfát transzportere azonosításra vár [Senesi *et al.*, 2010b].

Annak megerősítésére, hogy maga a fruktóz-6-foszfát valóban nem szubsztrátja közvetlenül a H6PD enzimnek, valamint annak tisztázására, hogy a hexóz-6-foszfát izomerizáció nem a H6PD saját aktivitása, tisztított enzimet hoztunk létre és tanulmányoztunk. Beigazolódott, hogy a tisztított humán H6PD fruktóz-6-foszfátot nem (csak glukóz-6-foszfátot) képes felhasználni NADPH-termeléshez, és ezzel összhangban a fruktóz-6-foszfát izomerizálására sem képes (**37. ábra**) [Senesi *et al.*, 2010b].





A: Az enzim nem használja fel a fruktóz-6-foszfátot (F6P) NADPH-termeléshez. A tisztított H6PD-t 100 μM hexóz-6-foszfát (G6P vagy F6P) és 250 μM NADP⁺ jelenlétében inkubáltuk és detektáltuk a NADPH-ra jellemző fluoreszcenciát.

B: Az enzim nem katalizálja a F6P-G6P izomerizációt. A tisztított H6PD-t 100 μM hexóz-6-foszfát (G6P vagy F6P) és 500 μM NAD⁺ jelenlétében inkubáltuk, és detektáltuk a NADH-ra jellemző fluoreszcenciát. Glukóz-6-foszfát kimutatására L. mesenteroides-ből származó, NAD⁺-függő glukóz-6-foszfát-dehidrogenázt (1 U/ml - G6PD) adtunk a reakcióelegyhez (nyíl). A (-) jel a fruktóz-1,6-biszfoszfát hiányára, a (+) jel az izomerázgátló jelenlétére utal. Három analízisből származó jellemző kép látható az ábrán.

Az ER lumenébe bejut tehát a fruktóz-6-foszfát, és ott egy még azonosítatlan foszfohexóz-izomeráz közreműködésével átalakul glukóz-6-foszfáttá, ami már a H6PD vagy a glukóz-6-foszfatáz (májban) szubsztrátjául szolgálhat. A citoplazmai fruktóz-6-foszfát tehát a glukóz-6-foszfáthoz hasonlóan táplálhatja a glukóztermelést és a lokális kortizolaktiválást is. Az ER membránjának fruktóz-6-foszfát-transzportját, valamint a luminális foszfohexózizomeráz működését mi írtuk le elsőként. Ez utóbbiról bizonyítottuk, hogy nem azonos a H6PD-vel (37. ábra), és további méréseinkkel azt is kizártuk, hogy azonos a citoplazmai izomerázzal: a citoplazmai enzimre specifikus antitest nem ismeri fel, és a citoplazmai enzimétől karakterisztikusan eltér a pH-függése, valamint eritróz-4-foszfáttal szembeni érzékenysége [Senesi et al., 2010b]. További kutatás szükséges a fruktóz-6-foszfát transzporterének és az organellum saját foszfohexóz-izomerázának molekuláris azonosításához.

A H6PD luminális NADPH-termelését eredményeink szerint a szénhidrát-anyagcsere két központi intermediere, a glukóz-6-foszfát és a fruktóz-6-foszfát egyaránt táplálhatja. Az enzim prereceptoriális glukokortikoid-aktiválásban betöltött szerepét meggyőző bizonyítékok támasztják alá. Ez a funkció a tápanyagmetabolizmus legfontosabb szerveiben (máj, izom, zsírszövet) bizonyítottan releváns, de nagyon keveset lehet tudni a többi sejt- és szövettípus ER-jének piridin-nukleotid redox homeosztázisáról és ezekben a H6PD expressziójáról, működéséről, illetve szerepéről.

5.2.5. A H6PD expressziója különböző szövetekben

Különböző patkány és humán szövetmintákban összehasonlítottuk a H6PD aktivitását, illetve mRNS- és fehérjeszintű expresszióját. Az enzimaktivitást a korábbiakban ismertetett módszerrel, a glukóz-6-foszfát és NADP⁺ jelenlétében inkubált mikroszóma NADPH-termelésének fluoreszcens detektálásával határoztuk meg. Minden általunk tanulmányozott mintában észlelhető volt a szinte 100%-os latencia, vagyis az enzim működését csak a membrán permeabilizálása után lehetett megmérni. 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 (**38. ábra**) [Marcolongo *et al.*, 2011].



38. ábra A H6PD aktivitása különböző patkány és humán szövetekben [Marcolongo et al., 2011]
A mikroszómapreparátumokat (0,5 mg fehérje/ml) NADP⁺ és glukóz-6-foszfát jelenlétében 37 °C-on inkubáltuk, Triton X-100-zal permeabilizáltuk, majd folyamatosan detektáltuk a NADPH-ra jellemző fluoreszcencia változását. Az enzimaktivitást az egyenes meredeksége alapján számítottuk.

Atlag + standard hiba; n=3-5.

Megerősítendő, hogy a mikroszomális aktivitásméréseinkkel valóban a H6PD enzim jelenlétét detektáltuk, összehasonlítottuk a H6PD mRNS szintjét is a vizsgált szövetekben. A teljes RNS-izolálást követő reverz transzkripcióval előállított cDNS-minták kvantitatív, "real time" PCR analíziséhez kétféle referencia RNS-t is használtunk (glicerinaldehid-3-foszfát-dehidrogenáz: GAPDH, valamint szukcinát-dehidrogenáz), és a kiszámított, normalizált mRNS-szinteket a májban kapott értékekhez viszonyítottuk (**39. ábra**) [Marcolongo *et al.*, 2011]. Minden szövetben jól mérhető volt a H6PD-mRNS mennyisége, tehát a gén átírása bizonyosan megtörtént. A relatív mRNS-expressziós szintek és a megfelelő szövetekben mért enzimaktivitások jól korreláltak, bár egyes mintákban a meglehetősen nagy aktivitáshoz viszonylag kis mRNS-szint társult (**39. ábra**) [Marcolongo *et al.*, 2011]. Fontos azonban megjegyezni, hogy az aktivitás mérésekor a mikroszomális fehérje mennyiségét vettük alapul, és egy-egy fehérje részaránya az összes mikroszomális fehérjéhez képest szövettípusonként jelentős eltéréseket mutathat.



39. ábra A H6PD mRNS-szintek patkány és humán szövetekben [Marcolongo et al., 2011]

A feltüntetett patkány és humán szövetekből nyert teljes RNS reverz transzkripciójával előállított cDNS-mintákban "real-time" PCR analízissel határoztuk meg a specifikus mRNSszinteket, és a H6PD mRNS mennyiségét a GAPDH-éra normalizáltuk. Minden eredményt a májban kapott értékekhez viszonyítva mutat az ábra baloldali része. A jobboldalon a bemutatott, relatív mRNS-szintek és az azonos szövetekből származó mikroszómapreparátumok H6PD aktivitásai közti korreláció analízise látható. Átlag + standard hiba; n=3-5.

H6PD-re specifikus elsődleges antitest segítségével, Western blot módszert alkalmazva a fehérjemennyiségeket is összehasonlítottuk a különböző szövetekből készült preparátumokban. A szemikvantitatív analízishez szkennelő denzitometriát használtunk, és minden denzitást a májmintáéhoz viszonyítottunk. A kapott eredmények jobban egybecsengtek az enzimaktivitásokkal, mint az mRNS-szintekkel, amit az előbbivel fennálló szorosabb korreláció is mutat (**40. ábra**) [Marcolongo *et al.*, 2011]. A H6PD általunk feltárt, általános kifejeződése az összes vizsgált szövetben azt valószínűsíti, hogy az enzim "housekeeping" géntermék, amelyre minden sejttípusban szükség van. Funkciója minden bizonnyal túlmutat a prereceptoriális kortizoltermelésen, mivel ott is viszonylag magas fehérjeszintet és aktivitást észleltünk, ahol a 11βHSD1 kifejeződése alacsony (pl. lép és here). Valószínűsíthető tehát, hogy a magas, luminális [NADPH]:[NADP⁺] arány fenntartása az organellum egyéb aktivitásához (pl. hibás fehérjék kitekeredése és retro-transzlokációja, antioxidáns védekezés) és szabályozási mechanizmusaihoz (pl. a rianodin-receptor csatornák nyitási valószínűségének redox kontrollja, az ER tápanyagérzékelő funkciója) is szükséges lehet [Senesi *et al.*, 2010a].

dc 997 15



40. ábra A H6PD fehérjeszintek patkány és humán szövetekben [Marcolongo et al., 2011]

A feltüntetett patkány és humán szövetekből készült lizátumokban Western blot analízissel detektáltuk a H6PD fehérjét, és a szkennelő denzitometriával számszerűsített mennyiséget a májmintánál kapott értékhez viszonyítottuk (baloldal). A jobboldalon a bemutatott, relatív fehérjeszintek és az azonos szövetekből származó mikroszómapreparátumok H6PD aktivitásai közti korreláció analízise látható. Átlag + standard hiba; n=3-5.

A lokális glukokortikoidtermelés, illetve ennek mozgató rugójaként a H6PD zsírsejtdifferenciálódásban betöltött szerepét több tanulmány is kimutatta. A kezdeti kutatások azt jelezték, hogy az adipogenezis során fordulat következik be a 11βHSD1 által katalizált reakció irányában, vagyis kortizontermelés helyett beindul a kortizoltermelés [353]. Ezt pedig azzal magyarázták, hogy a H6PD génexpressziója fokozódik a differenciálódó sejtekben [354]. Mivel a H6PD expressziójának jelentős változása nem állt összhangban saját megfigyeléseinkkel és a "housekeeping" funkcióval, mi is vizsgálatokat folytattunk az organellum lokális kortizoltermelését érintő és a zsírsejtdifferenciálódás során bekövetkező változások tisztázása érdekében.

5.2.6. A H6PD expressziója zsírsejtdifferenciáció során

A zsírsejtdifferenciációt kétféle sejtmodellen tanulmányoztuk. Egyrészt humán zsírszövetből származó mezenchimális őssejteket (ADMSC), másrészt 3T3-L1 egér fibroblasztokat késztettünk *in vitro* adipocita irányú differenciálódásra [Senesi *et al.*, 2008]. Előbbi esetében 14, míg utóbbinál 7 napig tartott a sejtek átalakulása. Mindkét sejttípusban

vizsgáltuk a kortizon-kortizol átalakulásért felelős enzimek működését és génexpressziójának alakulását. A differenciálatlan 3T3-L1 sejtekben nagyon alacsony kortizonredukciós aktivitás mérhető, de ez igen jelentős mértékben nő a differenciálódás hét napja során (**41. ábra**) [Senesi *et al.*, 2008]. Ugyanakkor az ellentétes irányú hormonátalakulás a differenciált sejtben nem is volt detektálható, és a folyamat hetedik napján is nagyon alacsony maradt, vagyis a kortizolkeletkezésnek kevesebb mint tizede volt (**41. ábra**) [Senesi *et al.*, 2008]. Hasonló eredményeket kaptunk ADMSC-k esetében is. Az általunk tapasztalt aktivitások tehát eltértek a korábban publikált adatoktól, hiszen a reakció iránya nem fordult meg, csupán az eleve domináns kortizolkeletkezés intenzitása nőtt.



41. ábra Kortizonredukció és kortizoloxidáció a 3T3-L1 sejtekből induló adipogenezis során [Senesi et al., 2008]

Zsírsejtdifferenciálódást váltottunk ki 3T3-L1 sejtekben, és a folyamat megjelölt napjain HPLC-vel mértük a kortizonból történő kortizol-, illetve kortizolból történő kortizon keletkezést (1 mM szteroid jelenlétében, 2 óra alatt, 37°C-on). Átlag ± szórás; n=4.

A differenciálódó sejtek H6PD és 11βHSD1 fehérjeszintjeit is tanulmányoztuk a megfelelő specifikus antitestek segítségével végzett Western blot módszerrel. Az aktivitásfokozódás alapja eredményeink szerint nem a H6PD, hanem a 11βHSD1 fehérje mennyiségének ugrásszerű növekedése volt. Amíg a H6PD egyenletes szinten maradt a differenciálatlan és differenciálódó ADMSC és 3T3-L1 sejtekben, addig az alig kimutatható

11βHSD1 fehérje szintje mindkét sejtmodellben sokszorosára emelkedett a folyamat végére (**42. ábra**) [Senesi *et al.*, 2008].



42. ábra H6PD és 11βHSD1 fehérjeszintek a zsírsejt irányba differenciálódó ADMSC, illetve 3T3-L1 sejtekben

[Senesi *et al.*, 2008] A Western blottal vizsgált fehérje lizátumok (ADMSC – baloldal), illetve mikroszómapreparátumok (3T3-L1 – jobboldal) a differenciálódás indukciója előtt (0. nap), illetve a differenciálódás jelzett napján készültek.

Felül a H6PD fehérje, alul pedig a 11βHSD1 fehérje immunoblotjai találhatók. Három (ADMSC), illetve négy (3T3-L1) analízisből származó jellemző kép látható az ábrán.

Annak kiderítésére, hogy észlelt fehérjeszintű változások az prevagy poszttranszlációs hatások következményei, megvizsgáltuk a két vizsgált fehérjét kódoló mRNS-ek mennyiségének alakulását is a differenciáció során. Reverz transzkripciót követő, kvantitatív "real-time" PCR analízisünkhöz referencia génként a β-2-mikroglobulin génjét (humán sejtekhez), illetve az Rplp0 riboszomális fehérje génjét (3T3-L1 sejtekhez) használtuk. Az aktivitásméréseink és Western blot analízisünk eredményeivel összhangban, a H6PD mRNS változatlan szintjét, valamint a 11βHSD1 mRNS közel két nagyságrendnyi emelkedését találtuk mindkét sejtes modellünkben (43. ábra) [Senesi et al., 2008].

dc_997_15





Kvantitatív "real-time" RT-PCR analízist végeztünk a H6PD és a 11βHSD1 mRNS-ek mennyiségének összehasonlítására ADMSC (baloldal) és 3T3-L1 (jobboldal) sejtekből a differenciálódás indukciója előtt (0. nap), illetve a differenciálódás jelzett napján készült teljes RNS-preparátumokon. Referencia génként a β-2-mikroglobulin génjét (humán sejtekhez), illetve az Rplp0 riboszomális fehérje génjét (3T3-L1 sejtekhez) használtuk. Átlag ± szórás; n=4.

A kétféle adipogenezis-modell vizsgálata tehát egységesen azt mutatta, hogy a H6PD expressziója nem változik a zsírsejtek kialakulása során, és a lokális kortizoltermelés differenciáció közben megfigyelhető, jelentős fokozódása a 11βHSD1 valóban nagymértékű indukciójának köszönhető. Mindez meggyőzően alátámasztja a H6PD "housekeeping" jellegét, hiszen ismét olyan sejtekben mutattuk ki egyértelmű jelenlétét, amelyek alig rendelkeznek 11βHSD1 enzimmel (a differenciálatlan mezenchimális őssejtek, illetve fibroblasztok); ráadásul a sejtműködés ugrásszerű 11βHSD1-indukcióval járó, alapos megváltozása során is konstitutív módon fejeződött ki.

A H6PD egyenletes kifejeződése összhangban van azzal az elméletünkkel, mely szerint az enzim központi szerepet játszik a tápanyag-ellátottság érzékelésében, vagyis aktivitását, és ezen keresztül az ER luminális piridin-nukleotid redox státuszát alapvetően a szubsztrátként szolgáló redukáló források mennyisége határozza meg. Már bemutattuk, hogy a glukóz-6-foszfát és a fruktóz-6-foszfát szinte egyenértékű módon táplálhatja a H6PD által

katalizált NADPH-termelést. Fontos azonban rámutatni, hogy e két intermedier szintjét nem csak a sejt szénhidrát- (glukóz-, galaktóz- és fruktóz-) ellátottsága, hanem a zsírsav- és aminosavkínálat is befolyásolja. Bármely forrásból keletkezik ugyanis NADH, ATP, acetil-KoA és citrát, ezek visszahatnak a monoszacharidok anyagcseréjére, és a glikolízis foszfofruktokináz-1 előtti intermediereinek felhalmozódásához vezetnek. Ez alapján feltételeztük, hogy szoros kapcsolatnak kell lennie a táplálékfelvétel (éhezés/jóllakottság), valamint az ER luminális piridin-nukleotidkészletének redox státusza között.

5.2.7. Éhezés és jóllakottság hatása az endoplazmás retikulum luminális piridin-nukleotidjainak redox státuszára

Az ER nutriensszenzor működésére és ezen belül a luminális redox státusz kiemelt szerepére vonatkozó hipotézisünket *in vivo* kísérletekkel ellenőriztük. Jóllakott, illetve különböző időtartamon át (12 vagy 36 óráig) éheztetett, hím Wistar patkányok májából preparált mikroszómában vizsgáltuk a kortizon-kortizol átalakítást, valamint a luminális NADP⁺-NADPH készlet állapotát. Először a folyamatban közvetlenül érintett fehérjék mennyiségének esetleges változását teszteltük Western blot módszerrel. Sem a glukóz-6-foszfát-transzporter, sem a H6PD vagy a 11βHSD1 enzim esetén nem észleltünk szignifikáns eltérést a három csoportból származó mintákban, és ezt az enzimek aktivitásának mérésével is megerősítettük [Kereszturi *et al.*, 2010].

Ezután a mikroszóma endogén kortizonredukáló és kortizoloxidáló képességét mértük, vagyis az intakt vezikulumokhoz csak szteroidot adtunk külső redukáló vagy oxidáló forrás nélkül. Markáns eltérést figyeltünk meg a jóllakott és éhező állatokból származó mikroszómapreparátumok között. Az éhezés előrehaladtával fokozatosan csökkent a kortizonredukció és nőtt a kortizoloxidáció (**44. ábra**) [Kereszturi *et al.*, 2010]. Mivel a H6PD és a 11βHSD1 fehérjeszintje és aktivitása nem tért el a mintákban, a jelenség hátterében a szteroidok redukálásához vagy oxidálásához a lumenben rendelkezésre álló szubsztrátok mennyiségének változása állhat.



44. ábra Patkány májmikroszóma endogén kortizonredukáló és kortizoloxidáló kapacitása [Kereszturi et al., 2010]

A jóllakott, illetve 12 vagy 36 órát éheztetett patkányok májából készült, intakt mikroszómát (5 mg fehérje/ml) kortizon (**A**) vagy kortizol (**B**) (10 μM) jelenlétében inkubáltuk, és a baloldali diagramokon jelzett időpontokban HPLC-vel mértük a keletkező kortizol (**A**), illetve kortizon (**B**) koncentrációját. A jobboldali diagramok a számított aktivitásokat mutatják. A redukció és oxidáció sebességének arányát (**C**) az **A** és **B** diagram adatainak felhasználásával számoltuk ki.

Átlag \pm szórás; n=3; *P < 0,05; ***P < 0,001 a jóllakotthoz képest.

A kortizonredukció közvetlen elektronforrása a NADPH, a kortizoloxidáció elektronfelvevője pedig a NADP⁺. A mikroszóma endogén szteroidátalakítási kapacitása tehát leginkább a luminális [NADPH]:[NADP⁺] arányt tükrözi. Kihasználva a NADPH jellegzetes fluoreszcenciáját, elvégeztük ennek direktebb vizsgálatát is. Várakozásunknak megfelelően azt találtuk, hogy az éhezés előrehaladtával egyre csökkent az endogén NADPH mennyisége, vagyis egyre kevesebb volt a mikroszómában kortizonnal, illetve metiraponnal (lásd 5.2.8. fejezet) oxidálható NADPH (**45. ábra**) [Kereszturi *et al.*, 2010].





A jóllakott, illetve 12 vagy 36 órát éheztetett patkányok májából készült, intakt mikroszómához (2 mg fehérje/ml) a luminális NADPH oxidálására alkalmas kortizont (balra) vagy metirapont (jobbra) adtunk, miközben folyamatosan detektáltuk a NADPH-ra jellemző fluoreszcencia mértékét.

Három analízisből származó jellemző képek láthatók az ábrán.

Éhezés hatására tehát egyre csökken a májsejtek ER-jében a kortizoltermeléshez felhasználható NADPH mennyisége, és feltételezhető, hogy a jelenség más sejtekben is

előfordul. A luminális NADPH-termeléshez, és ez által a kortizolaktiválódáshoz, felhasználható glukóz-6-foszfát és fruktóz-6-foszfát koncentrációja a sejtek szénhidráttal és egyéb típusú tápanyaggal való ellátottságának függvényében változik, így a H6PD működése valójában közvetlenül összekapcsolja az inetermedier anyagcserét a hormonmetabolizmussal [Bánhegyi et al., 2009]. Ez a jelenség pedig az organellum általános tápanyagérzékelő működésének egyik kulcsmechanizmusa lehet [Mandl et al., 2009]. Az ER elkülönült és mégis kölcsönható redox rendszerei [Bánhegyi et al., 2012] olyan szenzort képeznek, amely érzékenyen reagál a sejt tápanyag-ellátottságára, ugyanakkor alapvetően meghatározza az organellum szerteágazó működését [Csala et al., 2010]. A kortizon-kortizol átalakulás eltolódása, illetve a lokális glukokortikoidhatás ilyetén modulálása kiválóan példázza ezt, de a redox egyensúly eltolódása által kiváltott ER-stresszről is bebizonyosodott, hogy a fehérje- és lipidanyagcsere kiemelkedő regulátora [Mandl et al., 2013]. Az oxidatív fehérjeéréstől elválaszthatatlan tiol-diszulfid redox rendszer bármilyen irányú eltolódása az ER-stressz közvetlen kiváltó oka lehet, és beindítja az organellumból eredő jelátviteli folyamatokat. Figyelemre méltó, hogy bizonyos megfigyelések szerint a piridin-nukleotid redox rendszer szintén kiváltója vagy befolyásolója lehet az ER-stressznek [Bánhegyi et al., 2007].

A fiziológiás körülmények közt jól működő szenzor persze kóros folyamatok beindítója vagy erősítője is lehet. A metabolizmus változásai hatására, a redox homeosztázis finom eltolódása révén jeleket generáló vagy moduláló rendszer ugyanis fel is boríthatja a sejt/szervezet működését, ha a metabolizmus eleve szélsőséges vagy a redox homeosztázis egyéb okból zavart szenved. Számos neurológiai betegség hátterében bizonyították az ER redox-eredetű működési zavarát mint a patomechanizmus fontos elemét [Bánhegyi et al., 2008]. A túltáplálás és mozgásszegény életmód kombinációja szélsőséges terhelést jelenthet a nutriensszenzor számára, és káros mértékű prereceptoriális kortizoltermelést eredményezhet a tápanyag(túl)kínálat folyamatos fenntartása révén. Ez pedig hozzájárulhat az elhízáshoz és az inzulinrezisztenciához is. Felvetődik ugyanakkor a lehetőség, hogy e metabolikus organellum [NADPH]:[NADP⁺] rendellenességet éppen az arányának közvetlen befolyásolásával lehetne csökkenteni.

5.2.8. Az endoplazmás retikulum luminális piridin-nukleotidkészlete mint a prereceptoriális kortizoltermelés befolyásolásának támadáspontja

A metirapon a mellékvesekéreg kortizoltermelésének a klinikumban is alkalmazott inhibitora, ugyanis hatékonyan gátolja a 11-dezoxikortizol 11β-hidroxiláz enzimet. Évekkel

ezelőtt leírták róla, hogy – mellékhatásként – a célsejtek prereceptoriális kortizoltermelésében kulcsszereplő (de a mellékvesekéreg kortizoltermelésében rész nem vevő) 11βHSD1 enzimet is gátolja [355], és ezt az effektust a kutatásban széleskörűen ki is használják. Az általánosan elfogadott mechanizmus szerint a metirapon a 11βHSD1 alternatív szubsztrátja, és ezáltal a kortizon-kortizol átalakulás kompetitív gátlószere [356]. Ezzel összhangban van az a tapasztalatunk, hogy a mikroszóma luminális NADPH-tartalmát a metirapon a kortizonhoz hasonlóan csökkenti (**46. ábra**) [Marcolongo *et al.*, 2008].



46. ábra *A patkány májmikroszóma luminális NADPH-készletének oxidációja metiraponnal* [Marcolongo *et al.*, 2008]

A NADPH folyamatos, fluoreszcens detektálása mellett a nyilak által jelzett időpontban a feltüntetett vegyületeket adtuk az intakt mikroszómához (2 mg fehérje/ml). **1-es** regisztrátum: 10 μM kortizol, majd 10 μM metirapon; **2-es**: 10 μM metirapon, majd 10 μM kortizol. Négy kísérletből származó jellemző regisztrátumok láthatók az ábrán.

Amikor azonban a vegyület hatását mikroszómában alaposabban megvizsgáltuk, azt találtuk, hogy az intakt (glukóz-6-foszfátot és kortizont átalakító) vezikulumokban mérhető gátlás nem reprodukálható permeabilizált membrán esetén. Azt a gátlást, amelyet pl. 50 μ M koncentrációjú metirapon kiváltott az intakt mikroszóma kortizoltermelésére, csak egy nagyságrenddel magasabb koncentrációnál értük el a (NADPH-val inkubált) permeabilizált mikroszóma kortizoltermelése esetén, és el sem tudtuk érni a (NADP⁺-vel inkubált)

permeabilizált mikroszóma kortizontermelését vizsgálva (**47. ábra**) [Marcolongo *et al.*, 2008]. A jelenség semmiképp sem magyarázható pusztán a metirapon 11βHSD1-re kifejtett kompetitív gátló hatásával, ezért tovább tanulmányoztuk.



47. ábra A 11βHSD1 gátlása metiraponnal intakt és permeabilizált májmikroszómában [Marcolongo et al., 2008]

Intakt (kitöltött jel) vagy alameticinnel permeabilizált (üres jel) patkány májmikroszómát (1 mg fehérje/ml) inkubáltunk kortizon vagy kortizol (5 μM) és a jelzett koncentrációjú metirapon jelenlétében. A keletkezett kortizol vagy kortizon mennyiségét HPLC-vel mértük. A kortizonredukciót az intakt mikroszómában 50 μM glukóz-6-foszfát (●) a permeabilizáltban pedig hozzáadott 1 mM NADPH (△) táplálta. A kortizoloxidációt permeabilizált mikroszómában 1 mM NADP⁺ (□) hozzáadásával értük el. Átlag ± szórás; n=4.

Amikor az intakt mikroszómát csak kortizol és metirapon együttes jelenlétében inkubáltuk, a metirapon már egyáltalán nem gátlószerként viselkedett: az egyébként igen kismértékű kortizoloxidációt jelentősen fokozta, és a hatás széles tartományban koncentrációfüggőnek bizonyult (**48. ábra**) [Marcolongo *et al.*, 2008]. Ez az eredmény azt mutatja, hogy a membrán integritásának fenntartásakor a lumenben olyan redox ciklus keletkezik, amelyben a metirapon NADPH-t oxidál, és a keletkező NADP⁺-t a 11βHSD1 felhasználja a kortizol oxidálásához, ezzel egyúttal újratermeli a NADPH-t. A ciklus hatékony

működése egyrészt azt valószínűsíti, hogy a metirapont nem csak a 11βHSD1 képes redukálni, hanem feltehetőleg egyéb dehidrogenáz(ok) is közreműködnek a metiraponfüggő NADPH-oxidációban. A lényeg azonban, hogy az intakt mikroszómában, és így *in vivo* az ER-ben a metirapon általi 11βHSD1-inhibició alapvetően nem közvetlen, kompetitív gátlás, hanem elsősorban a luminális NADPH-utánpótlás akadályozásán keresztül megvalósuló, másodlagos hatás.



48. ábra Metiraponfüggő kortizoloxidáció intakt májmikroszómában [Marcolongo et al., 2008]

Intakt patkány májmikroszómát (1 mg fehérje/ml) inkubáltunk kortizol (5 μM) és a jelzett koncentrációjú metirapon jelenlétében. A keletkezett kortizon mennyiségét HPLC-vel határoztuk meg. Metirapon nélkül a kortizonkeletkezés nem volt mérhető. Átlag ± szórás; n=3.

Ezek után megvizsgáltuk, hogy a lokális kortizoltermelés metirapon általi gátlásával befolyásolni tudjuk-e a preadipocita-differenciációt. A korábban már bemutatott sejtes modellrendszereket alkalmaztuk, azaz humán zsírszövetből izolált mezenchimális őssejteket, valamint 3T3-L1 egér fibroblasztokat késztettünk adipogén differenciálódásra az általános protokoll szerint (lásd 5.2.6. fejezet). A differenciált sejtekben, ahol már jól mérhető a kétirányú kortizon-kortizol átalakulás, ellenőriztük a metirapon hatásosságát. Várakozásunknak megfelelően azt észleltük, hogy a hatóanyag jelenlétében csökkent a

kortizon redukciója kortizollá, ugyanakkor fokozódott az ellentétes irányú átalakulás (**49. ábra**) [Marcolongo *et al.*, 2008].



 49. ábra Metirapon hatása a kortizon-kortizol átalakulásra zsírsejtekben [Marcolongo et al., 2008]
 HPLC-vel mértük a 3T3-L1 és ADMSC eredetű zsírsejtekben történő átalakulást (1 μM szteroid, 2 óra, 37 °C) 50 μM metirapon jelenlétében vagy hiányában. Átlag + szórás; n=4.

Meggyőződtünk tehát arról, hogy metiraponnal kivédhető a kortizon lokális kortizollá alakulása a vizsgált sejtekben, sőt a vegyület még a kultúrához adott kortizol részleges inaktiválódását is kiválthatja. Ezután a differenciálódást három különböző módon indukáltuk: a szükséges glukokortikoid hatást a természetes kortizollal, a prereceptoriális aktiválást igénylő kortizonnal vagy – kontrollként – a nem metabolizálódó, mesterséges dexametazonnal próbáltuk elérni. Mindhárom eljárással hasonló mértékű differenciálódást sikerült elérnünk, amit a sejtekben felhalmozódó triglicerid Red Oil O festése és ennek fotometriás kvantifikálása mutat (**50. ábra**) [Marcolongo *et al.*, 2008].

dc_997_15

50. ábra Metirapon hatása a 3T3-L1 sejtek adipogén differenciálódására [Marcolongo et al., 2008]

Az adipogenezist 0,5 μM dexametazon (**A** és **B**), kortizol (**C** és **D**) vagy kortizon (**E** és **F**) adásával indukáltuk 3T3-L1 limfocitákban. A sejtek egy része a szteroidokkal együtt metirapont (50 μM) is kapott (**B**, **D** és **F**). A 7 napig kezelt, majd Red Oil O festékkel jelzett sejteket fáziskontraszt mikroszkóppal tanulmányoztuk, és a festődést az izopropanollal extrahált festék fotometrálásával számszerűsítettük.

Három kísérletből származó, jellemző képek láthatók az ábrán. Átlag + szórás; n=3.

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 prereceptoriális glukokortikoidtermelés akadályozásának tudható be (**50. ábra**) [Marcolongo *et al.*, 2008]. Ezzel összhangban azt is leírtuk, hogy ugyanezekben a sejtekben a kortizonnal kiváltott differenciálódás hetedik napján a 11βHSD1 mRNS-szintje metirapon jelenlétében szignifikánsan alacsonyabb (nagyjából 9-ed része) volt, mint metirapon nélkül [Marcolongo *et al.*, 2008]. Kortizollal vagy dexametazonnal kiváltott differenciáció esetén a hatás nem volt szignifikáns. Megfigyeléseink azt jelzik, hogy a 11βHSD1-indukció pozitív visszacsatolásként vesz részt a zsírsejtdifferenciálódás folyamatának szabályozásában. A részben glukokortikoid-hatásra beinduló differenciáció magában foglalja ugyanis a 11βHSD1 expressziójának markáns emelkedését, ami fokozott prereceptoriális glukokortikoid-termelést, és így erősödő indukciót eredményez. Ha pedig a

kortizonredukciót (például metiraponnal) gátoljuk, ezzel az enzim indukcióját és a differenciálódási folyamatot egyaránt akadályozzuk.

A prereceptoriális kortizoltermelés gátlása tehát a glukokortikoidhatás csökkentésének hatékony módszere lehet. Kíváncsiak voltunk, hogy az ismerten elhízásellenes és antidiabetikus hatású teaflavanol, EGCG befolyásolja-e a glukóz-6-foszfát-transzporter, a H6PD és a 11βHSD1 által alkotott katalitikus triád működését. Először intakt májmikroszómában teszteltük a katekin esetleges hatását, és a glukóz-6-foszfát felhasználásával történő kortizonredukció markáns, koncentrációfüggő gátlását észleltük (**51. ábra**) [Szelényi *et al.*, 2013].



51. ábra EGCG hatása a kortizoltermelésre intakt májmikroszómában [Szelényi et al., 2013]

Intakt patkány májmikroszómát (0,5 mg fehérje/ml) inkubáltunk kortizon (5 μM), glukóz-6foszfát (50 μM) és a jelzett koncentrációjú EGCG jelenlétében, majd HPLC-vel mértük a keletkezett kortizol mennyiségét.

Átlag + standard hiba; n=3; **P < 0,01 a kontrollhoz képest.

A jelenség kézenfekvő magyarázata lenne, hogy a flavanol a három közreműködő fehérje valamelyikének működését közvetlenül befolyásolja. Az EGCG által az ERmembránon keresztüli transzport folyamatokra gyakorolt hatásokat már korábban kutattuk. Az általunk vizsgált glukozidok (p-nitrofenil- és metil-umbelliferil-glukozid) átjutását nem befolyásolta szignifikánsan [Gamberucci *et al.*, 2006], a glukuronidok facilitált diffúzióját

azonban koncentrációfüggő módon és jelentős mértékben gátolta (**52. ábra**) [Révész *et al.*, 2007].



 52. ábra A mikroszomális glukuronidtranszport gátlása EGCG-vel [Révész et al., 2007]
 A metil-umbelliferil-glukuronid (MUGA) (2 mM) felvételének kezdeti sebességét mértük gyors szűréses módszerrel, HPLC-s detektálással patkány májmikroszómában különböző epigallokatekin-gallát (EGCG) koncentrációk mellett. Átlag ± szórás, n=3.

Felvetődik tehát az a lehetőség, hogy a lokális kortizoltermelés csökkenéséért a glukóz-6-foszfát befelé irányuló transzportjának gátlása felelős. Ezt a lehetőséget kizártuk, amikor a flavanolok által a glukóz-6-foszfatáz rendszerre kifejtett hatásokat tanulmányoztuk. Az izotóppal jelzett glukóz-6-foszfát mikroszomális felvételét mérve ugyanis azt figyeltük meg, hogy EGCG jelenlétében nemhogy csökken, hanem még emelkedik is a vezikulumokban az izotóp felhalmozódása (**53. ábra**) [Csala *et al.*, 2007b]. Az akkumulálódó izotóp valószínűleg a glukóz-6-foszfátból a lumenben keletkező intermedier, ami lehet

részben glukóz (a glukóz-6-foszfatáz terméke) és részben 6-foszfoglukonát (a H6PD terméke). Előbbit bizonyítja a felhalmozódás csökkenése a glukóz-6-foszfatázt gátló vanadát jelenlétében, utóbbit pedig a felhalmozódás fokozódása a H6PD működését serkentő metirapon jelenlétében [Csala *et al.*, 2007b]. Az EGCG hatására bekövetkező többletfelhalmozódás egyfelől a glukózkiáramlás csökkenésének, másfelől – az itt bemutatandó eredmények fényében – a flavanol metiraponszerű redoxmódosító hatásának tudható be.



53. ábra EGCG hatása a glukóz-6-foszfát felvételére májmikroszómában [Csala et al., 2007b]

Intakt patkány májmikroszómát (2 mg fehérje/ml) 2-3 percig előkezeltük 50 μM EGCG-vel, 100 μM EGCG-vel, 50 μM S3483-mal vagy ezek nélkül (kontroll), majd 1 mM glukóz-6foszfátot (G6P) adtunk hozzá annak radioaktívan jelzett analógjával ([14C]G6P), és 30 másodperc múlva gyors szűréssel elválasztottuk és mértük az intravezikuláris radioaktivitást. Átlag + standard hiba; n=4; *P < 0,05, **P < 0,01 a kontrollhoz képest.

Mivel az EGCG nem akadályozza a glukóz-6-foszfát transzportját, az intakt mikroszóma kortizoltermelésére kifejtett hatásának hátterében a másik két közreműködő fehérje valamelyikének gátlását feltételeztük. A membrán permeabilizálása lehetővé teszi a H6PD glukóz-6-foszfátfüggő NADPH-termelésének, valamint a 11βHSD1 kortizolfüggő NADPH-termelő vagy NADP⁺-függő kortizoloxidáló aktivitásának közvetlen mérését. E kísérleteket elvégeztük, és arra a megállapításra jutottunk, hogy egyik enzim direkt gátlása sem magyarázza az intakt mikroszómában mért hatást. A 11βHSD1 működését igen kis

mértékben, a H6PD-ét egyáltalán nem befolyásolta a flavanol jelenléte [Szelényi *et al.*, 2013]. Ezek után nem maradt más lehetséges támadáspont, mint a luminális piridin-nukleotidkészlet. Ennek vizsgálatára a korábban már ismertetett módszereket alkalmaztuk.

Az intakt mikroszóma endogén kortizonredukáló és kortizoloxidáló képességének mérése azt mutatta, hogy az EGCG koncentrációfüggő módon egyre inkább az oxidáció dominanciáját segíti elő, vagyis olyan hatása volt, mint a hosszabb időtartamú éhezésnek (**54. ábra**) [Szelényi *et al.*, 2013].



54. ábra EGCG hatása a májmikroszóma endogén kortizonredukáló és kortizoloxidáló kapacitására

[Szelényi *et al.*, 2013] A patkánymájból készült, intakt mikroszómát kortizon vagy kortizol (10 μM), valamint a jelzett koncentrációjú EGCG jelenlétében inkubáltuk, és HPLC-vel mértük a keletkező kortizol, illetve kortizon koncentrációját. N.D.: nem detektálható. Átlag + standard hiba; n=3; *P < 0,05; **P < 0,01 a kontrollhoz képest.

Az endogén szteroidoxidáló/-redukáló képesség eltolódása a luminális [NADPH]:[NADP⁺] arányt tükrözi, ezért a mikroszomális vezikulumok NADPH-tartalmának változását is ellenőriztük. Ez a módszer megerősítette, hogy az EGCG a metiraponhoz hasonlóan a luminális NADPH (reverzibilis) oxidációját váltja ki (**55. ábra**) [Szelényi *et al.*, 2013].



55. ábra *A patkány májmikroszóma luminális NADPH-készletének oxidációja metiraponnal* [Szelényi *et al.*, 2013]

A NADPH folyamatos, fluoreszcens detektálása mellett a nyilak által jelzett időpontban EGCG-t (100 μM), glukóz-6-foszfátot (100 μM), illetve metirapont (5 μM) adtuk az intakt mikroszómához (1 mg fehérje/ml).

Három kísérletből származó jellemző regisztrátumok láthatók az ábrán.

Meggyőző mennyiségű kísérletes adat és klinikai megfigyelés támasztja alá az ER-ben elhelyezkedő kortizoltermelő triád (G6PT, H6PD és 11βHSD1) szerepét az elhízással összefüggő metabolikus betegségek kialakulásában [Czegle *et al.*, 2012]. A 11βHSD1 kortizonredukáló aktivitásának specifikus gátlásától egyértelműen jótékony hatások várhatók az ilyen kórképek progressziója vonatkozásában. Kézenfekvő megoldásként kínálkozik az ER luminális redox homeosztázisának befolyásolása olyan módon, ami a kortizoloxidációnak kedvez. Bár a metiraponról bebizonyosodott, hogy a prereceptoriális kortizoltermelést az intakt ER luminális NADPH-készletének oxidációja révén gátolja, és *in vitro* rendszerben, élő sejtekben ezáltal képes csökkenteni a glukokortikoidhatást, ezen a mechanizmuson alapuló, *in vivo* alkalmazása szóba sem jöhet a mellékvesekéregben érvényesülő fő hatása miatt. Ugyanakkor a bemutatott eredményeink egyértelműen arra utalnak, hogy az organellum

luminális piridin-nukleotidjainak redox státusza ígéretes gyógyszer-támadáspont lehet az elhízással összefüggő metabolikus betegségek vonatkozásában.

5.3. Lipotoxicitás és lipoapoptózis kivédése

A lipotoxicitás, vagyis a szabad (főleg telített) zsírsavak által okozott diszfunkció kialakulásának mechanizmusa több szálon is kapcsolódik az ER általunk tanulmányozott folyamataihoz [Zámbó *et al.*, 2013]. A sejtekben emelkedett zsíracil-KoA-szint növeli az organellum membránjának permeabilitását [357], így rontja annak "barrier" funkcióját. Ez nehezíti a luminális miliő – elsősorban az oxidáló tiol-diszulfid környezet és a jellegzetesen magas kalciumszint [358] – fenntartását. Ráadásul az intenzív zsírsavoxidáció NADH- és acetil-KoA-túlkínálathoz vezet, és visszahat a glikolízis sebességére is, így a glukóz-6-foszfát és a fruktóz-6-foszfát koncentrációjának emelkedését eredményezi [359], ami által fokozhatja az organellum luminális NADPH-termelését is. Érdekes, hogy a fruktóz (és az etanol) hasonló metabolikus zavarokat okoz, beleértve magát a zsíracil-KoA-felhalmozódást is. Az oxidatív fehérjeérés akadályozása és a piridin-nukleotidok redox eltolódása együtt ER-stresszt vált ki, és ennek szerepét az inzulinrezisztenciában, valamint a β -sejtpusztulásban egyre több tanulmány bizonyítja.

A háttérmechanizmusok vizsgálata mellett kutatásunk kiterjedt olyan hatóanyagok keresésére is, amelyek alkalmasak lehetnek a lipotoxicitás patobiokémiai szempontból talán legfontosabb manifesztációjának kivédésére, vagyis a β -sejtek lipoapoptózisának gátlására. Vizsgálatainkat RINm5F patkány inzulinóma sejteken végeztük, és optimalizálás után a lipotoxicitást 6-8 órás palmitátkezeléssel (500 μ M) váltottuk ki. Az általunk kipróbált hatóanyagok közül az inzulin iránt szenzitizáló antidiabetikumként ismert metformin bizonyult hatékonynak. A palmitáttal együtt adva teljesen kivédte az apoptózis fokozódását (**56. ábra**) [Simon-Szabó *et al.*, 2014].

Mivel a metformint egy nemrég közölt, NIT-1 egér inzulinóma sejteken végzett tanulmány hatékonynak találta a tapszigarginnal kiváltott ER-stressz következtében fokozódó apoptózis kivédésére [294]; megvizsgáltuk, hogy a lipoapoptózis elleni védő hatás hátterében is megfigyelhető-e az ER-stressz csillapítása. Az UPR egyik általános részjelensége az ER dajkafehérjéinek indukciója. A stresszválasz aktiválódásának ez a gyakran észlelt indikátora a palmitáttal kezelt RINm5F sejtekben is megfigyelhető volt (**57. ábra**).

dc 997 15



56. ábra *RINm5F inzulinóma sejtek lipoapoptózisának kivédése metforminnal* [Simon-Szabó *et al.*, 2014]

A patkány inzulinóma sejteket palmitáttal (500 μM) és/vagy metforminnal (10 μM, 100 μM) kezeltük. Az apoptózis indexet (apoptotikus sejtek/testek száma 100 sejtből) és a nekrózis indexet (nekrotizáló sejtek száma 100 sejtből) 6 óra kezelés után határoztuk meg szimultán Annexin V-tel és propídium-jodiddal (PI) végzett jelölés és fluoreszcens mikroszkópia segítségével. Az Annexin V-pozitív/PI-negatív festődést apoptózisnak, míg a PI-pozitív festődést nekrózisnak tekintettük.

Átlag + szórás; n=3; \$ P < 0,001 a kezeletlenhez, ***P < 0,001 a palmitátkezelthez képest.

A lipotoxicitás hatására jelentősen indukálódó BiP (GRP78) és a PDI mennyiségi változásainak nyomon követésével azt észleltük, hogy a metformin a palmitáttal kezelt inzulinóma sejtjeinkben is enyhíti az ER-stresszt, illetve az arra adott sejtválaszt. Előbbi fehérje esetében nem teljesen és koncentrációfüggő mértékben csökkentette, míg utóbbi esetében már kisebb dózisban teljesen kivédte az indukciót (**57. ábra**) [Simon-Szabó *et al.*, 2014].

A transzláció eIF2 α iniciációs faktorának foszforilációja, ami a transzláció általános gátlását, ugyanakkor bizonyos fehérjék fokozott transzlációját eredményezi, az UPR jellegzetes, korai eseménye. Ezt a gyakran vizsgált UPR-markert a palmitáttal kezelt inzulinóma sejtekben is észleltük, és metformin együttes adása ennek mértékét is – a BiP indukciójánál megfigyelthez hasonló módon – csökkentette (**58. ábra**) [Simon-Szabó *et al.*, 2014].




57. ábra *Az endoplazmás retikulum egyes chaperonjainak indukciója lipotoxicitásban* [Simon-Szabó *et al.*, 2014]

A patkány inzulinóma sejteket palmitáttal (500 μM) és/vagy metforminnal (10 μM, 100 μM) kezeltük. Az ER dajkafehérje BiP (GRP78) és PDI fehérje szintjét 8 órás kezelés után határoztuk meg Western blot segítségével. Három kísérletből származó, jellegzetes képek láthatók az ábrán. A relatív fehérjemennyiségeket denzitometrálás után a kontrollként használt, konstitutív expressziójú β-aktin mennyiségére normalizáltuk, és a csak palmitáttal kezelt mintában számított értékhez (100%) viszonyítva tüntettük fel a diagramon.
Átlag + szórás; n=3; §§§P < 0,001 a kezeletlenhez, ***P < 0,001 a palmitátkezelthez képest.

Az ER dajkafehérjéinek indukciója és a transzláció általános gátlása ugyanakkor az UPR adaptív, túlélést szolgáló mechanizmusa. Ezek csökkenése tehát nem magyarázza a metformin antiapoptotikus hatását, csupán jelzi az ER-stressz háttérben húzódó gátlását. Az oksági kapcsolat megerősítéséhez ezért a továbbiakban olyan UPR-részjelenségek alakulását is ellenőriztük, amelyek részben vagy egészben destruktívak, vagyis összefüggésbe hozhatók a lipotoxicitásnak kitett sejtek pusztulásával.





A patkány inzulinóma sejteket palmitáttal (500 μM) és/vagy metforminnal (10 μM, 100 μM) kezeltük. Az eukarióta iniciációs faktor eIF2α PERK általi foszforilációjának mértékét 8 órás kezelés után határoztuk meg Western blot segítségével. Három kísérletből származó, jellegzetes képek láthatók az ábrán. A relatív fehérjemennyiségeket denzitometrálás után a kontrollként használt, összes eIF2α fehérje mennyiségére normalizáltuk, és a csak palmitáttal kezelt mintában számított értékhez (100%) viszonyítva tüntettük fel a diagramon. Átlag + szórás; n=3; §§§P < 0,001 a kezeletlenhez, ***P < 0,001 a palmitátkezelthez képest.

Az UPR több mechanizmus révén is elősegítheti a sejtek apoptózisát, és ezek súlyos, helyrehozhatatlan ER-stressz esetén elő is idézhetik a sejtek programozott halálát. A legismertebb, leggyakrabban vizsgált és legspecifikusabb proapoptotikus UPR-elem a CHOP indukciója, amely mindhárom jelátviteli útvonallal összefüggésbe hozható, mégis leginkább az IRE1 aktiválódásának tudható be. Az IRE1 fehérje-fehérje kölcsönhatások révén, a CHOP által mediáltnál közvetlenebb módon is serkenteni tudja a kaszpázkaszkád működésbe lépését. Patkány eredetű sejtekben ez a prokaszpáz-3 hasítása által valósul meg. Mindkét proapoptotikus UPR-részjelenség markánsan megjelent a RINm5F sejtek lipoapoptózisa

során, és mindkettőt hatékonyan gátolta a metformin (**59. ábra**) [Simon-Szabó *et al.*, 2014], ami már a sejtvédő hatás szempontjából is egyértelműen releváns.





A patkány inzulinóma sejteket palmitáttal (500 μM) és/vagy metforminnal (10 μM, 100 μM) kezeltük. A CHOP, valamint a hasított (aktivált) kaszpáz-3 mennyiségét 8 órás kezelés után határoztuk meg Western blot segítségével. Három kísérletből származó, jellegzetes képek láthatók az ábrán. A relatív fehérjemennyiségeket denzitometrálás után a kontrollként használt, konstitutív expressziójú β-aktin mennyiségére normalizáltuk, és a csak palmitáttal kezelt mintában számított értékhez (100%) viszonyítva tüntettük fel a diagramon. Átlag + szórás; n=3; §§§P < 0,001 a kezeletlenhez, ***P < 0,001 a palmitátkezelthez képest.

Az ER-stressz egyik fontos következménye, bizonyos stresszfüggő kinázok, köztük is kiemelten a JNK aktiválódása, ami szintén az IRE1 útvonal beindulásához köthető. Ez a jelenség a legtöbb sejtben az IRS fehérjék szerinfoszforilációja által inzulinrezisztenciát okoz. Így van ez magában a hasnyálmirigy β -sejtben is, ahol az inzulin túlélést és proliferációt tart fenn, ezért a JNK-általi IRS-foszforilációnak a diabétesz patomechanizmusában is jelentőséget tulajdonítanak. Tény azonban, hogy újabb megfigyelések megkérdőjelezik, vagy kimondottan cáfolják a JNK-aktiválódás citotoxikus szerepét a β -sejtekben [360, 361]. Az

általunk vizsgált lipotoxicitás-modellben ugyancsak megfigyelhető volt a JNK, valamint két szubsztrátja, a c-Jun és az IRS-1 fehérje fokozott foszforilációja (**60. ábra**).



60. ábra JNK-aktiválódás és IRS-1-Ser-foszforiláció lipotoxicitásban [Simon-Szabó et al., 2014]

A patkány inzulinóma sejteket palmitáttal (500 μM) és/vagy metforminnal (10 μM, 100 μM) kezeltük. A JNK izoenzimek, a c-Jun és az IRS-1 (307Ser-) foszforilációjának mértékét 8 órás kezelés után határoztuk meg Western blot segítségével. Három kísérletből származó, jellegzetes képek láthatók az ábrán. A relatív fehérjemennyiségeket denzitometrálás után a kontrollként használt, konstitutív expressziójú β-aktin mennyiségére normalizáltuk, és a csak palmitáttal kezelt mintában számított értékhez (100%) viszonyítva tüntettük fel a diagramon. Átlag + szórás; n=3; §§§P < 0,001 a kezeletlenhez, ***P < 0,001 a palmitátkezelthez képest.

Figyelemre méltó, hogy a metformin ezeket a paramétereket, bár szignifikánsan, de a többi vizsgált jelenségnél lényegesen kisebb mértékben csökkentette. Még a magasabb koncentrációjú kezelés esetén is a kontroll feletti (a csak palmitáttal inkubált sejtekben észlelt érték 50%-a körüli) JNK-, c-Jun- és IRS-1-foszforilációs szinteket detektáltunk (**60. ábra**) [Simon-Szabó *et al.*, 2014].

Összességében kijelenthető, hogy az inzulin-szenzitizálóként ismert metformin a RINm5F inzulinóma sejtvonalon a lipotoxicitás és a lipoapoptózis kivédésében is hatékonynak bizonyult. A hatás hátterében az ER-stressz, illetve az UPR 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.

6. A LEGFONTOSABB EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA ÉS MEGBESZÉLÉSE

Az ER a sejt központi, metabolikus szervecskéje, egyben a hormonális szabályozás és a jelátvitel egyik fontos modulátora. Az utóbbi egy-két évtized egyre intenzívebb kutatása betegségek hosszú sora esetén bizonyította az organellum működészavarának kóroki szerepét. Az értekezésben tárgyalt munka középpontjában az ER fiziológiás működésének, valamint az elhízáshoz társuló anyagcsere-betegségekkel (metabolikus szindróma és 2-es típusú diabetes mellitus) összefüggésbe hozható működészavarainak minél alaposabb megismerése áll. A bemutatott, legfontosabb eredmények a következők.

Feltártuk az ER lumenében zajló diszulfidképződés egy eddig ismeretlen mechanizmusát, amely összefonódik ugyan a korábban leírt rendszerrel, mégis egy attól eltérő mikroszomális elektrontranszfer-láncot alkot. A számos in vitro részeredmény egy koherens modell kidolgozását tette 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 általunk leírt elektrontranszfer-lánc kezdő és végpontja megegyezik a bevezetőben ismertetett mechanizmusokéval: a fehérjetiolokról a PDI által átvett elektronok végül az oxigénmolekulára kerülnek. Az új modell, az aszkorbát-oxidáz révén, akár független alternatív útvonalként is működhet; ugyanakkor a benne főszereplő aszkorbát és tokoferol részt vehet az Ero1 vagy a QSOX részvételével megvalósuló diszulfidképződésben is. Ezen oxidázok az oxigénmolekula részleges redukciójával ROS-t termelnek, melynek teljes redukciójához az antioxidáns C- és E-vitaminon keresztül szolgáltathatnak elektronokat a fehérjék. A két legismertebb, exogén, víz-, illetve zsíroldékony antioxidáns molekula tehát fontos szerepet játszik az ER lumenében zajló oxidatív fehérjefoldingban; hiányuk csökkentheti az organellum 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 luminális tioloxidáló környezetének kialakulásával kapcsolatban korábban mások felvetették a befelé irányuló GSSG-transzport szerepét. Az organellum membránjának jelentéktelen glutationpermeabilitását bizonyító eredményeink kizárták ezt a lehetőséget, így ezek alapján kijelenthető, hogy a citoplazmára jellemzőnél 30-szor (vagy akár többször is) magasabb luminális [GSSG]:[GSH] arány nem oka, hanem következménye a lokális diszulfidképződésnek. Kimutattuk ugyanakkor, hogy a RyR1 kalciumcsatorna képes a glutation (mind GSH, mind GSSG) transzportjára. Ez megmagyarázza a vázizom szarkoplazmás retikulum membránjának – más sejttípusok ER membránjáétól karakterisztikusan eltérő módon – jelentős glutationpermeabilitását. A megfigyelt 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 hexóz-6-foszfát-dehidrogenáz és 1-es típusú 11β-hidroxiszteroid-dehidrogenáz e közös piridin-nukleotidkészlet révén funkcionális kapcsolatban áll egymással. Az előbbi enzim "housekeeping" géntermékként van jelen minden sejtben, és rendszerint fenntartja a magas luminális [NADPH]:[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-6foszfát-izomeráz enzimét. Az 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 táplálkozás, illetve a tápanyag-ellátottság fontos meghatározója az ER luminális piridinnukleotid redox státuszának, illetve ezen keresztül a prereceptoriális kortizolképződésnek. Eredményeink azt mutatták, hogy éhezésben csökken, jóllakott állapotban pedig nő a májból preparált mikroszóma kortizonredukáló képessége. Bizonyítottuk a 11BHSD1 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 11BHSD1 aktivitása) fontos szerepet

játszik az elhízás és a hozzá kapcsolódó anyagcserezavarok kialakulásában. Az enzim ideális gátlószere csak a kortizonredukciót 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 11βHSD1-gátló (mellék)hatása, és kimutattuk, hogy így tolja el kedvező irányba a mikroszomális kortizon-kortizol átalakulást a teaflavanol EGCG is. Megfigyelésünk a katekinek elhízás- és diabéteszellenes aktivitásának egyik lehetséges magyarázatául is szolgál, de fontosabb, hogy rámutat az ER elkülönült NADP⁺-NADPH-készletére mint egy ígéretes, ám eddig figyelmen kívül hagyott gyógyszer-támadáspontra, amely az 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 megemelkedett szabad zsírsavszint, a lipotoxicitást és lipoapoptózist 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 organellum kismolekulák számára szabadon átjárható membránja csupán hálóként tartja együtt a sejt fehérjéinek egy részét. Az ER-membrán általános, nem specifikus permeabilitása mellett érvelők leginkább az alacsony koleszterin- és magas fehérjetartalomra, valamint a transzlokon csatornák jelenlétére hivatkoznak. Egy biotinszármazékokkal végzett tanulmányban az általános permeabilitás mérethatárát is megbecsülték [362]. 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 [Csala *et al.*, 2007a].

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. Bizonyítékokkal szolgáltunk arra, hogy

- az ER membránján keresztüli anyagforgalmat fehérjék (transzporterek) biztosítják;
- a kismolekulák transzportja minden eddig vizsgált esetben kétirányú, passzív folyamat, egyes esetekben antiport mechanizmusú;
- a kismolekuláknak csupán egy része jut át számottevő sebességgel a membránon, vagyis a transzport szelektív; még akkor is, ha
- az érintett transzporterek aktivitása rendszerint nem korlátozódik egy-egy ligandra, ezért számuk feltehetőleg csak töredéke az általuk szállított vegyületekének;
- a rájuk specifikus transzporterrel nem rendelkező molekulák membránon keresztüli mozgását olyan csatornák (pl. RyR, transzlokon) is biztosíthatják, melyeknek korábban egy-egy specifikus transzport szerepet tulajdonítottak.
- a transzport fontos meghatározója a lumenben zajló enzimatikus reakciók sebességének és specificitásának; következésképpen
- a már azonosított és az azonosításra váró transzporterek az ER-ben lokalizált sejtfunkciók befolyásolásának fontos lehetséges célpontjai; illetve
- e transzporterek veleszületett defektusai vagy polimorfizmusai egyes anyagcserebetegségek alapját képezhetik.

A sejt többi részétől ily módon elkülönülő, mégis szorosan összefüggő organellum, amely az anyagcsere minden ágában közreműködik, **a sejt tápanyagszenzoraként is funkcionál**. Luminális redox rendszereinek állapota érzékenyen reagál az elektrondonorként 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 prereceptoriális 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.

7. IRODALOMJEGYZÉK

- Clinical guidelines on the identification, evaluation, and treatment of overweight and obesity in adults: executive summary. Expert Panel on the Identification, Evaluation, and Treatment of Overweight in Adults. *Am J Clin Nutr* 68, 899-917 (1998).
- Flegal, K.M., Carroll, M.D., Kit, B.K. and Ogden, C.L. Prevalence of obesity and trends in the distribution of body mass index among US adults, 1999-2010. *JAMA* 307, 491-7 (2012).
- 3. Ogden, C.L., Carroll, M.D., Kit, B.K. and Flegal, K.M. Prevalence of obesity among adults: United States, 2011-2012. *NCHS Data Brief*, 1-8 (2013).
- 4. Arner, P. and Spalding, K.L. Fat cell turnover in humans. *Biochem Biophys Res Commun* **396**, 101-4 (2010).
- 5. Weyer, C., Foley, J.E., Bogardus, C., Tataranni, P.A. and Pratley, R.E. Enlarged subcutaneous abdominal adipocyte size, but not obesity itself, predicts type II diabetes independent of insulin resistance. *Diabetologia* **43**, 1498-506 (2000).
- Lonn, M., Mehlig, K., Bengtsson, C. and Lissner, L. Adipocyte size predicts incidence of type 2 diabetes in women. *FASEB J* 24, 326-31 (2010).
- Pasarica, M., Sereda, O.R., Redman, L.M., Albarado, D.C., Hymel, D.T., Roan, L.E., Rood, J.C., Burk, D.H. and Smith, S.R. Reduced adipose tissue oxygenation in human obesity: evidence for rarefaction, macrophage chemotaxis, and inflammation without an angiogenic response. *Diabetes* 58, 718-25 (2009).
- Lee, M.J., Wu, Y. and Fried, S.K. Adipose tissue heterogeneity: implication of depot differences in adipose tissue for obesity complications. *Mol Aspects Med* 34, 1-11 (2013).
- Komatsu, M., Takei, M., Ishii, H. and Sato, Y. Glucose-stimulated insulin secretion: A newer perspective. *J Diabetes Investig* 4, 511-6 (2013).
- 10. Mounier, C. and Posner, B.I. Transcriptional regulation by insulin: from the receptor to the gene. *Can J Physiol Pharmacol* **84**, 713-24 (2006).
- 11. White, M.F. The IRS-signalling system: a network of docking proteins that mediate insulin action. *Mol Cell Biochem* **182**, 3-11 (1998).
- 12. Taniguchi, C.M., Emanuelli, B. and Kahn, C.R. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 85-96 (2006).

- Fritsche, L., Weigert, C., Haring, H.U. and Lehmann, R. How insulin receptor substrate proteins regulate the metabolic capacity of the liver--implications for health and disease. *Curr Med Chem* 15, 1316-29 (2008).
- Ogihara, T., Shin, B.C., Anai, M., Katagiri, H., Inukai, K., Funaki, M., Fukushima, Y., Ishihara, H., Takata, K., Kikuchi, M., Yazaki, Y., Oka, Y. and Asano, T. Insulin receptor substrate (IRS)-2 is dephosphorylated more rapidly than IRS-1 via its association with phosphatidylinositol 3-kinase in skeletal muscle cells. *J Biol Chem* 272, 12868-73 (1997).
- Miki, H., Yamauchi, T., Suzuki, R., Komeda, K., Tsuchida, A., Kubota, N., Terauchi, Y., Kamon, J., Kaburagi, Y., Matsui, J., Akanuma, Y., Nagai, R., Kimura, S., Tobe, K. and Kadowaki, T. Essential role of insulin receptor substrate 1 (IRS-1) and IRS-2 in adipocyte differentiation. *Mol Cell Biol* 21, 2521-32 (2001).
- Kulkarni, R.N., Winnay, J.N., Daniels, M., Bruning, J.C., Flier, S.N., Hanahan, D. and Kahn, C.R. Altered function of insulin receptor substrate-1-deficient mouse islets and cultured beta-cell lines. *J Clin Invest* 104, R69-75 (1999).
- Xu, G.G., Gao, Z.Y., Borge, P.D., Jr. and Wolf, B.A. Insulin receptor substrate 1induced inhibition of endoplasmic reticulum Ca2+ uptake in beta-cells. Autocrine regulation of intracellular ca2+ homeostasis and insulin secretion. *J Biol Chem* 274, 18067-74 (1999).
- Downward, J. Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt. *Curr Opin Cell Biol* 10, 262-7 (1998).
- 19. Kulkarni, R.N., Mizrachi, E.B., Ocana, A.G. and Stewart, A.F. Human beta-cell proliferation and intracellular signaling: driving in the dark without a road map. *Diabetes* **61**, 2205-13 (2012).
- 20. Paris, M., Bernard-Kargar, C., Berthault, M.F., Bouwens, L. and Ktorza, A. Specific and combined effects of insulin and glucose on functional pancreatic beta-cell mass in vivo in adult rats. *Endocrinology* **144**, 2717-27 (2003).
- Hennige, A.M., Burks, D.J., Ozcan, U., Kulkarni, R.N., Ye, J., Park, S., Schubert, M., Fisher, T.L., Dow, M.A., Leshan, R., Zakaria, M., Mossa-Basha, M. and White, M.F. Upregulation of insulin receptor substrate-2 in pancreatic beta cells prevents diabetes. *J Clin Invest* 112, 1521-32 (2003).
- Ishiki, M. and Klip, A. Minireview: recent developments in the regulation of glucose transporter-4 traffic: new signals, locations, and partners. *Endocrinology* 146, 5071-8 (2005).

- 23. Ide, T., Shimano, H., Yahagi, N., Matsuzaka, T., Nakakuki, M., Yamamoto, T., Nakagawa, Y., Takahashi, A., Suzuki, H., Sone, H., Toyoshima, H., Fukamizu, A. and Yamada, N. SREBPs suppress IRS-2-mediated insulin signalling in the liver. *Nat Cell Biol* 6, 351-7 (2004).
- Bi, Y., Wu, W., Shi, J., Liang, H., Yin, W., Chen, Y., Tang, S., Cao, S., Cai, M., Shen, S., Gao, Q., Weng, J. and Zhu, D. Role for sterol regulatory element binding proteinlc activation in mediating skeletal muscle insulin resistance via repression of rat insulin receptor substrate-1 transcription. *Diabetologia* 57, 592-602 (2014).
- 25. Scott, P.H., Brunn, G.J., Kohn, A.D., Roth, R.A. and Lawrence, J.C., Jr. Evidence of insulin-stimulated phosphorylation and activation of the mammalian target of rapamycin mediated by a protein kinase B signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S* A 95, 7772-7 (1998).
- Harrington, L.S., Findlay, G.M., Gray, A., Tolkacheva, T., Wigfield, S., Rebholz, H., Barnett, J., Leslie, N.R., Cheng, S., Shepherd, P.R., Gout, I., Downes, C.P. and Lamb, R.F. The TSC1-2 tumor suppressor controls insulin-PI3K signaling via regulation of IRS proteins. *J Cell Biol* 166, 213-23 (2004).
- Copps, K.D. and White, M.F. Regulation of insulin sensitivity by serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins IRS1 and IRS2. *Diabetologia* 55, 2565-82 (2012).
- Aguirre, V., Werner, E.D., Giraud, J., Lee, Y.H., Shoelson, S.E. and White, M.F. Phosphorylation of Ser307 in insulin receptor substrate-1 blocks interactions with the insulin receptor and inhibits insulin action. *J Biol Chem* 277, 1531-7 (2002).
- Li, J., DeFea, K. and Roth, R.A. Modulation of insulin receptor substrate-1 tyrosine phosphorylation by an Akt/phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J Biol Chem* 274, 9351-6 (1999).
- Gual, P., Gremeaux, T., Gonzalez, T., Le Marchand-Brustel, Y. and Tanti, J.F. MAP kinases and mTOR mediate insulin-induced phosphorylation of insulin receptor substrate-1 on serine residues 307, 612 and 632. *Diabetologia* 46, 1532-42 (2003).
- De Fea, K. and Roth, R.A. Modulation of insulin receptor substrate-1 tyrosine phosphorylation and function by mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 272, 31400-6 (1997).
- 32. Sommerfeld, M.R., Metzger, S., Stosik, M., Tennagels, N. and Eckel, J. In vitro phosphorylation of insulin receptor substrate 1 by protein kinase C-zeta: functional

analysis and identification of novel phosphorylation sites. *Biochemistry* **43**, 5888-901 (2004).

- 33. Xiao, X. and Song, B.L. SREBP: a novel therapeutic target. *Acta Biochim Biophys Sin* (*Shanghai*) **45**, 2-10 (2013).
- 34. Tokunaga, C., Yoshino, K. and Yonezawa, K. mTOR integrates amino acid- and energy-sensing pathways. *Biochem Biophys Res Commun* **313**, 443-6 (2004).
- 35. Tremblay, F. and Marette, A. Amino acid and insulin signaling via the mTOR/p70 S6 kinase pathway. A negative feedback mechanism leading to insulin resistance in skeletal muscle cells. *J Biol Chem* 276, 38052-60 (2001).
- Shin, J.A., Lee, J.H., Lim, S.Y., Ha, H.S., Kwon, H.S., Park, Y.M., Lee, W.C., Kang, M.I., Yim, H.W., Yoon, K.H. and Son, H.Y. Metabolic syndrome as a predictor of type 2 diabetes, and its clinical interpretations and usefulness. *J Diabetes Investig* 4, 334-43 (2013).
- Reaven, G.M. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. Diabetes 37, 1595-607 (1988).
- 38. Mazziotti, G., Gazzaruso, C. and Giustina, A. Diabetes in Cushing syndrome: basic and clinical aspects. *Trends Endocrinol Metab* **22**, 499-506 (2011).
- Walker, B.R. Cortisol--cause and cure for metabolic syndrome? *Diabet Med* 23, 1281-8 (2006).
- Rask, E., Olsson, T., Soderberg, S., Andrew, R., Livingstone, D.E., Johnson, O. and Walker, B.R. Tissue-specific dysregulation of cortisol metabolism in human obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 1418-21 (2001).
- Walker, B.R., Soderberg, S., Lindahl, B. and Olsson, T. Independent effects of obesity and cortisol in predicting cardiovascular risk factors in men and women. *J Intern Med* 247, 198-204 (2000).
- Travison, T.G., O'Donnell, A.B., Araujo, A.B., Matsumoto, A.M. and McKinlay, J.B.
 Cortisol levels and measures of body composition in middle-aged and older men. *Clin Endocrinol (Oxf)* 67, 71-7 (2007).
- Anagnostis, P., Athyros, V.G., Tziomalos, K., Karagiannis, A. and Mikhailidis, D.P. Clinical review: The pathogenetic role of cortisol in the metabolic syndrome: a hypothesis. *J Clin Endocrinol Metab* 94, 2692-701 (2009).
- 44. Krikorian, A. and Khan, M. Is metabolic syndrome a mild form of Cushing's syndrome? *Rev Endocr Metab Disord* **11**, 141-5 (2010).

- 45. Divertie, G.D., Jensen, M.D. and Miles, J.M. Stimulation of lipolysis in humans by physiological hypercortisolemia. *Diabetes* **40**, 1228-32 (1991).
- 46. Exton, J.H. Regulation of gluconeogenesis by glucocorticoids. *Monogr Endocrinol* 12, 535-46 (1979).
- 47. Yabaluri, N. and Bashyam, M.D. Hormonal regulation of gluconeogenic gene transcription in the liver. *J Biosci* **35**, 473-84 (2010).
- Saad, M.J., Folli, F., Kahn, J.A. and Kahn, C.R. Modulation of insulin receptor, insulin receptor substrate-1, and phosphatidylinositol 3-kinase in liver and muscle of dexamethasone-treated rats. *J Clin Invest* 92, 2065-72 (1993).
- 49. Giorgino, F., Almahfouz, A., Goodyear, L.J. and Smith, R.J. Glucocorticoid regulation of insulin receptor and substrate IRS-1 tyrosine phosphorylation in rat skeletal muscle in vivo. *J Clin Invest* **91**, 2020-30 (1993).
- Morgan, S.A., Sherlock, M., Gathercole, L.L., Lavery, G.G., Lenaghan, C., Bujalska, I.J., Laber, D., Yu, A., Convey, G., Mayers, R., Hegyi, K., Sethi, J.K., Stewart, P.M., Smith, D.M. and Tomlinson, J.W. 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 regulates glucocorticoid-induced insulin resistance in skeletal muscle. *Diabetes* 58, 2506-15 (2009).
- 51. Piroli, G.G., Grillo, C.A., Reznikov, L.R., Adams, S., McEwen, B.S., Charron, M.J. and Reagan, L.P. Corticosterone impairs insulin-stimulated translocation of GLUT4 in the rat hippocampus. *Neuroendocrinology* 85, 71-80 (2007).
- 52. Zarkovic, M., Beleslin, B., Ciric, J., Penezic, Z., Stojkovic, M., Trbojevic, B., Drezgic, M. and Savic, S. Glucocorticoid effect on insulin sensitivity: a time frame. J *Endocrinol Invest* 31, 238-42 (2008).
- 53. Hazlehurst, J.M., Gathercole, L.L., Nasiri, M., Armstrong, M.J., Borrows, S., Yu, J., Wagenmakers, A.J., Stewart, P.M. and Tomlinson, J.W. Glucocorticoids fail to cause insulin resistance in human subcutaneous adipose tissue in vivo. *J Clin Endocrinol Metab* 98, 1631-40 (2013).
- Gathercole, L.L., Bujalska, I.J., Stewart, P.M. and Tomlinson, J.W. Glucocorticoid modulation of insulin signaling in human subcutaneous adipose tissue. *J Clin Endocrinol Metab* 92, 4332-9 (2007).
- 55. Gathercole, L.L., Morgan, S.A., Bujalska, I.J., Stewart, P.M. and Tomlinson, J.W. Short- and long-term glucocorticoid treatment enhances insulin signalling in human subcutaneous adipose tissue. *Nutr Diabetes* 1, e3 (2011).

- 56. Tomlinson, J.J., Boudreau, A., Wu, D., Abdou Salem, H., Carrigan, A., Gagnon, A., Mears, A.J., Sorisky, A., Atlas, E. and Hache, R.J. Insulin sensitization of human preadipocytes through glucocorticoid hormone induction of forkhead transcription factors. *Mol Endocrinol* 24, 104-13 (2010).
- Hauner, H., Schmid, P. and Pfeiffer, E.F. Glucocorticoids and insulin promote the differentiation of human adipocyte precursor cells into fat cells. *J Clin Endocrinol Metab* 64, 832-5 (1987).
- 58. Gathercole, L.L., Morgan, S.A., Bujalska, I.J., Hauton, D., Stewart, P.M. and Tomlinson, J.W. Regulation of lipogenesis by glucocorticoids and insulin in human adipose tissue. *PLoS One* **6**, e26223 (2011).
- 59. Yan, L.J. Pathogenesis of Chronic Hyperglycemia: From Reductive Stress to Oxidative Stress. *J Diabetes Res* 2014, 137919 (2014).
- 60. Tang, W.H., Martin, K.A. and Hwa, J. Aldose reductase, oxidative stress, and diabetic mellitus. *Front Pharmacol* **3**, 87 (2012).
- 61. Rajapakse, A.G., Ming, X.F., Carvas, J.M. and Yang, Z. O-linked beta-Nacetylglucosamine during hyperglycemia exerts both anti-inflammatory and prooxidative properties in the endothelial system. *Oxid Med Cell Longev* **2**, 172-5 (2009).
- 62. Mira, M.L., Martinho, F., Azevedo, M.S. and Manso, C.F. Oxidative inhibition of red blood cell ATPases by glyceraldehyde. *Biochim Biophys Acta* **1060**, 257-61 (1991).
- 63. Thornalley, P.J., Langborg, A. and Minhas, H.S. Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose. *Biochem J* **344 Pt 1**, 109-16 (1999).
- 64. Qiao, Q., Keinanen, K. and Kivela, S.L. Haemoglobin A(1c) measurement for diabetes among subjects with a previous history of impaired glucose tolerance. *Diabetes Res Clin Pract* **30**, 189-94 (1995).
- 65. Phan, C.T. and Tso, P. Intestinal lipid absorption and transport. *Front Biosci* **6**, D299-319 (2001).
- 66. Grey, N.J., Karl, I. and Kipnis, D.M. Physiologic mechanisms in the development of starvation ketosis in man. *Diabetes* **24**, 10-6 (1975).
- 67. Capurso, C. and Capurso, A. From excess adiposity to insulin resistance: the role of free fatty acids. *Vascul Pharmacol* **57**, 91-7 (2012).
- 68. Grygiel-Gorniak, B. Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands: nutritional and clinical implications--a review. *Nutr J* **13**, 17 (2014).

- Itoh, Y., Kawamata, Y., Harada, M., Kobayashi, M., Fujii, R., Fukusumi, S., Ogi, K., Hosoya, M., Tanaka, Y., Uejima, H., Tanaka, H., Maruyama, M., Satoh, R., Okubo, S., Kizawa, H., Komatsu, H., Matsumura, F., Noguchi, Y., Shinohara, T., Hinuma, S., Fujisawa, Y. and Fujino, M. Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic beta cells through GPR40. *Nature* 422, 173-6 (2003).
- 70. Fujiwara, K., Maekawa, F. and Yada, T. Oleic acid interacts with GPR40 to induce Ca2+ signaling in rat islet beta-cells: mediation by PLC and L-type Ca2+ channel and link to insulin release. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289, E670-7 (2005).
- 71. Jialal, I., Kaur, H. and Devaraj, S. Toll-like receptor status in obesity and metabolic syndrome: a translational perspective. *J Clin Endocrinol Metab* **99**, 39-48 (2014).
- Yin, J., Peng, Y., Wu, J., Wang, Y. and Yao, L. Toll-like receptor 2/4 links to free fatty acid-induced inflammation and beta-cell dysfunction. *J Leukoc Biol* 95, 47-52 (2014).
- 73. Kim, J.J. and Sears, D.D. TLR4 and Insulin Resistance. *Gastroenterol Res Pract* 2010 (2010).
- 74. Kazantzis, M. and Stahl, A. Fatty acid transport proteins, implications in physiology and disease. *Biochim Biophys Acta* **1821**, 852-7 (2012).
- 75. Seifert, E.L., Estey, C., Xuan, J.Y. and Harper, M.E. Electron transport chaindependent and -independent mechanisms of mitochondrial H2O2 emission during long-chain fatty acid oxidation. *J Biol Chem* **285**, 5748-58 (2010).
- 76. Vial, G., Dubouchaud, H., Couturier, K., Cottet-Rousselle, C., Taleux, N., Athias, A., Galinier, A., Casteilla, L. and Leverve, X.M. Effects of a high-fat diet on energy metabolism and ROS production in rat liver. *J Hepatol* 54, 348-56 (2011).
- 77. Chavez, J.A. and Summers, S.A. Characterizing the effects of saturated fatty acids on insulin signaling and ceramide and diacylglycerol accumulation in 3T3-L1 adipocytes and C2C12 myotubes. *Arch Biochem Biophys* **419**, 101-9 (2003).
- 78. Nakamura, S., Takamura, T., Matsuzawa-Nagata, N., Takayama, H., Misu, H., Noda, H., Nabemoto, S., Kurita, S., Ota, T., Ando, H., Miyamoto, K. and Kaneko, S. Palmitate induces insulin resistance in H4IIEC3 hepatocytes through reactive oxygen species produced by mitochondria. *J Biol Chem* 284, 14809-18 (2009).
- 79. Yu, C., Chen, Y., Cline, G.W., Zhang, D., Zong, H., Wang, Y., Bergeron, R., Kim, J.K., Cushman, S.W., Cooney, G.J., Atcheson, B., White, M.F., Kraegen, E.W. and Shulman, G.I. Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin

receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle. *J Biol Chem* **277**, 50230-6 (2002).

- Watt, M.J. Storing up trouble: does accumulation of intramyocellular triglyceride protect skeletal muscle from insulin resistance? *Clin Exp Pharmacol Physiol* 36, 5-11 (2009).
- Shao, S., Yang, Y., Yuan, G., Zhang, M. and Yu, X. Signaling molecules involved in lipid-induced pancreatic beta-cell dysfunction. *DNA Cell Biol* 32, 41-9 (2013).
- 82. Kusminski, C.M., Shetty, S., Orci, L., Unger, R.H. and Scherer, P.E. Diabetes and apoptosis: lipotoxicity. *Apoptosis* **14**, 1484-95 (2009).
- 83. Yang, J., Kang, J. and Guan, Y. The mechanisms linking adiposopathy to type 2 diabetes. *Front Med* **7**, 433-44 (2013).
- Kim, D.S., Jeong, S.K., Kim, H.R., Kim, D.S., Chae, S.W. and Chae, H.J. Metformin regulates palmitate-induced apoptosis and ER stress response in HepG2 liver cells. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 32, 251-7 (2010).
- Lupi, R., Del Guerra, S., Fierabracci, V., Marselli, L., Novelli, M., Patane, G., Boggi, U., Mosca, F., Piro, S., Del Prato, S. and Marchetti, P. Lipotoxicity in human pancreatic islets and the protective effect of metformin. *Diabetes* 51 Suppl 1, S134-7 (2002).
- 86. Parcellier, A., Tintignac, L.A., Zhuravleva, E. and Hemmings, B.A. PKB and the mitochondria: AKTing on apoptosis. *Cell Signal* **20**, 21-30 (2008).
- 87. Hennige, A.M., Ozcan, U., Okada, T., Jhala, U.S., Schubert, M., White, M.F. and Kulkarni, R.N. Alterations in growth and apoptosis of insulin receptor substrate-1-deficient beta-cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **289**, E337-46 (2005).
- White, M.F. Regulating insulin signaling and beta-cell function through IRS proteins. *Can J Physiol Pharmacol* 84, 725-37 (2006).
- Shimabukuro, M., Zhou, Y.T., Levi, M. and Unger, R.H. Fatty acid-induced beta cell apoptosis: a link between obesity and diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 2498-502 (1998).
- 90. Duffey, K.J. and Popkin, B.M. High-fructose corn syrup: is this what's for dinner? *Am J Clin Nutr* **88**, 1722S-1732S (2008).
- 91. Tappy, L. and Le, K.A. Metabolic effects of fructose and the worldwide increase in obesity. *Physiol Rev* **90**, 23-46 (2010).
- 92. Corpe, C.P., Burant, C.F. and Hoekstra, J.H. Intestinal fructose absorption: clinical and molecular aspects. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **28**, 364-74 (1999).

160

- 93. Sugawa-Katayama, Y. and Morita, N. Effects of a high fructose diet on lipogenic enzyme activities in some organs of rats fed ad libitum. *J Nutr* **105**, 1377-83 (1975).
- 94. Froesch, E.R. Fructose metabolism in adipose tissue from normal and diabetic rats1.In *Comprehensive Physiology* (John Wiley & Sons, Inc., 2010).
- 95. Kelly, F.J. Use of antioxidants in the prevention and treatment of disease. *J Int Fed Clin Chem* **10**, 21-3 (1998).
- Cunningham, J.J. Micronutrients as nutriceutical interventions in diabetes mellitus. J Am Coll Nutr 17, 7-10 (1998).
- 97. Banerjee, S. and Ghosh, N.C. Relation of scurvy to glucose tolerance test, liver glycogen, and insulin content of pancreas of guinea pigs. *J Biol Chem* **168**, 207-11 (1947).
- 98. Mukherjee, A.K. and Banerjee, S. Studies on histological changes in experimental scurvy. *Anat Rec* **120**, 907-15 (1954).
- 99. Wells, W.W., Dou, C.Z., Dybas, L.N., Jung, C.H., Kalbach, H.L. and Xu, D.P. Ascorbic acid is essential for the release of insulin from scorbutic guinea pig pancreatic islets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 11869-73 (1995).
- 100. Dou, C., Xu, D.P. and Wells, W.W. Studies on the essential role of ascorbic acid in the energy dependent release of insulin from pancreatic islets. *Biochem Biophys Res Commun* 231, 820-2 (1997).
- 101. Bergsten, P., Moura, A.S., Atwater, I. and Levine, M. Ascorbic acid and insulin secretion in pancreatic islets. *J Biol Chem* **269**, 1041-5 (1994).
- 102. H, B. Vitamin C in the Treatment of Diabetes. *Die Medizinische Welt* **13**, 117-120 (1939).
- Stewart, C.T., Salmon, R.J. and May, C.D. Factors determining effect of insulin on metabolism of glucose in ascorbic acid deficiency and scurvy in the monkey. *AMA Am J Dis Child* 84, 677-91 (1952).
- 104. Corti, A., Casini, A.F. and Pompella, A. Cellular pathways for transport and efflux of ascorbate and dehydroascorbate. *Arch Biochem Biophys* **500**, 107-15 (2010).
- 105. Kapeghian, J.C. and Verlangieri, A.J. The effects of glucose on ascorbic acid uptake in heart endothelial cells: possible pathogenesis of diabetic angiopathies. *Life Sci* 34, 577-84 (1984).
- 106. Kodaman, P.H., Aten, R.F. and Behrman, H.R. Accumulation of ascorbate by endocrine-regulated and glucose-sensitive transport of dehydroascorbic acid in luteinized rat ovarian cells. *Biol Reprod* **58**, 407-13 (1998).

- 107. Cunningham, J.J. The glucose/insulin system and vitamin C: implications in insulindependent diabetes mellitus. *J Am Coll Nutr* **17**, 105-8 (1998).
- 108. Johnston, C.S., Beezhold, B.L., Mostow, B. and Swan, P.D. Plasma vitamin C is inversely related to body mass index and waist circumference but not to plasma adiponectin in nonsmoking adults. *J Nutr* **137**, 1757-62 (2007).
- 109. Garcia, O.P., Ronquillo, D., Caamano Mdel, C., Camacho, M., Long, K.Z. and Rosado, J.L. Zinc, vitamin A, and vitamin C status are associated with leptin concentrations and obesity in Mexican women: results from a cross-sectional study. *Nutr Metab (Lond)* 9, 59 (2012).
- 110. Garcia, O.P., Ronquillo, D., del Carmen Caamano, M., Martinez, G., Camacho, M., Lopez, V. and Rosado, J.L. Zinc, iron and vitamins A, C and e are associated with obesity, inflammation, lipid profile and insulin resistance in Mexican school-aged children. *Nutrients* 5, 5012-30 (2013).
- Sumpio, B.E., Cordova, A.C., Berke-Schlessel, D.W., Qin, F. and Chen, Q.H. Green tea, the "Asian paradox," and cardiovascular disease. *J Am Coll Surg* 202, 813-25 (2006).
- 112. Weisburger, J.H. and Chung, F.L. Mechanisms of chronic disease causation by nutritional factors and tobacco products and their prevention by tea polyphenols. *Food Chem Toxicol* **40**, 1145-54 (2002).
- 113. Sato, T. and Miyata, G. The nutraceutical benefit, part I: green tea. *Nutrition* 16, 315-7 (2000).
- Arts, I.C., Hollman, P.C. and Kromhout, D. Chocolate as a source of tea flavonoids. *Lancet* 354, 488 (1999).
- 115. Hollman, P.C. and Katan, M.B. Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. *Food Chem Toxicol* **37**, 937-42 (1999).
- 116. Dufresne, C.J. and Farnworth, E.R. A review of latest research findings on the health promotion properties of tea. *J Nutr Biochem* **12**, 404-421 (2001).
- 117. Fernandez-Panchon, M.S., Villano, D., Troncoso, A.M. and Garcia-Parrilla, M.C. Antioxidant activity of phenolic compounds: from in vitro results to in vivo evidence. *Crit Rev Food Sci Nutr* 48, 649-71 (2008).
- 118. Kim, H.S., Quon, M.J. and Kim, J.A. New insights into the mechanisms of polyphenols beyond antioxidant properties; lessons from the green tea polyphenol, epigallocatechin 3-gallate. *Redox Biol* 2, 187-95 (2014).

- 119. Babu, P.V., Liu, D. and Gilbert, E.R. Recent advances in understanding the antidiabetic actions of dietary flavonoids. *J Nutr Biochem* **24**, 1777-89 (2013).
- 120. Munir, K.M., Chandrasekaran, S., Gao, F. and Quon, M.J. Mechanisms for food polyphenols to ameliorate insulin resistance and endothelial dysfunction: therapeutic implications for diabetes and its cardiovascular complications. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 305, E679-86 (2013).
- 121. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P. Intracellular compartments and protein sorting. In *Molecular Biology of the Cell* 695-748 (Garland Science, 2008).
- Baumann, O. and Walz, B. Endoplasmic reticulum of animal cells and its organization into structural and functional domains. *International review of cytology* 205, 149 (2001).
- 123. Palade, G.E. The endoplasmic reticulum. 2, 85 (1956).
- 124. van Meer, G., Voelker, D.R. and Feigenson, G.W. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 112-24 (2008).
- 125. Shibata, Y., Voeltz, G.K. and Rapoport, T.A. Rough sheets and smooth tubules. *Cell* 126, 435 (2006).
- 126. Voeltz, G.K., Rolls, M.M. and Rapoport, T.A. Structural organization of the endoplasmic reticulum. *EMBO reports* **3**, 944 (2002).
- 127. Borgese, N., Francolini, M. and Snapp, E. Endoplasmic reticulum architecture: structures in flux. *Current opinion in cell biology* **18**, 358 (2006).
- Berridge, M.J. The endoplasmic reticulum: a multifunctional signaling organelle. *Cell Calcium* 32, 235-49 (2002).
- 129. Bravo, R., Parra, V., Gatica, D., Rodriguez, A.E., Torrealba, N., Paredes, F., Wang, Z.V., Zorzano, A., Hill, J.A., Jaimovich, E., Quest, A.F. and Lavandero, S. Endoplasmic reticulum and the unfolded protein response: dynamics and metabolic integration. *Int Rev Cell Mol Biol* **301**, 215-90 (2013).
- Shen, J., Zeng, Y., Zhuang, X., Sun, L., Yao, X., Pimpl, P. and Jiang, L. Organelle pH in the Arabidopsis endomembrane system. *Mol Plant* 6, 1419-37 (2013).
- 131. Kim, J.H., Johannes, L., Goud, B., Antony, C., Lingwood, C.A., Daneman, R. and Grinstein, S. Noninvasive measurement of the pH of the endoplasmic reticulum at rest and during calcium release. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 2997-3002 (1998).
- 132. Daniels, A.J., Dean, G., Viveros, O.H. and Diliberto, E.J., Jr. Secretion of newly taken up ascorbic acid by adrenomedullary chromaffin cells originates from a compartment

different from the catecholamine storage vesicle. *Molecular pharmacology* **23**, 437 (1983).

- von Zastrow, M., Tritton, T.R. and Castle, J.D. Identification of L-ascorbic acid in secretion granules of the rat parotid gland. *The Journal of biological chemistry* 259, 11746 (1984).
- 134. von Zastrow, M., Tritton, T.R. and Castle, J.D. Exocrine secretion granules contain peptide amidation activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **83**, 3297 (1986).
- 135. Mandl, J., Szarka, A. and Banhegyi, G. Vitamin C: update on physiology and pharmacology. *Br J Pharmacol* **157**, 1097-110 (2009).
- Bass, R., Ruddock, L.W., Klappa, P. and Freedman, R.B. A major fraction of endoplasmic reticulum-located glutathione is present as mixed disulfides with protein. *J Biol Chem* 279, 5257-62 (2004).
- 137. Hwang, C., Sinskey, A.J. and Lodish, H.F. Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum. *Science* **257**, 1496 (1992).
- 138. Kolossov, V.L., Leslie, M.T., Chatterjee, A., Sheehan, B.M., Kenis, P.J. and Gaskins, H.R. Forster resonance energy transfer-based sensor targeting endoplasmic reticulum reveals highly oxidative environment. *Exp Biol Med (Maywood)* 237, 652-62 (2012).
- Papahadjopoulos, D., Nir, S. and Oki, S. Permeability properties of phospholipid membranes: effect of cholesterol and temperature. *Biochimica et biophysica acta* 266, 561 (1972).
- Csala, M., Banhegyi, G., Braun, L., Szirmai, R., Burchell, A., Burchell, B., Benedetti,
 A. and Mandl, J. Beta-glucuronidase latency in isolated murine hepatocytes. *Biochem Pharmacol* 59, 801-5 (2000).
- 141. Groenendyk, J., Lynch, J. and Michalak, M. Calreticulin, Ca2+, and calcineurin signaling from the endoplasmic reticulum. *Mol Cells* **17**, 383-9 (2004).
- 142. Braakman, I. and Bulleid, N.J. Protein folding and modification in the mammalian endoplasmic reticulum. *Annu Rev Biochem* **80**, 71-99 (2011).
- 143. van Kasteren, S.I., Overkleeft, H., Ovaa, H. and Neefjes, J. Chemical biology of antigen presentation by MHC molecules. *Curr Opin Immunol* **26**, 21-31 (2014).
- 144. van Schaftingen, E. and Gerin, I. The glucose-6-phosphatase system. *The Biochemical journal* **362**, 513 (2002).
- 145. Hino, Y. and Minakami, S. Hexose-6-phosphate and 6-phosphogluconate dehydrogenases of rat liver microsomes. Involvement in NADPH and carbon dioxide

generation in the luminal space of microsomal vesicles. *Journal of Biochemistry* **92**, 547 (1982).

- Vance, D.E. and Vance, J.E. Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes (Elsevier Science, 1996).
- 147. Black, S.D. Membrane topology of the mammalian P450 cytochromes. *FASEB J* 6, 680-5 (1992).
- 148. Stewart, P.M. and Krozowski, Z.S. 11 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase. *Vitamins and hormones* **57**, 249 (1999).
- Radominska-Pandya, A., Ouzzine, M., Fournel-Gigleux, S. and Magdalou, J. Structure of UDP-glucuronosyltransferases in membranes. *Methods Enzymol* 400, 116-47 (2005).
- 150. Vandecaetsbeek, I., Vangheluwe, P., Raeymaekers, L., Wuytack, F. and Vanoevelen,
 J. The Ca2+ pumps of the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3 (2011).
- 151. Decrock, E., De Bock, M., Wang, N., Gadicherla, A.K., Bol, M., Delvaeye, T., Vandenabeele, P., Vinken, M., Bultynck, G., Krysko, D.V. and Leybaert, L. IP3, a small molecule with a powerful message. *Biochim Biophys Acta* 1833, 1772-86 (2013).
- 152. Van Petegem, F. Ryanodine receptors: structure and function. J Biol Chem 287, 31624-32 (2012).
- 153. Akl, H., Vervloessem, T., Kiviluoto, S., Bittremieux, M., Parys, J.B., De Smedt, H. and Bultynck, G. A dual role for the anti-apoptotic Bcl-2 protein in cancer: mitochondria versus endoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta* 1843, 2240-52 (2014).
- Ivanova, H., Vervliet, T., Missiaen, L., Parys, J.B., De Smedt, H. and Bultynck, G. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-isoform diversity in cell death and survival. *Biochim Biophys Acta* 1843, 2164-83 (2014).
- 155. Kiviluoto, S., Vervliet, T., Ivanova, H., Decuypere, J.P., De Smedt, H., Missiaen, L., Bultynck, G. and Parys, J.B. Regulation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors during endoplasmic reticulum stress. *Biochim Biophys Acta* 1833, 1612-24 (2013).
- 156. Osborne, A.R., Rapoport, T.A. and van den Berg, B. Protein translocation by the Sec61/SecY channel. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**, 529-50 (2005).
- 157. Haas, I.G. and Wabl, M. Immunoglobulin heavy chain binding protein. *Nature* 306, 387 (1983).

- 158. Sorger, P.K. and Pelham, H.R. The glucose-regulated protein grp94 is related to heat shock protein hsp90. *Journal of Molecular Biology* **194**, 341 (1987).
- 159. Lin, H.Y., Masso-Welch, P., Di, Y.P., Cai, J.W., Shen, J.W. and Subjeck, J.R. The 170-kDa glucose-regulated stress protein is an endoplasmic reticulum protein that binds immunoglobulin. *Molecular biology of the cell* **4**, 1109 (1993).
- 160. Szegezdi, E., Logue, S.E., Gorman, A.M. and Samali, A. Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO reports* **7**, 880 (2006).
- 161. Bergeron, J.J., Brenner, M.B., Thomas, D.Y. and Williams, D.B. Calnexin: a membrane-bound chaperone of the endoplasmic reticulum. *Trends in biochemical sciences* **19**, 124 (1994).
- 162. Michalak, M., Milner, R.E., Burns, K. and Opas, M. Calreticulin. *The Biochemical journal* **285** (**Pt 3**), 681 (1992).
- 163. Tjoelker, L.W., Seyfried, C.E., Eddy, R.L., Jr., Byers, M.G., Shows, T.B., Calderon, J., Schreiber, R.B. and Gray, P.W. Human, mouse, and rat calnexin cDNA cloning: identification of potential calcium binding motifs and gene localization to human chromosome 5. *Biochemistry* 33, 3229 (1994).
- Ostwald, T.J. and MacLennan, D.H. Isolation of a high affinity calcium-binding protein from sarcoplasmic reticulum. *The Journal of biological chemistry* 249, 974 (1974).
- Vassilakos, A., Michalak, M., Lehrman, M.A. and Williams, D.B. Oligosaccharide binding characteristics of the molecular chaperones calnexin and calreticulin. *Biochemistry* 37, 3480 (1998).
- 166. Tatu, U. and Helenius, A. Interactions between newly synthesized glycoproteins, calnexin and a network of resident chaperones in the endoplasmic reticulum. *The Journal of cell biology* **136**, 555 (1997).
- 167. Sevier, C.S. and Kaiser, C.A. Formation and transfer of disulphide bonds in living cells. *Nature reviews.Molecular cell biology* **3**, 836 (2002).
- 168. Tu, B.P. and Weissman, J.S. Oxidative protein folding in eukaryotes: mechanisms and consequences. *The Journal of cell biology* **164**, 341 (2004).
- 169. Chang, S.G., Choi, K.D., Jang, S.H. and Shin, H.C. Role of disulfide bonds in the structure and activity of human insulin. *Mol Cells* **16**, 323-30 (2003).
- 170. Sevier, C.S. and Kaiser, C.A. Conservation and diversity of the cellular disulfide bond formation pathways. *Antioxidants & redox signaling* **8**, 797 (2006).

- 171. Collet, J.F. and Bardwell, J.C. Oxidative protein folding in bacteria. *Molecular microbiology* **44**, 1 (2002).
- Ritz, D. and Beckwith, J. Roles of thiol-redox pathways in bacteria. *Annual Review of Microbiology* 55, 21 (2001).
- 173. Venetianer, P. and Straub, F.B. The mechanism of action of the ribonucleasereactivating enzyme. *Biochimica et biophysica acta* **89**, 189 (1964).
- 174. Venetianer, P. and Straub, F.B. Studies on the mechanism of action of the ribonuclease-reactivating enzyme. Acta Physiologica Academiae Scientiarum Hungaricae 27, 303 (1965).
- 175. Freedman, R.B., Hirst, T.R. and Tuite, M.F. Protein disulphide isomerase: building bridges in protein folding. *Trends in biochemical sciences* **19**, 331 (1994).
- 176. Ferrari, D.M. and Soling, H.D. The protein disulphide-isomerase family: unravelling a string of folds. *The Biochemical journal* **339** (**Pt 1**), 1 (1999).
- 177. Mazzarella, R.A., Srinivasan, M., Haugejorden, S.M. and Green, M. ERp72, an abundant luminal endoplasmic reticulum protein, contains three copies of the active site sequences of protein disulfide isomerase. *The Journal of biological chemistry* 265, 1094 (1990).
- 178. Chaudhuri, M.M., Tonin, P.N., Lewis, W.H. and Srinivasan, P.R. The gene for a novel protein, a member of the protein disulphide isomerase/form I phosphoinositide-specific phospholipase C family, is amplified in hydroxyurea-resistant cells. *The Biochemical journal* 281 (Pt 3), 645 (1992).
- 179. Hirano, N., Shibasaki, F., Kato, H., Sakai, R., Tanaka, T., Nishida, J., Yazaki, Y., Takenawa, T. and Hirai, H. Molecular cloning and characterization of a cDNA for bovine phospholipase C-alpha: proposal of redesignation of phospholipase C-alpha. *Biochemical and biophysical research communications* 204, 375 (1994).
- Araki, K. and Inaba, K. Structure, mechanism, and evolution of Ero1 family enzymes. *Antioxid Redox Signal* 16, 790-9 (2012).
- 181. Pollard, M.G., Travers, K.J. and Weissman, J.S. Ero1p: a novel and ubiquitous protein with an essential role in oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum. *Molecular cell* 1, 171 (1998).
- 182. Frand, A.R. and Kaiser, C.A. The ERO1 gene of yeast is required for oxidation of protein dithiols in the endoplasmic reticulum. *Molecular cell* **1**, 161 (1998).

- 183. Frand, A.R. and Kaiser, C.A. Ero1p oxidizes protein disulfide isomerase in a pathway for disulfide bond formation in the endoplasmic reticulum. *Molecular cell* 4, 469 (1999).
- 184. Cabibbo, A., Pagani, M., Fabbri, M., Rocchi, M., Farmery, M.R., Bulleid, N.J. and Sitia, R. ERO1-L, a human protein that favors disulfide bond formation in the endoplasmic reticulum. *The Journal of biological chemistry* 275, 4827 (2000).
- 185. Pagani, M., Fabbri, M., Benedetti, C., Fassio, A., Pilati, S., Bulleid, N.J., Cabibbo, A. and Sitia, R. Endoplasmic reticulum oxidoreductin 1-lbeta (ERO1-Lbeta), a human gene induced in the course of the unfolded protein response. *The Journal of biological chemistry* 275, 23685 (2000).
- 186. Zito, E., Chin, K.T., Blais, J., Harding, H.P. and Ron, D. ERO1-beta, a pancreasspecific disulfide oxidase, promotes insulin biogenesis and glucose homeostasis. J *Cell Biol* 188, 821-32 (2010).
- 187. Tu, B.P., Ho-Schleyer, S.C., Travers, K.J. and Weissman, J.S. Biochemical basis of oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum. *Science* **290**, 1571 (2000).
- 188. Tu, B.P. and Weissman, J.S. The FAD- and O(2)-dependent reaction cycle of Ero1mediated oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum. *Molecular cell* 10, 983 (2002).
- 189. Takemori, Y., Sakaguchi, A., Matsuda, S., Mizukami, Y. and Sakurai, H. Stressinduced transcription of the endoplasmic reticulum oxidoreductin gene ERO1 in the yeast Saccharomyces cerevisiae. *Mol Genet Genomics* **275**, 89-96 (2006).
- Oka, O.B. and Bulleid, N.J. Forming disulfides in the endoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta* 1833, 2425-9 (2013).
- 191. Gerber, J., Muhlenhoff, U., Hofhaus, G., Lill, R. and Lisowsky, T. Yeast ERV2p is the first microsomal FAD-linked sulfhydryl oxidase of the Erv1p/Alrp protein family. *The Journal of biological chemistry* 276, 23486 (2001).
- 192. Sevier, C.S., Cuozzo, J.W., Vala, A., Aslund, F. and Kaiser, C.A. A flavoprotein oxidase defines a new endoplasmic reticulum pathway for biosynthetic disulphide bond formation. *Nature cell biology* **3**, 874 (2001).
- 193. Thorpe, C., Hoober, K.L., Raje, S., Glynn, N.M., Burnside, J., Turi, G.K. and Coppock, D.L. Sulfhydryl oxidases: emerging catalysts of protein disulfide bond formation in eukaryotes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **405**, 1 (2002).

- Thorpe, C. and Coppock, D.L. Generating disulfides in multicellular organisms: emerging roles for a new flavoprotein family. *The Journal of biological chemistry* 282, 13929 (2007).
- 195. Myllyharju, J. Prolyl 4-hydroxylases, the key enzymes of collagen biosynthesis. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* **22**, 15 (2003).
- 196. Kivirikko, K.I. and Myllyharju, J. Prolyl 4-hydroxylases and their protein disulfide isomerase subunit. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* **16**, 357 (1998).
- Myllyla, R., Kuutti-Savolainen, E.R. and Kivirikko, K.I. The role of ascorbate in the prolyl hydroxylase reaction. *Biochemical and biophysical research communications* 83, 441 (1978).
- 198. Myllyla, R., Majamaa, K., Gunzler, V., Hanauske-Abel, H.M. and Kivirikko, K.I. Ascorbate is consumed stoichiometrically in the uncoupled reactions catalyzed by prolyl 4-hydroxylase and lysyl hydroxylase. *The Journal of biological chemistry* 259, 5403 (1984).
- 199. Kornfeld, R. and Kornfeld, S. Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annual Review of Biochemistry* **54**, 631 (1985).
- 200. Hubbard, S.C. and Ivatt, R.J. Synthesis and processing of asparagine-linked oligosaccharides. *Annual Review of Biochemistry* **50**, 555 (1981).
- 201. Burda, P. and Aebi, M. The dolichol pathway of N-linked glycosylation. *Biochimica et biophysica acta* **1426**, 239 (1999).
- 202. Arendt, C.W. and Ostergaard, H.L. Identification of the CD45-associated 116-kDa and 80-kDa proteins as the alpha- and beta-subunits of alpha-glucosidase II. *The Journal of biological chemistry* **272**, 13117 (1997).
- 203. D'Alessio, C., Fernandez, F., Trombetta, E.S. and Parodi, A.J. Genetic evidence for the heterodimeric structure of glucosidase II. The effect of disrupting the subunitencoding genes on glycoprotein folding. *The Journal of biological chemistry* 274, 25899 (1999).
- 204. Trombetta, E.S., Simons, J.F. and Helenius, A. Endoplasmic reticulum glucosidase II is composed of a catalytic subunit, conserved from yeast to mammals, and a tightly bound noncatalytic HDEL-containing subunit. *The Journal of biological chemistry* 271, 27509 (1996).
- 205. Weng, S. and Spiro, R.G. Demonstration that a kifunensine-resistant alphamannosidase with a unique processing action on N-linked oligosaccharides occurs in

rat liver endoplasmic reticulum and various cultured cells. *The Journal of biological chemistry* **268**, 25656 (1993).

- 206. Trombetta, S.E. and Parodi, A.J. Purification to apparent homogeneity and partial characterization of rat liver UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase. *The Journal of biological chemistry* **267**, 9236 (1992).
- 207. Herscovics, A. Importance of glycosidases in mammalian glycoprotein biosynthesis.
 Biochimica et biophysica acta 1473, 96 (1999).
- 208. Flynn, G.C., Chappell, T.G. and Rothman, J.E. Peptide binding and release by proteins implicated as catalysts of protein assembly. *Science (New York, N.Y.)* **245**, 385 (1989).
- 209. Ruddock, L.W. and Molinari, M. N-glycan processing in ER quality control. *Journal of cell science* **119**, 4373 (2006).
- 210. Ellgaard, L. and Helenius, A. Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nature reviews.Molecular cell biology* **4**, 181 (2003).
- 211. Meusser, B., Hirsch, C., Jarosch, E. and Sommer, T. ERAD: the long road to destruction. *Nature cell biology* **7**, 766 (2005).
- 212. Nebert, D.W. Proposed role of drug-metabolizing enzymes: regulation of steady state levels of the ligands that effect growth, homeostasis, differentiation, and neuroendocrine functions. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* **5**, 1203 (1991).
- Burchell, B., Brierley, C.H. and Rance, D. Specificity of human UDPglucuronosyltransferases and xenobiotic glucuronidation. *Life Sciences* 57, 1819 (1995).
- 214. Brown, J., Novak, E.K., Takeuchi, K., Moore, K., Medda, S. and Swank, R.T. Lumenal location of the microsomal beta-glucuronidase-egasyn complex. *The Journal* of cell biology 105, 1571 (1987).
- 215. Hernandez-Guzman, F.G., Higashiyama, T., Pangborn, W., Osawa, Y. and Ghosh, D. Structure of human estrone sulfatase suggests functional roles of membrane association. *Journal of Biological Chemistry* 278, 22989 (2003).
- Werck-Reichhart, D. and Feyereisen, R. Cytochromes P450: a success story. *Genome biology* 1, REVIEWS3003 (2000).
- 217. Omura, T. Mitochondrial P450s. Chemico-biological interactions 163, 86 (2006).
- 218. Black, S.D. Membrane topology of the mammalian P450 cytochromes. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 6, 680 (1992).

- Porter, T.D. The roles of cytochrome b5 in cytochrome P450 reactions. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* 16, 311 (2002).
- 220. Gutierrez, A., Grunau, A., Paine, M., Munro, A.W., Wolf, C.R., Roberts, G.C. and Scrutton, N.S. Electron transfer in human cytochrome P450 reductase. *Biochemical Society transactions* **31**, 497 (2003).
- Draper, N. and Stewart, P.M. 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase and the prereceptor regulation of corticosteroid hormone action. *J Endocrinol* 186, 251-71 (2005).
- 222. Ozols, J. Lumenal orientation and post-translational modifications of the liver microsomal 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *J Biol Chem* **270**, 2305-12 (1995).
- 223. Tomlinson, J.W., Walker, E.A., Bujalska, I.J., Draper, N., Lavery, G.G., Cooper, M.S., Hewison, M. and Stewart, P.M. 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1: a tissue-specific regulator of glucocorticoid response. *Endocr Rev* 25, 831-66 (2004).
- 224. Hughes, K.A., Manolopoulos, K.N., Iqbal, J., Cruden, N.L., Stimson, R.H., Reynolds, R.M., Newby, D.E., Andrew, R., Karpe, F. and Walker, B.R. Recycling between cortisol and cortisone in human splanchnic, subcutaneous adipose, and skeletal muscle tissues in vivo. *Diabetes* 61, 1357-64 (2012).
- 225. Maser, E. and Oppermann, U.C. Role of type-1 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase in detoxification processes. *European journal of biochemistry / FEBS* **249**, 365 (1997).
- 226. Sampath-Kumar, R., Yu, M., Khalil, M.W. and Yang, K. Metyrapone is a competitive inhibitor of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 reductase. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* **62**, 195 (1997).
- 227. Odermatt, A., Atanasov, A.G., Balazs, Z., Schweizer, R.A., Nashev, L.G., Schuster, D. and Langer, T. Why is 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 facing the endoplasmic reticulum lumen? Physiological relevance of the membrane topology of 11beta-HSD1. *Molecular and cellular endocrinology* 248, 15 (2006).
- 228. Iwasaki, Y., Takayasu, S., Nishiyama, M., Tsugita, M., Taguchi, T., Asai, M., Yoshida, M., Kambayashi, M. and Hashimoto, K. Is the metabolic syndrome an intracellular Cushing state? Effects of multiple humoral factors on the transcriptional activity of the hepatic glucocorticoid-activating enzyme (11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1) gene. *Mol Cell Endocrinol* **285**, 10-8 (2008).
- Masuzaki, H., Paterson, J., Shinyama, H., Morton, N.M., Mullins, J.J., Seckl, J.R. and Flier, J.S. A transgenic model of visceral obesity and the metabolic syndrome. *Science* 294, 2166-70 (2001).

- 230. Paterson, J.M., Morton, N.M., Fievet, C., Kenyon, C.J., Holmes, M.C., Staels, B., Seckl, J.R. and Mullins, J.J. Metabolic syndrome without obesity: Hepatic overexpression of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 7088-93 (2004).
- 231. Kotelevtsev, Y., Holmes, M.C., Burchell, A., Houston, P.M., Schmoll, D., Jamieson, P., Best, R., Brown, R., Edwards, C.R., Seckl, J.R. and Mullins, J.J. 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 knockout mice show attenuated glucocorticoid-inducible responses and resist hyperglycemia on obesity or stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 14924-9 (1997).
- 232. Morton, N.M., Holmes, M.C., Fievet, C., Staels, B., Tailleux, A., Mullins, J.J. and Seckl, J.R. Improved lipid and lipoprotein profile, hepatic insulin sensitivity, and glucose tolerance in 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 null mice. *J Biol Chem* **276**, 41293-300 (2001).
- 233. Alberts, P., Nilsson, C., Selen, G., Engblom, L.O., Edling, N.H., Norling, S., Klingstrom, G., Larsson, C., Forsgren, M., Ashkzari, M., Nilsson, C.E., Fiedler, M., Bergqvist, E., Ohman, B., Bjorkstrand, E. and Abrahmsen, L.B. Selective inhibition of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 improves hepatic insulin sensitivity in hyperglycemic mice strains. *Endocrinology* 144, 4755 (2003).
- 234. Livingstone, D.E. and Walker, B.R. Is 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 a therapeutic target? Effects of carbenoxolone in lean and obese Zucker rats. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **305**, 167 (2003).
- 235. Stomby, A., Andrew, R., Walker, B.R. and Olsson, T. Tissue-specific dysregulation of cortisol regeneration by 11betaHSD1 in obesity: has it promised too much? *Diabetologia* 57, 1100-10 (2014).
- 236. Ge, R., Huang, Y., Liang, G. and Li, X. 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibitors as promising therapeutic drugs for diabetes: status and development. *Curr Med Chem* 17, 412-22 (2010).
- 237. Cori, G.T., Cori, C.F. and Schmidt, G. The role of glucose-1-phosphate in the formation of blood sugar and synthesis of glycogen in the liver. *Journal of Biological Chemistry* **129**, 629 (1939).
- 238. de Duve, C., Berthet, J., Hers, H.G. and Dupret, L. Le systeme hexosephosphatasique. I. Existence d'une glucose-6-phosphatase specifique dans le foie. Bulletin de la Socjete de Chimie Biologique (Paris) 31, 1242-1253 (1949).

- 239. Hers, H.G., Berthet, J., Berthet, L. and de Duve, C. The hexose-phosphatase system.
 III. Intracellular localization of enzymes by fractional centrifugation. *Bulletin de la Societe de chimie biologique* 33, 21 (1951).
- 240. Cori, G.T. and Cori, C.F. Glucose-6-phosphatase of the liver in glycogen storage disease. *The Journal of biological chemistry* **199**, 661 (1952).
- Arion, W.J., Lange, A.J., Walls, H.E. and Ballas, L.M. Evidence for the participation of independent translocation for phosphate and glucose 6-phosphate in the microsomal glucose-6-phosphatase system. Interactions of the system with orthophosphate, inorganic pyrophosphate, and carbamyl phosphate. *Journal of Biological Chemistry* 255, 10396 (1980).
- 242. Arion, W.J., Wallin, B.K., Lange, A.J. and Ballas, L.M. On the involvement of a glucose 6-phosphate transport system in the function of microsomal glucose 6-phosphatase. *Molecular and cellular biochemistry* **6**, 75 (1975).
- 243. Igarashi, Y., Kato, S., Narisawa, K., Tada, K., Amano, Y., Mori, T. and Takeuchi, S. A direct evidence for defect in glucose-6-phosphate transport system in hepatic microsomal membrane of glycogen storage disease type IB. *Biochemical and biophysical research communications* 119, 593 (1984).
- 244. Tada, K., Narisawa, K., Igarashi, Y. and Kato, S. Glycogen storage disease type IB: a new model of genetic disorders involving the transport system of intracellular membrane. *Biochemical medicine* **33**, 215 (1985).
- 245. Marcolongo, P., Banhegyi, G., Benedetti, A., Hinds, C.J. and Burchell, A. Liver microsomal transport of glucose-6-phosphate, glucose, and phosphate in type 1 glycogen storage disease. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **83**, 224 (1998).
- 246. Gerin, I., Veiga-da-Cunha, M., Achouri, Y., Collet, J.F. and Van Schaftingen, E. Sequence of a putative glucose 6-phosphate translocase, mutated in glycogen storage disease type Ib. *FEBS letters* **419**, 235 (1997).
- 247. Fulceri, R., Bellomo, G., Gamberucci, A., Scott, H.M., Burchell, A. and Benedetti, A. Permeability of rat liver microsomal membrane to glucose 6-phosphate. *The Biochemical journal* 286, 813 (1992).
- 248. Gerin, I. and Van Schaftingen, E. Evidence for glucose-6-phosphate transport in rat liver microsomes. *FEBS letters* **517**, 257 (2002).
- 249. Arion, W.J., Canfield, W.K., Ramos, F.C., Su, M.L., Burger, H.J., Hemmerle, H., Schubert, G., Below, P. and Herling, A.W. Chlorogenic acid analogue S 3483: a

potent competitive inhibitor of the hepatic and renal glucose-6-phosphatase systems. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **351**, 279 (1998).

- 250. Hemmerle, H., Burger, H.J., Below, P., Schubert, G., Rippel, R., Schindler, P.W., Paulus, E. and Herling, A.W. Chlorogenic acid and synthetic chlorogenic acid derivatives: novel inhibitors of hepatic glucose-6-phosphate translocase. *Journal of medicinal chemistry* **40**, 137 (1997).
- 251. Guillam, M.T., Burcelin, R. and Thorens, B. Normal hepatic glucose production in the absence of GLUT2 reveals an alternative pathway for glucose release from hepatocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 12317 (1998).
- 252. Smart, E.J., Ying, Y., Donzell, W.C. and Anderson, R.G. A role for caveolin in transport of cholesterol from endoplasmic reticulum to plasma membrane. *The Journal of biological chemistry* **271**, 29427 (1996).
- 253. Banhegyi, G., Marcolongo, P., Burchell, A. and Benedetti, A. Heterogeneity of glucose transport in rat liver microsomal vesicles. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **359**, 133 (1998).
- 254. Marcolongo, P., Fulceri, R., Giunti, R., Burchell, A. and Benedetti, A. Permeability of liver microsomal membranes to glucose. *Biochemical and biophysical research communications* **219**, 916 (1996).
- 255. Fehr, M., Takanaga, H., Ehrhardt, D.W. and Frommer, W.B. Evidence for highcapacity bidirectional glucose transport across the endoplasmic reticulum membrane by genetically encoded fluorescence resonance energy transfer nanosensors. *Molecular and cellular biology* **25**, 11102 (2005).
- 256. Pudney, C.R., Khara, B., Johannissen, L.O. and Scrutton, N.S. Coupled motions direct electrons along human microsomal P450 Chains. *PLoS Biol* **9**, e1001222 (2011).
- Foster, C.A., Mick, G.J., Wang, X. and McCormick, K. Evidence that adrenal hexose-6-phosphate dehydrogenase can effect microsomal P450 cytochrome steroidogenic enzymes. *Biochim Biophys Acta* 1833, 2039-44 (2013).
- 258. Armstrong, R.N. Enzyme-catalyzed detoxication reactions: mechanisms and stereochemistry. *CRC Crit Rev Biochem* **22**, 39-88 (1987).
- 259. Dixon, B.M., Heath, S.H., Kim, R., Suh, J.H. and Hagen, T.M. Assessment of endoplasmic reticulum glutathione redox status is confounded by extensive ex vivo oxidation. *Antioxid Redox Signal* **10**, 963-72 (2008).

- Banhegyi, G., Lusini, L., Puskas, F., Rossi, R., Fulceri, R., Braun, L., Mile, V., di Simplicio, P., Mandl, J. and Benedetti, A. Preferential transport of glutathione versus glutathione disulfide in rat liver microsomal vesicles. *Journal of Biological Chemistry* 274, 12213 (1999).
- Cuozzo, J.W. and Kaiser, C.A. Competition between glutathione and protein thiols for disulphide-bond formation. *Nature cell biology* 1, 130 (1999).
- 262. Liu, G. and Pessah, I.N. Molecular interaction between ryanodine receptor and glycoprotein triadin involves redox cycling of functionally important hyperreactive sulfhydryls. *The Journal of biological chemistry* **269**, 33028 (1994).
- 263. Sun, J., Xu, L., Eu, J.P., Stamler, J.S. and Meissner, G. Classes of thiols that influence the activity of the skeletal muscle calcium release channel. *The Journal of biological chemistry* 276, 15625 (2001).
- 264. Xia, R., Stangler, T. and Abramson, J.J. Skeletal muscle ryanodine receptor is a redox sensor with a well defined redox potential that is sensitive to channel modulators. *The Journal of biological chemistry* 275, 36556 (2000).
- 265. Zable, A.C., Favero, T.G. and Abramson, J.J. Glutathione modulates ryanodine receptor from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. Evidence for redox regulation of the Ca2+ release mechanism. *The Journal of biological chemistry* 272, 7069 (1997).
- 266. Feng, W., Liu, G., Allen, P.D. and Pessah, I.N. Transmembrane redox sensor of ryanodine receptor complex. *The Journal of biological chemistry* **275**, 35902 (2000).
- 267. Wells, W.W., Xu, D.P., Yang, Y.F. and Rocque, P.A. Mammalian thioltransferase (glutaredoxin) and protein disulfide isomerase have dehydroascorbate reductase activity. *Journal of Biological Chemistry* **265**, 15361 (1990).
- 268. Meister, A. Glutathione-ascorbic acid antioxidant system in animals. *The Journal of biological chemistry* **269**, 9397 (1994).
- 269. Wajih, N., Hutson, S.M. and Wallin, R. Disulfide-dependent protein folding is linked to operation of the vitamin K cycle in the endoplasmic reticulum. A protein disulfide isomerase-VKORC1 redox enzyme complex appears to be responsible for vitamin K1 2,3-epoxide reduction. *J Biol Chem* 282, 2626-35 (2007).
- Bublitz, C., Lawler, C.A. and Steavenson, S. The topology of phosphogluconate dehydrogenases in rat liver microsomes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 259, 22 (1987).

- 271. Bublitz, C. and Steavenson, S. The pentose phosphate pathway in the endoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry* **263**, 12849 (1988).
- Ozols, J. Lumenal orientation and post-translational modifications of the liver microsomal 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry* 270, 2305 (1995).
- 273. Takahashi, T. and Hori, S.H. Intramembraneous localization of rat liver microsomal hexose-6-phosphate dehydrogenase and membrane permeability to its substrates. *Biochimica et biophysica acta* **524**, 262 (1978).
- 274. McCormick, K.L., Wang, X. and Mick, G.J. Evidence that the 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase (11 beta-HSD1) is regulated by pentose pathway flux. Studies in rat adipocytes and microsomes. *The Journal of biological chemistry* **281**, 341 (2006).
- 275. Bublitz, C. and Lawler, C.A. The levels of nicotinamide nucleotides in liver microsomes and their possible significance to the function of hexose phosphate dehydrogenase. *The Biochemical journal* **245**, 263 (1987).
- 276. Hewitt, K.N., Walker, E.A. and Stewart, P.M. Minireview: hexose-6-phosphate dehydrogenase and redox control of 11{beta}-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 activity. *Endocrinology* 146, 2539 (2005).
- 277. Lavery, G.G., Walker, E.A., Draper, N., Jeyasuria, P., Marcos, J., Shackleton, C.H., Parker, K.L., White, P.C. and Stewart, P.M. Hexose-6-phosphate dehydrogenase knock-out mice lack 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1-mediated glucocorticoid generation. *The Journal of biological chemistry* 281, 6546 (2006).
- 278. Murphy, D.J. and Mavis, R.D. Membrane transfer of alpha-tocopherol. Influence of soluble alpha-tocopherol-binding factors from the liver, lung, heart, and brain of the rat. *The Journal of biological chemistry* **256**, 10464 (1981).
- 279. Sato, P. and Udenfriend, S. Scurvy-prone animals, including man, monkey, and guinea pig, do not express the gene for gulonolactone oxidase. *Arch Biochem Biophys* 187, 158-62 (1978).
- 280. Padayatty, S.J., Katz, A., Wang, Y., Eck, P., Kwon, O., Lee, J.H., Chen, S., Corpe, C., Dutta, A., Dutta, S.K. and Levine, M. Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention. *Journal of the American College of Nutrition* 22, 18 (2003).
- 281. Wells, W.W. and Xu, D.P. Dehydroascorbate reduction. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* **26**, 369 (1994).
- 282. Hirschmann, J.V. and Raugi, G.J. Adult scurvy. *Journal of the American Academy of Dermatology* 41, 895 (1999).

- 283. Reiter, R.J. Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology 9, 526 (1995).
- Porter, N.A., Caldwell, S.E. and Mills, K.A. Mechanisms of free radical oxidation of unsaturated lipids. *Lipids* 30, 277 (1995).
- 285. Buettner, G.R. and Schafer, F.Q. Free radicals, oxidants, and antioxidants. *Teratology* 62, 234 (2000).
- 286. Buettner, G.R. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **300**, 535 (1993).
- 287. Horemans, N., Foyer, C.H. and Asard, H. Transport and action of ascorbate at the plant plasma membrane. *Trends in plant science* **5**, 263 (2000).
- Araki, E., Oyadomari, S. and Mori, M. Endoplasmic reticulum stress and diabetes mellitus. *Intern Med* 42, 7-14 (2003).
- 289. Back, S.H., Kang, S.W., Han, J. and Chung, H.T. Endoplasmic reticulum stress in the beta-cell pathogenesis of type 2 diabetes. *Exp Diabetes Res* **2012**, 618396 (2012).
- 290. Cavener, D.R., Gupta, S. and McGrath, B.C. PERK in beta cell biology and insulin biogenesis. *Trends Endocrinol Metab* **21**, 714-21 (2010).
- 291. Papa, F.R. Endoplasmic reticulum stress, pancreatic beta-cell degeneration, and diabetes. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2**, a007666 (2012).
- Cnop, M., Igoillo-Esteve, M., Cunha, D.A., Ladriere, L. and Eizirik, D.L. An update on lipotoxic endoplasmic reticulum stress in pancreatic beta-cells. *Biochem Soc Trans* 36, 909-15 (2008).
- 293. Biden, T.J., Boslem, E., Chu, K.Y. and Sue, N. Lipotoxic endoplasmic reticulum stress, beta cell failure, and type 2 diabetes mellitus. *Trends Endocrinol Metab* **25**, 389-398 (2014).
- 294. Jung, T.W., Lee, M.W., Lee, Y.J. and Kim, S.M. Metformin prevents endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis through AMPK-PI3K-c-Jun NH2 pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 417, 147-52 (2012).
- 295. Bertolotti, A., Zhang, Y., Hendershot, L.M., Harding, H.P. and Ron, D. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nature cell biology* **2**, 326 (2000).

- 296. Hetz, C., Martinon, F., Rodriguez, D. and Glimcher, L.H. The unfolded protein response: integrating stress signals through the stress sensor IRE1alpha. *Physiol Rev* 91, 1219-43 (2011).
- 297. Hollien, J., Lin, J.H., Li, H., Stevens, N., Walter, P. and Weissman, J.S. Regulated Ire1-dependent decay of messenger RNAs in mammalian cells. *J Cell Biol* 186, 323-31 (2009).
- 298. Calfon, M., Zeng, H., Urano, F., Till, J.H., Hubbard, S.R., Harding, H.P., Clark, S.G. and Ron, D. IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature* **415**, 92-6 (2002).
- 299. Haze, K., Yoshida, H., Yanagi, H., Yura, T. and Mori, K. Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Mol Biol Cell* **10**, 3787-99 (1999).
- 300. Lee, K., Tirasophon, W., Shen, X., Michalak, M., Prywes, R., Okada, T., Yoshida, H., Mori, K. and Kaufman, R.J. IRE1-mediated unconventional mRNA splicing and S2Pmediated ATF6 cleavage merge to regulate XBP1 in signaling the unfolded protein response. *Genes Dev* 16, 452-66 (2002).
- 301. Harding, H.P., Novoa, I., Zhang, Y., Zeng, H., Wek, R., Schapira, M. and Ron, D. Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol Cell* 6, 1099-108 (2000).
- 302. Wek, R.C., Jiang, H.Y. and Anthony, T.G. Coping with stress: eIF2 kinases and translational control. *Biochem Soc Trans* **34**, 7-11 (2006).
- 303. Schroder, M. and Kaufman, R.J. The mammalian unfolded protein response. *Annual Review of Biochemistry* **74**, 739 (2005).
- 304. Schroder, M. and Kaufman, R.J. Divergent roles of IRE1alpha and PERK in the unfolded protein response. *Current Molecular Medicine* **6**, 5 (2006).
- 305. Urra, H., Dufey, E., Lisbona, F., Rojas-Rivera, D. and Hetz, C. When ER stress reaches a dead end. *Biochim Biophys Acta* **1833**, 3507-17 (2013).
- 306. Kim, I., Xu, W. and Reed, J.C. Cell death and endoplasmic reticulum stress: disease relevance and therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug Discov* **7**, 1013-30 (2008).
- 307. McCullough, K.D., Martindale, J.L., Klotz, L.O., Aw, T.Y. and Holbrook, N.J. Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Mol Cell Biol* 21, 1249-59 (2001).
- 308. Ghosh, A.P., Klocke, B.J., Ballestas, M.E. and Roth, K.A. CHOP potentially cooperates with FOXO3a in neuronal cells to regulate PUMA and BIM expression in response to ER stress. *PLoS One* 7, e39586 (2012).
- 309. Li, J., Lee, B. and Lee, A.S. Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis: multiple pathways and activation of p53-up-regulated modulator of apoptosis (PUMA) and NOXA by p53. *J Biol Chem* **281**, 7260-70 (2006).
- Marciniak, S.J., Yun, C.Y., Oyadomari, S., Novoa, I., Zhang, Y., Jungreis, R., Nagata, K., Harding, H.P. and Ron, D. CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. *Genes Dev* 18, 3066-77 (2004).
- 311. Han, J., Back, S.H., Hur, J., Lin, Y.H., Gildersleeve, R., Shan, J., Yuan, C.L., Krokowski, D., Wang, S., Hatzoglou, M., Kilberg, M.S., Sartor, M.A. and Kaufman, R.J. ER-stress-induced transcriptional regulation increases protein synthesis leading to cell death. *Nat Cell Biol* 15, 481-90 (2013).
- 312. Hollien, J. and Weissman, J.S. Decay of endoplasmic reticulum-localized mRNAs during the unfolded protein response. *Science* **313**, 104-7 (2006).
- 313. Upton, J.P., Wang, L., Han, D., Wang, E.S., Huskey, N.E., Lim, L., Truitt, M., McManus, M.T., Ruggero, D., Goga, A., Papa, F.R. and Oakes, S.A. IRE1alpha cleaves select microRNAs during ER stress to derepress translation of proapoptotic Caspase-2. *Science* 338, 818-22 (2012).
- 314. Lerner, A.G., Upton, J.P., Praveen, P.V., Ghosh, R., Nakagawa, Y., Igbaria, A., Shen, S., Nguyen, V., Backes, B.J., Heiman, M., Heintz, N., Greengard, P., Hui, S., Tang, Q., Trusina, A., Oakes, S.A. and Papa, F.R. IRE1alpha induces thioredoxin-interacting protein to activate the NLRP3 inflammasome and promote programmed cell death under irremediable ER stress. *Cell Metab* 16, 250-64 (2012).
- 315. Urano, F., Wang, X., Bertolotti, A., Zhang, Y., Chung, P., Harding, H.P. and Ron, D. Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science* 287, 664-6 (2000).
- 316. Nguyen, D.T., Kebache, S., Fazel, A., Wong, H.N., Jenna, S., Emadali, A., Lee, E.H., Bergeron, J.J., Kaufman, R.J., Larose, L. and Chevet, E. Nck-dependent activation of extracellular signal-regulated kinase-1 and regulation of cell survival during endoplasmic reticulum stress. *Mol Biol Cell* 15, 4248-60 (2004).
- 317. Hu, P., Han, Z., Couvillon, A.D., Kaufman, R.J. and Exton, J.H. Autocrine tumor necrosis factor alpha links endoplasmic reticulum stress to the membrane death

receptor pathway through IRE1alpha-mediated NF-kappaB activation and down-regulation of TRAF2 expression. *Mol Cell Biol* **26**, 3071-84 (2006).

- 318. Nakagawa, T., Zhu, H., Morishima, N., Li, E., Xu, J., Yankner, B.A. and Yuan, J. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* 403, 98-103 (2000).
- 319. Morishima, N., Nakanishi, K., Tsuchiya, K., Shibata, T. and Seiwa, E. Translocation of Bim to the endoplasmic reticulum (ER) mediates ER stress signaling for activation of caspase-12 during ER stress-induced apoptosis. *J Biol Chem* **279**, 50375-81 (2004).
- 320. Li, G., Mongillo, M., Chin, K.T., Harding, H., Ron, D., Marks, A.R. and Tabas, I. Role of ERO1-alpha-mediated stimulation of inositol 1,4,5-triphosphate receptor activity in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *J Cell Biol* 186, 783-92 (2009).
- 321. Hsu, Y.T., Wolter, K.G. and Youle, R.J. Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X(L) during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 3668-72 (1997).
- 322. Scorrano, L., Oakes, S.A., Opferman, J.T., Cheng, E.H., Sorcinelli, M.D., Pozzan, T. and Korsmeyer, S.J. BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca2+: a control point for apoptosis. *Science* **300**, 135-9 (2003).
- Wang, X., Olberding, K.E., White, C. and Li, C. Bcl-2 proteins regulate ER membrane permeability to luminal proteins during ER stress-induced apoptosis. *Cell Death Differ* 18, 38-47 (2011).
- 324. Huang, Y., Li, X., Wang, Y., Wang, H., Huang, C. and Li, J. Endoplasmic reticulum stress-induced hepatic stellate cell apoptosis through calcium-mediated JNK/P38 MAPK and Calpain/Caspase-12 pathways. *Mol Cell Biochem* **394**, 1-12 (2014).
- 325. Matsuzaki, S., Hiratsuka, T., Kuwahara, R., Katayama, T. and Tohyama, M. Caspase-4 is partially cleaved by calpain via the impairment of Ca2+ homeostasis under the ER stress. *Neurochem Int* **56**, 352-6 (2010).
- 326. Tsujimoto, Y., Nakagawa, T. and Shimizu, S. Mitochondrial membrane permeability transition and cell death. *Biochim Biophys Acta* **1757**, 1297-300 (2006).
- Benedetti, A., Fulceri, R., Romani, A. and Comporti, M. MgATP-dependent glucose 6-phosphate-stimulated Ca2+ accumulation in liver microsomal fractions. Effects of inositol 1,4,5-trisphosphate and GTP. *The Journal of biological chemistry* 263, 3466 (1988).

- 328. Brattin, W.J., Jr., Waller, R.L. and Recknagel, R.O. Analysis of microsomal calcium sequestration by steady state isotope exchange. Enzyme kinetics and role of membrane permeability. *The Journal of biological chemistry* **257**, 10044 (1982).
- 329. Burchell, A., Hume, R. and Burchell, B. A new microtechnique for the analysis of the human hepatic microsomal glucose-6-phosphatase system. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* **173**, 183 (1988).
- 330. Saito, A., Seiler, S., Chu, A. and Fleischer, S. Preparation and morphology of sarcoplasmic reticulum terminal cisternae from rabbit skeletal muscle. *The Journal of Cell Biology* 99, 875 (1984).
- 331. Fulceri, R., Giunti, R., Knudsen, J., Leuzzi, R., Kardon, T. and Benedetti, A. Rapamycin inhibits activation of ryanodine receptors from skeletal muscle by the fatty acyl CoA–acyl CoA binding protein complex. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 264, 409 (1999).
- 332. Kredics, L., Szekeres, A., Czifra, D., Vagvolgyi, C. and Leitgeb, B. Recent results in alamethicin research. *Chem Biodivers* **10**, 744-71 (2013).
- 333. Johansson, F.I., Michalecka, A.M., Moller, I.M. and Rasmusson, A.G. Oxidation and reduction of pyridine nucleotides in alamethicin-permeabilized plant mitochondria. *The Biochemical journal* 380, 193 (2004).
- 334. Fiskum, G., Craig, S.W., Decker, G.L. and Lehninger, A.L. The cytoskeleton of digitonin-treated rat hepatocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **77**, 3430 (1980).
- 335. Ellman, G. and Lysko, H. A precise method for the determination of whole blood and plasma sulfhydryl groups. *Anal Biochem* **93**, 98-102 (1979).
- Omaye, S.T., Turnbull, J.D. and Sauberlich, H.E. Selected methods for the determination of ascorbic acid in animal cells, tissues, and fluids. *Methods Enzymol* 62, 3-11 (1979).
- 337. Harapanhalli, R.S., Howell, R.W. and Rao, D.V. Testicular and plasma ascorbic acid levels in mice following dietary intake: a high-performance liquid chromatographic analysis. *J Chromatogr* **614**, 233-43 (1993).
- 338. Csala, M., Senesi, S., Banhegyi, G., Mandl, J. and Benedetti, A. Characterization of sulfate transport in the hepatic endoplasmic reticulum. *Arch Biochem Biophys* 440, 173-80 (2005).

- 339. Banhegyi, G., Braun, L., Marcolongo, P., Csala, M., Fulceri, R., Mandl, J. and Benedetti, A. Evidence for an UDP-glucuronic acid/phenol glucuronide antiport in rat liver microsomal vesicles. *Biochem J* 315 (Pt 1), 171-6 (1996).
- 340. Lizak, B., Csala, M., Benedetti, A. and Banhegyi, G. The translocon and the nonspecific transport of small molecules in the endoplasmic reticulum (Review). *Mol Membr Biol* 25, 95-101 (2008).
- 341. Linsdell, P. and Hanrahan, J.W. Glutathione permeability of CFTR. *The American Journal of Physiology* **275**, C323 (1998).
- 342. Dawson, C.R., Strothkamp, K.G. and Krul, K.G. Ascorbate oxidase and related copper proteins. *Annals of the New York Academy of Sciences* **258**, 209 (1975).
- 343. Soute, B.A., Groenen-van Dooren, M.M., Holmgren, A., Lundstrom, J. and Vermeer,
 C. Stimulation of the dithiol-dependent reductases in the vitamin K cycle by the thioredoxin system. Strong synergistic effects with protein disulphide-isomerase. *The Biochemical journal* 281 (Pt 1), 255 (1992).
- 344. Bulleid, N.J. and Ellgaard, L. Multiple ways to make disulfides. *Trends Biochem Sci* 36, 485-92 (2011).
- 345. Hudson, D.A., Gannon, S.A. and Thorpe, C. Oxidative protein folding: From thioldisulfide exchange reactions to the redox poise of the endoplasmic reticulum. *Free Radic Biol Med* 80C, 171-182 (2015).
- 346. Kojer, K. and Riemer, J. Balancing oxidative protein folding: the influences of reducing pathways on disulfide bond formation. *Biochim Biophys Acta* 1844, 1383-90 (2014).
- Ruddock, L.W. Low-molecular-weight oxidants involved in disulfide bond formation. *Antioxid Redox Signal* 16, 1129-38 (2012).
- 348. Saaranen, M.J., Karala, A.R., Lappi, A.K. and Ruddock, L.W. The role of dehydroascorbate in disulfide bond formation. *Antioxid Redox Signal* 12, 15-25 (2010).
- 349. Paolisso, G., D'Amore, A., Balbi, V., Volpe, C., Galzerano, D., Giugliano, D., Sgambato, S., Varricchio, M. and D'Onofrio, F. Plasma vitamin C affects glucose homeostasis in healthy subjects and in non-insulin-dependent diabetics. *Am J Physiol* 266, E261-8 (1994).
- 350. Chang, L.C., Madsen, S.A., Toelboell, T., Weber, P.S. and Burton, J.L. Effects of glucocorticoids on Fas gene expression in bovine blood neutrophils. *The Journal of endocrinology* **183**, 569 (2004).

- 351. Leuzzi, R., Banhegyi, G., Kardon, T., Marcolongo, P., Capecchi, P.L., Burger, H.J., Benedetti, A. and Fulceri, R. Inhibition of microsomal glucose-6-phosphate transport in human neutrophils results in apoptosis: a potential explanation for neutrophil dysfunction in glycogen storage disease type 1b. *Blood* **101**, 2381 (2003).
- 352. Gautam, S., Kirschnek, S., Gentle, I.E., Kopiniok, C., Henneke, P., Hacker, H., Malleret, L., Belaaouaj, A. and Hacker, G. Survival and differentiation defects contribute to neutropenia in glucose-6-phosphatase-beta (G6PC3) deficiency in a model of mouse neutrophil granulocyte differentiation. *Cell Death Differ* 20, 1068-79 (2013).
- 353. Bujalska, I.J., Walker, E.A., Hewison, M. and Stewart, P.M. A switch in dehydrogenase to reductase activity of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 upon differentiation of human omental adipose stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 87, 1205-10 (2002).
- 354. Atanasov, A.G., Nashev, L.G., Schweizer, R.A., Frick, C. and Odermatt, A. Hexose-6phosphate dehydrogenase determines the reaction direction of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 as an oxoreductase. *FEBS Lett* **571**, 129-33 (2004).
- 355. Raven, P.W., Checkley, S.A. and Taylor, N.F. Extra-adrenal effects of metyrapone include inhibition of the 11-oxoreductase activity of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase: a model for 11-HSD I deficiency. *Clin Endocrinol (Oxf)* **43**, 637-44 (1995).
- 356. Maser, E. and Bannenberg, G. 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase mediates reductive metabolism of xenobiotic carbonyl compounds. *Biochem Pharmacol* 47, 1805-12 (1994).
- 357. Banhegyi, G., Csala, M., Mandl, J., Burchell, A., Burchell, B., Marcolongo, P., Fulceri, R. and Benedetti, A. Fatty acyl-CoA esters and the permeability of rat liver microsomal vesicles. *Biochem J* 320 (Pt 1), 343-4 (1996).
- 358. Rich, G.T., Comerford, J.G., Graham, S. and Dawson, A.P. Effects of CoA and acyl-CoA on Ca(2+)-permeability of endoplasmic-reticulum membranes from rat liver. *Biochem J* 306 (Pt 3), 703-8 (1995).
- Marchut, E., Guminska, M. and Kedryna, T. The inhibitory effect of various fatty acids on aerobic glycolysis in Ehrlich ascites tumour cells. *Acta Biochim Pol* 33, 7-16 (1986).
- 360. Prause, M., Christensen, D.P., Billestrup, N. and Mandrup-Poulsen, T. JNK1 protects against glucolipotoxicity-mediated beta-cell apoptosis. *PLoS One* **9**, e87067 (2014).

- 361. Nemcova-Furstova, V., Balusikova, K., Sramek, J., James, R.F. and Kovar, J. Caspase-2 and JNK activated by saturated fatty acids are not involved in apoptosis induction but modulate ER stress in human pancreatic beta-cells. *Cell Physiol Biochem* **31**, 277-89 (2013).
- 362. Le Gall, S., Neuhof, A. and Rapoport, T. The endoplasmic reticulum membrane is permeable to small molecules. *Mol Biol Cell* **15**, 447-55 (2004).

8. A SZERZŐ TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEI

8.1. Az értekezés alapjául szolgáló saját közlemények

- 43 angol nyelvű tudományos közlemény (ebből 11 első és 12 utolsó szerzős); összesített impakt faktoruk 153,87.
- A szövegben az első szerző vezetéknevével és évszámmal történő hivatkozások az itt felsorolt közleményekre vonatkoznak.
- 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 channeldependent 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. Metyrapone prevents cortisone-induced preadipocyte differentiation by depleting luminal NADPH of the endoplasmic reticulum. *Biochem Pharmacol* 76, 382-90 (2008).
- Marcolongo, P., Senesi, S., Giunti, 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 highperformance 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., Mandi, 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 obesityrelated 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).

8.2. A szerzőnek az értekezésben nem tárgyalt közleményei

- Bánhegyi, G., Braun, L., Marcolongo, P., Csala, M., Fulceri, R., Mandl, J. and Benedetti, A. Evidence for an UDP-glucuronic acid/phenol glucuronide antiport in rat liver microsomal vesicles. *Biochem J* 315 (Pt 1), 171-6 (1996a).
- Bánhegyi, G., Csala, M., Mandl, J., Burchell, A., Burchell, B., Marcolongo, P., Fulceri, R. and Benedetti, A. Fatty acyl-CoA esters and the permeability of rat liver microsomal vesicles. *Biochem J* 320 (Pt 1), 343-4 (1996b).
- Bánhegyi, G., Benedetti, A., Csala, M. and Mandl, J. Stress on redox. *FEBS Lett* **581**, 3634-40 (2007).

- Braun, L., Csala, M., Poussu, A., Garzó, T., Mandl, J. and Bánhegyi, G. Glutathione depletion induces glycogenolysis dependent ascorbate synthesis in isolated murine hepatocytes. *FEBS Lett* 388, 173-6 (1996a).
- Braun, L., Puskás, F., Csala, M., Gyorffy, E., Garzó, T., Mandl, J. and Bánhegyi, G. Gluconeogenesis from ascorbic acid: ascorbate recycling in isolated murine hepatocytes. *FEBS Lett* **390**, 183-6 (1996b).
- Braun, L., Kardon, T., Puskás, F., Csala, M., Bánhegyi, G. and Mandl, J. Regulation of glucuronidation by glutathione redox state through the alteration of UDP-glucose supply originating from glycogen metabolism. *Arch Biochem Biophys* 348, 169-73 (1997a).
- Braun, L., Puskás, F., Csala, M., Mészáros, G., Mandl, J. and Bánhegyi, G. Ascorbate as a substrate for glycolysis or gluconeogenesis: evidence for an interorgan ascorbate cycle. *Free Radic Biol Med* 23, 804-8 (1997b).
- Braun, L., Kardon, T., El Koulali, K., Csala, M., Mandl, J. and Bánhegyi, G. Different induction of gulonolactone oxidase in aromatic hydrocarbon-responsive or unresponsive mouse strains. *FEBS Lett* **463**, 345-9 (1999a).
- Braun, L., Mile, V., Schaff, Z., Csala, M., Kardon, T., Mandl, J. and Bánhegyi, G. Induction and peroxisomal appearance of gulonolactone oxidase upon clofibrate treatment in mouse liver. *FEBS Lett* **458**, 359-62 (1999b).
- Csala, M., Bánhegyi, G., Kardon, T., Fulceri, R., Gamberucci, A., Giunti, R., Benedetti, A. and Mandl, J. Inhibition of glucuronidation by an acyl-CoA-mediated indirect mechanism. *Biochem Pharmacol* 52, 1127-31 (1996).
- Csala, M., Lerant, I., Bánhegyi, G., Kardon, T., Puskás, F., Mucha, I., Machovich, R., Falus, A. and Mandl, J. Prostaglandin-independent stimulation of interleukin-6 production by fibrinogen degradation product D in perfused murine liver. *Scand J Immunol* 48, 269-71 (1998).
- Csala, M., Bánhegyi, G., Braun, L., Szirmai, R., Burchell, A., Burchell, B., Benedetti, A. and Mandl, J. Beta-glucuronidase latency in isolated murine hepatocytes. *Biochem Pharmacol* 59, 801-5 (2000).

- Csala, M., Senesi, S., Bánhegyi, G., Mandl, J. and Benedetti, A. Characterization of sulfate transport in the hepatic endoplasmic reticulum. *Arch Biochem Biophys* **440**, 173-80 (2005).
- Csala, M., Kardon, T., Legeza, B., Lizák, B., Mandl, J., Margittai, E., Puskás, F., Száraz, P., Szelényi, P. and Bánhegyi, G. On the role of 4-hydroxynonenal in health and disease. *Biochim Biophys Acta* 1852, 826-838 (2015).
- Kálmán, F.S., Lizák, B., Nagy, S.K., Mészáros, T., Zámbó, V., Mandl, J., Csala, M. and Kereszturi, E. Natural mutations lead to enhanced proteasomal degradation of human Ncb5or, a novel flavoheme reductase. *Biochimie* **95**, 1403-10 (2013).
- Kardon, T., Mile, V., Bánhegyi, G., Csala, M., Burchell, B., Mandl, J. and Braun, L. Ethanoldependent induction of bilirubin UDP-glucuronosyl-transferase in rat liver is mediated by Kupffer cells. *Life Sci* 70, 1205-12 (2002).
- Kardon, T., Nagy, G., Csala, M., Kiss, A., Schaff, Z., Nagy, P.L., Wunderlich, L., Bánhegyi,
 G. and Mandl, J. Influence of BGP-15, a nicotinic amidoxime derivative, on the vascularization and growth of murine hepatoma xenografts. *Anticancer Res* 26, 1023-8 (2006).
- Konta, L., Száraz, P., Magyar, J.E., Révész, K., Bánhegyi, G., Mandl, J. and Csala, M. Inhibition of glycoprotein synthesis in the endoplasmic reticulum as a novel anticancer mechanism of (-)-epigallocatechin-3-gallate. *Biofactors* 37, 468-76 (2011).
- Lizák, B., Czegle, I., Csala, M., Benedetti, A., Mandl, J. and Bánhegyi, G. Translocon pores in the endoplasmic reticulum are permeable to small anions. *Am J Physiol Cell Physiol* 291, C511-7 (2006).
- Lizák, B., Csala, M., Benedetti, A. and Bánhegyi, G. The translocon and the non-specific transport of small molecules in the endoplasmic reticulum (Review). *Mol Membr Biol* 25, 95-101 (2008).
- Magyar, J.E., Gamberucci, A., Konta, L., Margittai, E., Mandl, J., Bánhegyi, G., Benedetti, A. and Csala, M. Endoplasmic reticulum stress underlying the pro-apoptotic effect of epigallocatechin gallate in mouse hepatoma cells. *Int J Biochem Cell Biol* **41**, 694-700 (2009).
- Mandl, J., Csala, M., Lerant, I., Bánhegyi, G., Biro, J., Machovich, R. and Falus, A. Enhancement of interleukin-6 production by fibrinogen degradation product D in

human peripheral monocytes and perfused murine liver. *Scand J Immunol* **42**, 175-8 (1995).

- Margittai, E., Low, P., Szarka, A., Csala, M., Benedetti, A. and Bánhegyi, G. Intraluminal hydrogen peroxide induces a permeability change of the endoplasmic reticulum membrane. *FEBS Lett* **582**, 4131-6 (2008).
- Margittai, E., Csala, M., Mandl, J. and Bánhegyi, G. Participation of low molecular weight electron carriers in oxidative protein folding. *Int J Mol Sci* **10**, 1346-59 (2009).
- Margittai, E., Enyedi, B., Csala, M., Geiszt, M. and Bánhegyi, G. Composition of the redox environment of the endoplasmic reticulum and sources of hydrogen peroxide. *Free Radic Biol Med* (2015).

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

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 jóakaratában és a szakmán túlmutató segítő szándékában.

A Mandl-munkacsoportban a kezdetektől alkalmam adódott együtt dolgozni **Bánhegyi Gábor**ral, akit mindig nagyszerű tudósnak 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 múlott.

Mandl József és Bánhegyi Gábor révén kerültem kapcsolatba **Angelo Benedetti**vel (Sienai Egyetem, Olaszország) és **Brian Burchell**-lel (Dundee-i Egyetem, Skócia). Benedetti professzorral húsz éve folytatunk gyümölcsöző kooperációt. Részben különleges személyiségének köszönhető, hogy a Sienaban 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 társszerzői**ként 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, **szüleim**et 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.