Fehérjeglikoziláció az endoplazmás retikulumban mint lehetséges daganatellenes támadáspont

Doktori értekezés

Dr. Konta Laura Éva

Semmelweis Egyetem

Molekuláris Orvostudományok Tudományági Doktori Iskola

Témavezető: Dr. Csala Miklós egyetemi docens, Ph.D.

Hivatalos bírálók: Dr. Csanády László egyetemi docens, Ph.D.
Dr. Szakács Gergely tudományos főmunkatárs, Ph.D.

Szigorlati bizottság

elnöke: Dr. Rosivall László egyetemi tanár, D.Sc.

tagjai : Dr. Voszka István egyetemi adjunktus, Ph.D.

Dr. Deák Veronika egyetemi adjunktus, Ph.D.

Budapest

2012

TARTALOMJEGYZÉK

Ábrák jegyzéke *4*

Táblázatok jegyzéke *5*

Rövidítések jegyzéke *6*

1. Bevezetés *8*

1.1. Az endoplazmás retikulum felépítése és fő funkciói **8**

1.2. Fehérjeérés az endoplazmás retikulum lumenében **10**

1.2.1. Diszulfid hidak kialakítása 11

1.2.2. N-glikoziláció 12

1.2.2.1. Glukozidáz II enzim 15

1.3. Minőségellenőrzés **16**

1.3.1. Primer minőségellenőrzés 17

1.3.1.1. A glikoproteinek minőségellenőrzése 18

1.3.2. Szekunder minőségellenőrzés 20

1.4. ER-stressz és UPR **20**

1.4.1. ER-stressz eredetű apoptózis 23

1.5. Glikoproteinek **25**

1.5.1. Tirozináz 27

1.5.2. VEGF 28

1.6. A glikánok, glikoproteinek érésének a gátlása mint tumorellenes mechanizmus **29**

1.7. A zöld tea **31**

1.7.1. A tea hatóanyagai 33

1.7.1.1. Polifenolok – flavonoidok – katekinek 34

1.7.2. A zöld tea egészségre gyakorolt jótékony hatásai 36

1.7.2.1. A zöld tea és a rák 37

1.7.2.1.1. A zöld tea mint kemopreventív szer 39

1.7.2.1.2. A zöld tea és az apoptózis 40

2. Célkitűzések *42*

3. Módszerek *44*

3.1. Felhasznált vegyszerek, antitestek **44**

3.2. Sejtkultúrák tenyésztése és kezelése **45**

3.3. Sejtlizátum készítése **45**

3.4. Az apoptózis vizsgálata **46**

3.5. Western blot analízis **46**

3.6. Tirozináz aktivitásmérés in situ **47**

3.7. Tirozináz fehérje mennyiségi meghatározása elektroforézissel és enzimaktivitáson alapuló festéssel **47**

3.8. cDNS-szintézis és kvantitatív „real-time" PCR **48**

3.9. A melanoszómák és az endoplazmás retikulum morfológiájának vizsgálata **49**

3.10. A glukozidáz II enzimaktivitásának méréséhez alkalmazott módszerek **50**

3.10.1. Patkány máj mikroszóma előállítása 50

3.10.2. Glukozidáz II enzim aktivitásának mérése fluoriméterrel 50

3.10.3. Glukozidáz II enzim aktivitásának mérése a termékek HPLC-alapú detektálásával 51

3.11. Számítási módszerek, statisztikai analízis **52**

4. Eredmények *54*

4.1. Teaflavanolok hatása a máj mikroszóma glukozidáz II enzim aktivitására **54**

4.2. Az EGCG által kiváltott enzimgátlás kinetikai jellemzése **56**

4.3. A glukozidáz II aktivitás gátlása EGCG-vel hepatóma sejtekben **58**

4.4. Endoplazmás-retikulum-stressz és apoptózis az EGCG-vel kezelt hepatóma sejtekben **60**

4.5 Csökkent tirozináz aktivitás az EGCG-vel kezelt melanoma sejtekben **63**

4.6. Az endoplazmás retikulum és a melanoszómák morfológiai eltérései EGCG kezelés hatására **64**

4.7. Tirozináz enzim fehérje szintű expressziójának koncentráció- és időfüggő gátlása EGCG-vel **65**

4.8. A tirozináz mRNS szintű expressziója EGCG-vel kezelt sejtekben **67**

4.9. EGCG-kezelés hatása a VEGF fehérje mennyiségére **68**

4.10. A tirozináz és a VEGF fehérjék fokozott proteaszomális lebontása EGCG-vel kezelt sejtekben **70**

5. Megbeszélés ***74***

6. Következtetések ***82***

7. Összefoglalás ***84***

8. Summary ***85***

9. Irodalomjegyzék ***86***

10. Saját közlemények jegyzéke ***105***

10.1. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények **105**

10.2. Egyéb közlemények **105**

Köszönetnyilvánítás ***106***

Ábrák jegyzéke

1. ábra. A natív fehérjékre helyezett oligoszacharid szerkezete emlős sejtekben [16] .. 13
2. ábra. Az N-glikoproteinek érésének kezdeti lépése 14
3. ábra. Az újonnan szintetizálódó N-glikoproteinek oligoszacharid láncának átalakulása (a) – és a kitüntetett aszparinghoz kapcsolódó oligoszacharid szerkezete (b) 15
4. ábra. Kalnexin/kalretikulin ciklus 19
5. ábra. Az UPR során aktiválódó legfontosabb folyamatok [48] 22
6. ábra. ER-stressz eredetű apoptózis 24
7. ábra. A tirozináz szerepe a melanin szintézisében [62] 27
8. ábra. A glikoprotein-érés gátlószereinek szerkezete: 30
9. ábra. A leggyakoribb flavonoidok felosztása és szerkezete [103] 34
10. ábra. A zöld teában található legjelentősebb katekinek szerkezete 35
11. ábra. Teakatekinek és NBDJ hatása permeabilizált máj mikroszóma glukozidáz II enzim aktivitására 55
12. ábra Az EGCG glukozidáz II enzimre gyakorolt gátló hatásának kinetikája 57
13. ábra. Glukozidáz II gátlása EGCG-vel hepatóma sejtekben 59
14. ábra. Az eIF2α foszforilációja EGCG-vel kezelt Hepa1c1c7 sejtekben. 60
15. ábra. A CHOP indukciója és a prokaszpáz-12 hasítása egcg-kezelés hatására 61
16. ábra. Hepa1c1c7 sejtek apoptózisának fokozódása EGCG-kezelés hatására 62
17. ábra. Glukozidázgátlók hatása a melanóma sejtek aktív tirozináz enzimének mennyiségére 63
18. ábra. Az ER és a melanoszómák morfológiai eltérései EGCG-kezelt sejtekben. 64
19. ábra. EGCG és DNJ koncentrációfüggő hatása a tirozináz fehérje mennyiségére... 66
20. ábra. Az EGCG- és DNJ-kezelések hatásának időfüggése 67
21. ábra. EGCG hatása a HIF1α és VEGF fehérje mennyiségére 69
22. ábra. Glukozidázgátlók hatása a laktacisztinnel kezelt melanóma sejtek aktív tirozináz enzimének mennyiségére 71
23. ábra. EGCG és DNJ hatása a tirozináz és VEGF fehérje expressziójára laktacisztin jelenlétében, ill. anélkül 72

Táblázatok jegyzéke

1. táblázat. A glikoproteinek funkciói [60]..... 26
2. táblázat. Glikoproteinek érését befolyásoló vegyületek [60] 29
3. táblázat. A zöld és fekete tea fő összetevői a szárazanyag-tartalom százalékos megoszlása szerint [97] 33
4. táblázat. Teaflavanolok glukozidáz II-re gyakorolt gátló hatását jellemző IC_{50} és K_i értékek összehasonlítása. 56
5. táblázat. Tirozináz mRNS szintje a melanóma sejtekben 68
6. táblázat. Tirozináz, HIF1α és VEGF mRNS szintje a melanóma sejtekben 70
7. táblázat. Tirozináz, HIF1α és VEGF mRNS szintje a melanóma sejtekben laktacisztin hozzáadása mellett 73

Rövidítések jegyzéke

ASK1	„apoptosis signal-regulating kinase 1”
ATF	„activating transcription factor”
AP-1	„activator protein 1”
AP-3	adaptor protein 3
BiP	„binding protein”
Bcl-2	„B-cell lymphoma protein 2” fehérjecsalád és annak egyik (antiapoptotikus) tagja
BH3	„Bcl-2-homology domain 3”
CHOP	„CCAAT-box enhancer binding protein-homologous protein”
CRE	„cAMP response element”
Ct	„cycle treshold”
DNJ	deoxinojirimicin
DOPA	dihidroxi-fenilalanin
EDEM	„endoplasmic reticulum degradation-enhancing 1,2-mannosidase-like protein”
EDTA	etilén-diamin-tetraacetát
EC	epikatekin
ECG	epikatekin-3-gallát
EGC	epigallokatekin
EGCG	epigallokatekin-3-gallát
eIF2	eukarióta iniciációs faktor 2
ER	endoplazmás retikulum
ERAD	endoplazmás retikulum asszociált degradáció
ERP72	endoplazmás retikulum protein 72
FBS	„fetal bovine serum”
FITC	fluoreszcein-izotiocianát
GADD	„growth arrest and DNA damage-inducible protein”
GC	gallokatekin
GCG	gallokatekin-gallát

HEPES	„4-(2-hydroxyethyl) piperazine-1-ethanesulfonic acid”
HIF1	hipoxia által indukált faktor 1
HPLC	„high performance liquid chromatography”
IGF-1R	„insulin-like growth factor-1 receptor”
IRE1	„inositol requiring 1”
JNK	c-Jun N-terminális kináz
MATP	„membran-associated transporter protein”
MEM	„minimum essential medium”
MHC	„major histocompatibility complex”
MMP	mátrix metalloproteináz
MOPS	„3-(N-morpholino) propanesulfonic acid”
MUG	metil-umbelliferil-α-D-glukozid
NF-κB	„nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells”
NPG	p-nitrofenil-α-D-glukozid
NBDJ	N-butil-deoxinojirimicin
pC-12	prokaszpáz-12
PDI	protein-diszulfid izomeráz
PERK	„RNA-dependent protein kinase-like ER-kinase”
PG	propil-gallát
PVDF	polivinilidin-fluorid
ROS	„reactive oxygen species”
SDS	„sodium dodecyl sulfate”, Na-lauril-szulfát
UDP	uridin-difoszfát
UGGT	UDP-glukóz: glikoprotein-glukoziltranszferáz
UPR	„unfolded protein response”
VEGF	„vascular endothelial growth factor”
TFA	trifluorecetsav
Tyrp1	„tyrosinase related protein”
TRAF2	„tumor necrosis factor receptor-associated factor 2”
VHL	„von Hippel-Lindau tumor suppressor”
VEGFR	„vascular endothelial growth factor receptor”
XBP	„cis-acting X-box binding protein”

1. Bevezetés

1.1. Az endoplazmás retikulum felépítése és fő funkciói

Az eukarióta sejtekben a membránnal körülhatárolt, különböző szerepet betöltő kompartmentek sokasága közül a sejtmag, a citoplazma, a citoszol, a Golgi apparátus, a mitokondrium (és a kloroplaszt), a lizoszómák, a peroxiszómák és az endoplazmás retikulum (ER) emelendő ki.

Az ER egy folyamatos membránnal határolt sejtorganellum [1,2], melynek összefüggő lumene ciszternák és tubulusok hálózatából áll. Az ER membránja – mely a sejtmag burkát is magába foglalja – teljes mértékben elhatárolja az ER lumenét a citoplazmától, ezzel biztosítva a más organellumoktól karakterisztikusan eltérő környezet fenntartását, melyre a viszonylag magas kalcium-, proton- és aszkorbátkoncentráció mellett az alacsony tiol/diszulfid arány a jellemző. Az ER membránja több sajátossággal – pl. magas fehérje/lipid arány és alacsony koleszterintartalom – rendelkezik, ezáltal jelentősen eltér a plazmamembrántól és más intracelluláris membránoktól.

Az ER az eukarióta sejt legnagyobb membránnal határolt organelluma, melynek mérete és morfológiai sajátossága a különböző sejttípusokra jellemző folyamatoktól függően igen széles határok között változhat (pl. a szarkoplazmás retikulum a harántcsíkolt izomrostokban). A hepatociták membránrendszerének akár 95%-át, illetve a sejt teljes térfogatának 10%-át is alkothatja az ER, de vannak sejtek, ahol mérete mindössze a magburokra szorítkozik.

Morfológiai és funkcionális szempontból két fontos altípusát különböztetjük meg: a magmembránt alkotó ER-t és a perifériás ER-t. A perifériás ER tovább csoportosítható sima felszínű endoplazmás retikulumra (SER) és durva felszínű endoplazmás retikulumra (DER) [3]. A SER szerteágazó csőrendszerre emlékeztető tubuláris szerkezetű kompartment, mely nevét onnan kapta, hogy nem hordoz felszínén riboszómákat. A DER-t ezzel szemben riboszómák borítják, és szerkezete lamelláris elrendeződést mutat. A tubulusok és ciszternák kiterjedt rendszere összekapcsolódva egy egységet képez, melyben a különböző szubkompartmentek membránja és lumene

egymással folytonos. Az ER, fent részletezett, három morfológiailag eltérő régiója fluoreszcens elektronmikroszkóppal jól elkülöníthető egymástól [4].

A morfológiai eltérésekhez funkcionális különbségek is társulnak. A sejtmag membránja jellegzetes szerkezeti elemei révén elsősorban a sejtmag funkcióihoz kötődő feladatokat tölti be. A SER lumenében számos biotranszformációs reakció (pl. glukuronidáció) játszódik le; ugyancsak a SER membránjában folynak a lipidanyagcsere különböző lépései (pl. zsírsavak elongációja, deszaturációja, trigliceridszintézis, koleszterinszintézis több lépése stb.). A DER központi szerepet tölt be a szekrécióra és a plazmamembránba, valamint a sejt különböző organellumainak membránrendszerébe kerülő fehérjék szintézisében, ko- és poszttranszlációs módosításaiban, illetve e fehérjék minőségellenőrzésében és az ER-asszociált degradációban. A DER legnagyobb mennyiségben a májsejtekben és az exokrin pancreassejtekben található meg.

Az ER, a sejtmaggal való szoros kapcsolaton kívül, mind a plazmamembránnal mind egyéb membránnal határolt sejtorganellumokkal, mint a mitokondrium, Golgi, peroxiszóma, vakuólák és kloroplasztok, szoros membránkapcsolatokat alakít ki. Ennek köszönhetően vezikuláris úton transzportálódhatnak az ER-ben szintetizált lipidek, szterolok rendeltetési helyükre és közvetlen kalcium szignálok alakulhatnak ki a különböző organellumok között. Ezek az eltérő tulajdonságokkal és összetétellel rendelkező kapcsolódási régiók folyamatosan változhatnak a sejt igényeinek megfelelően [5].

A fehérjeszintézisen túl számos sejtbiológiai és biokémiai folyamat játszódik a durva és sima felszínű ER lumenében [6]. Belső kalciumraktárai révén az ER szerepet játszik a sejt szabályozási mechanizmusaiban. A szénhidrát-anyagcserében is fontos szerepe van, ugyanis a glukoneogenezis utolsó lépését, a szabad glukóz keletkezését, az ER membránjához kötött enzim, a glukóz-6-foszfatáz katalizálja. A lipidanyagcsere több enzimrendszere is itt található, a koleszterin, a foszfolipidek és a trigliceridek szintézisének legtöbb lépése itt zajlik, nagy részben itt történik a koleszterin epesavakká vagy szteroid hormonokká alakítása.

A biotranszformáció főbb lépései is az ER-hez kötött folyamatok. A biotranszformáció első fázisában az adott vegyületen konjugációra alkalmas csoportok alakulnak ki oxidáció, redukció vagy hidrolízis révén. Ennek a legfontosabb enzimei, a

citokróm P450 monooxigenázok az ER membránfehérjéi. Az enzimrendszer rendkívül változatos endogén (pl. szteroid, koleszterin), és exogén szubsztrátok (pl. gyógyszerek) átalakítását végzi. Kiemelendők a 11β-hidroxiszteroid-dehidrogenáz izoenzimek, amelyek a biotranszformáció első fázisaként a glukokortikoidok oxidoredukcióját katalizálják, és ezáltal prereceptoriális aktiválását vagy inaktiválását végzik [6]. A biotranszformáció második (un. konjugációs) fázisának legfontosabb enzimei, az UDP-glukuronozil-transzferázok szintén az ER integráns membránfehérjéi. A glukuronidáción túl a biotranszformáció második fázisának egyéb reakciói: a szulfatálás, a glutationnal történő konjugáció és a metilezés is itt zajlanak.

1.2. Fehérjeérés az endoplazmás retikulum lumenében

Az ER lumenére jellemző ionkoncentrációk, oxidatív környezet és a chaperonok jelenléte optimális helyszínt biztosít a fehérjék éréséhez. Az ER-ben számos speciális ko- és poszttranszlációs módosítás történik: diszulfidhidak kialakítása, N-glikoziláció, prolil- és lizil-hidroxiláció, valamint glutamil-γ-karboxiláció. Ezek a módosítások rendkívül fontosak a fehérjék megfelelő éréséhez, a natív konformáció kialakításához.

A fehérjék érése az ER lumenében három fázisra osztható:

1. A transzlokon komplex közreműködésével kotranszlációs, kotranszlokációs módosítások.
2. A fehérjék riboszómáról, illetve transzlokon komplexről történő leválása után poszttranszlációs folding.
    - A szignál szekvencia lehasítása egy erre kijelölt peptidáz által.
    - A polipeptidlánc kapcsolódása chaperonokhoz.
    - Másodlagos szerkezettől függően, a megfelelő peptidkötések cisz konfigurációjúvá alakítása a peptidil-prolil cisz-transz-izomeráz enzim által.
    - Egyes fehérjék prolil vagy lizil oldalláncainak hidroxilálódása.
    - Néhány fehérje glutamil oldalláncainak γ-karboxilálódása (a γ-karboxil-glutaminsav szintézise a máj ER-jében zajló K-vitamin ciklus része, és a hemosztázisban fontos alvadási faktorok – protrombin, X-faktor, IX-

faktor, VII-faktor, protein C és protein S szintézisében/aktiválásban elengedhetetlen folyamat).

- A láncon belüli, illetve láncok közötti diszulfid hidak kialakulása.
- Oligoszacharidok kapcsolódása a fehérjékhez (fehérje-glikoziláció, a glikoproteinek kialakulása)

3. A fehérje alegységek kapcsolódása oligomerekké.

A fehérjék megfelelő érésében fontos szerepet játszanak az ER lumenében nagy koncentrációban megtalálható chaperonok (dajkafehérjék), illetve a hajtogatást (foldingot) elősegítő enzimfehérjék (foldázok). A chaperonok felismerik az éretlen, rosszul hajtogatott fehérjéket és emellett képesek a fehérjék megfelelő tekeredését, az úgynevezett „foldingot" segíteni [7]. A folding során a kezdetben még a felszínen is jelen lévő hidrofób oldalláncok a fehérjék belsejébe kerülnek. A nem megfelelően hajtogatott fehérjék felszínén azonban számos hidrofób rész marad, melyet a dajkafehérjék felismernek, és saját hidrofób oldalláncaikkal hozzájuk kapcsolódnak. Ezáltal megakadályozzák a rosszul hajtogatott fehérjék aggregációját, és segítik a megfelelő szerkezet kialakítását. A chaperonok a rosszul hajtogatott fehérjéket hidrofób magjukba zárják, majd ezt a környezetet hidrofilre váltják, ami az éretlen fehérjékben is hasonló változásokat indít meg: a felszíni hidrofób láncok helyére hidrofilek kerülnek, majd az érett, natív fehérje disszociál a chaperonról [8].

A fenti mechanizmusokkal a chaperonok elősegítik, hogy a „folding" megfelelő legyen és kialakuljon a fehérjék natív konformációja, ami energetikailag a legkedvezőbb állapotot jelenti.

1.2.1. Diszulfid hidak kialakítása

A diszulfid hidak kialakulása a fehérjeérés egyik legfontosabb lépése. A szekrécióra kerülő és a membránban elhelyezkedő fehérjék harmadlagos és negyedleges szerkezetének stabilitásához, a fehérjék megfelelő működéséhez a diszulfid hidak alapvetően szükségesek [9].

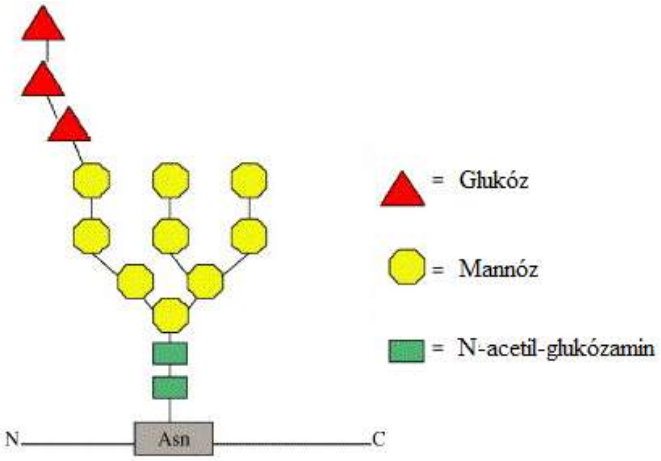
A diszulfid hidak kialakítása két elektron átvitelével történik. Ez *in vitro* spontán is bekövetkezhet, a ciszteinek tiol csoportjainak egy akceptorra (pl. molekuláris oxigén)

történő elektronleadásán keresztül. *In vivo* a fehérjék diszulfid hídjai a tiol-diszulfid kicserélődése révén alakulnak ki. Ez az enzimatikus reakció bármely tiol csoportot tartalmazó molekula és egy fehérje között létrejöhet. A folyamat végeredményeképpen az eredetileg oxidált állapotban lévő tiol csoportok redukálódnak, a redukáltak pedig oxidálódnak. A reakciót tiol-diszulfid oxidoreduktázok katalizálják [10]. Emberben eddig két fehérje szerepét bizonyították a folyamatban. A protein-diszulfid-izomeráz (PDI) közvetlenül az éretlen fehérjétől, míg az Ero1p a PDI-től vesz át elektronokat [11,12]. A PDI szerepének fontosságát bizonyítja az is, hogy ez az egyik legnagyobb mennyiségben előforduló enzim emlős és élesztő sejtek ER lumenében. A sejt teljes fehérjetartalmának mintegy 0,8%-át alkotják ezek az enzimek [13]. Részleteiben még nem ismert, hogy az elektronok hogyan jutnak el a végső elektronakceptorra, az oxigénre.

1.2.2. N-glikoziláció

Az N-glikoziláció a fehérjék egyik fontos poszttranszlációs módosítása, ami az ER lumenében következik be. A fehérjék glikozilációjának lépései már az 1980-as évek elejétől kezdve ismertek, bár akkor még nem értették teljesen ennek a folyamatnak a jelentőségét.

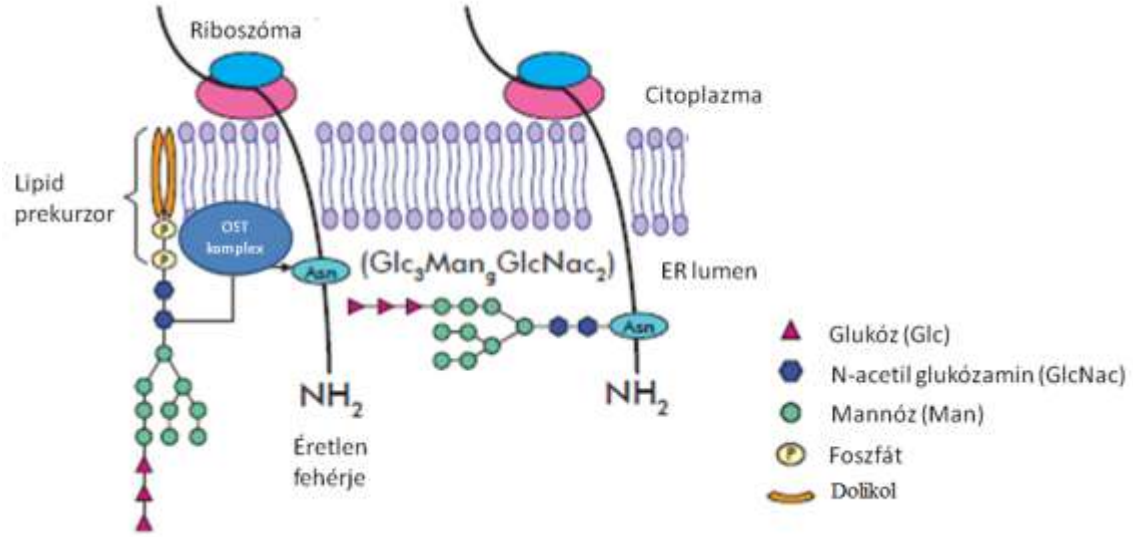
Az N-glikozilált fehérjék kialakulásakor a fehérje kitüntetett aszparagil egységeinek amid csoportjához egy 14-tagú oligoszacharid lánc ($Glc_3Man_9GlcNAc_2$) kapcsolódik [14]. A glikán szerkezete az evolúció során igen konzervatívnak bizonyult; összetétele megegyezik mind emlős, mind növény, mind gombasejtekben [15] (**1. ábra**).



1. ábra. A natív fehérjékre helyezett oligoszacharid szerkezete emlős sejtekben [16]

A glikán közvetlenül a dolikol-foszfátról helyeződik a fehérjére, amit egy transzferáz enzim katalizál. A dolikol-foszfát hosszú (15-19 izoprénegységből álló), apoláros lipid. A segítségével aktivált „core" oligoszacharid egység a polipeptid láncra helyeződik át, miközben a dolikol-pirofoszfát felszabadul [17]. A transzfert katalizáló oligoszacharil-transzferáz egy 8 alegységből álló komplex enzim, mely az ER membránjában foglal helyet. Érdekes, hogy a hatékony transzporthoz szükség van a „core" oligoszacharid mindhárom szélső glukóz alegységének a jelenlétére, mert az enzim a triglukozilált oligoszacharidot hússzor gyorsabban szállítja, mint azt, amelyikről egy glukóz alegység hiányzik, habár a glukóz alegységek lehasadnak, mihelyt a glikán a fehérjéhez kötődött [18].

Számos enzim vesz részt az oligoszacharid lánc átalakítási folyamataiban (**2. ábra**). A szélső glukóz alegységet a glukozidáz I (ER membránjához kötött) enzim távolítja el az α1,2 kötés hidrolizálása révén [19], majd a két maradék glukóz alegységet a glukozidáz II enzim hasítja le a köztes α1,3 kötések hidrolizálásával [20].

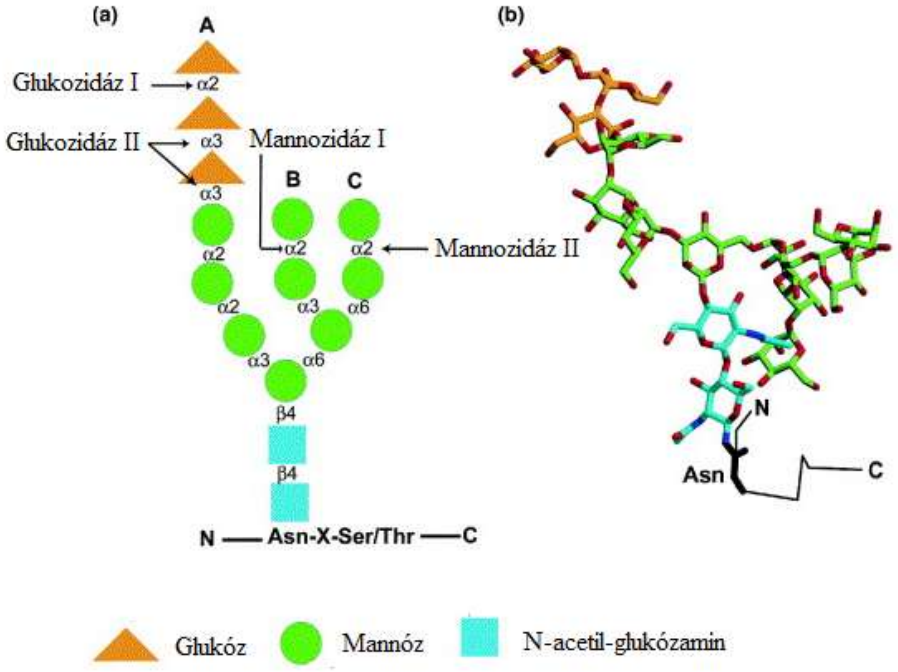


2. ábra. Az N-glikoproteinek érésének kezdeti lépése

***Az oligoszacharil transzferáz (OST komplex) az oligoszacharid ($Glc_3Man_9GlcNAc_2$) láncot a dolikol-foszfátról az éretlen fehérjére helyezi át* [21].**

A továbbiakban néhány mannóz is lehasadhat a fehérjéről, amit a mannozidáz I - II és egy még azonosítatlan mannozidáz katalizál [22]. Az említett reakciókon kívül az ER-ben még egy reakció történhet az N-glikoproteinek oligoszacharid láncával, az átmeneti re-glukoziláció az UDP-glukóz:glikoprotein glukozil-transzferáz közreműködésével [23] a „minőségellenőrzésnél" részletesen tárgyalt módon.

A szélső három glukózegység és egy mannózegység hidrolízisét követően a fehérje a Golgi komplex felé továbbítódik, ahol az N-glikoproteinek glikán csoportja további változásokon megy keresztül, az ott található mannozidázok és N-acetil-glukózaminil-transzferázok révén [24] (**3. ábra**).



3. ábra. Az újonnan szintetizálódó N-glikoproteinek oligoszacharid láncának átalakulása (a) – és a kitüntetett aszparinghoz kapcsolódó oligoszacharid szerkezete (b)

A kitüntetett aszparagin – mely az N-Asn-X-Ser/Thr-C (X bármilyen aminosav lehet a prolin kivételével) konstitutív szekvenciában helyezkedik el – amid csoportjához kötődik a glikán. Kezdeti lépésként a $Glc_3Man_9GlcNAc_2$ láncról a glukozidáz I enzim hasít le egy szélső glukóz alegységet, majd a glukozidáz II hidrolizálja a köztes α1-3 kötéseket. Ezt követően további mannóz alegységek hasadnak le a mannozidázok révén **[25]**

1.2.2.1. Glukozidáz II enzim

A glukozidáz II enzim kulcsszerepet játszik a glikoproteinek oligoszacharid oldalláncának átalakításában, valamint a glikoproteinek minőségellenőrzésében [26]. A glukozidáz II – a glukozidáz I enzimmel ellentétben – szolubilis állapotban található az ER lumenében; pH optimuma közel neutrális. Az enzim ismert gátlószere az 1-deoxinojirimicin és az ebből származtatható castanospermin. A fehérje tetramer szerkezetű, két 110 kDa-os részből épül fel, melyek α és β alegységekből állnak [27].

A – túlnyomórészt az ER lumenében található – glukozidáz II ER-ben tartásáért jelenleg az enzim 80 kDa-os, katalitikus aktivitással nem rendelkező, β alegységének tulajdonítanak szerepet, míg az α alegység az enzimatikus aktivitásért felelős. *In vitro* a

katalitikus alegység a β alegység hiányában is aktív, de *in vivo* mindkét alegység szükséges az enzim működéséhez [28].

Miután a glukozidáz I hidrolizálja az újonnan szintetizált glikoprotein oligoszacharid oldalláncának szélső glukóz alegységét, a maradék két glukóz molekulát a glukozidáz II hasítja le. Az első köztes α1,3 kötés hidrolízise gyorsan végbemegy, míg a második α1,3 kötés hasítása ennél jóval lassabban, szabályozott lépésként következik be. Az eltérő enzimkinetika a glukozidáz II enzimen található két eltérő szubsztrát-kötőhellyel magyarázható [29].

A szélső három glukóz alegységtől megfosztott, de nem megfelelően hajtogatott glikoproteinek átmenetileg reglukozilálódhatnak a mannóz molekulán mind membránhoz kötött, mind szolubilis glukozil-transzferázok által.

A glukozidáz II enzim aminosav-szekvenciájában teljesen eltér a glukozidáz I enzimtől [30]. Egyéb glukóz-hidroláz enzimekkel (mint a lizoszomális α-glukozidáz, szukráz-izomaltáz és az élesztő glukozidáz) azonban meglepő módon rokonságot mutat. A glukozidáz II enzim kiemelt jelentőségét mutatja, hogy a gén szerkezete az evolúció során igen konzervatívnak bizonyult; a gén aminosav-szekvenciája nagymértékű hasonlóságot mutat a különböző, egymástól távol álló fajok (ember, sertés és élesztőgomba) között.

Az újonnan szintetizált N-glikoproteinek minőségellenőrző folyamatában a glukozidáz II enzim kiemelten fontos szerepet játszik. A minőségellenőrzés hivatott biztosítani az újonnan szintetizált fehérjék megfelelő érését, valamint megakadályozza, hogy a hibás – vagy még éretlen – fehérjék sejten belüli rendeltetési helyükre szállítódjanak vagy szecernálódjanak. Ez kitüntetett jelentőséggel bír, mert a részlegesen, vagy esetleg teljesen funkcióképtelen ioncsatornák, transzporterek, receptorok jelenléte a sejtek membránjában sejthalálhoz is vezethet [31].

1.3. Minőségellenőrzés

Minőségellenőrző rendszerek szabályozzák a DNS, RNS és fehérjeszintézis szinte minden lépését. Ezeknek a jól működő, szigorúan ellenőrzött folyamatoknak köszönhetően a sejtekben a hibás makromolekulák száma rendkívül alacsony [32].

A fehérjéket az erre kijelölt molekulák a transzkripció, transzláció, a folding és az összeszerelés szintjén is ellenőrzés alatt tartják. Ahhoz, hogy a fehérje a végső

ellenőrzőponton is átjusson, el kell érnie natív konformációját, amely energetikailag a legkedvezőbb állapotot jelenti. Amikor a fehérjék érése az ER lumenében nem tökéletes, és a sejt ezt a hibát nem tudja kijavítani, akkor az érintett fehérjék lebontásra kerülnek. Ez a folyamat az ER-asszociált degradáció (ERAD).

A natív és nem natív konformáció közötti különbséget a sejtekben az erre kijelölt molekulák érzékelik. Ide tartoznak többek között a chaperonok, melyek a nem megfelelően hajtogatott fehérjékhez kötődnek és kettős funkciójuk van: a megfelelő tekeredés elősegítése mellett a rosszul hajtogatott fehérjék lebontásában is szerepet játszanak. A konformáció ellenőrzésében enzimek is részt vesznek, melyek megfelelő jelzésekkel látják el a rosszul hajtogatott fehérjéket. A lebontásra ítélt fehérjék jelzése az ubiquitin. Az ER-ből retrotranszlokációval eltávolított fehérjék ubiquitinálódnak és a proteaszómában degradálódnak (ERAD).

Az N-glikoproteinek érése és a minőségellenőrzése során az oligoszacharid oldalláncban található kitüntetett glukóz alegység az éretlenség jeleként és retenciós szignálként szolgál, amely a rosszul hajtogatott fehérjéket visszatartja az ER lumenében [33].

1.3.1. Primer minőségellenőrzés

Primer minőségellenőrzésnek nevezzük az ER-ben újonnan szintetizált fehérjék Golgi apparátusba történő transzportját szabályozó rendszert, mely minden fehérjét kontroll alatt tart, szemben a másodlagos minőségellenőrzéssel, amely csak a fehérjék egy bizonyos csoportját érinti [34].

A minőségellenőrzésben számos chaperon (pl. BiP/GRP78, GRP94), lektin (pl. kalnexin, kalretikulin) és foldáz (pl. PDI, ERp57, Erp72) vesz részt. A rendszer jelentőségét mutatja, hogy ezek az enzimek rendkívül nagy mennyiségben találhatók az ER lumenében. Amikor a fehérje szerkezete eltér a natív konformációtól, akkor a fenti molekulák ezt felismerik, hozzákötődnek az éretlen fehérjéhez, és megakadályozzák, hogy elhagyja az ER lumenét, miközben segítik a megfelelő konformáció kialakítását is. Gyakran már egészen kis konformációbeli különbség elengedő a chaperonok működésbe lépéséhez [35]. A megfelelően hajtogatott fehérjék vezikuláris transzporttal szabadon elhagyhatják az ER lumenét.

1.3.1.1. A glikoproteinek minőségellenőrzése

A kalnexin-kalretikulin ciklus egy különösen jól ismert primer minőség-ellenőrző folyamat. Ez a rendszer felelős a glikoproteinek megfelelő tekeredéséért, a rosszul a hajtogatott fehérjék ER-ben tartásáért (amíg a fehérjék megfelelő konformációjukat el nem érik), szerepet játszik továbbá a rosszul hajtogatott fehérjék lebontásában is [36].

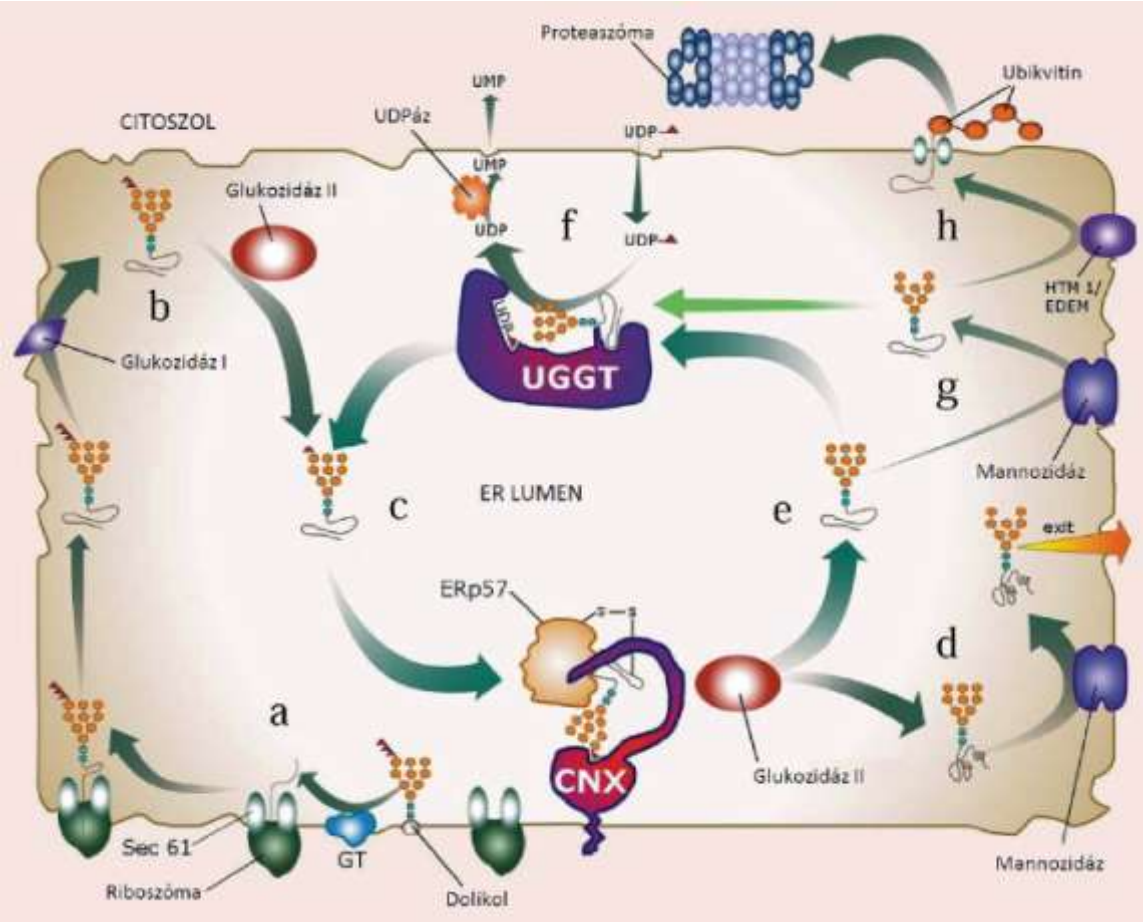
A lektinekhez tartozó két homológ fehérje, a kalnexin és kalretikulin az ER lumenében található és megköti az újonnan szintetizált monoglukozilált N-glikoproteineket [37].

A kalnexin vagy kalretikulin (esetleg mindkettő egyszerre) az ER-ben szintetizált összes glikoproteinnel átmenetileg kapcsolatba kerül, ami a monoglukozilált glikánokhoz ($Glc_1Man_{7\text{-}9}GlcNAc_2$) való specifikus kötődésének köszönhető [38].

A kalnexin transzmembrán fehérje, míg a kalretikulin szolubilis formában van jelen az ER lumenében. Mindketten komplexet alkotnak az ERp57 tiol-diszulfid oxidoreduktázzal. Az ERp57 enzim a diszulfid kötések kialakítását katalizálja a kalnexin-kalretikulin által kötött fehérjékben [39]. Egyéb ER chaperonok és foldáz enzimek (mint a BiP és PDI) is gyakran szerepet játszanak a glikoproteinek megfelelő hajtogatásában, érésében.

A kalnexin/kalretikulin ciklus be- és kikapcsolásáért két egymástól független enzim felelős. A glukozidáz II a monoglukozilált glikánok kitüntetett glukóz alegységének hidrolízise révén szabályozza a glikoproteinek disszociációját a chaperonról. A másik jelentős enzim az UDP-glukóz:glikoprotein-glukoziltranszferáz, amely a reglukozilációt katalizálja és ezzel a chaperonok kapcsolódását ismét lehetővé teszi a fehérjéhez. *In vitro* és *in vivo* tanulmányok bizonyítják, hogy a reglukoziláció csak akkor következik be, ha a glikoproteinek konformációja nem megfelelő [33].

A glikoproteinek végül vagy elérik natív konformációjukat, vagy lebomlanak. A lebontásra ítélt glikoproteinek oligoszacharid oldalláncában egy szélső mannózt hasít az ER α1,2 mannozidáz I. Ezután egy újonnan felfedezett lektin, az EDEM köti meg a degradációra ítélt fehérjéket [40], melyek a proteaszómákban lebontásra kerülnek. Az N-glikoproteinek minőségellenőrzésében központi szerepet játszó kalnexin/kalretikulin ciklust a **4. ábra** mutatja.



4. ábra. Kalnexin/kalretikulin ciklus

Az ER lumenében két enzim: a glukozidáz II és az UGGT szabályozza glikoproteinek kötődését és disszociációját a kalnexinhez és kalretikulinhoz, ezzel biztosítva az N-glikoproteinek érésének sajátos minőségellenőrző folyamatát, a kalnexin-kalretikulin ciklust **[41].**

a) A prekurzor glikán ($Glc_3Man_9GlcNAc_2$) a dolikolról az újonnan szintetizálódó fehérje kitüntetett aszparagin amid csoportjára helyeződik át egy specifikus glikozil-transzferáz révén, amint a fehérje bejut az ER lumenébe a Sec61 p transzlokon komplexen keresztül **[42].**

b) A glukozidáz I és II enzim lehasítja a két szélső glukóz alegységet.

c) A monoglukozilált ($Glc_1Man_9GlcNAc_2$) glikoproteinek specifikusan kötődnek a kalnexinhez és a luminalisan elhelyezkedő kalretikulinhoz, ezáltal kerülnek kapcsolatba az ERp57 tiol oxidoreduktázzal. Amint a glukozidáz II lehasítja a szélső, kitüntetett glukóz alegységet, a fehérje disszociál a lektinekről.

d, A megfelelően hajtogatott fehérjék szekrécióra kerülnek.

e, A rosszul hajtogatott fehérjéket az UGGT felismeri.

f, Az éretlen fehérjék reglukozilálódnak az UGGT révén, és a monoglukozilált glikoproteinek ismételten a lektinek szubsztrátjai lesznek.

g, A kalnexin/kalretikulin ciklus addig tart, amíg a fehérjék elérik natív konformációjukat vagy az ERAD felé irányítódnak, miután az α1,2 mannozidáz a szélső mannóz molekulát hidrolizálta.

h, Egy enzimatikusan inaktív tagja ennek a folyamatnak az EDEM protein, amely lektinként funkcionál, és a rosszul hajtogatott fehérjéket az ERAD felé irányítja. Az éretlen fehérjék a Sec61p transzlokon csatornán keresztül visszajutnak a citoplazmába ahol proteaszómákban lebontásra kerülnek, általában a poliubikvitinációt követően

CNX: kalnexin, ERAD: ER-asszociált degradáció, EDEM: „ER Degradation Enhancing α-Mannosidase-like protein", UGGT: UDP-glukóz:glikoprotein-glukoziltranszferáz **[43]**

1.3.2. Szekunder minőségellenőrzés

Ahhoz, hogy a fehérjék szekrécióra kerüljenek, a primer minőségellenőrzés követelményein felül egyéb kritériumoknak is meg kell felelniük. A szekunder minőségellenőrzés során különböző szelektív mechanizmusok szabályozzák a fehérjék vagy fehérjecsaládok exportját. Minden résztvevő faktornak megvan a saját módszere, hogy felismerje az általa ellenőrzött fehérjét. E faktorok csoportjába tartozik néhány specifikus chaperon és enzim, mint a NinaA peptidil-prolil cisz/transz izomeráz, amely a specifikus rodopszinok transzportját biztosítja Drosophilia melanogasterben [44]. Egy jól ismert faktor a „receptor-associated protein" (RAP), amely az LDL („low density lipoprotein") receptor család tagjait az ER lumenében megköti és „elkíséri" őket a Golgi komplexbe, hogy megvédje a receptorokat a korai szekréciótól.

A szekunder minőségellenőrzés szerepet játszik a fehérjék ER-ben tartásának és exportjának sejtspecifikus szabályozásában [45].

1.4. ER-stressz és UPR

A szekrécióra kerülő fehérjék és a membránhoz, valamint egyéb organellumokhoz kötött fehérjék szintézisének helye az ER. Az optimális fehérjefoldinghoz számos faktor szükséges: ATP, relatív magas Ca^{2+} ionkoncentráció, oxidatív környezet (ami a diszulfid-hídak kialakításához elengedhetetlen) és bizonyos fehérjék megfelelő működése [46]. A speciális luminális környezetet megzavaró hatások befolyásolják az ER működését.

Amennyiben az ER-ben zavar következik be, akkor nem képes a fehérjék megfelelő érését a szükséges mértékben biztosítani. Ebben az esetben a nem megfelelően hajtogatott („unfolded" vagy „misfolded") fehérjék felhalmozódhatnak az

ER lumenében, aggregálódhatnak – ez a fehérje-túlterheléses állapot az ER-stressz egyik kiváltója [46]. Az ER fehérje-túlterheléséhez vezető legfontosabb folyamatok:

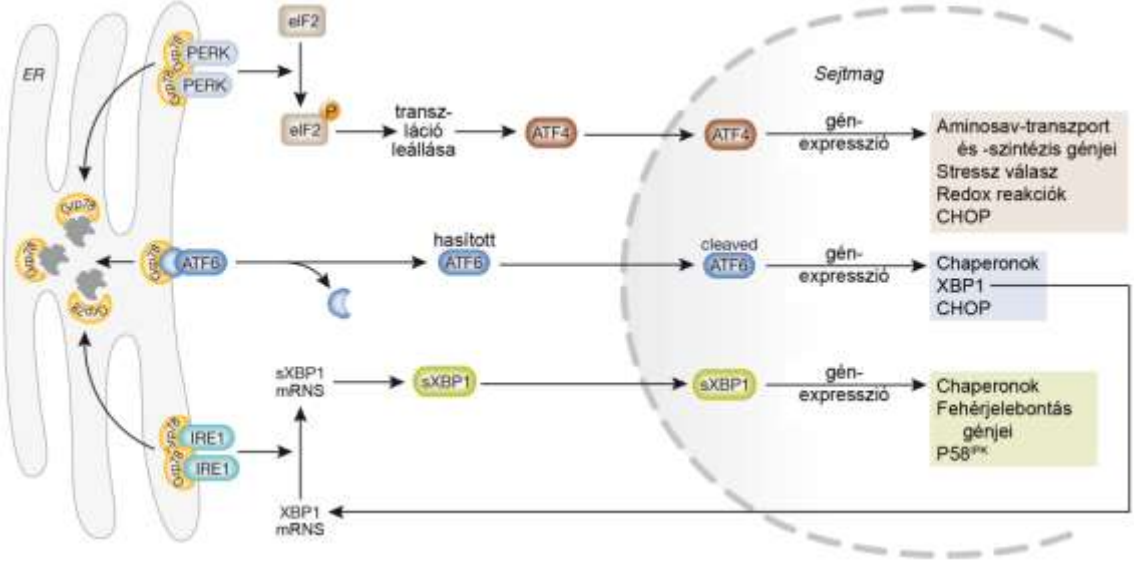
- kalcium-homeosztázis megváltozása (pl. luminális Ca^{2+}-szint csökken, aminek következében a Ca-függő chaperonok működése elégtelen lesz),
- luminális tiolok redox státuszának a megváltozása, ami a diszulfid hidak képződését vagy a kóros diszulfid hidak izomerizációját akadályozza meg,
- a szervezet – és ezáltal az ER lumen – glukózszintjének csökkenése, ami gátolja a glikoproteinek érését,
- integráns membránfehérjék, luminális fehérjék túltermelése, pl. virális fertőzésben.

A sejtek – hogy legyőzzék az ER-stressz okozta ártalmakat – különböző mechanizmusokat fejlesztettek ki, melyeket összefoglalóan UPR-nek („unfolded protein response”) nevezünk (**5. ábra**). Az UPR legfontosabb elemei:

- az ER foldingkapacitásának a helyreállítása (ER chaperonok és foldázok szintézisének fokozása);
- az ER méretének növelése a foszfolipidek és integráns fehérjék fokozott szintézisével;
- a fehérjeszintézis gátlása a transzláció és transzkripció szintjén egyaránt, ezáltal a fehérjetúlsúly csökkentése;
- az ER-asszociált degradáció (ERAD) fokozása, ami a fehérjék lebontását serkenti.

Az előbb említett változások elősegítik, hogy a rosszul hajtogatott fehérjék a lumenben maradjanak mindaddig, amíg megfelelő konformációjukat el nem érik, vagy ha kijutnak a citoszolba, akkor lebontásra kerüljenek (ERAD).

Ez az összetett sejtválasz alapjában véve három transzmembrán receptoron keresztül valósul meg: PERK („pancreatic ER kinase”), ATF6 („activating transcription factor 6”) és az IRE1 („inositol requiring enzyme 1”). A nyugalomben lévő sejtekben mindhárom receptort inaktív állapotban tartja a GRP78 ER chaperon [47]



5. ábra. Az UPR során aktiválódó legfontosabb folyamatok [48]

Amikor a nem megfelelően hajtogatott fehérjék felhalmozódnak az ER lumenében, a GRP78 chaperonok disszociálnak a receptorukról és az éretlen fehérjékhez kötődnek. A receptorok e folyamat révén aktiválódnak és beindítják az UPR-t. Az UPR elsődleges célja a normál ER funkció helyreállítása, a sejt megmentése [49]. Amikor az UPR nem tudja helyreállítani az ER egyensúlyát, és kivédeni a stresszt, akkor beindul a programozott sejthalál.

Az ER-stressz által indukált apoptózis 3 fázisra osztható (az iniciáció, elköteleződés az apoptózis irányába és a végrehajtás). A kezdeti fázisban központi szerepet játszanak a korábban már említett PERK, ATF6 és IRE1 transzmembrán receptorok. Először a PERK aktiválódik, majd az ATF6 és végül az IRE1.

PERK: a GRP78 chaperon disszociációja a receptor dimerizációját és autofoszforilációját eredményezi. Az aktiválódott PERK foszforilálja az eukarióta iniciációs faktor 2α alegységét (eIF2α), ami egy GTP-kötő fehérje. Normális esetben a GDP eltávolításához és a GTP kötéséhez egy segítő fehérje, az eIF2β szükséges. Az eIF2α foszforilálódása meggátolja az eIF2β GDP/GTP cserélő funkcióját és így gátolja a „cap-dependent” úton keletkező fehérjék transzlációját.

Ezzel ellentétben a „cap-independent” úton keletkező fehérjék, mint az ATF4 és a CHOP, fokozott mértékben fognak termelődni e folyamat hatására. Az újonnan szintetizált ATF4 a magba transzportálódik, ahol olyan fehérjék (pl. CHOP, GADD34, ATF3) transzkripcióját indukálja, melyek az ER-homeosztázis helyreállítását segítik.

Az eIF2α foszforilációján keresztüli transzlációs kontroll mechanizmus az ER-stressz érzékelése után rövid időn belül (néhány perc) kifejti hatását, míg az IRE1 és ATF6 molekula általi transzkripciós szabályozás csak néhány óra után jelentkezik.

ATF6: két Golgi-lokalizációs szekvenciát tartalmaz, melyek egyikéhez a GRP78 kapcsolódik. Az ER-stressz során szabaddá vált ATF6 a Golgi apparátusba transzportálódik, ahol limitált proteolízissel egy citoszólikus fragmentum keletkezik belőle, mely transzkripciós faktorként működik. Az ATF6 tisztán túlélést elősegítő molekula, az általa kiváltott folyamatok teljes mértékben az ER-stressz ellensúlyozását szorgalmazzák. Az aktivált ATF6 transzkripciós faktor az ATF/CRE elemekhez, illetve „ER stress response" elemekhez képes kapcsolódni és ezáltal fokozni az ER chaperonok (GRP78, GRP94, PDI), a CHOP transzkripciós faktorok szintézisét, a lipogenézist valamint az XBP1 szintézisét, mellyel az IRE1-nek szolgáltat szubsztrátot és az UPR pozitív visszacsatolását biztosítja. Az aktív XBP1 keletkezéséhez mRNS-ének hasításon kell átesnie, amihez szükség van az aktivált IRE1 jelenlétére.

IRE1: A citoszol felé néző doménjein Ser/Thr protein kináz és RN-áz aktivitással rendelkezik. A GRP78 a lumen felőli oldalon lévő oligomerizációs doménjéhez kapcsolódik, a chaperon leválása után az IRE1 dimerizálódik és autofoszforilálódik, aminek hatására beindul RN-áz aktivitása és elhasítja az előbb említett XBP1 mRNS-ét.

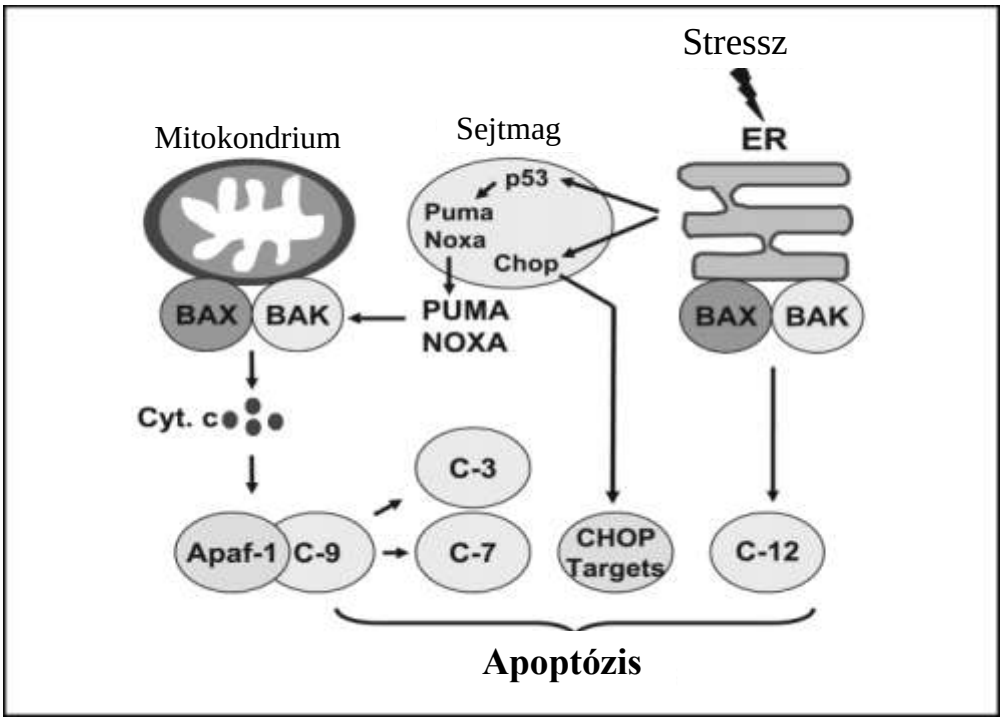
Az így hasított mRNS által kódolt XBP1 fehérje a magban fejti ki hatását, adott DNS szekvenciákhoz, az „UPR element"-ekhez képes kötődni és indukálni számos chaperon és a PERK-inhibitor P58 átíródását [50]. A P58 negatív feed-back révén csökkenti a PERK hatását, így képes mérsékelni a fehérjék transzlációjának gátlását.

A P58 megjelenése akár az UPR végét is jelezheti. Ha az UPR sikeres volt, az ER ismét megfelelően fog működni. Azonban előfordulhat, hogy az ER-stressz perzisztál, ilyenkor a P58 által mérsékelt transzlációs blokád révén bizonyos pro-apoptotikus faktorok szintézisére nyílik lehetőség.

1.4.1. ER-stressz eredetű apoptózis

Az UPR kezdetekor aktiválódó jelpályák igyekeznek megszüntetni az ER-stresszt. Ha azonban az UPR nem tudja kijavítani a hibákat, és az ER-stressz perzisztál, akkor többféle jelpálya útján is apoptózishoz vezető folyamatok indulnak meg (**6. ábra**). Az

apoptózis irányába való elköteleződést a CHOP és JNK faktorok megjelenése jelzi. Végső soron a különböző transzkripciós faktorok, kinázok és a Bcl-2 család tagjai a kaszpáz kaszkád aktiválásán keresztül sejthalálhoz vezetnek.



6. ábra. ER-stressz eredetű apoptózis

Az ER-stressz során aktiválódó proapoptotikus Bax/Bak aktiválja a kaszpáz-12-t (C-12). Az ER-stressz transzkripciós szinten fokozza a Puma, Noxa – csak BH3 domént tartalmazó fehérjék – expresszióját a p53 révén. A Puma és a Noxa aktiválja a citokróm c (cyt. c) felszabadulását a mitokondriumból a Bak/Bax által. A citokróm c aktiválja a kaszpáz-9-et (C-9), amely aktiválja az effektor kaszpázokat: a kaszpáz-3-at (C-3) és a kaszpáz-7-et (C-7). Emellett az ER-stressz fokozza a CHOP transzkripciós faktort expresszióját. **[51]**

Az ER-stressz során aktiválódó az IRE1 és PERK aktiválja a pro-apoptotikus JNK-t [52]. Az ER-stressz ezeken túl az ER membrán citoplazmatikus oldalán található prokaszpáz-12 proteolízisét, a kaszpáz-12 aktiválódását is fokozza [53].

Az ATF4, ATF6 és XBP1 transzkripciós szinten fokozzák a CHOP expresszióját [54]. A CHOP/GADD153 csökkenti az anti-apoptotikus Bcl-2 szintjét, míg a proapoptotikus Bax és Bak fehérje valamint a TRB3 („tribbels related protein”) expresszióját fokozza, e mellett aktiválja a GADD34-t, és az ERO1α-t (ER oxidáz) [55].

A GADD34 protein foszfatáz 1 (PP1)-gyel kölcsönható fehérje, amely a PP1-gyel kapcsolódva az eIF2α defoszforilációját okozza, ezáltal megszünteti a transzlációs blokkot [56]. A GADD34 megjelenése korrelál az ER-stressz súlyosságával és overexpressziója az apoptózis felé való elköteleződést jelzi [57].

Egy másik gén, melyet a CHOP indukál: a TRB3. A TRB3 a túlélést elősegítő szerin/treonin kináz Akt-hoz kötődik, és foszforilációjának a gátlásával csökkenti a kináz aktivitását, így az apoptózis felé irányítja a sejtet. A TRB3 az átmeneti ER-stressz során a túlélést elősegítő szerepet tölt be, a CHOP pro-apoptotikus aktivitását gátolja, és a normál sejtfunkció helyreállítását szorgalmazza. A perzisztáló ER-stressz során azonban már pro-apoptotikus funkciója kerül előtérbe [58].

A Bcl-2 család szerepére a mitokondriális eredetű apoptózison túl az ER eredetű apoptózis kiváltásában először 1996-ban derült fény Distelhorst és McCormick révén [50]. A CHOP overexpressziója fokozza a proapoptotikus Bax aktiválását és mitokondriumba való transzlokációját. A JNK az ER membránjához kötött Bcl-2-t foszforilálja, ezáltal meggátolja annak inhibitor hatását a proapoptotikus csak BH3 domént tartalmazó fehérjékre. A csak BH3 domént tartalmazó fehérjék közül a folyamatban a legfontosabbak: a PUMA („p53-upregulated modulator of apoptosis), Noxa és Bim. A JNK, CHOP és a csak BH3 domént tartalmazó fehérjék hatása a Bcl-2 család tagjaira végső soron a Bax, Bak aktiválásán keresztül a kaszpáz kaszkád aktiválódását eredményezik és ezen keresztül sejthalálhoz vezetnek [48].

A kaszpázok közül az ER eredetű apoptózis kiváltásában legnagyobb jelentőséget a kaszpáz-12-nek tulajdonítanak [59]. A kaszpáz-12 egerekben fordul elő, emberben a kaszpáz-4-nek tulajdonítanak ehhez hasonló jelentőséget.

1.5. Glikoproteinek

A glikoproteinek olyan oligoszacharid oldalláncot (glikán) tartalmazó fehérjék, melyek szénhidrátkomponense kovalensen kötött. Szénhidráttartalmuk igen széles határok között változhat, a molekula tömegének 1- 85%-t adhatja. A glikoproteinek a legtöbb organizmusban megtalálhatók a baktériumoktól az emberig, és emellett számos vírus is tartalmaz glikoproteineket.

Az oligoszacharid egységek a polipeptidlánchoz egy aszparagin oldalláncon N-glikozidos kötéssel vagy szerin/treonin oldalláncon O-glikozidos kötéssel kötődnek. Az N-glikozidos kötések az ER lumenében alakulnak ki. Az erre kijelölt enzimek hidrolizálják az oligoszacharid egység végén lévő három glukóz alegységet és egy mannóz alegységet, ezt követően a fehérjék továbbítódhatnak a Golgi apparátusba. A Golgi komplexben az oligoszacharid egységek további módosulásokon mennek keresztül, és itt alakulnak ki az O-glikozidos kötések. Itt történik továbbá a fehérjék válogatása és rendeltetési helyük felé irányítása [17].

A glikoproteinek funkciójának sokféleségét az **1. táblázat** részletezi.

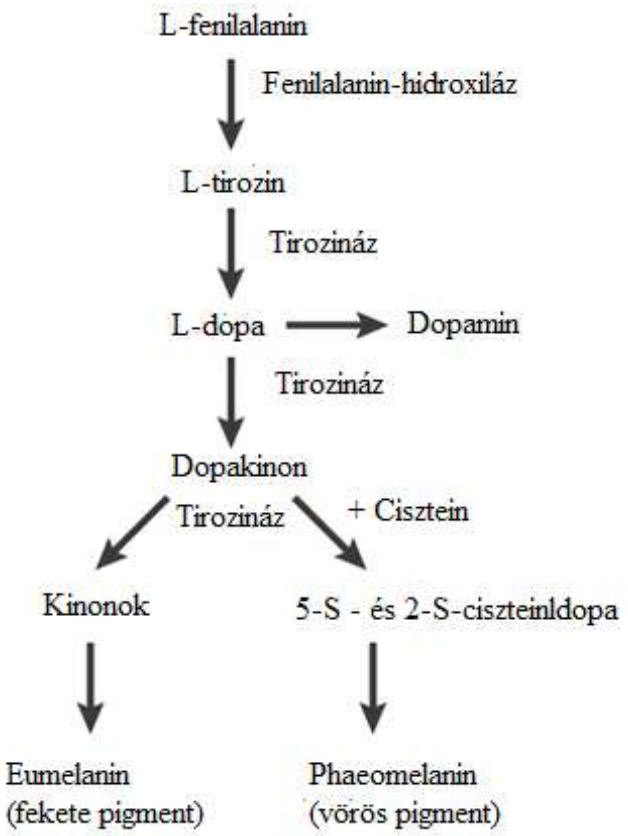
Funkció	Glikoproteinek
Struktúrfehérjék	Kollagén
Protektív és lubrikens ágens	Mucin
Transzportfehérje	Transzferrin, coeruloplazmin
Immunomolekulák	Immunoglobulinok, hisztokompatibilitási fehérjék
Hormonok	Humán chorio-gonadotropin (HCG), thiroid-stimuláló hormon (TSH), alfa-fetoprotein (AFP), eritropoetin (EPO), vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (VEGF)
Enzimek	tirozináz, alkalikus foszfatáz (ALP)
Sejtkapcsolatok - felismerő struktúrák	sejt-sejt, vírus-sejt (pl. gp120), baktérium-sejt, hormon-sejt kapcsolatokért felelős glikoproteinek
Receptorok	VEGF-receptor (VEGFR), TSH-receptor (TSHR)
Dajkafehérjék	kalnexin, kalretikulin

1. táblázat. A glikoproteinek funkciói [60]

A legtöbb membánfehérje és a szekrécióra kerülő fehérjék többsége – pl. az albumin kivételével szinte az összes humán plazmafehérje – glikoprotein. A vércsoportot meghatározó fehérjék és bizonyos hormonok (pl. VEGF, chorio-gonadotropin) szintén glikoproteinek. A glikoproteinek jelentőségét bizonyítja továbbá az is, hogy a daganatos sejtek felszínén a változó glikoprotein mintázatnak szerepe van a metasztázisok kialakulásában. Munkánk során két glikoprotein, a tirozináz és a VEGF termelődésével és lebomlásával foglalkoztunk.

1.5.1. Tirozináz

A tirozináz membránhoz kötött, réztartalmú polifenol-oxidáz, amely a melaninszintézis sebességmeghatározó lépését (az L-tirozin hidroxilációját Dopává, majd a Dopa oxidációját dopakinonná) katalizálja a melanoszómában [61] (**7. ábra**).



7. ábra. A tirozináz szerepe a melanin szintézisében [62]

A tirozináz egyláncú polipeptidként 6 N-glikozilációs oldallánccal rendelkezik, melyek közül három igen közel helyezkedik el az aktív helyhez. Az oligoszacharid láncok kitüntetett szerepére utal, hogy szerkezetük az evolúció során gyakorlatilag nem változott [63], továbbá hogy elvesztésükkel az enzim funkciója is megszűnik [64].

A tirozináz a melanociták ER-jében szintetizálódik, ahol számos ko- és poszttranszlációs módosításon és minőségellenőrzésen (kalnexin-kalretikulun cilus) megy keresztül, amíg el nem éri megfelelő konformációját. Homodimerek formájában, COPII vezikulákban jut a Golgi apparátusba, ahol az N-glikánokról a mannozidáz I-II

mannóz alegységeket hasít le és további komplex oligoszacharid láncok kapcsolódnak az enzimhez. Itt történik a rézionok kötődése is az enzim aktív centrumához. A fehérjék melanoszómákba irányításáért a fehérje C-terminális végén található dileucin motívum felelős, melyet az adaptor protein 3 (AP-3) ismer fel; de a tirozináz érésében és célba juttatásában a „tyrosinase related protein" (Tyrp1) és a „membran-associated transporter protein" (MATP) is szerepet játszik [65,66].

A tirozináz enzimet több kísérletben alkalmazták már a glikoproteinek érésének modelljeként [67,68]. A glukozidázgátló N-butil-deoxinojirimicin hatása pl. kiválóan demonstrálható egér melanóma sejtek tirozináztermelésének detektálásával [69].

1.5.2. VEGF

A VEGF („vascular endothelial growth factor") egy 45 kDa molekulatömegű homodimer glikoprotein [70], melynek központi jelentősége van az angiogenézis szabályozásában. A VEGF expresszióját elsősorban a HIF1α („hypoxia inducible factor") – a hipoxiához való alkalmazkodásban kulcsszerepet játszó transzkripciós faktor – szabályozza. A HIF1α konstitutívan termelődik, de normoxiás körülmények között a proteaszómában gyorsan lebomlik, mivel folyamatosan hidroxilálódik a HIF1α-prolil-hidroxilázok által (ezek koszubsztrátja az oxigén), majd a pVHL (von Hippel Lindau) ubikvitin-ligáz ubikvitinálja. A prolil-hidroxiláz működéséhez oxigénre is szükség van, ezáltal ez az enzim mint oxigénszenzor működik. Hipoxiás körülmények között az enzim működése gátolt, így a HIF1α mennyisége megsokszorozódhat [71]. A HIF1α által szabályozott gének olyan fehérjéket kódolnak, melyek segítenek alkalmazkodni a hipoxiás körülményekhez: fokozzák az anaerob metabolizmust, és elősegítik az angiogenézist, valamint serkentik a glikolízist.

A pVHL ubikvitin-ligáznak fontos szabályozó szerepe van ezekben a folyamatokban. Az enzim mutációja okozza a VHL betegséget, mely a VEGF overexpressziójával, haemangioblasztómák, phaeochromocitómák kialakulásával jár.

Az angiogenézis elengedhetetlen a szolid tumorok növekedéséhez és a metasztázisok kialakulásához. A legújabb kutatások szerint az angiogenézisre kifejtett hatásán túl a VEGF-nek szerepe van a tumoros őssejtek fenntartásában is [72]. A VEGF és a VEGF receptorainak gátlása mindezek alapján ígéretes tumorellenes terápiás

célpontnak tekinthető [73,74]. Számos tanulmány igazolja, hogy az EGCG megzavarja a VEGF angiogenézisre kifejtett hatását [75,76], de a pontos mechanizmusok még tisztázásra várnak.

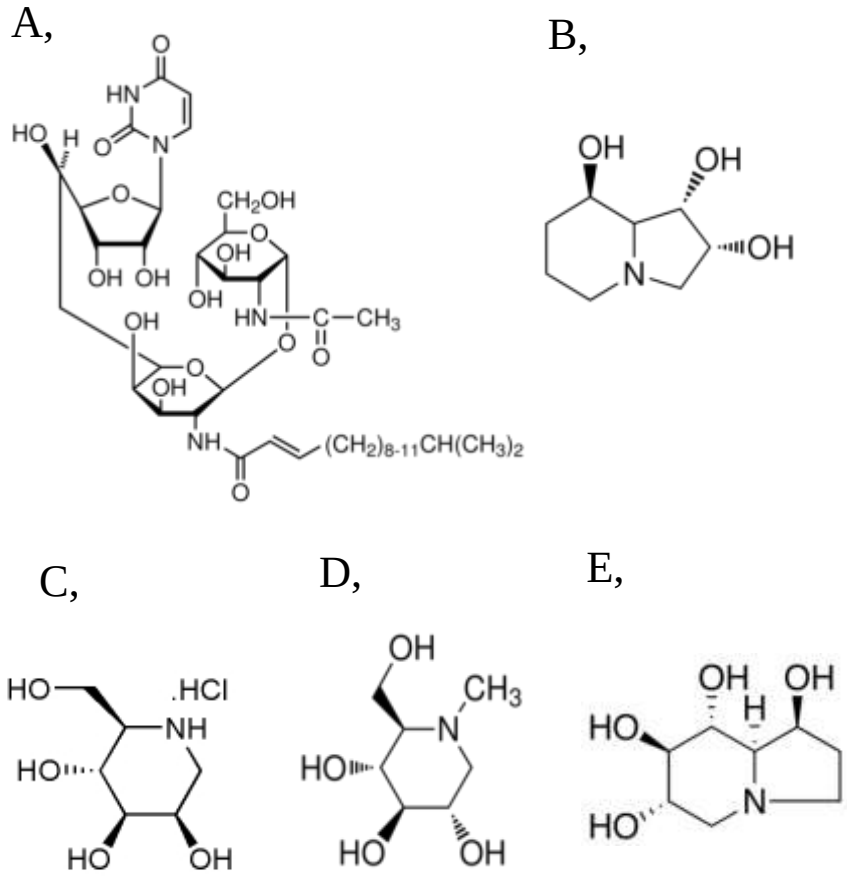
1.6. A glikánok, glikoproteinek érésének a gátlása mint tumorellenes mechanizmus

A sejtek malignizálódása során a sejt felszínén található glikánmintázat megváltozik, aminek fontos szerepe van a sejtek közötti, és sejt-mátrix közötti kapcsolatok, a migráció és apoptózis kialakulásában [77]. A glikoproteinek közé tartoznak olyan fontos hormonok és receptorok is, mint a VEGF és a VEGFR, melyeknek közvetlen szerepük van a metasztázisok kialakulásában, a tumorok növekedésében. A glikoproteinek expressziójának befolyásolása tehát ígéretes tumorellenes mechanizmus lehet.

Inhibitor	**Hatás**
Tunikamicin	GlcNAc-P transzferázt gátolja, ami a GlcNAc áthelyezését katalizálja a dolikol-P-ra, ami az oligoszacharid-P-P-dolikol bioszintézisének első lépése
Deoxinojirimicin	Glukozidáz I-II-t gátolja
Swainsonin	Mannozidáz II-t gátolja

2. táblázat. Glikoproteinek érését befolyásoló vegyületek [60]

Több vegyület ismert, melyekkel a glikoproteinek érése befolyásolható. A tunikamicin, deoxinojirimicin és a swainsonin ezek közül a legismertebbek. Hatásukat a **2. táblázat** foglalja össze.



8. ábra. A glikoprotein-érés gátlószereinek szerkezete:
A) Tunikamicin; B) Swainsonin; C) 1-Deoximannojirimicin-hidroklorid;
D) N-Metil-1-deoxinojirimicin; E) Castanospermin

A korábban említett tunikamicin, swainsonin és deoxinojirimicin különböző pontokon gátolja a glikoproteinek érését. A tunikamicin az N-acetil-glukózamin-foszfotranszferázt gátló antibiotikum. Az enzim az N-glikoproteinek érésének kezdeti lépéseként az N-acetil-glukózamin-foszfát áthelyezését katalizálja az UDP-N-acetil-glukózaminról a dolikol-foszfátra. A tunikamicin tehát az N-glikoproteinek érésének kezdeti lépését gátolja [78]. A swainsonin (1,2,8-Oktahidro-indolizidinetriol) a különböző α-mannozidázokat gátolja, elsősorban az α-mannozidáz II-t [79] és így befolyásolja a glikoproteinek érését [80]. Az 1-deoximannojirimicin-hidroklorid (1,5-dideoxi-1,5-imino-d-mannitol hidroklorid) szelektíven gátolja a Golgi apparátusban található α1-2 mannozidázt [81]. Az N-metil-1-deoxinojirimicin (1,5-dideoxi-1,5-imino-

1-metil-D-szorbitol) a glukozidáz I és II enzimeket gátolja [82]. A Castanospermin a glukozidáz I enzim specifikus gátlószere [83]. A gátlószerek képletét a **8. ábra** mutatja.

Több tanulmány foglalkozik a glikoproteinek érésének befolyásolásán keresztüli tumorellenes hatással. De Freitas és munkatársai az N-glikán bioszintézis gátlószereinek, a swainsoninnek és tunikamicinnek a hatását vizsgálták *in vitro* humán kolorektális karcinóma sejteken. Eredményeik alapján az N-glikán-bioszintézis gátlása fokozza a kemoterápiás szerek hatékonyságát [84]. Emellett kimutatták, hogy az N-glikoziláció tunikamicin általi gátlása fokozza az E-kadherin mediált sejt-sejt adhéziót és gátolja a differenciálatlan karcinóma sejtek proliferációját a [85]. A swainsonin, a Golgi α-mannozidáz kompetitív inhibitora a tunikamicinnél kevésbé toxikus szer. Állatkísérletek során bizonyították, hogy a swainsonin mind *per os*, mind parenterális alkalmazásban csökkentette a tumorok növekedését, gátolta a metasztázisok kialakulását, és növelte a túlélés időtartamát a sebészi tumoreltávolításon átesett egereknél [86,87]. A swainsonin a humán melanóma MeWo tumor xenograftok növekedését is gátolta egerekben [88]. Klinikai fázis I vizsgálatok során a swainsonin leggyakoribb és legsúlyosabb mellékhatásai a perifériás ödéma, májenzimek emelkedése, légzészavar voltak [89]. A fázis II vizsgálatok során a GD0039 (*per os* adható Golgi alfa-mannozidáz II inhibitor) nem váltotta be a hozzáfűzött reményeket, 17 betegnél alkalmazták előrehaladott vesesejtes karcinómában, a kezelést mind a 17 esetben abba kellett hagyni a súlyos mellékhatások vagy a betegség progressziója miatt [90]. Az N-oktil-1-deoxinojirimicin esetében az angiogenézis gátlását írták le, valamint a tüdő karcinóma sejtek sejtfelszíni oligoszacharid mintázatának megváltozását, ami a sejtek növekedésének gátlásához, a sejtciklust G1 fázisban való megállításához és apoptózishoz vezetett [91]. Az N-butil-deoxinojirimicin a gangliozidmetabolizmus gátlásával késleltetette a tumorok kialakulását egér melanóma sejtekben [92]. Az N-glikoziláció gátlása tunikamicinnel befolyásolta az anaplasztikus limfóma kináz foszforilációját neuroblasztóma sejtvonalon, ezáltal megzavarta a túlélési szignál útvonalat [93].

1.7. A zöld tea

A tea a víz után a második legnagyobb mennyiségben fogyasztott ital a világon [94]. A távol-keleti országokban figyeltek fel először az „Ázsia Paradoxonnak”

(egészségtelen életmód ellenére alacsony a rákos megbetegedések, valamint szív- és érrendszeri betegségek előfordulási gyakorisága) nevezett jelenségre [95]. A hipotézis szerint mindez a rendszeresen fogyasztott zöld teában található katekineknek köszönhető. A katekinek, akárcsak a vörösborban található resveratrol, a polifenolok csoportjába tartozó vegyületek. Érdemes említést tenni a mediterrán országokra jellemző „Francia Paradoxon"-ról is, melynek hátterében napjainkra bizonyossá vált a vörösborfogyasztással összefüggő magas polifenolbevitel szerepe [96].

A tea ital alapanyagát, a *Camellia sinensis* örökzöld növényt időszámításunk előtt 3000 évvel fedezték fel Kínában. Japánba a buddhista szerzetesek juttatták el évezredekkel ezelőtt. Egy japán Zen szerzetes már 1211-ben könyvet írt „Kitcha-Yojoki" (Tea egészségmegőrző hatása) címmel a tea jótékony hatásairól és a teakészítés módjáról [97].

A teanövény feldolgozása során első lépésként hervasztják (fonnyasztják) a tealeveleket, melyek a vízvesztés által sodorhatóvá válnak. A sodrás során a levél sejtfalai felszakadoznak, és a sejtnedvek a levél felületére kerülnek, ahol a levegővel érintkezésbe lépve megindulnak a fermentációhoz szükséges kémiai folyamatok. A művelet hagyományos eszközei a teasodró asztalok. A fermentálás során a növényi enzimek – elsősorban a polifenol-oxidáz – alakítják ki azokat a vegyületeket, melyek a fekete tea jellegzetes ízét adják. A fermentálás elnevezés egyébként félrevezető, mert a folyamatot nem mikroorganizmusok váltják ki [98]. A fermentáció során az egyszerű polifenolokból/katekinekből kinonok keletkeznek és ezek egymással reagálva teaflavinokat és tearubigineket alkotnak. A tealevelek feldolgozásának utolsó lépése a szárítás, mely során a víztartalom 60%-ról 4% alá csökken, és az enzimek inaktiválódnak.

A zöld tea készítése során a fermentáció helyett a tealeveleket hevítik, melynek többféle módja ismert – Kínában forró vaslábosban pörkölik percekig, míg Japánban 15-20 másodpercig gőzölik a tealeveleket. A hűtés-hevítés-sodrás folyamatát többször ismétlik, végül a teát kiszárítják. A gőzölés vagy pörkölés legfontosabb biokémiai következménye, hogy a polifenol-oxidáz enzim elveszti aktivitását, így a katekinek nem oxidálódnak, hanem eredeti állapotukban megmaradnak. Az oxidálatlan katekineknek köszönhetően fanyarabb a zöld tea a fekete teánál [99].

A feldolgozás módjai szerint három fő teatípust különböztethetünk meg: a nem-fermentált (zöld), a részlegesen fermentált (oolong és sárga) és a fermentált (fekete és vörös) teákat. A tea mindhárom formája 3-6%-ban tartalmaz koffeint, mert a koffeintartalom a tealevelek feldolgozási módjától független.

1.7.1. A tea hatóanyagai

A teában található különböző anyagok mennyiségét a tealevelek feldolgozási módján túl az éghajlat, a vízellátottság és a kertművelés módja is befolyásolja [100,101].

Összetevő	Zöld tea	Fekete tea
Fehérje	15	15
Aminosavak	4	4
Rostok	26	26
Szénhidrátok	7	7
Lipidek	7	7
Pigmentek	2	2
Ásványi anyagok	5	5
Fenolos vegyületek - flavonoidok	30	5
Oxidált fenolos vegyületek - tearubigin, teaflavin	0	25

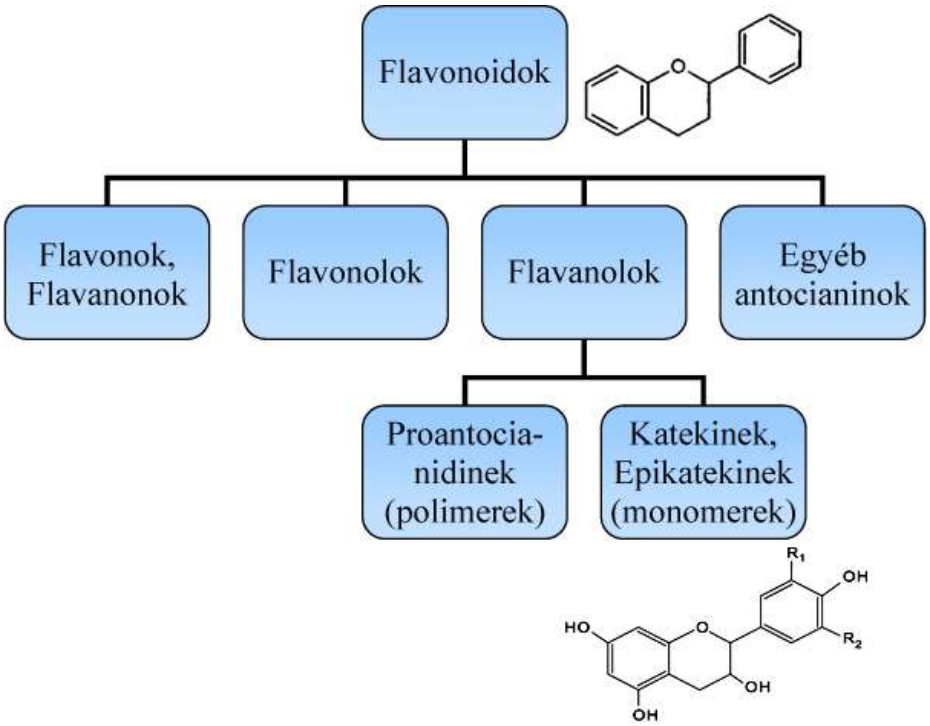
3. táblázat. A zöld és fekete tea fő összetevői a szárazanyag-tartalom százalékos megoszlása szerint [97]

A tealevél fehérjéket, aminosavakat (teanin, 5-N-etilglutamin, glutaminsav, triptofán, glicin, szerin, aszpartánsav, tirozin, valin, leucin, treonin, arginin, lizin), szénhidrátokat (cellulóz, pektin, glukóz, fruktóz, szukróz), ásványi anyagokat (Ca, Mg, Cr, Mg, Fe, Cu, Zn, Mo, Se, Na, P, Co, Sr, Ni, K, F), pigmenteket (klorofill, karotinoid), lipideket (linolénsav), szterolokat (sztigmaszterol), vitaminokat (B, C, E, K), xantin vegyületeket (koffein, teofillin) és polifenolokat tartalmaz (**3. táblázat**).

1.7.1.1. Polifenolok – flavonoidok – katekinek

A tea, valamint a gyümölcsök, zöldségek, csokoládé és bor igen jelentős polifenoltartalommal rendelkezik. A zöld teában a polifenolok közülük elsősorban a flavonoidok vannak jelen.

Több mint 8000 természetes polifenol vegyület ismert, és ezek közül több mint 4000 flavonoid vegyületet azonosítottak [102]. Habár a polifenolok kémiailag fenol szerkezettel rendelkező vegyületként jellemezhetők, mégis számos tulajdonságban eltérnek egymástól. A polifenolok többféle módon csoportosíthatók: származási hely, biológiai funkció és kémiai szerkezet szerint. Kémiai szerkezet szerint megkülönböztethetünk polifenol-savakat, polifenol-amidokat, flavonoidokat és az előbbi csoportokba nem besorolható egyéb polifenolokat (pl. resveratrol).



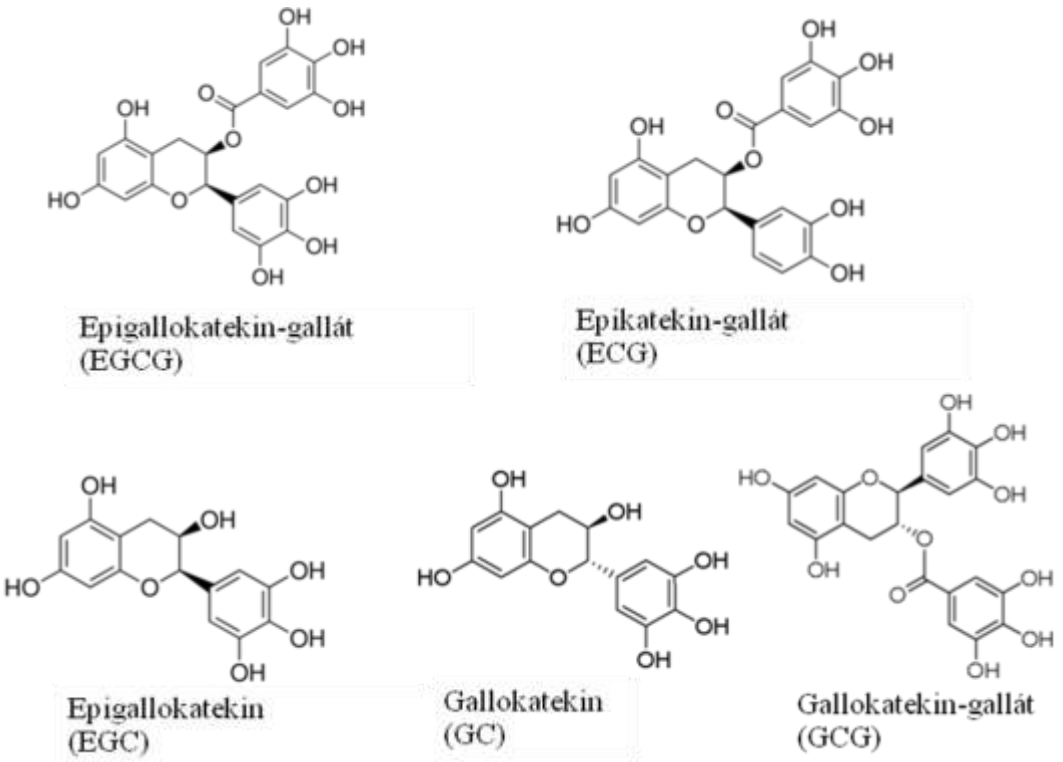
9. ábra. A leggyakoribb flavonoidok felosztása és szerkezete [103]

A flavonoidokra, az egyik legjelentősebb polifenol csoportra a C6–C3–C6 általános szerkezet jellemző, melyben az “A” és “B” heterociklusos gyűrűt két fenolos

C6 alegység alkotja. Az “A” és “B” gyűrűt összekötő “C” gyűrű hidroxiláltsági mintázata pedig meghatározza a flavonoidok további alcsoportjait: flavanolok, flavonok, flavonolok, flavanonok, izoflavonok és antocianidinek (**9. ábra**).

A flavonoidok az alapszerkezeten túl oligoszacharid oldalláncokat is tartalmaznak. A biológiai aktivitás – mint pl. az antioxidáns tulajdonságok – szempontjából mind a szerkezeti tulajdonságok, mind a glikozilációs mintázat fontosak (Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols Rong Tsao 2010)

A fekete tea polifenoltartalma mindössze 3-10%. Ezzel szemben a zöld tea szárazanyagtartalmának 30-42%-át a katekinek teszik ki. Többféle katekin található a zöldteában: az epikatekin (EC), epikatekin-3-gallát (ECG), epigallokatekin (EGC), epigallokatekin-3-gallát (EGCG), katekin és gallokatekin (GC) (**10. ábra**). A legjelentősebb katekin az EGCG, ami a katekin tartalom 50-65%-t adja. A katekin és gallokatekin csak nyomokban fordul elő benne [104]. Egy pohár zöld tea – ami 2,5 g tealevélből készül 200 ml vízben – átlagosan 90 mg EGCG-t tartalmaz [105].



10. ábra. A zöld teában található legjelentősebb katekinek szerkezete

1.7.2. A zöld tea egészségre gyakorolt jótékony hatásai

A zöld tea – elsősorban fő hatóanyagának, az EGCG-nek köszönhetően – tumorellenes, elhízásellenes, ateroszklerózist megelőző, antivirális, antibakteriális, antidiabetikus hatásokkal rendelkezik [97]. A teakatekinek antioxidáns tulajdonsága jól ismert. A polifenolok eliminálják a reaktív oxigén gyököket (ROS), mely magyarázza szerepüket a ROS-sal összefüggő betegségek (kardiovaszkuláris, neurodegeneratív betegségek, rosszindulatú daganatok) megelőzésében. A zöld tea koleszterinszint csökkentő is, gátolja az ateroszklerotikus plakkok kifejlődését, illetve a plakkok további növekedését [106,107]

A zöld tea a neurodegeneratív betegségekkel szemben is védelmet nyújthat [108]. Állatkísérletek során bizonyították, hogy az EGCG gátolja a substantia nigraban a dopaminerg neuronok pusztulását és segít fenntartani a szükséges striatalis dopamin szintet, így megakadályozhatja a Parkinson-kór kialakulását [109].

Emellett szerepe lehet az Alzheimer-kór megelőzésében, illetve az Alzheimer-kór progressziójának lassításában is a plazminogén aktivátor inhibitor inaktiválásán keresztül [110]. Epidemiológiai bizonyíték ugyan nincs rá, de állatkísérletek és különböző sejtkultúrákon végzett vizsgálatok alátámasztják ezt a hatását. *In vitro* kísérletek eredményei igazolják, hogy az EGCG megvédi a hippocampus neuronsejteket a β-amiloid neurotoxikus hatásától [111,112]. Ezt egyrészt antioxidáns tulajdonságaival magyarázzák, másrészt az EGCG gátolja a neurotoxikus β-amiloid kialakulását az amiloid prekurzor proteinből (APP) [113,114]

A zöld tea antidiabetikus hatásokkal is rendelkezik. Egy csoport önkéntest vizsgálva azt találták, hogy a tea fogyasztása növeli a glukóztoleranciát [115]. A hosszú időn át adagolt teaextraktumok növelték az inzulinérzékenységet patkányokban. *In vitro* kísérletek során kimutatták, hogy a zöld tea hatóanyagai növelik az adipociták inzulinérzékenységét és fokozzák a glukóz felvételét a sejtekbe. Az EGCG bizonyult a legaktívabb katekin származéknak az előbb említett antidiabetikus hatások kiváltásában [116].

Nem obez, diabeteses egereknél megfigyelték, hogy az EGCG-kezelés az 1-es típusú diabetes mellitus kialakulásának esélyét jelentősen csökkentette, és az EGCG-vel kezelt csoportban magasabb szérum inzulinszinteket mértek, emellett jobb volt az egerek túlélési aránya is [117].

A zöld tea jótékony hatásai közé sorolhatjuk antibakteriális, anti-inflammatorikus tulajdonságait. A teafogyasztás ismerten gátolja a fogszuvasodást. Nemrégiben kimutatták, hogy az EGCG gátolja a HIV fertőzés [118] és MRSA (meticillin rezisztens Staphylococccus aureus) fertőzés kialakulását is [119,120]. Az EGCG gátolja a HIV-1 vírus replikációját, aminek hátterében valószínűleg a HIV reverz transzkriptáz gátló hatása áll [121]. Továbbá kimutatták, hogy az EGCG megakadályozza a HIV-1 virion gp120 kötődését a T helper sejtek felszínén található CD4 molekulákhoz, ami a HIV fertőzés ismert kezdeti lépése [122,123]

1.7.2.1. A zöld tea és a rák

A zöld tea jótékony tulajdonságai közül tumorellenes hatásai a legismertebbek és leginkább tanulmányozottak. Mind az állatkísérletek, mind a humán vizsgálatok egyértelműen bizonyították a teakatekinek kemopreventív tulajdonságait [124-127]. A tudományos irodalmat áttekintve több mint 1600 publikáció foglalkozik a zöld tea tumorellenes, elsősorban kemopreventív hatásaival.

Bizonyított, hogy a teakatekinek és metabolitjaik *per os* fogyasztást követően a gastrointestinalis traktusból hatékonyan felszívódnak. Egy csésze zöld tea elfogyasztását követően azonban a katekinek szérumszintje csak μM-os vagy nM-os nagyságrendű koncentrációkat ér el. Ez a viszonylag alacsonyabb szérumkoncentráció annak a következménye, hogy a katekinek nagyobb részének polifenol gyűrűje már a bélrendszerben a mikroflóra hatására felhasad, míg egy a másik része gyorsan metabolizálódik (főként) a májban és ennek eredményeképpen glukuronid/szulfát konjugátumok keletkeznek [128].

A zöldteából már évekkel ezelőtt extraktumot készítettek, mely Polyphenon E néven ismert. Azóta több klinikai vizsgálatot végeztek, és jelenleg is több kutatás van folyamatban – gyógyszerkísérletek II-III-as fázisában. Az I-es fázisú vizsgálatok során megállapították, hogy naponta 2 x 2000 mg Polyphenon E dózis jól tolerálható, és 1 hónap EGCG kezelést követően az EGCG elérhető szérumszintje 3974 ng/ml, míg átlagos koncentrációja 40,4 ng/mL volt. Az egyik klinikai vizsgálat során a krónikus lymphoid leukémiában szenvedő betegek többségénél az EGCG hatására jelentősen csökkent az összlimfocita szám és mérséklődött a limfadenopátia, mely ígéretes

eredménynek tűnik, de a II-es fázisú gyógyszervizsgálatok még folyamatban vannak [129].

Állatkísérletek azt mutatták, hogy a zöld tea és az EGCG képes gátolni a karcinogenezis minden stádiumát (iniciáció, promoció, progresszió) [130]. A zöld tea tumorellenes hatásait elsősorban antioxidáns, antiproliferatív és apoptózist kiváltó tulajdonságaival magyarázzák [131]. Emellett ismert még az angiogenezist valamint a metasztázisok kialakulását gátló hatása is [132,133].

A zöld tea hatékonynak bizonyult mind *in vivo*, mind *in vitro* modelleken a metasztázisok kialakulásának a megelőzésében [134]. Ennek a tulajdonságának hátterében több mechanizmust kimutattak. Isemura és munkatársai már 1993-ban leírták, hogy az EGCG gátolja a tumorsejtek kapcsolódását az endothelialis sejtekhez [135]. Emellett az EGCG gátolja, hogy a tumorsejtek a bazálmembrán két fő alkotójához, a fibronektinhez vagy lamininhez kötődjenek, valószínűleg így előzve meg a metasztázisok kialakulását [136,137]. A zöld tea gátolja a metallo-proteinázokat is; ez a hatás szintén akadályozza a tumoros sejtek megtapadását [138].

Önkénteseken végzett prospektív, kohort vizsgálat alapján kimutatták, hogy a naponta zöld teát fogyasztók között kisebb volt a daganat kialakulásának esélye [139]. A daganatos betegeknél a zöld tea fogyasztása csökkentette a betegség kiújulásának esélyét, illetve növelte a betegségmentes időszakot [140]. A humán papillomavírus fertőzés által kiváltott léziók kezelésében is hatékonynak bizonyult az EGCG kapszula (200 mg) alkalmazása [141].

Az EGCG számos előnnyel rendelkezik más kemoterápiás szerekkel szemben. Az EGCG teaként világszerte könnyen hozzáférhető, a teából olcsón ki lehet vonni, és *per os* szedhető, mert a béltraktusból felszívódik [142]. Míg a hagyományos tumorellenes szerek gyakran az egészséges sejteket is súlyosan károsítják a tumorsejtek mellett [143], addig úgy tűnik, hogy az EGCG olyan biokémiai és genetikai funkciókra van hatással, melyek specifikusan a tumoros sejtekre jellemzőek [144]. Ezért – a kemoterápiás szerek többségével ellentétben – az EGCG biztonsággal alkalmazható nagyobb dózisban is [145]. Ezek az előnyös tulajdonságok alátámasztják a további vizsgálatok és fejlesztések jelentőségét az EGCG mint új, lehetséges anti-karcinogén szer irányában.

1.7.2.1.1. A zöld tea mint kemopreventív szer

A kemoprevenció célja, hogy valamely kóros állapot kialakulását megakadályozza, késleltesse, vagy a megindult kóros szabályozások menetét a normális irányba terelje, esetenként visszafordítsa. A figyelem egyre inkább olyan természetes hatóanyagok felé terelődik, melyek kemopreventív tulajdonságokkal rendelkeznek, ezek közül is a legnépszerűbb természetes vegyületek a polifenolok.

A polifenoloknak több hatását kimutatták, mely hozzájárul kemopreventív tulajdonságaihoz. Több kísérletben igazolták, hogy az EGCG gátolja a sejtek transzformációját, gátolja a proliferációt, fokozza a programozott sejthalált [146]. Az EGCG a növekedési faktorok jelátviteli útvonalaira, illetve a sejtciklus és apoptózis szabályozásnak több pontjára is hatással van, ezeknek a hatásoknak az összessége hozzájárul az EGCG angiogenézis- és sejtproliferáció-gátló tulajdonságaihoz [147].

A tirozin-kináz receptoroknak központi szerepe van a sejtproliferációban. Az EGCG számos tirozin-kináz receptor (pl. IGF-1R és VEGFR2) működését gátolja [148].

Az EGCG gátolja a ciklindependes kinázokat és indukálja a ciklinfüggő-kináz-gátlókat (p21, p27) tumoros sejtvonalakon. Az EGCG emellett gátolja számos növekedési faktor jelátviteli útját a növekedési faktor receptorok közvetlen gátlásán vagy a jelátvitel egyéb pontjainak befolyásolásán keresztül [131]. Bizonyos transzkripciós faktorok működését is gátolja – mint az NF-κB-t és AP1-t. Az NF-κB egy oxidatív stresszre aktiválódó transzkripciós faktor, mely olyan gének expresszióját serkenti melyeknek a gyulladásos folyamatokban szerepük van. Az NF-κB és AP1 gátlás egy olyan központi jelenség, ahol a zöld tea katekinek antioxidáns tulajdonsága és a zöld tea egyéb molekulákra gyakorolt hatása összekapcsolódik, hiszen az EGCG antioxidáns tulajdonságai révén megelőzi az NF-κB aktivációját, de emellett NF-κB aktivációját közvetlenül is gátolja, ezáltal csökkenti a pro-inflammatorikus és anti-apoptotikus gének transzkripcióját [149].

Állatkísérletek során megfigyelték, hogy az EGCG számos karcinogén vegyület hatását képes ellensúlyozni – pl. a nitrózaminok indukálta oesophagus-, a metilnitrózurea indukálta colon-, a dietilnitrozamin indukálta tüdőkarcinóma és az UV sugárzás hatására megjelenő bőrrák kialakulását gátolta [126].

Japánban egy 8552 önkéntes bevonásával végzett prospektív kohort vizsgálat során bizonyították, hogy a zöld tea kemopreventív tulajdonságokkal bír számos daganat, így a gyomor-, tüdő-, colorectalis-, és májrák megelőzésének a tekintetében [150].

1.7.2.1.2. A zöld tea és az apoptózis

Az apoptózis vagy más néven programozott sejthalál jelentősége a tumoros sejtvonalak eliminálásában régóta ismert [151]. Először 1996-ban írták le Hibasami és munkatársai, hogy a katekinek fokozzák az apoptózist humán leukémia Molt 4B sejteken [152]. Azóta számos kísérlet bizonyítja az EGCG apoptózist kiváltó hatását tumoros sejtvonalakon. Ennek hátterében többféle mechanizmust is kimutattak: az EGCG fokozza a H_2O_2 keletkezését [153], gátolja a sejtciklust [154], gátolja az NF-κB aktivációját [155], aktiválja a mitogén-aktivált protein kináz kaszkádot [97,156]. Az EGCG közvetlenül kötődik a sejt felszínén a Fas receptorhoz, ezen keresztül aktiválja a halál-receptor jelátviteli útvonalat és apoptózist vált ki [157]. Az EGCG gátolja a foszfatidil-inozitol-3-kináz és a PKB/Akt aktivációját, ezen keresztül befolyásolja a Bcl-2 család fehérjéinek expresszióját T24 humán hólyagrák sejtvonalon [158]. Az EGCG megállítja a sejtciklust G1 fázisban és apoptózist vált ki a ROS és a kaszpáz-9, kaszpáz-3 aktiválódásán keresztül [159]. Az EGCG kezelés az S180 szarkóma sejtvonalon egyértelműen csökkenti a sejtciklus G_2/M fázisában lévő sejtek számát, fokozza a p53 és a proapoptotikus Bcl-2 fehérjék expresszióját, míg az antiapoptotikus fehérjék mennyisége csökken. A p21, p27, bcl-xl, mdm2 és ciklin D1 mennyiségét az EGCG kezelés nem befolyásolja [160]. Humán prosztata adenokarcinóma LNCaP sejtvonalon az EGCG a p53-függő Bax expresszióját fokozza, a Bax/Bcl-2 arányát az apoptózis irányába tolja el [161]. Az EGCG csökkenti az NFκB aktivációját, ezáltal gátolja az NFκB-indukálta kinázok expresszióját humán tüdőkarcinóma sejteken és csökkenti az antiapoptotikus Bcl-2 fehérje expresszióját is [162].

Az EGCG apoptózist kiváltó hatása koncentráció- és időfüggést mutat, a hatékony apoptózishoz egyes tanulmányok szerint 50 μM EGCG koncentráció és 24 órás kezelés már elégséges [163]. Az EGCG a tumoros sejtek apoptózisát fokozza, míg a normál sejtvonalakon ez a hatása nem figyelhető meg [164,165]. Több hipotézis létezik e

jelenség magyarázatára. Az EGCG által kiváltott apoptózis egyik fő mechanizmusa lehet az NFκB inaktivációja, az NFκB a tumoros sejtekben aktiválódik, ezért a normál sejtvonalon ez a hatás nem érvényesül [166]. Okada és munkatársai kimutatták, hogy a Hl-60 sejtek differenciálódását követően az EGCG nem vált ki fokozott apoptózist, ami szintén arra utal, hogy az EGCG specifikusan a tumoros sejtekre fejti ki hatását [167]. Egy nemrégiben megjelent közlemény alapján az EGCG fokozza a H_2O_2 felszabadulását tumoros sejtvonalon, ami apoptózist eredményez, míg ez a hatása a normál sejtvonalon nem figyelhető meg [168].

A zöld tea és a teaflavanolok daganatellenes és – azon belül – pro-apoptotikus hatásának több mechanizmusára utalnak tehát kutatási eredmények. A téma nem tekinthető lezártnak, és a lehetséges támadáspontok jelenleg is intenzív kutatás tárgyát képezik.

2. Célkitűzések

Mivel az ER egyrészt számos sejtproliferációt és apoptózist szabályzó fehérje szintézisének helye a sejtben, másrészt az apoptózis jelátviteli útvonalainak egyik jól ismert – és egyre nagyobb jelentőségű – modulátora, felállítottuk azt a hipotézist, mely szerint a teaflavanolok ezen organellum révén is kifejthetik tumorellenes és pro-apoptotikus hatásaikat. Munkánk céljául tűztük ki annak feltárását, hogy a teakatekinek – elsősorban az EGCG – hogyan befolyásolják az ER-ben zajló fehérjeérést és minőségellenőrzést, valamint ezen keresztül kiváltanak-e ER-eredetű programozott sejthalált. Mindez lehetőséget nyújt újabb mechanizmusok feltárására a teaflavanolok széles körben tanulmányozott tumorellenes hatásainak hátterében, valamint új daganatellenes támadáspontok azonosítására is.

Az N-glikoproteinek ER lumenében zajló érése során és a minőségellenőrzésben kitüntetett szerepet betöltő glukozidáz II enzim ismert specifikus gátlószerei – a nojirimicinek – a teakatekinekhez hasonlóan antivirális és tumorellenes hatásokkal rendelkeznek. Ezért a flavanolok esetleges hatását is a glukozidáz II enzimen vizsgáltuk, majd tovább tanulmányoztuk, hogy a glukozidáz II gátlása valóban ER-stresszhez és fokozott apoptózishajlamhoz vezet-e a vizsgált sejtekben.

Hipotézisünk egyik kulcskérdése, hogy EGCG hatására a glikoproteinek érése zavart szenved-e az ER lumenében. Ennek megválaszolásához – az ilyen jellegű vizsgálatokra korábban már alkalmasnak bizonyult – tirozináz enzimet használtuk fel modellként, majd kísérleteinket kiterjesztettük egy olyan glikoproteinre is (VEGF), amely a daganatképződéssel, daganatnövekedéssel és vaszkularizációval közvetlenül is kapcsolatba hozható.

Munkánk során tehát a következő kérdéseket vizsgáltuk:

- Hogyan hatnak a különböző teaflavanolok az ER glukozidáz II enzimének aktivitására máj mikroszómában, illetve hepatóma sejtekben?
- A glukozidáz II gátlása kivált-e az ER-stresszt a hepatóma sejtekben, és észlelhetők-e ilyenkor az ER-eredetű proapoptotikus mechanizmusok mint az UPR részjelenségei?

- A melanóma sejtekben található (endogén) tirozináz enzim mennyiségét csökkenti-e az EGCG-vel végzett kezelés?
- A tirozináz csökkent mennyisége valóban poszttranszlációs szinten (az érés fázisában) érvényesül-e, és kivédhető-e a proteaszóma gátlásával?
- A glikoproteinek érésének – hipotézisünk szerint általános – zavara okoz-e csökkenést más, a tumornövekedés szempontjából elsődlegesen fontos fehérje (VEGF) mennyiségében is?

A kérdések megválaszolásához tehát patkány májból izolált mikroszómát, hepatóma és melanóma sejteket egyaránt felhasználtunk. A máj mikroszóma zömében ER membránból álló és eredeti orientációját megőrző vezikulumokból áll, ezért kiválóan alkalmas ER enzimek aktivitásának vizsgálatára. A hepatóma sejtek – máj eredetüknél fogva – rendszerint jelentős mennyiségű, és fehérjét intenzíven szintetizáló ER hálózattal rendelkeznek, ezért indokoltnak találtuk az ER-stressz és az UPR jelenségeit, valamint az ER-eredetű apoptózist ilyen sejteken vizsgálni. Végül a tirozináz enzim érésének és intracelluláris lebontásának adekvát terepe volt az általunk használt melanóma sejtvonal. Ráadásul e sejtek endogén VEGF termelése lehetőséget kínált az eredmények ilyen irányú bővítésére is. Nem utolsó sorban említésre méltó, hogy a melanóma – viszonylagos malignitása és rossz prognózisa miatt – különösen érdekes tumorfajta az új daganatellenes hatások vizsgálatához.

3. Módszerek

3.1. Felhasznált vegyszerek, antitestek

A glukozidáz II enzim két specifikus, mesterséges szubsztrátját: a 4-metilumbelliferil-D-glukopiranozidot (MUG) és a 4-nitrofenil-D-glucopiranozidot (NPG); ezek aglikonjait: a 4-metilumbelliferont és a 4-nitrofenolt; a vizsgált katekinszármazékokat: az epigallokatekin-gallátot (EGCG), gallokatekint (GC), gallokatekin-gallátot (GCG), az epigallokatekint (EGC) és az epikatekin-gallátot (EG); valamint a propil-gallátot (PG), az N-butil-deoxinojirimicint (NBDJ), az alameticint, az L-DOPA-t, a 3-metil-2-benzotiazolinon hidrazont, a proteázinhibitor koktélt, a sejttenyésztő médiumot és ennek kiegészítőit a Sigma-Aldrich-tól vásároltuk meg. A laktacisztint az Invitrogentől szereztük be. A BODIPY® FL tapszigargin a Molecular Probes, Invitrogen-től származott.

Vizsgálatainkhoz a következő elsődleges antitesteket használtuk: anti-kaszpáz-12 (MFCD03454855) monoklonális, patkány antitest (Sigma-Aldrich), anti-ERp72 (324787-25UL) poliklonális, nyúl antitest (Calbiochem), anti-kalnexin (NP_001003232.1) poliklonális, nyúl antitest (StressMarq Biosciences), anti-eIF2 (L57A5) monoklonális, egér antitest, valamint anti-eIF2αP (3398P) monoklonális, nyúl antitest (Cell Signaling Technology), anti-CHOP/GADD153 (sc-7351) monoklonális, egér antitest, anti-GRP94 (sc-11402) poliklonális, nyúl antitest, anti-GRP78 (sc-166490) monoklonális, egér antitest, anti-PDI (sc-376369) monoklonális, egér antitest, anti-ERP72 (sc-292586) poliklonális, nyúl antitest, anti-tirozináz (sc-20035) monoklonális, egér, anti-VEGF (sc-7269) monoklonális, egér antitest, anti-HIF1α (sc-13515) monoklonális, egér antitest, valamint anti-β-aktin (sc-130300) monoklonális, egér antitest (Santa Cruz Biotechnology). A tormaperoxidáz-konjugált másodlagos antitestek részben a Santa Cruz Biotechnology-tól: kecske anti-egér IgG (sc-2031) és kecske anti-nyúl IgG (sc-2030), részben a Sigma-Aldrich-tól: kecske anti-patkány IgG (MFCD00162808) származtak.

3.2. Sejtkultúrák tenyésztése és kezelése

Az Sk-Mel28 humán melanoma és Hepa1c1c7 egér hepatóma sejtvonal tenyésztését 10% FBS-t, 1% antibiotikum/antimikotikum oldatot és 2 mM L-glutamint tartalmazó α-MEM médiumban végeztük 37˚C-on, 95% levegő és 5% CO_2 koncentráció mellett.

A sejteket EGCG-vel (5-500 μM), DNJ-vel (5-50μM) és laktacisztinnel (2,5 μM) kezeltük 12-72 órán át. Ezeket a hatóanyagokat 100-szoros hígulással oldottuk a sejttenyésztő médiumban. A sejteket hatlyukú sejttenyésztő edényekben tartottuk és 70-80%-os konfluencia elérésekor kezeltük őket az előbb említett hatóanyagokkal. A kontroll sejteket ugyanilyen módon tartottuk, de hatóanyag-tartalmú médium helyett a szokásos szövettenyésztő oldatot alkalmaztunk. A megfelelő hatóanyag-tartalmú médiumokat naponta kétszer cseréltük. 12-72 óra múlva a sejteket lizáltuk és a mintákat Western blot analízis céljából előkészítettük. A 72 órás kezelések sejtlizátumaiból nemcsak Western blot analízist végeztünk, hanem RNS-izolálást követően cDNS-szintézist és kvantitatív PCR-t is. A 72 órán át kezelt sejteken *in situ* méréseket is végeztünk a tirozináz enzimaktivitásának meghatározása céljából.

3.3. Sejtlizátum készítése

A megfelelő kezelések végeztével a sejtekről eltávolítottuk a médiumot, majd kétszeri PBS-sel történő mosást követően a sejteket tartalmazó edényben 100 μl frissen elkészített lizáló puffert oszlattunk el egyenletesen. (A lizáló puffer összetétele: 50 mM TRIS (pH 7,5), 5 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% NP40, 0,1% SDS, 1 mM vanadát és proteáz-inhibitor koktél). A sejteket a lízis során végig jégen tartottuk. A lizáló pufferrel történt 1-2 perces inkubációt követően a sejteket egy erre a célra fejlesztett kaparó eszközzel (”scraper”-rel) eltávolítottuk az edény aljáról, majd az intenzív szuszpendálás és ultrahangos sejtfeltárás után nyert lizátumot centrifugáltuk (10 perc, 10000 x g, 4 ˚C). A felülúszót felhasználásig fagyasztóban tároltuk.

A sejtlizátumok fehérjekoncentrációját Bio-Rad reagenssel, marha-szérumalbumin standard-del határoztuk meg.

3.4. Az apoptózis vizsgálata

A Hepa1c1c7 sejtvonalat 6-lyukú sejttenyésztő edényekben, Bürker-kamrára illeszthető steril fedőlemezeken tenyésztettük. 70%-os konfluencia elérése után a médium leszívása, majd a sejtek PBS-sel történt mosása után a fedőlemezeken lévő sejtekre rámértük a 2% annexint és 2% propidium-jodidot tartalmazó festéket, majd 15 perces, szobahőmérsékleten történt inkubálást követően az így megfestett sejteket tartalmazó fedőlemezt Bürker-kamrára illesztettük, és az annexinnel zöldre festődött apoptotikus, valamint a propidium-jodiddal pirosra festődött nekrotikus sejteket fluoreszcens mikroszkóp alatt számoltuk meg. Az annexinnel és propidium-jodiddal egyaránt festődött sejteket – mely jellemző lehet az apoptózis késői, de a nekrózis korai fázisára is – morfológiai jellegzetességek alapján soroltuk be az apoptotikus vagy a nekrotikus sejtek csoportjába.

A fluoreszcein izotiocianáttal (FITC) jelzett annexin V (annexin V-FITC) nagy affinitással kötődik az apoptózis kezdetekor a membrán külső felszínére kihelyeződő foszfatidil-szerinhez. Az annexin V egy kitűnő indikátor, mely képes jelezni már az apoptózis korai szakaszát is [169]. A nekrózis kimutatására szolgáló propidium-jodid a kettős szálú DNS-t festi meg, mikor a sejtmembrán illetve magmembrán már megfelelő mértékben szétszakadozott ahhoz, hogy a festék elérje a DNS-t [170,171].

Miután a különböző színű sejteket a mikroszkóp alatt megszámoltuk, meghatároztuk az apoptózis indexet, ami 100 sejtre jutó apoptotikus sejtek/testek számát jelenti.

3.5. Western blot analízis

Az ER-stressz tanulmányozása során az egyes stresszmarker fehérjék (CHOP/GADD153, kaszpáz-12, foszforilált és foszforilálatlan eIF2α és különböző chaperonok) szintjét, valamint a glikoproteinek érésének vizsgálatához a tirozináz, HIF1α és VEGF fehérjeszinteket, illetve a kontrollként használt β-aktin szintjét a sejtlizátumokban Western blot analízissel vizsgáltuk.

A mintákat β-merkaptoetanolt tartalmazó mintapufferben 10 perces 95°C-on történő inkubálással állítottuk elő. A polipeptid láncok méret szerinti elválasztásához

egyenlő mennyiségű (30-50 μg) fehérjét tartalmazó mintákat vittünk fel a 9%-os redukáló SDS poliakrilamid gélre.

Az elválasztott fehérjéket elektro-blot készülékkel transzferáltuk nitrocellulóz vagy PVDF membránra (60 perc, 100 V). A minták fehérjemennyiségét – ellenőrzésképpen – Ponceau-vörös festés után denzitometriás analízissel hasonlítottuk össze. Az eredmények kiértékelésekor a konstitutív expressziójú β-aktin mennyiségére normalizáltuk a jelölődések intenzitását.

A membránokat 1x PBS-t, 5% zsírmentes tejport és 0,1% Tween 20-at tartalmazó oldat keverékével blokkoltuk. Az antitesteket ugyanilyen oldatban 1:1000 - 1:2000 (elsődleges), illetve 1:2500 (másodlagos) hígításban alkalmaztuk. Legvégül a membránt 3x20 percen át mostuk 1xPBS oldattal, majd – desztillált vizes átöblítés után – a membránhoz kemilumineszcens előhívó oldatot (LumiPico) adtunk. A lumineszcenciát 30-300 másodperces exponálással röntgenfilmen rögzítettük. Mindegyik fehérje esetében az elvárt molekulatömegnél kaptunk jelet, melyet denzitometriával (a β-aktin jel intenzitására normalizálva) számszerűsítettünk.

3.6. Tirozináz aktivitásmérés in situ

Intakt SK-Mel28 melanoma sejteken szemi-kvantitatív *in situ* tirozináz próbát végeztünk. A sejttenyésztő flaskában felnövesztetett és a megfelelő hatóanyagokkal kezelt sejteket 30 percen át L-DOPA-t (2 mM) és 3-metil-2-benzotiazolinon hidrazint (4 mM) tartalmazó foszfátpufferben inkubáltuk 37 ˚C-on. A tirozináz enzim aktivitására a felhalmozódó melanin pigment mennyiségéből, vagyis a sejttenyészetek eltérő denzitásaiból következtettünk.

3.7. Tirozináz fehérje mennyiségi meghatározása elektroforézissel és enzimaktivitáson alapuló festéssel

A tirozináz fehérje Western blottal történő meghatározása mellett, az aktív tirozináz enzim expresszióját natív gélelektroforézissel, és azt követő, enzimaktivitáson alapuló festéssel is tanulmányoztuk. A tirozináz fehérje elválasztásához egyenlő

mennyiségű (50 μg) fehérjét tartalmazó mintákat vittünk fel a 9%-os natív poliakrilamid gélre.

Az elektroforézist követően a gélt 30 percig inkubáltuk 37 ˚C-on L-DOPA-t (2 mM) és 3-metil-2-benzotiazolinon hidrazint (4mM) tartalmazó foszfátpufferben. Az enzim által katalizált reakció során keletkezett melanin pigment a tirozináz fehérjének megfelelő molekulatömegnél jelenik meg, és intenzitásából az aktív enzim mennyiségére lehet következtetni.

3.8. cDNS-szintézis és kvantitatív „real-time" PCR

A különböző hatóanyagokkal kezelt SK-Mel28 melanoma sejtekből „RNaqueus" kit (Ambion) segítségével RNS-t izoláltunk, majd a cDNS elkészítéséhez Retroscript kitet (Ambion) alkalmaztunk. A nukleinsav-koncentrációt NanoDrop spektrofotométer (Thermo Scientific) segítségével mértük le.

A kvantitatív „real-time" PCR méréséket Stratagene MX3005P „real-time" PCR gépen végeztük. A primereket az Oligo Primer Analysis Software program segítségével terveztük meg. A detektáláshoz SYBR Green és szekvenciaspecifikus fluoreszcens hidrolízis vagy más néven TaqMan próbát alkalmaztunk. A SYBR Green I fluoreszcens DNS festék a kettős szálú DNS molekulába épül be, lehetővé téve annak fluorimetriás detektálását. Ebben az esetben a fluoreszcens jel detektálása 470 nm hullámhosszúságú gerjesztő fény mellett 530 nm hullámhosszon történik az extenziós fázis végén, a PCR termék olvadáspontja alatti hőmérsékleten.

A TaqMan vagy hidrolízis próbához, olyan egyszálú oligonukleotidot alkalmaztunk, amely 5' és a 3' végein egy „reporter" (fluoreszcens), illetve egy „quencher" festékkel van jelölve, és a vizsgált cDNS egy rövid szakaszához illeszkedik. Amíg a próba intakt, a „quencher" gátolja a „reporter" fluoreszcens szignálját. Amikor a DNS-polimeráz az 5' exonukleáz aktivitása révén lehasítja a reporter festéket tartalmazó 5' véget az extenziós lépésben, akkor a quencher nem gátolja annak emisszióját, és a reporter festék fluoreszcens jele detektálhatóvá válik. A fluoreszcens jel detektálása a reporter molekulára jellemző hullámhosszokon történik [172].

Minden egyes mintánál meghatároztuk az áttörési pontot, azaz a Ct értékét vagy más néven detektálási küszöböt. A Ct azt a pontot jelenti az amplifikációs görbén, ahol

az exponenciális fázis véget ér, és elkezdődik a lineáris fázis. A detektálási küszöb az adott „real-time” PCR berendezésre jellemző paraméter. Az áttörési pont annál kisebb PCR ciklusszámnál jelentkezik, minél több volt a mintában az adott nukleinsav templát. Ez az összefüggés képezi a kvantitatív mérések alapját [173]. A vizsgálni kívánt mRNS minták expressziós szintjét referenciaként „housekeeping” génekre vonatkoztattuk. A „housekeeping” (háztartási) géneket a sejtek konstitutív módon fejezik ki, a háztartási gének expressziós szintje egyenesen arányos a kiindulási sejtmennyiséggel [173]. Kétféle „housekeeping” gént használtunk (GAPDH és 18S riboszomális RNS), de – mivel mindkét esetben hasonló eredményeket kaptunk – csak a GAPDH-ra normalizált eredményeket mutatjuk be. A minták mRNS mennyiségének összehasonlítására egyszerűsített relatív kvantifikációs módszert alkalmaztunk, a komparatív Ct metodikát vagy másnéven ΔCt módszert. A módszer alkalmazhatóságának feltétele, hogy a housekeeping gének és a target gén között a PCR amplifikációs hatásfokainak eltérése ne haladja meg a ± 5%-t.

$\Delta Ct_{target} = Ct_{kontrol} – Ct_{kezelés}$

$\Delta Ct_{referencia} = Ct_{kontrol} - Ct_{kezelés}$

$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{referencia} – \Delta Ct_{target}$

Amennyiben a ΔΔCt érték 1 alatt maradt, úgy azt mondhatjuk, hogy a különbség a minták mRNS expressziója között nem volt szignifikáns.

Minden kísérletben, mindegyik minta esetében legalább három amplifikációs görbét analizáltunk.

3.9. A melanoszómák és az endoplazmás retikulum morfológiájának vizsgálata

A melanoma sejtek ER-jének morfológiáját Nikon S Fluor40X vagy Planapo100X objektívvel, a FITC-szűrőkészlettel és Photometrics Cool SNAP HQ CCD kamerával felszerelt Nikon Eclipse TE300 mikroszkóppal tanulmányoztuk. A készüléket MetaMorph, Meta Imaging Series™ program segítségével vezéreltük. Az ER-t fluoreszcens jelöléssel tettük láthatóvá; ehhez 0,1 μM BODIPY® FL tapszigargint használtunk. A tapszigargin specifikusan kötődik a szarko/endoplazmás retikulum kalcium-ATP-ázához, és gátolja az aktív kalciumtranszportot [174]. A képeket a

BODIPY® FL tapszigargin hozzáadása után két percen belül rögzítettük, hogy megelőzzük a jelölés hatására kialakuló kalciumdepléció indukálta esetleges morfológiai változásokat.

3.10. A glukozidáz II enzimaktivitásának méréséhez alkalmazott módszerek

3.10.1. Patkány máj mikroszóma előállítása

A mikroszómát egy éjszakán át éheztetett, hím Wistar patkányok (180-230g) májából preparáltuk. A frissen kivett májat apró darabokra vágtuk és 0,3 M szacharózt és 20 mM HEPES-t (pH=7,0) tartalmazó pufferbe tettük és Potter-Elvehjem homogenizátorral egyenletes szuszpenziót készítettünk. A szuszpenziót szacharóz-HEPES pufferrel 20%-os „koncentrációig" hígítottuk, majd centrifugacsövekbe töltöttük, és lecentrifugáltuk (1000 x g, 10 perc, 4 °C). A felülúszót tovább centrifugáltuk (11000 × g, 20 perc, 4 °C). Az így nyert üledék a mitokondriális frakciót tartalmazta, a keletkezett felülúszó pedig a sejtek citoplazmáját [175]. Az üledéket ezután MOPS pufferben (100 mM KCl, 20 mM NaCl, 1 mM $MgCl_2$, 20 mM MOPS, pH 7,2) szuszpendáltuk, majd újból lecentrifugáltuk (100000 × g, 60 perc, 4°C). Végül az üledéket MOPS pufferben reszuszpendáltuk, és a fehérjekoncentrációt 20-40 mg/ml-re állítottuk be. Az elkészült mikroszómát ezután rögtön lefagyasztottuk és felhasználásig (max. 6 hónap) folyékony nitrogénben tároltuk. A mikroszomális fehérjekoncentrációt Lowry módszere alapján határoztuk meg, amelyhez standardként marha szérum albumint használtunk [176].

A mikroszómák tisztaságát marker-enzim analízis segítségével ellenőriztük [177]. A mikroszomális vezikulumok épségét mannóz-6-foszfatáz vizsgálattal bizonyítottuk [178], amely több mint 95 %-os latenciát mutatott.

3.10.2. Glukozidáz II enzim aktivitásának mérése fluoriméterrel

A mikroszóma glukozidáz II enzimaktivitásának fluorimetriás méréshez a enzim specifikus, mesterséges szubsztrátját, a metilumbelliferil-glukozidot (MUG) használtuk.

Az enzim hatására keletkező fluoreszcens metilumbelliferont Cary-Varian Spektrofluoriméterrel folyamatosan detektáltuk. A mérés során a mikroszómát (0,1 mg fehérje/ml) a küvettában MOPS-KCl pufferben 37°C-on inkubáltuk. A MUG hozzáadása után egy percen át detektáltuk a fluoreszcencia változását 360 nm excitációs és 440 nm emissziós hullámhossz mellett. Ezután minden mintához ismert mennyiségű (0,1 vagy 0,5 nmol/ml) metil-umbelliferont adtunk kalibráció céljából. A mérések egy részénél a mikroszóma membránját egy pórusképző antibiotikummal, az alameticinnel (0,1 mg/mg mikroszomális fehérje) permeabilizáltuk [179].

Az ismert vagy feltételezett glukozidázinhibitorokat (EGCG és egyéb katekinek, valamint DNJ) 1-2 perccel a szubsztrátot (MUG) megelőzően adtuk hozzá a mikroszómaszuszpenziókhoz.

3.10.3. Glukozidáz II enzim aktivitásának mérése a termékek HPLC-alapú detektálásával

A mikroszomális glukozidáz II aktivitásmérések megerősítése és kiegészítése céljából az enzim működését egy másik mesterséges szubsztrát, a 4-nitrofenil-glukozid (NPG) felhasználásával is vizsgáltuk. Emellett a glukozidáz II aktivitását a MUG hidrolízise alapján intakt és permeabilizált Hepa1c1c7 egér hepatóma sejtekben is tanulmányoztuk. A keletkezett termék (4-nitrofenol, illetve metil-umbelliferon) mennyiségét mindkét esetben HPLC segítségével mértük meg.

A mikroszómákat (0,5 mg protein/ml) MOPS-KCl pufferben 37°C-on 10 percig inkubáltuk az NPG szubsztrát jelenlétében. Egyes esetekben a mikroszomális membránt alameticinnel (0,1 mg/mg mikroszomális fehérje) permeabilizáltuk. A reakciót kétszeres térfogatnyi jéghideg metanol hozzáadásával állítottuk le, és a mintákat további kiértékelésig azonnal lefagyasztottuk. A vizsgált glukozidázinhibitorokat (EGCG, egyéb katekinek, valamint DNJ) 1-2 perccel a szubsztrátot (NPG) megelőzően adtuk hozzá a mikroszómaszuszpenziókhoz.

A konfluens hepatóma sejtekből tripszines emésztéssel szuszpenziót hoztunk létre (10^7 sejt/ml), és azt kétfelé osztottuk. Egyik felében a sejtek membránjait alameticinnel permeabilizáltuk (0,2 mg/ml, 37 ºC, 5 perc). A másik felét (intakt sejtek) alameticin nélkül inkubáltuk. Centrifugálás (250 x g, 4 perc) után PBS-sel mostuk a sejteket, majd

szérummentes α-MEM médiumban hígítottuk a szuszpenziókat (5 x 10^6 sejt/ml). Ezeket tovább osztottuk, és 0-12 óráig előinkubáltuk EGCG (100 μM) jelenlétében vagy anélkül. A reakciót MUG (50 μM) hozzáadásával indítottuk, és a 0, 15, 30, illetve 45 perc elteltével vett mintákat kétszeres térfogatnyi jéghideg metanolhoz kevertük, majd -20 ºC-on tároltuk.

A HPLC-vel történő mérésekhez a mikroszomális és sejtes kísérletek mintáit felolvasztottuk, majd lecentrifugáltuk (10 percig 4°C-on 20000 × g), és a fehérjementes felülúszókat HPLC-s mintatartókba mértük.

A két terméket (4-nitrofenol, illetve metil-umbelliferon) Waters Alliance 2690 HPLC készülékkel, Nucleosil 100 C18 oszlopon (5mikrom 25×0,46) (Teknokroma) választottuk el. A 4-nitrofenol fényelnyelését 316 nm hullámhossz mellett detektáltuk (Waters Dual λ Absorbance Detector 2487), a metil-umbelliferon fluoreszcenciáját 325 nm excitációs és 455 nm emissziós hullámhosszaknál mértük (Waters Multi λ Fluorescence Detector 2475). Az eluenst mindkét esetbent két komponensből állítottuk össze: „A” oldat: 0,1% TFA és „B” oldat: 0,1% TFA metanolban; és áramlási sebessége 0,9 ml/perc volt.

A 4-nitrofenol mérésekor fél percig tartó 100% „A” oldószerrel történő kiegyenlítés után a „B” oldószer koncentrációját folyamatosan emeltük 0%-ról 60%-ra 8 percen át, majd 2 percig folytattuk a mérést 40% „A” oldószer - 60% „B” oldószer arány mellett, végül visszaállítottuk a 100% „A” oldószert. A metil-umbelliferon mérésekor a gradiens kezdetben (30 sec) 80 % A és 20 % B oldat volt, amit lineárisan 7 perc alatt 40 % A és 60 % B-re változtattunk, ezután 2 percig maradt ez az arány, majd visszaállt a 80 % A és 20 % B arány. Az elúciós időket standard oldatok segítségével határoztuk meg.

3.11. Számítási módszerek, statisztikai analízis

A enzimaktivitást nmol/perc/mg egységben fejeztük ki, vagyis az 1 mg mikroszomális fehérje által 1 perc alatt termelt metil-umbelliferon, illetve 4-nitrofenol mennyiségére vonatkoztattuk. A mérés során keletkező metil-umbelliferon mennyiségét a fluoreszcencia emelkedésének mértékéből határoztuk meg, pontosabban a fluoreszcencia intenzitásának 1 perc alatti változásából. Az inkubáció során keletkezett

4-nitrofenol mennyiségét a minták végső és kezdeti (kevesebb mint a végső 5%-a) 4-nitrofenol-tartalmának különbségéből számítottuk. Megmértük az enzimaktivitás különbségét intakt és alameticinnel permeabilizált mikroszómák között is.

Diagramokat készítettünk és a derivált paraméterek (K_M, v_{max}, IC_{50} és K_i) számítását a kapott adatok alapján GraphPad Prism 4.01 software segítségével végeztük [180].

Minden eredményhez 3 független kísérletet és egy-egy kísérletnél 3 párhuzamos mérést végeztünk. Az eredményekből átlagértéket és standard deviációt számoltunk, majd az így kapott értékeket egymással az „Anova with Tukey's multiple comparsion post hoc" teszt segítségével hasonlítottuk össze. A különbségeket 0,05-nél kisebb P érték esetén tekintettük szignifikánsnak.

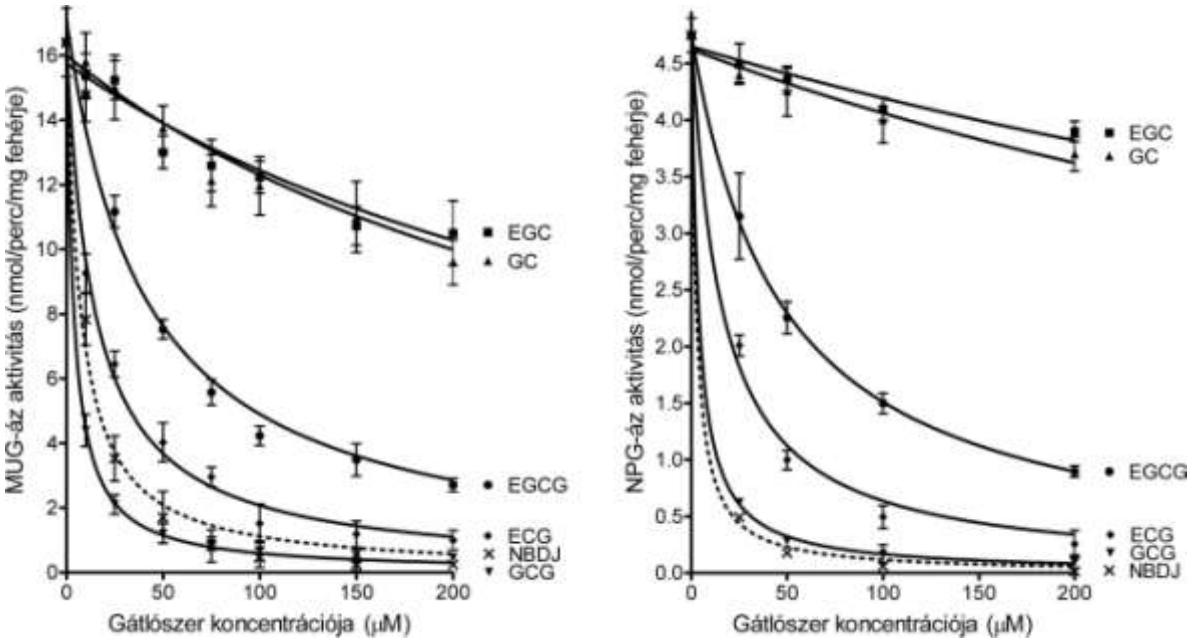
4. Eredmények

4.1. Teaflavanolok hatása a máj mikroszóma glukozidáz II enzim aktivitására

Első lépésként meghatároztuk a patkány máj mikroszóma glukozidáz II aktivitásának latenciáját, valamint kinetikai paramétereit mindkét mesterséges szubsztrát (MUG és NPG) vonatkozásában. Azt találtuk, hogy a latencia erősen függött a szubsztráttól és annak koncentrációjától. MUG esetében intakt mikroszómában kisebb enzimaktivitást detektáltunk, mint a membrán permeabilizálása után, és a különbség a koncentráció növelésével egyre csökkent. NPG esetében az intakt és permeabilizált mikroszómában mért aktivitás között nem észleltünk különbséget. Mindez azt mutatja, hogy a MUG transzportja a folyamatban sebességmeghatározó, míg az NPG bejutása lépést tud tartani a hidrolízissel. A megfigyelésnek azonban nincs fiziológiás relevanciája, csupán alátámasztja, hogy az enzim gátlását permeabilizált mikroszómán célszerű tanulmányozni.

Az alameticinnel permeabilizált mikroszómában a glukozidáz II enzim Michaelis-Menten kinetikát mutatott. A kinetikai paraméterek azt mutatják, hogy az enzim NPG iránti affinitása sokkal kisebb. MUG esetében a K_m 55,2 ± 3,1 μM és a v_{max} 39,0 ± 0,7 nmol/perc/mg fehérje; NPG esetében pedig a K_m 2,2 ± 0,1 mM, a v_{max} 15,3 ± 0,2 nmol/perc/mg fehérje volt. A teaflavanolok gátló hatásának vizsgálatakor a MUG-ot 40 μM-os, a NPG-t pedig 1 mM-os koncentrációban alkalmaztuk.

Patkány máj mikroszómán tanulmányoztuk, hogy a zöld tea különböző katekinszármazékai hogyan hatnak a glukozidáz II enzim aktivitására (**11. ábra**). A legnagyobb mennyiségben előforduló teaflavanolok (epigallokatekin-gallát, EGCG; epikatekin-gallát, ECG; gallokatekin, GC; epigallokatekin EGC; és gallokatekin-gallát, GCG) koncentrációfüggő hatását hasonlítottuk össze az N-butil-deoxinojirimicinével (NBDJ), ami a glukozidáz II ismert gátlószere. A vizsgált vegyületeket különböző koncentrációkban (10-200 μM) adtuk az alameticinnel permeabilizált mikroszómához, majd a glukozidáz II aktivitást 40 μM MUG, valamint 1 mM PNG szubsztrát jelenlétében egyaránt megmértük.



11. ábra. Teakatekinek és NBDJ hatása permeabilizált máj mikroszóma glukozidáz II enzim aktivitására

Az „A" ábrán 40μM MUG, a „B" ábrán pedig 1mM NPG szubsztrát jelenlétében végzett aktivitásmérések eredményeit tüntettük fel. A különböző hatóanyagokat 1-2 perccel a szubsztrát előtt adtuk a mintákhoz. Az NBDJ hatását összehasonlítás céljából tüntettük fel. Az eredményeket három független mérésből számolt átlag ± szórás alakban ábrázoltuk.

Bár különböző mértékben, de mindegyik vizsgált flavanol gátolta a glukozidáz II enzimet. A két leghatékonyabb flavanol, a GCG és az ECG nagyobb koncentrációkban szinte teljesen megszüntette az enzim aktivitását, és ezek koncentráció-hatás görbéje az NBDJ-éhez hasonló volt. Még a legkevésbé hatékony katekinszármazékok (a GC és az EGC) is közel 30%-os gátlást tudtak kifejteni 200μM koncentrációban. A többi flavanolhoz viszonyítva az EGCG glukozidáz II enzimre gyakorolt gátló hatása közepesnek mondható. A bemutatott eredményekből számított IC_{50} és K_i értékeket a **4. táblázat** tartalmazza.

	MUG-áz		NPG-áz	
gátlószer	**IC_{50} (μM)**	**K_i (μM)**	**IC_{50} (μM)**	**K_i (μM)**
GCG	3,50	2,03	3,70	2,55
ECG	15,14	8,76	19,06	13,10
EGCG	50,92	29,48	47,72	32,81
EGC	117,72	68,15	110,51	75,99
GC	136,29	78,93	102,68	70,62
NBDJ	8,97	5,19	3,27	2,25

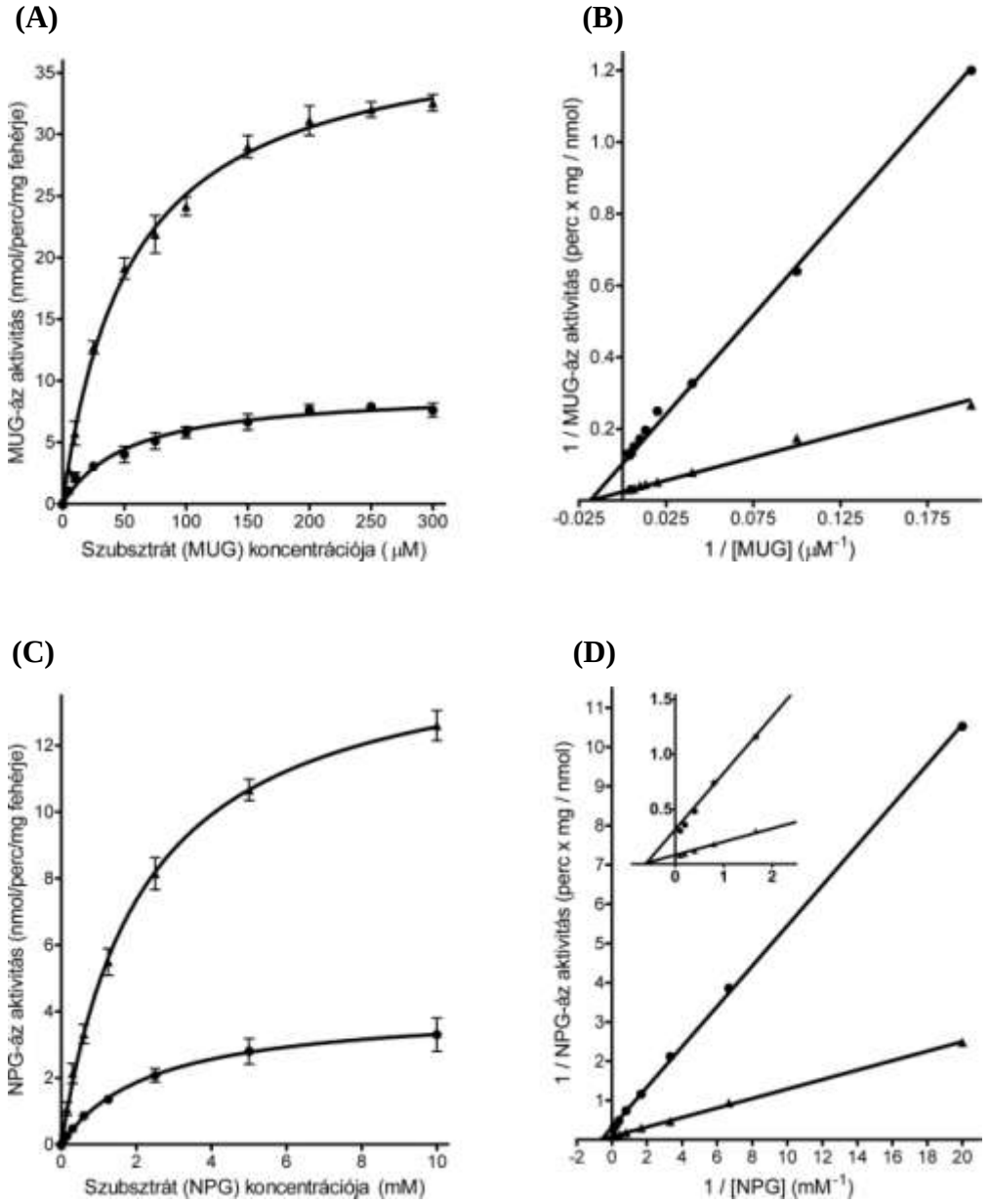
4. táblázat. Teaflavanolok glukozidáz II-re gyakorolt gátló hatását jellemző IC_{50} és K_i értékek összehasonlítása.

A különböző hatóanyagokat 37°C-on adtuk az alameticinnel permeabilizált patkány máj mikroszómához. A MUG-áz aktivitást 40μM MUG szubsztrát és 0,1 mg/ml fehérjekoncentráció mellett 2 percen át, míg az NPG-áz aktivitást 1 mM NPG szubsztrát jelenlétében és 0,5 mg/ml fehérjekoncentráció mellett 25 percen át vizsgáltuk. A táblázatban feltüntetett eredményeket három független mérésből GraphPad Prism Software segítségével számoltuk.

Méréseink tehát azt mutatják, hogy a teaflavanolok különböző mértékben gátolják a glukozidáz II enzim aktivitását, és az EGCG közepesen hatékony. A továbbiakban mégis az EGCG hatásait vizsgáltuk, mivel a teában ez a katekin fordul elő legnagyobb mennyiségben, és az irodalomban is e flavanollal kapcsolatban lelhető fel a legtöbb adat.

4.2. Az EGCG által kiváltott enzimgátlás kinetikai jellemzése

A glukozidáz II EGCG általi gátlását – a hatás kinetikai jellemzése céljából – tovább vizsgáltuk patkány máj mikroszómában. Az alameticinnel permeabilizált mikroszómát 100 μM EGCG-vel kezeltük, és az enzimaktivitást emelkedő MUG (5-300 μM) valamint NPG (50 μM - 10 mM) koncentráció mellett vizsgáltuk.



12. ábra Az EGCG glukozidáz II enzimre gyakorolt gátló hatásának kinetikája

A glukozidáz II aktivitását két különböző szubsztrát: MUG (A és B ábra) és NPG (C és D ábra) jelenlétében vizsgáltuk alameticinnel permeabilizált mikroszómán 100 μM EGCG hozzáadásával (●), illetve a nélkül (▲). A szubsztrátokat különböző koncentrációkban adtuk a mintákhoz. Az eredményeket három független mérésből számolt átlag ± szórás alakban ábrázoltuk.

A telítési görbéken jól látható, hogy az EGCG jelentősen csökkentette az enzim aktivitását mind MUG, mind NPG szubsztrát alkalmazása esetén a vizsgált koncentrációk mellett (**12. ábra A és C része**). A Lineweaver-Burk „kettős reciprok”

ábrázolás azt mutatja, hogy EGCG-kezelés hatására a v_{max} megközelítően negyedére csökkent, míg a K_M érték nem változott (**12. ábra B és D része**), vagyis a gátlás kinetikailag nem-kompetitív típusú.

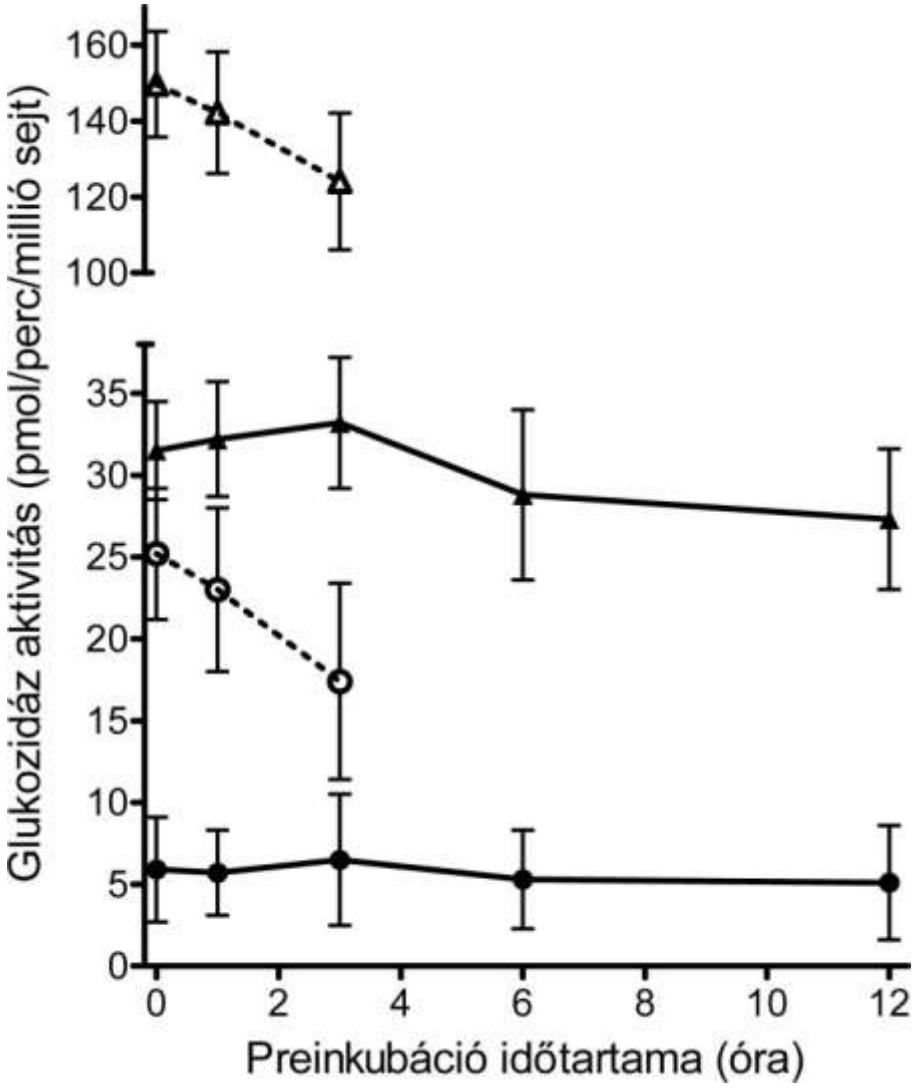
4.3. A glukozidáz II aktivitás gátlása EGCG-vel hepatóma sejtekben

Miután a glukozidáz II enzim gátlását máj mikroszómában kimutattuk, és kinetikailag jellemeztük, megvizsgáltuk, hogy a hatás sejteken is kiváltható-e. Kísérleteinkhez a laboratóriumunkban használt sejtvonalak közül a Hepa1c1c7 egér hepatóma sejteket választottuk, mert – előkísérleteink alapján – ezekben volt legjobban mérhető a glukozidáz II aktivitása. A MUG (50 μM) hidrolízisének sebességét mértük intakt és alameticinnel permeabilizált sejtekben EGCG (100 μM) jelenlétében, illetve hiányában. Annak megállapítására, hogy a várt gátlás tartós és egyenletes-e, a flavanollal különböző időtartamú (0, 1, 3, 6, 12 órás) előkezeléseket is végeztünk.

Az alameticinnel végzett permeabilizálás a plazma membránt és az ER membránját egyaránt átjárhatóvá teszi, így a glukozidáz II aktivitását nem korlátozza a MUG hozzáférése az enzim aktív centrumához (átjutása a két membránon). Jól látható a 13. ábrán, hogy a permeabilizált sejtekben nagyjából ötször akkora aktivitást mértünk, mint az intakt membránokkal rendelkezőkben, ami azt jelenti, hogy az általunk használt, intakt, élő hepatóma sejtekben az adott körülmények között a glukozidáz II aktivitásának 80%-a látens. A MUG és hasonló mesterséges glukozidok sejtbe, illetve ER-be történő transzportja vizsgálataink szempontjából irreleváns, és fiziológiás jelentősége is korlátozott. A permeabilizálást azért végeztük, hogy kiderítsük, a gátló hatás valamelyik transzport lépésen, vagy magán az enzimen érvényesül-e. Mivel a glukozidáz II aktivitás EGCG-kezelés hatására intakt és permeabilizált sejtekben egyaránt kb. a kontroll 20%-ára csökkent, kijelenthető, hogy a flavanol intakt, élő sejtben is effektív gátlószer, amely közvetlenül az enzimen fejti ki hatását.

Az észlelt hatás időfüggését 12 órán át vizsgáltuk a hepatóma sejtekben (**13. ábra**). Megfigyelhető, hogy az alameticinnel végzett permeabilizálás következtében a glukozidáz II aktivitás fokozatosan csökken, ami feltehetőleg a sejtek progresszív pusztulásának következménye. Ezért a permeabilizált sejteket három óra után nem

vizsgáltuk tovább. Így is megállapítható volt, hogy a kezeletlen és EGCG-vel kezelt sejtekben párhuzamosan csökken az enzimaktivitás, vagyis a gátlás mértéke időben nem változott, csupán a működő enzim fogyott. Az intakt sejtek aktivitása azonban stabil maradt, és az EGCG által kifejtett gátló hatás sem csökkent a 12-órás kezelés során.

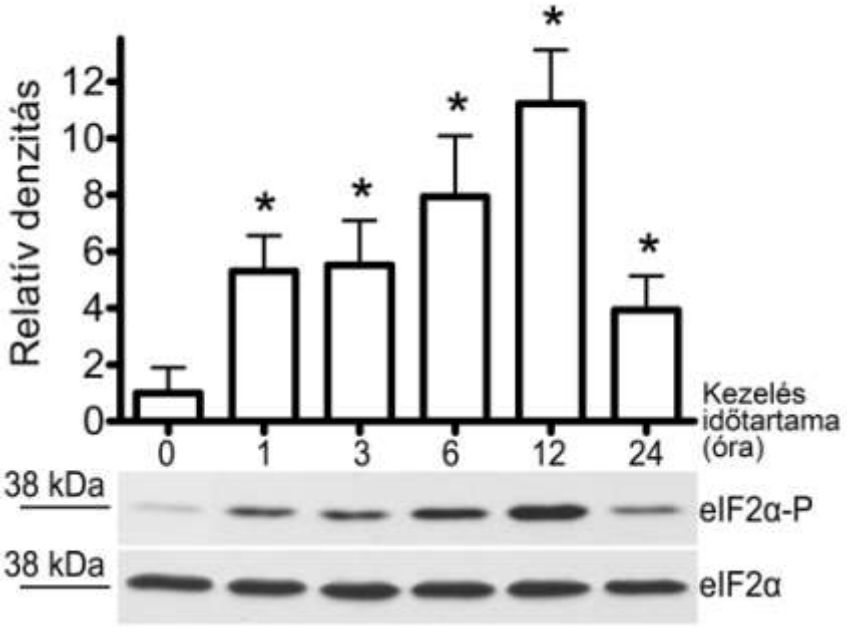


13. ábra. Glukozidáz II gátlása EGCG-vel hepatóma sejtekben

Intakt (▲, ●) és alameticinnel permeabilizált (△, ○) Hepa1c1c7 sejtszuszpenziót 100 µM EGCG jelenlétében (●, ○), illetve anélkül (▲, △) különböző időtartamokig inkubáltunk 37 ºC-on, majd 50 µM MUG szubsztrátot adtunk a mintákhoz. Az enzimaktivitást a preinkubálást követően a keletkező metil-umbelliferon mennyisége alapján határoztuk meg HPLC segítségével. Az ábrán három független mérésből számolt átlag ± szórás alakban tüntettük fel az eredményeket; *P < 0,05

4.4. Endoplazmás-retikulum-stressz és apoptózis az EGCG-vel kezelt hepatóma sejtekben

A glukozidáz II enzim gátlása feltehetőleg megzavarja az ER működését. Olyan sejtekben, amelyek intenzív fehérjeszintézist és -szekréciót folytatnak (pl. a májsejtek és májeredetű sejtvonalak), különösen érzékenyek ilyen hatásokra. Az ER-t ért stressz az UPR aktiválódásához, ezen keresztül az apoptózis fokozódásához vezethet.

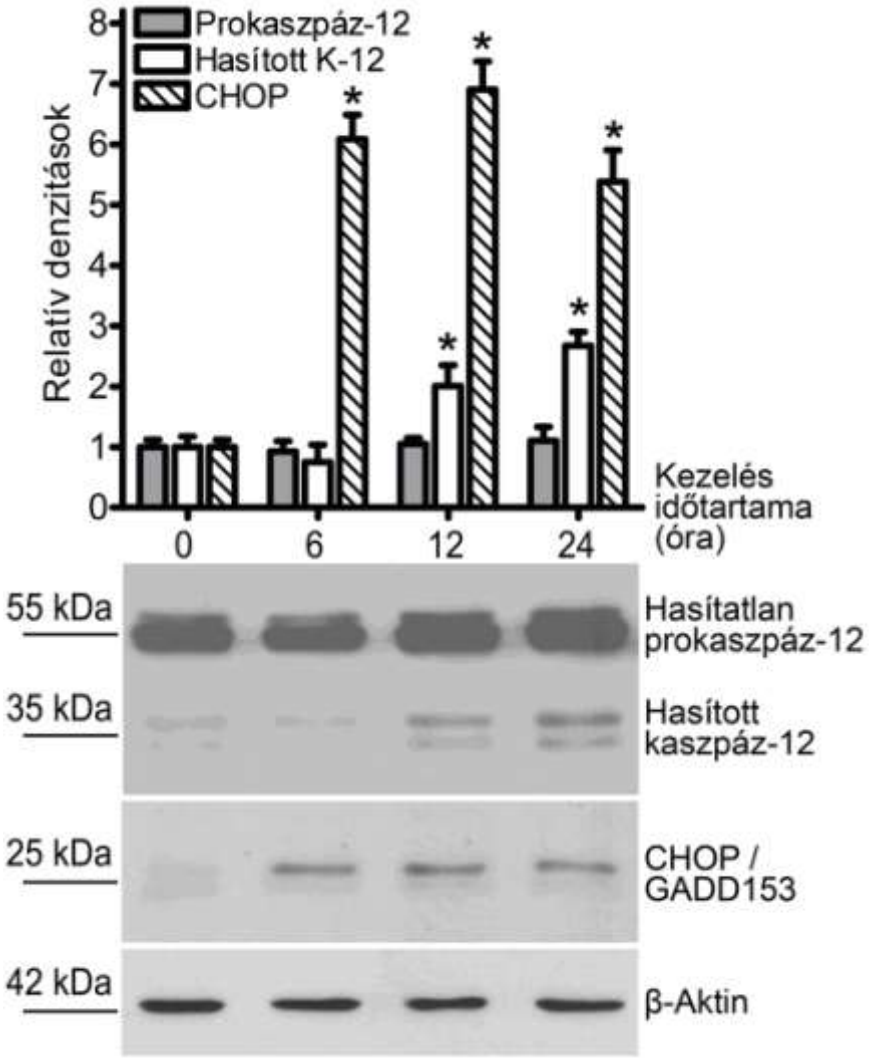


14. ábra. Az eIF2α foszforilációja EGCG-vel kezelt Hepa1c1c7 sejtekben.

A hepa1c1c7 sejteket különböző ideig kezeltük 100 µM EGCG-vel és a teljes sejtlizátumokat Western blot analízis céljából a megfelelő módon előkészítettük. A foszforilált eIF2α (eIF2α-P) és a teljes eIF2α mennyiségét specifikus antitestek segítségével határoztuk meg. A fenti ábra 3 független kísérlet egy tipikus eredményét mutatja. A diagram az eIF2α-P jelölések intenzitásának relatív változását mutatja a 0 órás méréshez képest. A jelölések intenzitását denzitometriával (ImageQuant software) határoztuk meg. Az eredményeket átlag ± szórás alakban tüntettük fel; *P < 0,05

Ezért megvizsgáltuk, hogy az EGCG-vel kezelt Hepa1c1c7 hepatóma sejtekben észlelhetők-e az UPR jelei – különös tekintettel a proapoptotikus jelenségekre. A sejteket különböző ideig kezeltük 100 µM EGCG-vel, majd a sejtek lizátumában Western blottal hasonlítottuk össze az ER stresszmarker fehérjéinek szintjét. Az organellum legfontosabb chaperonjai és foldázai (Grp78, Grp94, PDI, kalnexin, ERp72) ugyan – meglepetésünkre – nem indukálódtak (ábra nélkül); azonban jelentős

emelkedést észleltünk az eIF2α foszforilációjában, ami az UPR tipikus részjelensége. A **14. ábrán** látható, hogy az eIF2α fehérje összmennyisége nem változott, ezzel szemben a foszforilált eIF2α szintje már egyórás EGCG-kezelés hatására nagymértékben nőtt, és hosszabb kezelések hatására tovább emelkedett.

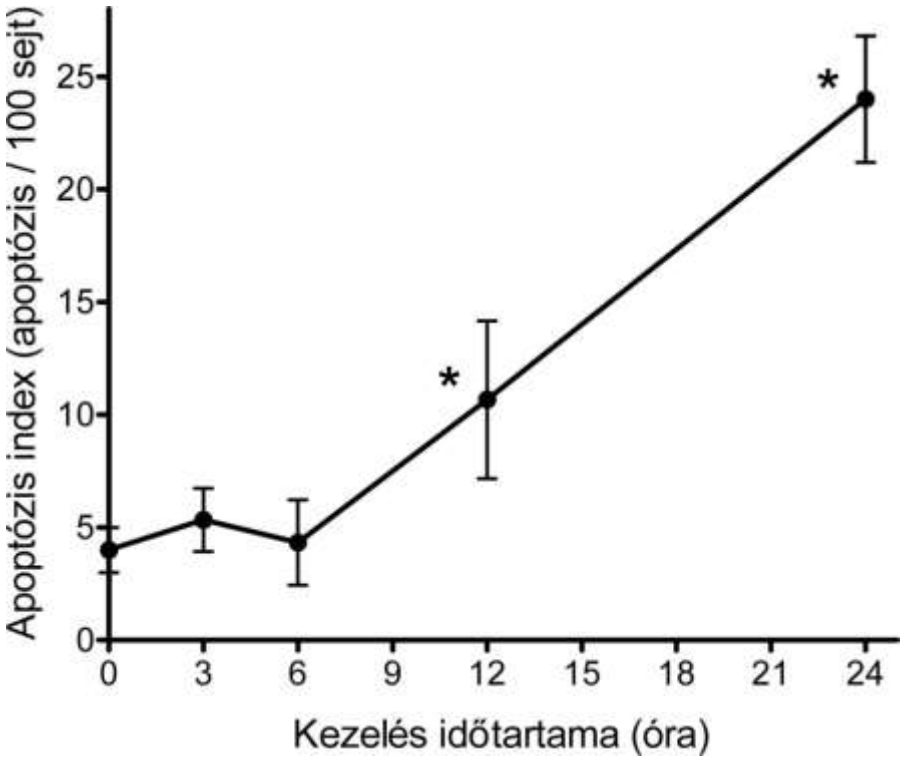


15. ábra. A CHOP indukciója és a prokaszpáz-12 hasítása EGCG-kezelés hatására

A különböző időtartamú 100μM EGCG kezelést követően a teljes Hepa1c1c7 sejtlizátumokat előkészítettük Western blot analízis céljából. A prokaszpáz-12, a kaszpáz-12, CHOP és kontrollként használt β-aktin mennyiségét specifikus antitestek segítségével határoztuk meg. A fenti ábra 3 független kísérlet egy tipikus eredményét mutatja. A jelölések intenzitását denzitometriával (ImageQuant software) határoztuk meg. A diagram mutatja a jelölések intenzitásának relatív változását a kiinduló értékhez képest. Az eredményeket átlag ± szórás alakban tüntettük fel; *P < 0,05

Szintén jelentős változást észleltünk a proapoptotikus CHOP fehérje mennyiségében, amely már hatórás kezelés után 6-7-szerese volt a kiinduló, kontroll értéknek (**15. ábra**). Emellett, 12 órás EGCG-kezelés hatására szignifikánsan nőtt a hasított kaszpáz-12 szintje is (**15. ábra**), ami szintén jellegzetesen ER eredetű apoptózis aktiválódásra utal.

A megfigyelt ER-stresszel és részleges UPR-aktiválódással összhangban, az apoptózis fokozódását is észleltük az EGCG-vel kezelt hepatóma sejtekben (**16. ábra**). Annexinnel és propidium-jodiddal végzett festést követően fluoreszcens mikroszkóp alatt számoltuk az apoptotizáló sejteket, illetve apoptotikus testeket, majd kiszámoltuk az apoptózis indexet (100 sejtre jutó apoptózis). Ez az index az EGCG-kezelés első 6 órájában nem változott, de 12, valamint 24 órás kezelés hatására már jelentősen és progresszíven emelkedett. A nekrotizáló sejtek száma nem változott jelentős mértékben a kísérlet során.



16. ábra. Hepa1c1c7 sejtek apoptózisának fokozódása EGCG-kezelés hatására

A 70-80% konfluenciát elért sejttenyészeteket 100 µM EGCG-vel kezeltük különböző ideig, majd az apoptózis indexet (apoptózis/100 sejt) a minták annexines festésével fluoreszcens mikroszkóp segítségével határoztuk meg. A fenti ábra három független kísérlet eredményeit mutatja be. Az eredményeket átlag ± szórás alakban tüntettük fel; *P < 0,05

4.5 Csökkent tirozináz aktivitás az EGCG-vel kezelt melanoma sejtekben

A tirozináz enzim felelős a melaninszintézis sebességmeghatározó lépéseiért, melyek során a tirozin DOPA-n keresztül dopakinonná alakul. Az aktív tirozináz enzim mennyisége szemikvantitatív módon mérhető a melanin termelődésének detektálásával, ha az intakt sejteket DOPA-val kezeljük. A melanin hozzávetőleges mennyiségére a színintezitás változásából következtethetünk. Hipotézisünket, mely szerint az EGCG gátolja a glikoproteinek érését, először ezen az egyszerű modellen teszteltük. Pozitív kontrollként a glukozidáz enzimek ismert gátlószerét, a DNJ-t használtuk. Az SK-Mel 28 melanoma sejteket EGCG-vel (100 μM), illetve DNJ-vel (100 μM) kezeltük 3 napon át, és végül a tirozináz enzim aktivitását *in situ* detektáltuk (**17. ábra**).

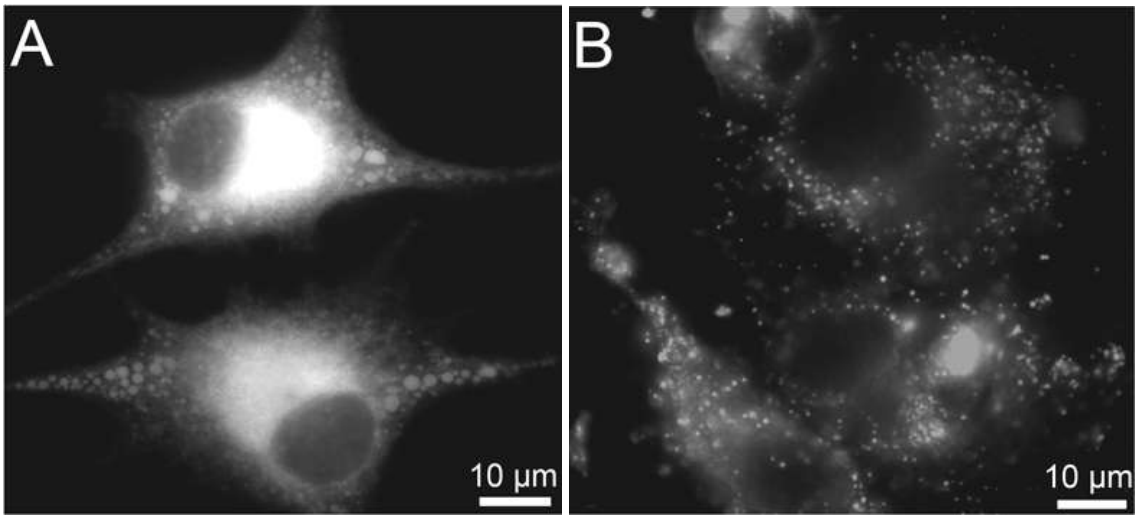
17. ábra. Glukozidázgátlók hatása a melanóma sejtek aktív tirozináz enzimének mennyiségére

Az intakt SK-Mel 28 melanoma sejtek tirozináz aktivitását a sejtkultúra lemezeken in situ detektáltuk. A sejteket 72 órán át EGCG-vel (100 μM) vagy DNJ-vel (100 μM) kezeltük, majd 30 percen át L-DOPA-t és 3-metil-2-benzotiazolinon hidrazont tartalmazó PBS oldatban inkubáltuk. A tirozináz enzim aktivitására a lemezek sötét pigmentációjának (melanin) intenzitásából következtettünk. Az itt látható ábra 4 független kísérlet egyikének tipikus eredményét mutatja.

A gátlószerekkel történő kezelés nem okozott szignifikáns eltérést a sejtek konfluenciájában, így a melaninszintézis mértéke a sejtekben lévő aktív tirozináz enzim mennyiségére utalt. Az EGCG-vel kezelt sejttenyésztő edényekben a kontrollhoz képest halványabb színintenzitást detektáltunk, ami a működőképes tirozináz enzim csökkent expresszióját jelzi. A DNJ – a glikoproteinek érésének és tirozináz expressziójának ismert gátlószere – hatására az EGCG-hez hasonló eredményt kaptunk: a kontrollhoz képest a színintenzitás nagyjából az EGCG-vel megegyező mértékben csökkent.

4.6. Az endoplazmás retikulum és a melanoszómák morfológiai eltérései EGCG kezelés hatására

Fluoreszcens jelölést követő mikroszkópos vizsgálataink azt mutatták, hogy az EGCG kezelés nem csak a tirozináz fehérje expressziójában, hanem az ER és a melanoszómák morfológiájában is jelentős változást okoz. A kontroll sejtek képeit összehasonlítva a 16 órán át EGCG-vel kezelt sejtekével (**18. ábra**) a normál struktúra egyértelmű megbomlását figyeltük meg.



18. ábra. Az ER és a melanoszómák morfológiai eltérései EGCG-kezelt sejtekben.

Az ER hálózat és a melanoszómák morfológiai eltéréseit fluoreszcens mikroszkóppal tanulmányoztuk. A képeket a fluoreszcens BODIPY® FL tapszigargin származékkal történő jelölést követő 2 percen belül készítettük. (A) kontroll SK-Mel 28 melanóma sejtek; (B) 16 órán át 100 µM EGCG-vel kezelt sejtek. A fenti ábrák 3 független kísérlet reprezentatív felvételeit mutatják.

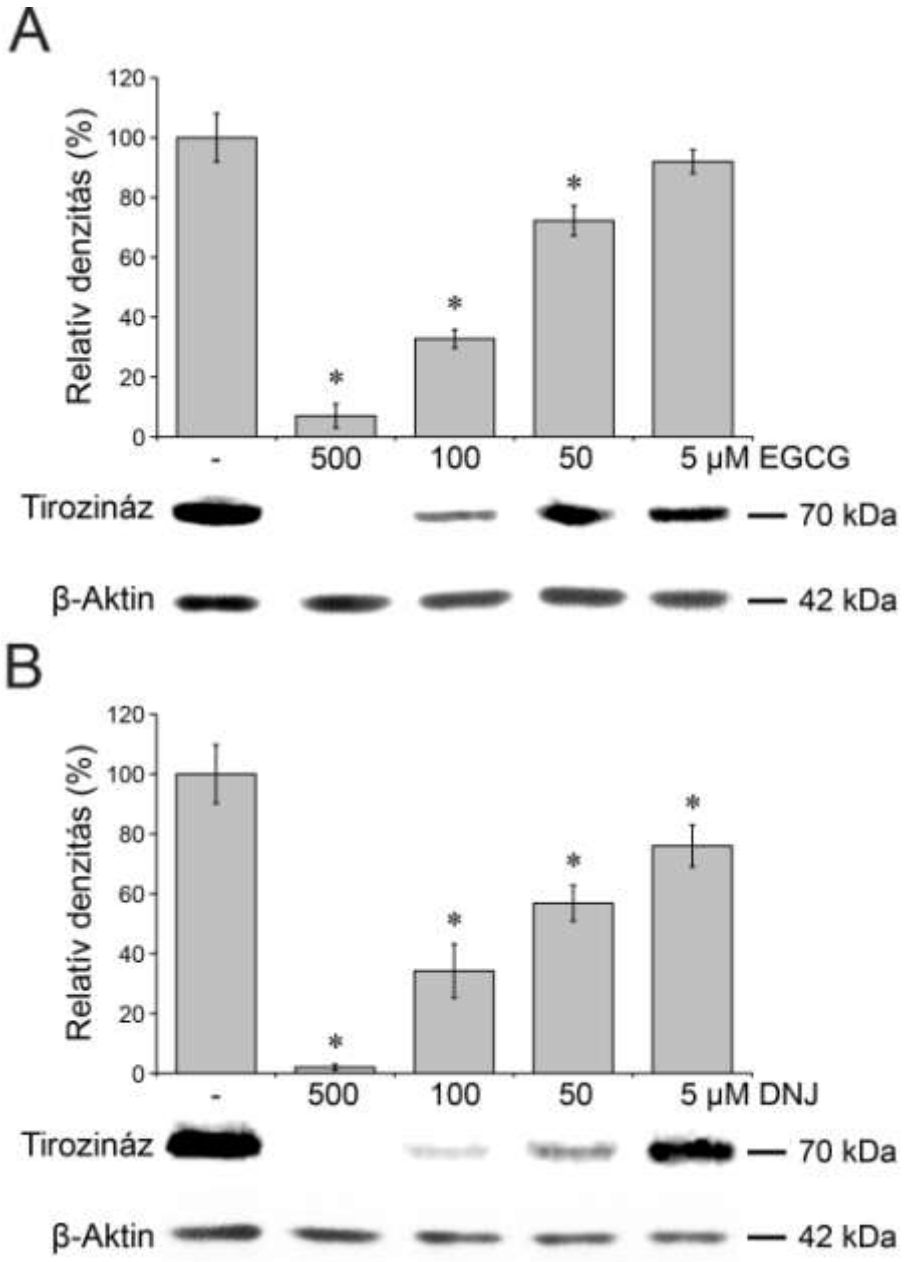
A perinukleáris ER hálózat szinte teljesen eltűnt és az organellum membránja elhúzódott a plazmamembrántól is. A nagy melanoszómák helyett kisebb vezikulák jelentek meg, melyek lehetnek összezsugorodott melanoszómák vagy a degenerálódott ER hálózatból származó vakuólumok is. DNJ kezelés hatására hasonló elváltozásokat figyeltünk meg (be nem mutatott eredmények).

4.7. Tirozináz enzim fehérje szintű expressziójának koncentráció- és időfüggő gátlása EGCG-vel

A melanóma sejteket EGCG-vel (5-500 μM) és DNJ-vel (5-500 μM) kezeltük, majd a sejtlizátumokban kétféle módszerrel vizsgáltuk a tirozináz fehérje mennyiségét. Az elektroforézist követő, enzim-aktivitáson alapuló gélfestés, valamint a Western blot analízis egyaránt csökkent tirozináz fehérjeexpressziót mutatott az EGCG-vel és DNJ-vel kezelt mintákban. A tirozináz fehérje mennyisége mindkét vizsgált hatóanyag esetében koncentrációfüggő módon változott (**19. ábra**). Az EGCG hatása 50 μM koncentrációnál már szignifikáns volt, és 150 μM koncentráció felett módszereinkkel alig lehetett tirozináz fehérjét detektálni.

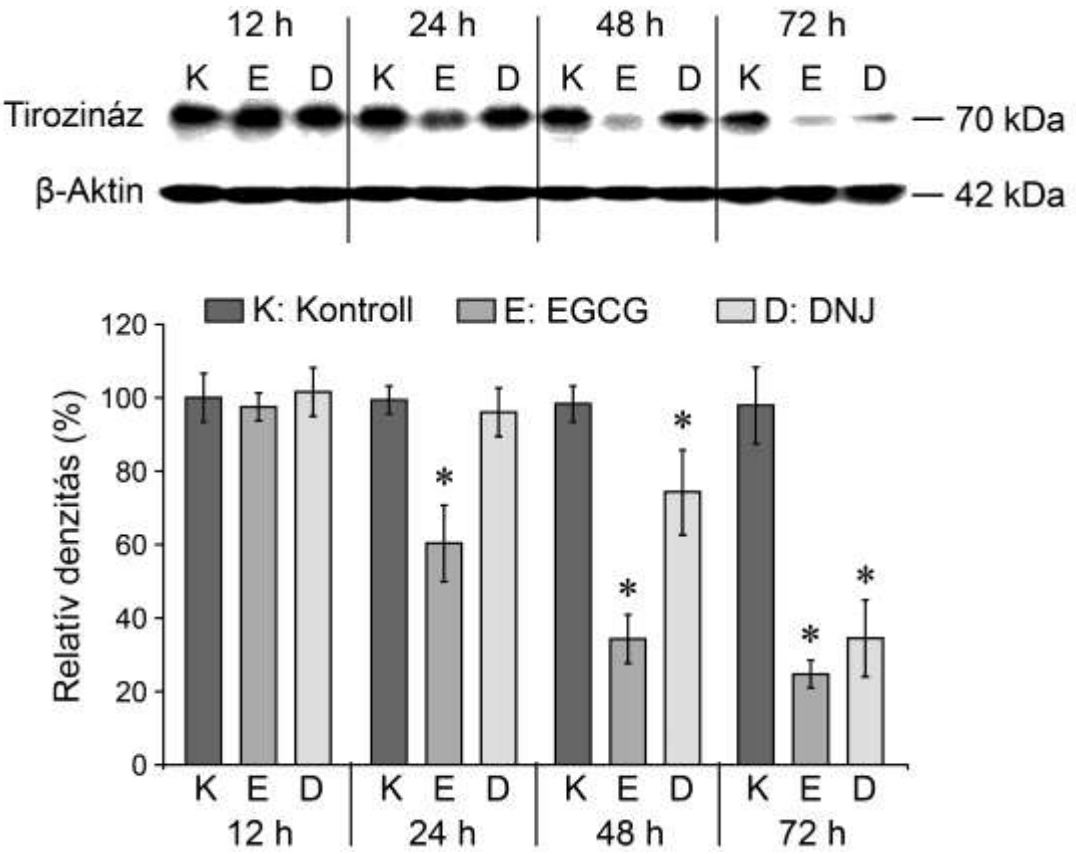
A DNJ proteinglikozilációra gyakorolt gátló hatását B16 melanóma sejtekben 72 órán át tartó kezelés esetén mutatták ki, és rövidebb kezelések hatásáról nem állt rendelkezésünkre adat. Ezért megvizsgáltuk, hogy a kezelés időtartama, hogyan befolyásolja a különböző glukozidázinhibitorok – EGCG, DNJ – melanoma sejtekre gyakorolt hatását. A sejteket 100 μM koncentrációjú EGCG-vel és DNJ-vel kezeltük 12, 24, 48 és 72 órán át, majd a sejtek lizálását és minták megfelelő előkészítését követően a fehérjemennyiségeket Western blot segítségével detektáltuk.

A különböző időtartamú kezelések hatására a tirozináz enzim mennyisége eltérő mértékben csökkent, és az EGCG-, illetve DNJ-kezelés során a hatás kinetikájában mérsékelt eltéréseket figyelhettünk meg (**20. ábra**). EGCG-kezelés során a tirozináz fehérje mennyisége már 24 óra alatt csökkent, majd a hosszabb időtartamú kezelésnél a fehérje expressziójának további gátlását tapasztaltuk. DNJ-kezelés hatására csak 48 óra elteltével detektáltunk szignifikáns mértékű csökkenést a tirozináz fehérje mennyiségében. Az EGCG hatása szinte már 48 órás kezelésnél elérte a maximumát, a DNJ-nél ennél hosszabb idejű inkubációra volt szükség.



19. ábra. EGCG és DNJ koncentrációfüggő hatása a tirozináz fehérje mennyiségére

Az SK-Mel 28 sejteket 72 órán át kezeltük EGCG-vel (5-500 μM) vagy DNJ-vel (5-500 μM). A sejtlizátumok tirozináz fehérjeszintjeit Western blot analízissel vizsgáltuk és a jelölés intenzitását denzitometriával (ImageQuant software) hasonlítottuk össze. A fenti diagram (három független kísérletből származó eredmények) mutatja a β-aktinra normalizált és kontrollhoz viszonyított relatív denzitásokat százalékban kifejezve (átlag ± szórás; n = 3). * P < 0.05 a kontrolltól való szignifikáns különbség. A képek 3 független kísérlet egy-egy tipikus eredményét mutatják.



20. ábra. Az EGCG- és DNJ-kezelések hatásának időfüggése

Az SK-Mel 28 sejteket 12, 24, 48, 72 órán át kezeltük EGCG-vel (100 µM) vagy DNJ-vel (100 µM). A sejtlizátumok tirozináz fehérje szintjeit Western blot analízissel vizsgáltuk és a jelölődés intenzitását denzitometriával (ImageQuant software) hasonlítottuk össze. A fenti diagram (3 független kísérletből származó eredmények) mutatja a β-aktinra normalizált és kontrollhoz viszonyított relatív denzitásokat százalékban kifejezve (átlag ± szórás; n = 3). * P < 0.05 a kontrolltól való szignifikáns különbség. A képek 3 független kísérlet egy tipikus eredményét mutatják.

Eredményeink alapján a további kísérletekhez a glukozidáz inhibitorokat 100 µM koncentrációban alkalmaztuk és a sejteket 72 órán át kezeltük.

4.8. A tirozináz mRNS szintű expressziója EGCG-vel kezelt sejtekben.

Hipotézisünk szerint a glikoprotein-szintézis gátlása az EGCG-kezelés hatására posztranszlációs szinten következett be. Annak érdekében, hogy feltételezésünket

tovább vizsgáljuk, először kvantitatív „real-time” PCR analízist végeztünk, hogy a tirozináz mRNS szintű expressziójának esetleges változását megvizsgáljuk. A kontroll, illetve 72 órán át EGCG-vel (100 µM) és DNJ-vel (100 µM) kezelt melanoma sejtekből RNS preparátumot készítettünk. A tirozináz mRNS szintjét konstitutív expresszióval rendelkező „housekeeping” géntermékre (GAPDH mRNS) normalizáltuk. A minták mRNS-tartalmának összehasonlítására egyszerűsített relatív kvantifikációs módszert, a komparatív Ct metodikát alkalmaztuk. A változás akkor állapítható meg ezzel a módszerrel, ha a ΔΔCt érték 1-nél nagyobb vagy -1-nél kisebb (az mRNS mennyisége a kontrollhoz viszonyítva több mint 200% vagy kevesebb, mint 50%). Az **5. táblázat** mutatja, hogy a tirozináz mRNS mennyisége a glukozidázinhibitorokkal történt kezelések hatására nem változott jelentős mértékben a kontrollhoz képest. Tehát a tirozináz fehérje expressziójában EGCG- és DNJ-kezelés hatására megfigyelt nagymértékű csökkenés hátterében nem az mRNS mennyiségének csökkenése áll.

	Kontroll	EGCG	DNJ
Tirozináz mRNS	100%	81,23%	65,98%

5. táblázat. Tirozináz mRNS szintje a melanóma sejtekben

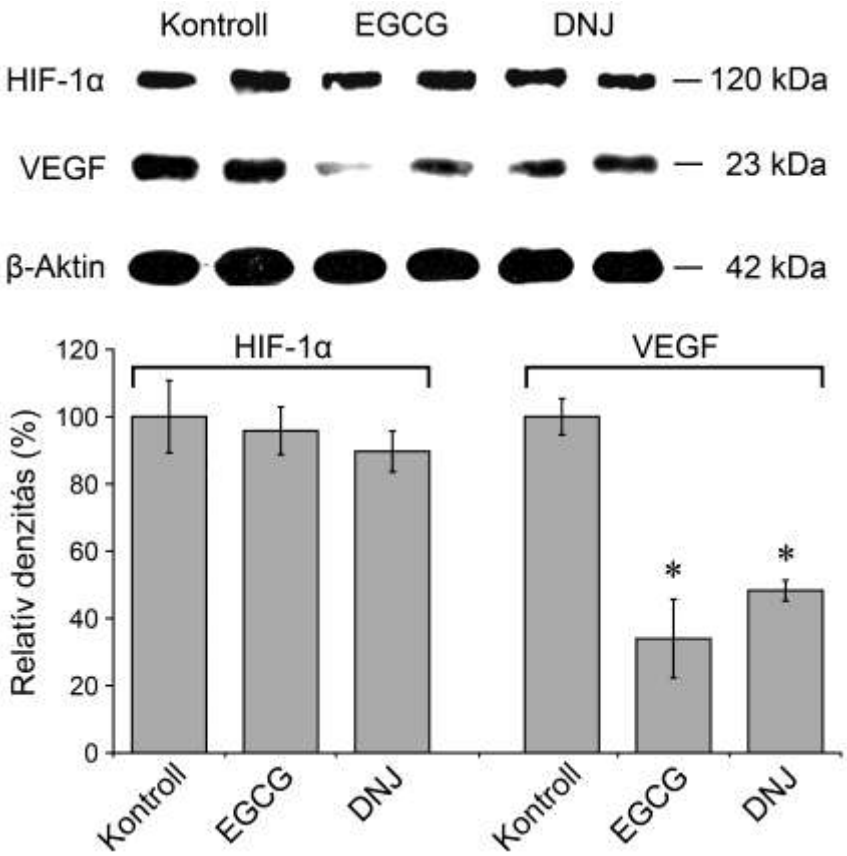
A cDNS mintákat a 72 órán át EGCG-vel (100 µM) vagy DNJ-vel (100 µM) kezelt SK-Mel 28 sejtek teljes RNS izolálását követően készítettük el. A tirozináz mRNS szintjét kvantitatív ”real-time” PCR analízissel hasonlítottuk össze. A ciklusszámokat a GAPDH mRNS-re kapott értékekre normalizáltuk. Az eredményekből a tirozináz mRNS relatív mennyiségét a módszerekben részletezettek alapján számoltuk. A módszer a legalább kétszeres eltérés (kontroll több mint 200%-a vagy kevesebb mint 50%-a) érzékelésére alkalmas.

4.9. EGCG-kezelés hatása a VEGF fehérje mennyiségére

A modellfehérjeként vizsgált tirozináz mellett célul tűztük ki egy olyan glikoprotein vizsgálatát is, amely a teaflavanolok tumorellenes hatásával közvetlen összefüggésben állhat. A vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (VEGF) olyan glikoprotein, amely megfelel ennek a kritériumnak, hiszen az endotelsejtek proliferációjának serkentése révén kulcsszerepet játszik a szolid tumorok

vaszkularizációjában. Mivel a VEGF mennyisége elsősorban a HIF1α (hypoxia indukált faktor 1α) szabályozása alatt áll, kísérleteinkben e transzkripciós faktor mennyiségének esetleges változását is nyomon követtük.

Kísérleteink során a melanoma sejteket 72 órán át 100 μM EGCG-vel vagy 100 μM DNJ-vel kezeltük, majd a sejtlizátumokban Western blot analízis segítségével vizsgáltuk a VEGF és HIF1α fehérjék szintjét. Bár a HIF1α mennyiségében nem észleltünk szignifikáns változást, a VEGF fehérje expressziója – a tirozináz enzimnél kapott eredményekhez hasonlóan – mindkét glukozidázinhibitor hatására jelentősen csökkent (**21. ábra**).



21. ábra. EGCG hatása a HIF1α és VEGF fehérje mennyiségére

Az SK-Mel 28 sejteket 72 órán át kezeltük EGCG-vel (100 μM) vagy DNJ-vel (100 μM). A sejtlizátumok HIF1α és VEGF fehérje szintjeit Western blot analízissel vizsgáltuk és a jelölődés intenzitását denzitometriával (ImageQuant software) hasonlítottuk össze. A fenti diagram (3 független kísérletből származó eredmények) mutatja a β-aktinra normalizált és kontrollhoz viszonyított relatív denzitásokat százalékban kifejezve (átlag ± szórás; n = 3). * P < 0.05 a kontrolltól való szignifikáns különbség. A képek 3 független kísérlet egy tipikus eredményét mutatják.

A VEGF és HIF1α mRNS szintű expressziójának vizsgálatára a mintákat kvantitatív „real-time” PCR-rel analizáltuk. Sem az EGCG, sem a DNJ nem okozott értékelhető mértékű változást a két fehérjét kódoló mRNS mennyiségében (**6. táblázat**).

Mindezek alapján elmondhatjuk, hogy az általunk vizsgált glukozidázinhibitorok a HIF1α expresszióját nem befolyásolják, azonban a VEGF glikoprotein mennyiségét – a tirozinázéhoz hasonlóan – az mRNS szintjének befolyásolása nélkül csökkentették.

	Kontroll	EGCG	DNJ
Tirozináz	100%	81,23%	65,98%
HIF1α	100%	70,71%	93,30%
VEGF	100%	81,45%	75,79%

6. táblázat. Tirozináz, HIF1α és VEGF mRNS szintje a melanóma sejtekben

A cDNS mintákat a 72 órán át EGCG-vel (100 µM) vagy DNJvel (100 µM) kezelt SK-Mel 28 sejtek teljes RNS izolálását követően készítettük el. A tirozináz mRNS szintjét kvantitatív ”real-time” PCR analízissel hasonlítottuk össze. A ciklusszámokat a GAPDH mRNS-re kapott értékekre normalizáltuk. Az eredményekből a tirozináz mRNS relatív mennyiségét a módszerekben részletezettek alapján számoltuk. A módszer a legalább kétszeres eltérés (kontroll több mint 200%-a vagy kevesebb mint 50%-a) érzékelésére alkalmas .

4.10. A tirozináz és a VEGF fehérjék fokozott proteaszomális lebontása EGCG-vel kezelt sejtekben

Eredményeink alapján az EGCG és DNJ zavart okoz mindkét vizsgált glikoprotein termelésében, de ez a változás az mRNS szintjében nem mutatkozik meg. Mindezek alapján kizárhatjuk az általunk használt glukozidázinhibitorok transzkripciós szintű hatását, és valószínűsíthető, hogy a tirozináz és VEGF fehérje mennyiségének csökkenése transzlációs vagy poszttranszlációs szintű folyamatok következménye. Amennyiben eredeti hipotézisünk helyes, akkor a glukozidáz gátlása zavart okoz a glikoproteinek érésében az ER lumenében. Az EGCG- és DNJ-kezelés hatására a fehérjék mennyiségében észlelt csökkentés valószínű magyarázata, hogy az érésükben

megzavart glikoproteinek a minőségellenőrző rendszeren keresztül az ERAD felé irányítódnak, így végül a proteaszómákban lebomlanak. Ennek vizsgálata céljából a glukozidázinhibitorok hatását olyan melanoma sejteken is tanulmányoztuk, melyeket egyidejűleg a proteaszómagátló laktacisztinnel is kezeltünk és ezáltal kivédtük, hogy az éretlen glikoproteinek lebontásra kerüljenek.

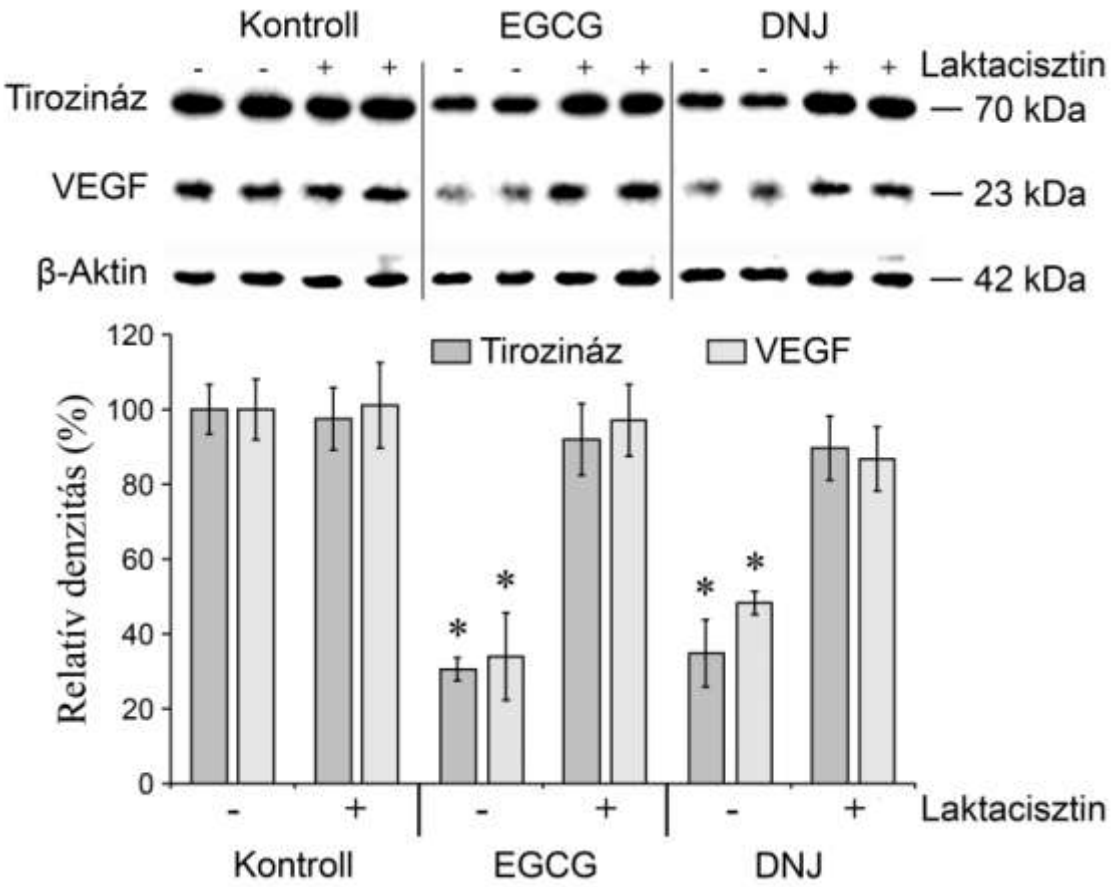
Először megismételtük a tirozinázaktivitás *in situ* szemikvantitatív mérését laktacisztin (2,5 µM) jelenlétében. A glukozidázinhibitorok laktacisztin jelenlétében nem okoztak érdemi zavart a melanin termelődésben. A proteaszóma gátlása esetén a pigmenttermelés – korábban EGCG és DNJ hatására megfigyelt (**17. ábra**) – csökkenése alig volt észlelhető, vagyis az aktív tirozináz mennyiségének csökkenését a proteaszomális lebontás gátlása szinte teljesen kivédte (**22. ábra**).

***22*. ábra. Glukozidázgátlók hatása a laktacisztinnel kezelt melanóma sejtek aktív tirozináz enzimének mennyiségére**

Az intakt SK-Mel 28 melanóma sejtek tirozináz aktivitását sejtkultúra lemezeken in situ detektáltuk. A sejteket 72 órán át kezeltük EGCG-vel (100 µM) és DNJ-vel (100 µM) laktacisztin (2,5 µM) jelenlétében, majd 30 percig inkubáltuk L-DOPA-t és 3-metil-2-benzotiazolinon hidrazont tartalmazó PBS oldatban. A tirozináz enzim aktivitására a lemezek sötét pigmentációjának (melanin) intenzitásából következtettünk. Az itt látható ábra 4 független kísérlet egyikének tipikus eredményét mutatja.

Ezt követően Western blot segítségével hasonlítottuk össze a tirozináz fehérje mennyiségét a mintákban. A laktacisztines kezelés önmagában nem okozta a tirozináz fehérje szintjének jelentős változását a sejtekben, ami arra utal, hogy a proteaszomális

lebontásnak normál körülmények között nincs fontos szerepe a tirozináz fehérje mennyiségének a szabályozásában (**23. ábra**).



23. ábra. EGCG és DNJ hatása a tirozináz és VEGF fehérje expressziójára laktacisztin jelenlétében, ill. anélkül

Az SK-Mel 28 sejteket 72 órán át kezeltük EGCG-vel (100 µM) és DNJ-vel (100 µM) laktacisztin (2,5 µM) jelenlétében és anélkül. A tirozináz és VEGF fehérje mennyiségét a sejtlizátumokból Western blot segítségével detektáltuk, és a jelölődés intenzitását denzitometriával (ImageQuant software) hasonlítottuk össze. A fenti diagram (3 független kísérletből származó eredmények) mutatja a β-aktinra normalizált és kontrollhoz viszonyított relatív denzitásokat százalékban kifejezve (átlag ± szórás; n = 3). *P < 0,05 a kontrolltól való szignifikáns különbség. A képek 3 független kísérlet egy tipikus eredményét mutatják.

Az EGCG-vel vagy DNJ-vel kezelt sejtekben azonban a laktacisztin jelentősen – a kontroll szintjéig – növelte a tirozináz mennyiségét. Az *in situ* aktivitásmérés eredményeivel összhangban – a proteaszóma gátlása tehát szintje teljesen kivédte a

glukozidázinhibitorok hatását. Hasonló eredményt kaptunk a VEGF esetében is: laktacisztin hatására ugyan nem emelkedett a kontroll (EGCG-vel és DNJ-vel nem kezelt) sejtek VEGF-tartalma, de a proteaszóma blokkolása megakadályozta a VEGF-szint glukozidázgátlók által kiváltott csökkenését (**23. ábra**). Eredményeink azt mutatják, hogy EGCG- és DNJ-kezelés hatására a vizsgált glikoproteinek (tirozináz és VEGF fehérje) proteaszomális lebontása jelentősen felerősödik.

A laktacisztin transzkripciós vagy egyéb pre-transzlációs szinten kifejtetett esetleges hatásának kizárására kvantitatív real-time PCR analízist végeztünk. A mérés nem mutatott szignifikáns eltérését a tirozináz, a HIF1α és a VEGF mRNS szintű expressziójában sem EGCG, sem DNJ kezelés hatására laktacisztin jelenlétében (**7. táblázat**). Eredményeink alapján a melanocitákban az EGCG és DNJ hatását a laktacisztin a transzláció után, feltehetően a glikoproteinek érési és lebontási fázisaiban ellensúlyozta.

	Kontroll	EGCG	DNJ
Tirozináz	100%	81,23%	65,98%
HIF1α	100%	70,71%	93,30%
VEGF	100%	81,45%	75,79%

7. táblázat. Tirozináz, HIF1α és VEGF mRNS szintje a melanóma sejtekben laktacisztin hozzáadása mellett

A cDNS mintákat laktacisztin hozzáadása mellett 72 órán át EGCG-vel (100 μM) vagy DNJvel (100 μM) kezelt SK-Mel 28 sejtek teljes RNS izolálását követően készítettük el. A tirozináz mRNS szintjét kvantitatív "real-time" PCR analízissel hasonlítottuk össze. A ciklusszámokat a GAPDH mRNS-re kapott értékekre normalizáltuk. Az eredményekből a tirozináz mRNS relatív mennyiségét a módszerekben részletezettek alapján számoltuk. A módszer a legalább kétszeres eltérés (kontroll több mint 200%-a vagy kevesebb mint 50%-a) érzékelésére alkalmas.

5. Megbeszélés

A zöld tea egészségre gyakorolt jótékony hatásait elsősorban magas flavanoltartalmának köszönheti. Ezek a polifenol szerkezetű és a katekinek családjába tartozó vegyületek kitűnő antioxidánsok, ami némely hatásukat önmagában is megmagyarázhatja. Emellett azonban specifikusabb effektusaikat is megfigyelték, melyek közül a daganatkialakulás és -növekedés gátlása szempontjából kiemelendő, hogy akadályozzák az angiogenezist, a daganatsejtek proliferációját, és sok esetben a tumorsejtek apoptózisát váltják ki. E jelenségek intenzív kutatása számos molekuláris mechanizmust tárt fel, de nem jelenthető ki, hogy a flavanolok daganatellenes hatásának molekuláris támadáspontjai és mechanizmusai kétséget kizáróan tisztázódtak volna, ezért jó néhány részlet még tisztázásra szorul.

A daganatellenes hatások szempontjából az ER rendkívül izgalmas kutatási terület, hiszen az organellum az antiproliferatív és proapoptotikus hatások egyik lehetséges kiindulópontja. Az ER-hez kötött riboszómák segítségével szintetizálódnak a szekrécióra kerülő fehérjék, valamint azon intracelluláris fehérjék, melyek rendeltetési helye az ER, a Golgi apparátus, a lizoszómák vagy a plazma membrán. E fehérjék érése (foldingja és poszttranszlációs módosításai) is nagyrészt az ER lumenében történik. A glikoziláció – amely az egyik legjelentősebb poszttranszlációs módosítás – a fehérjék minőségellenőrzésében is szerepet játszik. Az N-glikoproteinek érése során az egységes oligoszacharid oldalláncokról a glukozidáz és mannozidáz enzimek meghatározott sorrendben hidrolizálják a glukóz és mannóz alegységeket. A két, disztális glukóz molekula lehasítását követően, a fennmaradó, proximális glukóz molekulának kitüntetett szerepe van: ez az „éretlenségi jel” mutatja, hogy fehérje még nem érte el a natív konformációját. Ha a glukozidáz II enzim lehasítja ezt a kitüntetett glukóz alegységet, a fehérje ellenőrzés alá kerül, és eldől a további sorsa. Az érett, natív fehérje továbbhaladhat a szekréciós útvonalon, a még éretlen polipeptid azonban vagy újraglukozilálódik, és az ER chaperonjai ismételt kísérletet tesznek kijavítására, vagy egy mannóz alegysége is lehasad, és lebomlik az ERAD útvonalon. Ebből kifolyólag, a glukozidáz II enzimnek központi szerepe van mind a fehérjeérésben, mind a glikoproteinek minőségellenőrzésében.

Amennyiben az ER fehérjeérlelő kapacitása nem tud lépést tartani a polipeptid láncok szintézisével, akkor a nem megfelelően hajtogatott („unfolded” vagy „misfolded”) fehérjék felhalmozódnak a lumenben, ami beindíthatja az UPR („unfolded protein response”) folyamatát. Az UPR alapvető célja az ER terhelése és teljesítőképessége közti megbomlott egyensúly helyreállítása (fehérjeszintézis feltartóztatása, chaperonok és foldázok szintézisének fokozása, ER méretének növelése, ERAD stimulálása). Ugyanakkor a súlyosan károsodott sejtekben, ahol az ER működése nem hozható egyensúlyba, az UPR a programozott sejthalált is beindíthatja.

Hipotézisünk szerint a teaflavanolok, köztük a leginkább kutatott EGCG, antiproliferatív és proapoptotikus hatásaiban szerepet játszhat az ER-ben történő fehérjeérés és -minőségellenőrzés zavara, és az ezek által előidézett UPR.

Elsőként megvizsgáltuk a teaflavanolok glukozidáz II enzimre gyakorolt közvetlen hatását. Ehhez patkány máj mikroszómát használtunk, amely túlnyomórészt ER-ből származó vezikulumokat tartalmaz. Miután megállapítottuk, hogy a mesterséges szubsztrátok transzportja sebességmeghatározó, a vezikulumok membránját pórusképző alameticinnel permeabilizáltuk, ami lehetővé teszi a szubsztrátok és a gátlószerek szabad bejutását a mikroszóma lumenébe. Ilyen körülmények között a glukozidáz II aktivitás mindkét mesterséges szubsztrát alkalmazásakor – bár eltérő kinetikai paraméterekkel jellemezhető – Michaelis-Menten kinetikát mutatott.

Összehasonlítva a glukozidáz II különböző teakatekinek általi gátlásának koncentrációfüggését, megállapíthatjuk, hogy jelentős különbség van e vegyületek hatékonyságában. Az EGC és a GC, melyekből hiányzik a gallát csoport, kevésbé voltak hatékonyak, mint a többi vizsgált flavanol. Ugyanakkor a gallo csoport kapcsolódásának konfigurációja is nagyban befolyásolja a gátló hatást: a GCG IC_{50} és K_i értékei szinte megegyeznek az NBDJ esetében kapott értékekkel, míg az EGCG hatékonysága ennél kisebb volt. Bár a vizsgált flavanolok között az EGCG nem bizonyult a glukozidáz II leghatékonyabb gátlószerének, a továbbiakban mégis ezzel végeztük a vizsgálatokat, mert ez van jelen legnagyobb mennyiségben a zöld tea levelében és annak főzetében, valamint e katekint tanulmányozták legkiterjedtebben, és így erről áll rendelkezésre a legtöbb adat. Elsőként a glukozidáz II enzim EGCG általi gátlását elemeztük permeabilizált máj mikroszómán, és azt találtuk, hogy az nem kompetitív kinetikát mutat.

A mikroszómán végzett kísérletek után kimutattuk, hogy az EGCG a Hepa1c1c7 egér hepatóma sejtekben is gátolja a glukozidáz II aktivitását. Ez a hatás mind alameticinnel permeabilizált, mind intakt sejteken megfigyelhető és hasonló mértékű volt. Az intakt sejtekben észlelt hatás legalább 12 órán át változatlan maradt, vagyis tartós kezelések esetén tartós enzimgátlással lehet számolni. A permeabilizált sejtek progresszív pusztulása megakadályozta, hogy azokban három óránál tovább vizsgáljuk a gátlást, de erre nem is volt szükség. A plazma membrán és ER membrán permeabilizálásának az volt a szerepe, hogy lássuk, a hepatóma sejtekben is közvetlenül az enzimen hat az EGCG és nem a mesterséges szubsztrát (MUG) bejutását akadályozza, aminek nem volna relevanciája.

Mivel a glukozidáz II enzim működése kulcsfontosságú az ER glikoprotein-érési és -minőségellenőrzési folyamataiban, feltételezhető volt, hogy az azt gátló EGCG ER-stresszt és UPR-t vált ki, amely akár a sejtek apoptózisához is vezethet. Várakozásainknak megfelelően, az EGCG-vel kezelt sejtekben az UPR számos részjelensége (eIF2-foszforiláció, CHOP-indukció, prokaszpáz-12 hasítása) megfigyelhető volt, és ezek egy része kapcsolatba hozható az apoptózis progresszív fokozódásával is. Érdekes, hogy az ER chaperonjainak indukciója – amelyet az UPR tipikus markereként szokás vizsgálni – elmaradt. A hepatóma sejteken végzett kísérleteink tehát azt támasztják alá, hogy ebben az intenzív fehérjeszekréciót folytató sejtben az EGCG-kezelés ER-stresszt és részleges UPR-t vált ki, amely hozzájárulhat a sejtek pusztulásához is.

Megfigyeléseink tovább erősítik hipotézisünket, mely szerint az EGCG a glukozidáz II gátlásán keresztül megzavarja a glikoproteinek érését és minőségellenőrzését az ER lumenében. A továbbiakban célul tűztük ki e feltételezett mechanizmus vizsgálatát. Kísérleteinkhez melanóma sejteket és az általuk szintetizált (endogén) tirozináz enzimet választottuk. A tirozináz ugyanis könnyen kimutatható poliglikozilált glikoprotein enzimfehérje, amelyet ezért széles körben alkalmaznak a glikoproteinek érésének tanulmányozására. A melanocitákban termelődő enzim a melanin pigment szintézisének sebességmeghatározó lépését katalizálja. A tirozináz fehérje egy polipeptid láncból álló N-glikoprotein, amely hat N-glikozilált oldallánccal rendelkezik. Az N-glikozilációs pontok kitüntetett szerepére utal, hogy az evolúciósan konzervatív fehérje szerkezete egérben és emberben megegyezik [34], és N-

glikozilációjának defektusa, vagyis az oligoszacharid láncok hiánya az enzim inaktivitásához és albinizmushoz vezet [35]

Az EGCG-kezelésnek az érett tirozináz fehérje mennyiségére gyakorolt hatását Sk-Mel 28 melanóma sejteken vizsgáltuk. Az intakt sejteken folytatott aktivitásmérések csak hozzávetőleges mennyiségi meghatározásra alkalmasak, azonban jól mutatták, hogy az EGCG-vel vagy DNJ-vel kezelt sejtekben jelentősen csökkent a tirozináz aktivitás. Fontos megjegyezni, hogy az EGCG közvetlenül nem befolyásolta a tirozináz enzim működését, tehát a jelenség az enzim mennyiségének változásán alapult. A Western blottal és natív elektroforézissel végzett méréseink szerint a tirozináz fehérje mennyiségét az EGCG valóban szignifikánsan csökkentette, és az effektus idő- és koncentrációfüggőnek bizonyult. Ezzel összhangban voltak morfológiai vizsgálataink eredményei. Az EGCG-vel kezelt sejtekben ugyanis a melanoszómák száma is csökkent és struktúrája is megváltozott, aminek hátterében az organellumot alkotó fehérjekomponensek csökkent termelődése állhat.

A fehérjemennyiség csökkenése mögött persze a transzkripció vagy az mRNS érésének és féléletidejének változása is feltételezhető; ezért kvantitatív „real-time” PCR analízissel hasonlítottuk össze a tirozináz mRNS-ének mennyiségét a kezelt és kezeletlen sejtekben. Eredményeink azt mutatták, hogy a glukozidázinhibitorok nem változtatták szignifikáns mértékben a tirozináz mRNS mennyiségét, tehát a tirozináz glikoprotein szintjének csökkenése transzlációs vagy poszttranszlációs hatás következménye volt.

Kiinduló hipotézisünk szerint az EGCG posszttranszlációs szinten hat, hiszen a fehérjeérést és -minőségellenőrzést zavarja meg az ER lumenében. Amennyiben igaz a feltételezésünk, az éretlen – de legalábbis éretlennek ítélt – tirozináz glikoprotein molekulák sikertelen korrekciós kísérletek után az ERAD-on keresztül eliminálódnak. Ebben az esetben az ERAD, illetve a proteaszomális fehérjelebontás gátlásával az EGCG hatása jelentősen csökkenthető vagy akár ki is védhető.

Az általunk vizsgált melanóma sejtekben proteaszómainhibitor laktacisztin hatására nem észleltünk érdemi változást a tirozináz fehérje aktivitásában és mennyiségében, ami arra utal, hogy normál körülmények között a proteaszomális lebontásnak nincs érdemi szerepe a tirozináz fehérje kifejeződésének szabályozásában.

Laktacisztin jelenlétében azonban az EGCG és a DNJ sem csökkentette a sejtek tirozináz aktivitását, valamint a tirozináz fehérje mennyiségét, ami azt jelenti, hogy e két glukozidázgátlóval kezelt sejtekben a tirozináz fehérje mennyisége valóban a fokozott proteaszomális lebontás következtében csökkent, és ezért a hatást az ERAD akadályozása kivédi. Megjegyzendő, hogy eredményeink szerint az éretlenségi jelként megmaradt glukóz egységet tartalmazó és az ERAD rendszerében lebomló tirozináz fehérje már rendelkezik enzimaktivitással. Ez magyarázhatja azt a jelenséget, hogy az ERAD kiküszöbölése nem csupán a tirozináz fehérje mennyiségét, hanem a tirozináz aktivitást is növeli.

A hiperpigmentációs betegségek bőrgyógyászati kezelésében a tirozináz enzim gátlásának régóta terápiás jelentősége van; és erre – újabb irodalmi adatok alapján – a tirozináz fehérjeérésének befolyásolásán keresztül is lehetőség nyílik [181]. A lokális szerként használt hidrokinonok, retionoidok gyakran okoznak bőrirritációt. Az elmúlt időszakban intenzív kutatások folytak egy jobban tolerálható, de mégis hatékony szer irányába, így terelődött a figyelem a természetes anyagok felé, többek között a teakatekinek felé is [182]. Eredményeink alapján az EGCG csökkenti a tirozináz fehérje mennyiségét, ami magyarázatul szolgálhat a zöld tea hiperpigmentációban kifejtett jótékony hatására.

Mindazonáltal, kísérleteinkben a tirozináz elsősorban a glikoprotein-érés és -minőségellenőrzés modelljeként szerepelt, és a tirozináz fehérje érésének gátlását főként mint a glikoprotein-érés általános zavarának jelét tartjuk fontos megfigyelésnek. Ráadásul eredményeink azt támasztják alá, hogy ez a hatás nem korlátozódik egyik-másik tumorsejtvonalra, vagy akár a tumorsejtekre általában. Az EGCG és a DNJ fehérjeérésre gyakorolt hatásának általános voltát az is alátámasztja, hogy a két hatóanyag a tirozinázhoz hasonlóan a másik vizsgált glikoprotein, a VEGF termelődését is poszttranszlációs mechanizmussal gátolta a kezelt melanóma sejtekben. A VEGF fehérje mennyisége jelentős mértékben csökkent az EGCG-vel vagy DNJ-vel kezelt sejtekben, annak ellenére, hogy a HIF1α mennyisége és az mRNS-szintek változatlanok maradtak. Ráadásul ezt a hatást is ki lehetett védeni a proteaszóma laktacisztin általi gátlásával. Eredményeink tehát bizonyítják, hogy az EGCG poszttranszlációs szintű fehérjeérési zavart okoz az ER lumenében, amelynek hátterében nagy valószínűséggel a glukozidáz II enzim gátlása áll.

A zöld tea rendszeres fogyasztásával a humán plazmában 1-4 μM EGCG koncentrációt lehet elérni [183]. A legmagasabb EGCG-koncentráció, melyet egészséges önkéntesek vérkeringésében mértek 8,7 ± 4,5 μM volt; és ezt éjszakai éhezést követően, egyszeri dózisú (1200 mg EGCG) Polyphenon E (tisztított, koffeinmentes teakatekin készítmény) orális alkalmazásával érték el [184]. Zöld tea ivásakor a katekinek a gasztrointesztinális traktusból felszívódnak és bekerülnek a keringésbe, de nagyrészük gyorsan metabolizálódik, mely során főként glukuronidált, szulfatált, valamint metilált katekin konjugátumok keletkeznek. A katekinek egy részének polifenol váza már a gyomor-béltraktusban felhasad a bélflóra hatására. Ezzel együtt a teakatekinek és mikrobiális származékaik biológiai hasznosulási („bioavailability") értéke a 40%-ot is eléri [185]. A katabolitok biológiai hatásairól azonban sajnos nem áll rendelkezésre adat.

In vitro vizsgálatoknál a teaflavanolokat általában 10-100 μM koncentrációban alkalmazzák. Saját kísérleteinkben a tirozináz fehérje mennyiségének nagymértékű csökkenése 50-100 μM EGCG koncentráció mellett következett be. Ez a koncentráció jól összeegyeztethető azzal, amely a glukozidáz II enzim hatékony gátlásához szükséges (100 μM EGCG a glukozidáz II enzim 80-90% körüli gátlását eredményezte). Habár ezek a koncentrációk kb. egy nagyságrenddel magasabbak a *per os* fogyasztással elérhető szérumszinteknél, nem szabad megfeledkezni a teakatekinek metabolitjairól, melynek hatásai még kevéssé ismertek. Az is megemlítendő, hogy némely vizsgált katekinszármazék az EGCG-nél sokkal hatékonyabban gátolta az enzimet, pl. a GCG már 10μM-os koncentrációban 80% körüli gátlást tudott kifejteni. Emellett feltételezhető, hogy a teakatekinek feldúsulva, a szérumszintjüket meghaladó koncentrációt tudnak elérni intracellulárisan vagy a különböző kompartmentekben. Ezt a feltételezést támasztják alá azok az eredmények, amelyeket nemrégiben fluoreszcens EGCG-származékokkal végzett vizsgálatok szolgáltattak. A sejtek konfokális fluoreszcens mikroszkópos megfigyelése azt mutatta, hogy a flavanol gyorsan bejut a sejtbe és a fluoreszcens jelölés inhomogén formában jelentkezett a sejtek citoszóljában. Mindez azt valószínűsíti, hogy az EGCG valóban felhalmozódik a sejtben, és azon belül is bizonyos sejtorganellumokban, főként az ER és a mitokondriumban [186]. Az *in vitro* megfigyelt hatásokhoz hasonló metabolikus hatásokat tudtak elérni *in vivo* is a megtisztított katekinek intraperitonealis alkalmazásakor [187] és a zöld tea vagy EGCG

per os alkalmazásakor [188,189], ami szintén azt támasztja alá, hogy az effektív koncentráció *in vivo* is elérhető. Összességében ezek az eredmények arra utalnak, hogy a zöld tea flavanolok és származékaik valóban nagyobb koncentrációt érhetnek el a sejtekben vagy a szubcellularis kompartmentekben, mint a plazmában.

Eredményeink megerősítették hipotézisünket, mely szerint a tea flavanolok a glukozidáz II enzimre és a minőségellenőrző rendszerre kifejtett hatásukon keresztül befolyásolják a glikoproteinek érését. Ez az általunk leírt mechanizmus összekötőkapcsot jelenthet a glukozidáz II enzim gátlása, valamint az UPR indukciója és az ER eredetű apoptózis kiváltása között. A glikoziláció gátlása az éretlen – vagy legalábbis éretlenként megjelölt – fehérjék felhalmozódása révén ER-stresszt okoz, és az UPR aktiválásán keresztül apoptózishoz vezethet. Az N-glikoziláció gátlószereként ismert tunikamicint, valamint a glukozidázgátló castanospermint gyakran alkalmazzák a kísérletes UPR előidézésére [190,191]. Számos irodalmi adat támasztja alá, hogy a glikoproteinek érésének gátlása tumorellenes hatással bír. A kemoterápiás szerek hatékonyságának fokozására tehát új lehetőséget kínál az ER-stressz manipulálása, ezért az ER ígéretes újszerű daganatellenes terápiás célpontnak tekinthető [192]. A glikoziláció kezdeti lépését gátló tunikamicin, fokozta az erlotinib kemoterápiás ágens hatását nem kissejtes tüdőrákban. Egereken végzett kísérletek sora bizonyítja, hogy a glikoziláció lépéseinek az indolizidin alkaloid, swainsoninennel (a Golgi apparátusban az α-mannozidáz inhibitora) történő gátlása tumorellenes hatással rendelkezik. A swainsonin jelenleg klinikai vizsgálatok I., II. fázisában tart, melyek megerősítették tumorellenes hatását, de emellett számos mellékhatást, mint a májenzimek emelkedését, légzészavart, fáradtságot, anorexiát, anémiát, zavarodottságot is észleltek [193]. Ezzel összhangban áll az a megfigyelés, mely szerint a glukozidáz I és II enzimek hatékony gátlószerei (a castanospermin, illetve a nojirimicin-származékok, pl. DNJ) daganat- és vírusellenes hatásokkal rendelkeznek [194-198]. E mechanizmus szerepét a flavonoidok tumorgátló hatása esetén is számos megfigyelés támasztja alá [199,200].

A glukozidáz II által katalizált reakció az N-glikoproteinek érésének központi lépése, ezért ennek gátlása minden N-glikoprotein termelődésére hatással lehet. Különösen érdekes kérdés, hogy befolyásolja-e olyan glikoprotein érését is, melyeknek közvetlen szerepe van a tumorok növekedésében, illetve a metasztázisok kialakulásában. Ide sorolhatók elsősorban a növekedési faktorok, és azok receptorai,

valamint a sejt-sejt és sejt-extracelluláris mátrix kölcsönhatások fehérjéi is. Mi – az általunk vizsgált melanóma sejtekben jól kifejeződő – endogén VEGF termelődésének gátlását találtuk, de mindenképpen érdemes a kutatást kiterjeszteni más sejtekre és fehérjékre is. Saját megfigyeléseinkkel összhangban van az a nemrégiben közölt megfigyelés, mely szerint kolorektális karcinómában az EGCG-kezelés csökkenti egy másik – a tumornövekedésben és áttétképzésben is szerepet játszó – növekedési faktor, a „basic fibroblast growth factor" (bFGF) mennyiségét. Ráadásul ebben az esetben is kimutatták, hogy a proteaszomális degradáció fokozódása áll az alacsonyabb fehérjemennyiség hátterében [201]. A növekedési faktorok (VEGF, bFGF) elterelése a rendeltetési helyüktől az intracelluláris lebomlás felé izgalmas daganatellenes mechanizmus, amely a rákterápia számára új célpontokat és stratégiákat is kínál.

A megfigyelt jelenség a tea polifenolok toxicitásához is hozzájárulhat. Bár az EGCG-t általában széleskörű jótékony hatásokkal rendelkező, és bizonyított mellékhatásoktól mentes, természetes antioxidánsnak tekintjük, néhány egereken végzett *in vivo* tanulmány a nagy dózisú (egyszeri 1500 mg/kg, i.g. vagy 7 napon keresztül ismételt 50 mg/kg/nap i.p.) EGCG-kezelés hepatotoxicitását hangsúlyozza. A kiterjedt ER-rel rendelkező és abban intenzív glikoprotein-érlelést folytató, fehérjeszekretáló hepatociták az N-glikozilációra ható gyógyszerek és mérgek kiemelt célpontjai. Ezért szükséges a megfigyel jelenség tanulmányozása különböző eredetű tumoros és nem tumoros sejtek esetében, hogy jobban megbecsülhetők legyenek a fehérjeérés farmakológiás befolyásolásának jótékony vagy ártalmas *in vivo* következményei.

6. Következtetések

Munkánk során a teaflavanolok, elsősorban az EGCG glukozidáz II enzimre, és – ezen keresztül – az ER-ben zajló fehérjeérésre kifejtett hatását tanulmányoztuk. Kíváncsiak voltunk, hogy e hatóanyag előidézi-e az ER-ben érlelt glikoproteinek felhalmozódását és következményes proteaszomális lebomlását. Arra a kérdésre is kerestük a választ, hogy az EGCG hatására megfigyelt tumorsejt-apoptózis összefüggésbe hozható-e az ER-ben kialakult stressz állapottal, és az ennek hatására aktiválódó UPR-rel.

Eredményeinkből az alábbi következtetésekre jutottunk:

1. A vizsgált teaflavanolok egy része – köztük az EGCG – hatékonyan gátolja az ER glukozidáz II enzimét máj mikroszómában. E katekinek koncentráció-hatás görbéi alapján meghatározott gátlási paraméterei összevethetők voltak a széles körben alkalmazott glukozidázgátló DNJ-éhez. Az EGCG-által kifejtett enzimgátlás kinetikai jellemzése máj mikroszómában nem kompetitív mechanizmusra utalt.

2. A glukozidáz II enzim gátlása EGCG-vel kezelt, intakt hepatóma sejteken is kimutatható volt, és együtt járt az ER-stressz kialakulásával. Az EGCG hatására kialakult részleges UPR nem járt ugyan az ER chaperonjainak indukciójával, de az eIF2α foszforilációja mellett ER eredetű proapoptotikus elemeket (CHOP indukciója, prokaszpáz-12 hasítása) is magában foglalt. Ezek összefüggésbe hozhatók az EGCG-vel kezelt sejtek fokozott apoptózisával.

3. Sk-Mel 28 melanóma sejteken az EGCG és a DNJ koncentráció- és időfüggő módon csökkenti két glikoprotein, a tirozináz és a VEGF mennyiségét. A kezelt sejtekben nem változott a tirozináz és VEGF mRNS-ének mennyisége, valamint a HIF1α szintje. A két szer hatását a proteaszómagátló laktacisztin alkalmazásával ki tudtuk védeni. Mindez arra utal, hogy a tirozináz és a VEGF mennyiségének csökkenése

hátterében e glikoproteinek érésének és -minőségellenőrzésének zavara áll, és összefügghet a glukozidáz II enzim gátlásával.

Az általunk leírt jelenség a glukozidázgátlók tumorellenes (proapoptotikus és antiproliferatív) hatásának új mechanizmusait tárják fel. A glikoproteinek érésének és -minőségellenőrzésének általános zavara ER-stresszt és következményes UPR-aktiválódást eredményezhet, ami számos mechanizmus révén fokozhatja a sejtek apoptóziskészségét. Emellett bizonyos glikoproteinek közvetlen szerepet játszanak a sejtproliferácó szabályozásában, és – patológiás körülmények között – a daganatnövekedésben és áttétképződésben. E fehérjék érésének megzavarása és ERAD felé terelése szintén hozzájárulhat a glukozidázgátlók daganatellenes aktivitásához. Eredményeink tehát a teaflavanolok ismert tumorellenes hatásának jobb megértése mellett új terápiás célpontokat is kínál az ER-ben.

7. Összefoglalás

A zöld tea flavanoljai számos jótékony hatással rendelkeznek. Proapoptotikus és antiproliferatív tulajdonságaik miatt daganatellenes aktivitást is tulajdonítanak nekik.

Kimutattuk, hogy a teaflavanolok hatékonyan gátolják az endoplazmás retikulum (ER) glukozidáz II enzimét, mely a glikoproteinek érésében és minőségellenőrzésében játszik fontos szerepet. A legnagyobb mennyiségben jelenlévő polifenol, az epigallokatekin-gallát (EGCG) gátló hatását kinetikailag is jellemeztük és Hepa1c1c7 hepatóma sejtekben is kimutattuk.

Az EGCG-vel kezelt hepatóma sejtekben, részleges UPR-t és ER eredetű apoptózist észleltünk. Mindezek alapján valószínűsítettük, hogy az EGCG a glukozidáz II gátlásával zavart okoz a glikoproteinek érésében, ami ER-stresszhez vezet. Hipotézisünket Sk-Mel 28 melanóma sejteken, két glikoprotein, a tirozináz enzim és a „vascular endothelial growth factor" (VEGF) növekedési faktor kifejeződésének vizsgálatával igazoltuk.

EGCG-vel vagy deoxi-nojirimicinnel (DNJ) végzett kezelés hatására mindkét glikoprotein mennyisége csökkent, holott ezek mRNS szintű expressziója nem változott. Az ER-hez kapcsolódó degradáció (ERAD) akadályozása a proteaszómagátló laktacisztinnel kivédte az EGCG- vagy DNJ-kezelés hatását, ami alátámasztja, hogy mindkét szer effektusa poszttranszlációs szinten érvényesül.

Eredményeink alátámasztják eredeti feltételezésünket, mely szerint az EGCG a glukozidáz II enzim gátlása révén megzavarja a glikoproteinek ER-ben zajló fehérjeérési és minőségellenőrzési folyamatait, ami a tirozinázt, a VEGF-et, valamint feltételezhetően egyéb glikoproteineket is a lebontás, az ERAD felé irányít. Megfigyelésünk hozzájárulhat a tea-flavonolok ismert tumorellenes hatásmechanizmusának megértéséhez, és egyben az ER fehérjeérési folyamatait új terápiás célpontként helyezi előtérbe.

8. Summary

Green tea flavanols have many beneficial health effects. They are promising anticancer agents due to their proapoptotic and antiproliferative properties.

Tea flavanols were shown to inhibit the glucosidase II enzyme, which plays a central role in the glycoprotein maturation and quality control mechanism in the endoplasmic reticulum (ER). The kinetic parameters of this inhibition were further studied in rat liver microsomes, and the inhibitory effect of EGCG, the major tea flavanol was demonstrated in Hepa1c1c7 hepatoma cells too.

ER stress and a partial unfolded protein response (UPR) was observed in EGCG-treated Hepa1c1c7 cells. Our results indicate that EGCG interferes with protein processing in the ER presumably due to inhibition of glucosidase II, which causes ER stress and triggers elements of the UPR. This hypothesis was tested in SK-Mel28 human melanoma cells by assessing the effect of EGCG and deoxynojirimycin (DNJ) on the synthesis of two endogenous glycoproteins: tyrosinase and VEGF.

The levels of both glycoproteins were remarkably reduced despite unaltered mRNA expression in EGCG- or DNJ-treated cells compared to control. The attenuation of ER associated degradation (ERAD) with the proteasome inhibitor lactacystin could efficiently counteract the inhibitiory effect of EGCG and DNJ on the expression of tyrosinase and VEGF. These observations strongly suggest, that both agents interfere with posttranslational modifications in the ER.

In summary, our results support that EGCG is an efficient glucosidase II inhibitor, which interferes with protein processing and quality control in the ER, and hence diverts tyrosinase, VEGF and likely other glycoproteins towards proteasomal degradation. This mechanism might play an important role in the antitumor effect of EGCG and it provides glycoprotein maturation in the ER as novel promising anticancer target in tumor therapy.

9. Irodalomjegyzék

1. Baumann O, Walz B. (2001) Endoplasmic reticulum of animal cells and its organization into structural and functional domains. Int Rev Cytol, 205: 149-214.
2. Palade GE. (1956) The endoplasmic reticulum. J Biophys Biochem Cytol, 2(4 Suppl): 85-98.
3. Shibata Y, Voeltz GK, Rapoport TA. (2006) Rough sheets and smooth tubules. Cell, 126(3): 435-439.
4. Voeltz GK, Rolls MM, Rapoport TA. (2002) Structural organization of the endoplasmic reticulum. EMBO Rep, 3(10): 944-950.
5. Borgese N, Francolini M, Snapp E. (2006) Endoplasmic reticulum architecture: structures in flux. Curr Opin Cell Biol, 18(4): 358-364.
6. Csala M, Banhegyi G, Benedetti A. (2006) Endoplasmic reticulum: a metabolic compartment. FEBS Lett, 580(9): 2160-2165.
7. Ellgaard L, Helenius A. (2003) Quality control in the endoplasmic reticulum. Nat Rev Mol Cell Biol, 4(3): 181-191.
8. Fink AL. (1999) Chaperone-mediated protein folding. Physiol Rev, 79(2): 425-449.
9. Sevier CS, Kaiser CA. (2002) Formation and transfer of disulphide bonds in living cells. Nat Rev Mol Cell Biol, 3(11): 836-847.
10. Bulaj G. (2005) Formation of disulfide bonds in proteins and peptides. Biotechnol Adv, 23(1): 87-92.
11. Cabibbo A, Pagani M, Fabbri M, Rocchi M, Farmery MR, Bulleid NJ, Sitia R. (2000) ERO1-L, a human protein that favors disulfide bond formation in the endoplasmic reticulum. J Biol Chem, 275(7): 4827-4833.
12. Feige MJ, Hendershot LM. (2011) Disulfide bonds in ER protein folding and homeostasis. Curr Opin Cell Biol, 23(2): 167-175.
13. Freedman RB, Hirst TR, Tuite MF. (1994) Protein disulphide isomerase: building bridges in protein folding. Trends Biochem Sci, 19(8): 331-336.
14. Burda P, Aebi M. (1999) The dolichol pathway of N-linked glycosylation. Biochim Biophys Acta, 1426(2): 239-257.

15. Hubbard SC, Ivatt RJ. (1981) Synthesis and processing of asparagine-linked oligosaccharides. Annu Rev Biochem, 50: 555-583.
16. Jones J, Krag SS, Betenbaugh MJ. (2005) Controlling N-linked glycan site occupancy. Biochim Biophys Acta, 1726(2): 121-137.
17. Ádám V, Dux L, Faragó A, Fésüs L, Machovich R, Mandl J, Sümegi B. Fehérjeszintézis: a transzláció mechanizmusa és a polipeptidlánc további sorsa. In: Ádám V (szerk.), Orvosi Biokémia. Medicina Könyvkiadó Rt, Budapest, 2002.
18. Dempski RE Jr., Imperiali B. (2002) Oligosaccharyl transferase: gatekeeper to the secretory pathway. Curr Opin Chem Biol, 6(6): 844-850.
19. Kornfeld R, Kornfeld S. (1985) Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. Annu Rev Biochem, 54: 631-664.
20. Trombetta ES, Parodi AJ. (2003) Quality control and protein folding in the secretory pathway. Annu Rev Cell Dev Biol, 19: 649-676.
21. Mazola Y, Chinea G, Musacchio A. (2011) Integrating bioinformatics tools to handle glycosylation. PLoS Comput Biol, 7(12): e1002285.
22. Weng S, Spiro RG. (1993) Demonstration that a kifunensine-resistant alpha-mannosidase with a unique processing action on N-linked oligosaccharides occurs in rat liver endoplasmic reticulum and various cultured cells. J Biol Chem, 268(34): 25656-25663.
23. Trombetta SE, Parodi AJ. (1992) Purification to apparent homogeneity and partial characterization of rat liver UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase. J Biol Chem, 267(13): 9236-9240.
24. Herscovics A. (1999) Importance of glycosidases in mammalian glycoprotein biosynthesis. Biochim Biophys Acta, 1473(1): 96-107.
25. Hebert DN, Garman SC, Molinari M. (2005) The glycan code of the endoplasmic reticulum: asparagine-linked carbohydrates as protein maturation and quality-control tags. Trends Cell Biol, 15(7): 364-370.
26. Grinna LS, Robbins PW. (1979) Glycoprotein biosynthesis. Rat liver microsomal glucosidases which process oligosaccharides. J Biol Chem, 254(18): 8814-8818.
27. Strous GJ, Van Kerkhof P, Brok R, Roth J, Brada D. (1987) Glucosidase II, a protein of the endoplasmic reticulum with high mannose oligosaccharide chains and a rapid turnover. J Biol Chem, 262(8): 3620-3625.

28. Pelletier MF, Marcil A, Sevigny G, Jakob CA, Tessier DC, Chevet E, Menard R, Bergeron JJ, Thomas DY. (2000) The heterodimeric structure of glucosidase II is required for its activity, solubility, and localization in vivo. Glycobiology, 10(8): 815-827.
29. Alonso JM, Santa-Cecilia A, Calvo P. (1991) Glucosidase II from rat liver microsomes. Kinetic model for binding and hydrolysis. Biochem J, 278 (Pt 3): 721-727.
30. Kalz-Fuller B, Bieberich E, Bause E. (1995) Cloning and expression of glucosidase I from human hippocampus. Eur J Biochem, 231(2): 344-351.
31. Bichet D, Cornet V, Geib S, Carlier E, Volsen S, Hoshi T, Mori Y, De Waard M. (2000) The I-II loop of the Ca2+ channel alpha1 subunit contains an endoplasmic reticulum retention signal antagonized by the beta subunit. Neuron, 25(1): 177-190.
32. Lindahl T, Wood RD. (1999) Quality control by DNA repair. Science, 286(5446): 1897-1905.
33. Parodi AJ. (2000) Protein glucosylation and its role in protein folding. Annu Rev Biochem, 69: 69-93.
34. Ellgaard L, Molinari M, Helenius A. (1999) Setting the standards: quality control in the secretory pathway. Science, 286(5446): 1882-1888.
35. Hellman R, Vanhove M, Lejeune A, Stevens FJ, Hendershot LM. (1999) The in vivo association of BiP with newly synthesized proteins is dependent on the rate and stability of folding and not simply on the presence of sequences that can bind to BiP. J Cell Biol, 144(1): 21-30.
36. Ou WJ, Cameron PH, Thomas DY, Bergeron JJ. (1993) Association of folding intermediates of glycoproteins with calnexin during protein maturation. Nature, 364(6440): 771-776.
37. Hebert DN, Foellmer B, Helenius A. (1995) Glucose trimming and reglucosylation determine glycoprotein association with calnexin in the endoplasmic reticulum. Cell, 81(3): 425-433.
38. Zhang JX, Braakman I, Matlack KE, Helenius A. (1997) Quality control in the secretory pathway: the role of calreticulin, calnexin and BiP in the retention of glycoproteins with C-terminal truncations. Mol Biol Cell, 8(10): 1943-1954.

39. Molinari M, Helenius A. (1999) Glycoproteins form mixed disulphides with oxidoreductases during folding in living cells. Nature, 402(6757): 90-93.
40. Hosokawa N, Tremblay LO, You Z, Herscovics A, Wada I, Nagata K. (2003) Enhancement of endoplasmic reticulum (ER) degradation of misfolded Null Hong Kong alpha1-antitrypsin by human ER mannosidase I. J Biol Chem, 278(28): 26287-26294.
41. Helenius A, Trombetta ES, Hebert DN, Simons JF. (1997) Calnexin, calreticulin and the folding of glycoproteins. Trends Cell Biol, 7(5): 193-200.
42. Lodish HF, Kong N, Snider M, Strous GJAM. (1983) Hepatoma Secretory Proteins Migrate from Rough Endoplasmic-Reticulum to Golgi at Characteristic Rates. Nature, 304(5921): 80-83.
43. Dejgaard S, Nicolay J, Taheri M, Thomas DY, Bergeron JJM. (2004) The ER glycoprotein quality control system. Curr Issues Mol Biol, 6: 29-42.
44. Stamnes MA, Shieh BH, Chuman L, Harris GL, Zuker CS. (1991) The cyclophilin homolog ninaA is a tissue-specific integral membrane protein required for the proper synthesis of a subset of Drosophila rhodopsins. Cell, 65(2): 219-227.
45. Gaut JR, Hendershot LM. (1993) The modification and assembly of proteins in the endoplasmic reticulum. Curr Opin Cell Biol, 5(4): 589-595.
46. Kaufman RJ. (2002) Orchestrating the unfolded protein response in health and disease. J Clin Invest, 110(10): 1389-1398.
47. Bertolotti A, Zhang Y, Hendershot LM, Harding HP, Ron D. (2000) Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. Nat Cell Biol, 2(6): 326-332.
48. Szegezdi E, Logue SE, Gorman AM, Samali A. (2006) Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. EMBO Rep, 7(9): 880-885.
49. Schroder M, Kaufman RJ. (2005) The mammalian unfolded protein response. Annu Rev Biochem, 74: 739-789.
50. Distelhorst CW, McCormick TS. (1996) Bcl-2 acts subsequent to and independent of Ca2+ fluxes to inhibit apoptosis in thapsigargin- and glucocorticoid-treated mouse lymphoma cells. Cell Calcium, 19(6): 473-483.

51. Li JZ, Lee B, Lee AS. (2006) 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(11): 7260-7270.
52. Urano F, Wang X, Bertolotti A, Zhang Y, Chung P, Harding HP, Ron D. (2000) Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. Science, 287(5453): 664-666.
53. Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, Yuan J. (2000) Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. Nature, 403(6765): 98-103.
54. Oyadomari S, Mori M. (2004) Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. Cell Death Differ, 11(4): 381-389.
55. Marciniak SJ, Yun CY, Oyadomari S, Novoa I, Zhang Y, Jungreis R, Nagata K, Harding HP, Ron D. (2004) CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. Genes Dev, 18(24): 3066-3077.
56. Brush MH, Weiser DC, Shenolikar S. (2003) Growth arrest and DNA damage-inducible protein GADD34 targets protein phosphatase 1 alpha to the endoplasmic reticulum and promotes dephosphorylation of the alpha subunit of eukaryotic translation initiation factor 2. Mol Cell Biol, 23(4): 1292-1303.
57. Adler HT, Chinery R, Wu DY, Kussick SJ, Payne JM, Fornace AJ, Jr., Tkachuk DC. (1999) Leukemic HRX fusion proteins inhibit GADD34-induced apoptosis and associate with the GADD34 and hSNF5/INI1 proteins. Mol Cell Biol, 19(10): 7050-7060.
58. Ohoka N, Yoshii S, Hattori T, Onozaki K, Hayashi H. (2005) TRB3, a novel ER stress-inducible gene, is induced via ATF4-CHOP pathway and is involved in cell death. EMBO J, 24(6): 1243-1255.
59. Szegezdi E, Fitzgerald U, Samali A. (2003) Caspase-12 and ER-stress-mediated apoptosis: the story so far. Ann N Y Acad Sci, 1010: 186-194.
60. Murray RK: Harper's illustrated biochemistry, in *A Lange medical book*. 2009, McGraw-Hill Medical; McGraw-Hill distributor: New York, London.
61. Hearing VJ, Ekel TM. (1976) Mammalian tyrosinase. A comparison of tyrosine hydroxylation and melanin formation. Biochem J, 157(3): 549-557.

62. Nadeau JH. (2001) Modifier genes in mice and humans. Nat Rev Genet, 2(3): 165-174.
63. Muller G, Ruppert S, Schmid E, Schutz G. (1988) Functional analysis of alternatively spliced tyrosinase gene transcripts. EMBO J, 7(9): 2723-2730.
64. Park KC, Chintamaneni CD, Halaban R, Witkop CJ, Jr., Kwon BS. (1993) Molecular analyses of a tyrosinase-negative albino family. Am J Hum Genet, 52(2): 406-413.
65. Laskin JD, Piccinini LA. (1986) Tyrosinase isozyme heterogeneity in differentiating B16/C3 melanoma. J Biol Chem, 261(35): 16626-16635.
66. Wang N, Hebert DN. (2006) Tyrosinase maturation through the mammalian secretory pathway: bringing color to life. Pigment Cell Res, 19(1): 3-18.
67. Branza-Nichita N, Negroiu G, Petrescu AJ, Garman EF, Platt FM, Wormald MR, Dwek RA, Petrescu SM. (2000) Mutations at critical N-glycosylation sites reduce tyrosinase activity by altering folding and quality control. J Biol Chem, 275(11): 8169-8175.
68. Choi H, Ahn S, Chang H, Cho NS, Joo K, Lee BG, Chang I, Hwang JS. (2007) Influence of N-glycan processing disruption on tyrosinase and melanin synthesis in HM3KO melanoma cells. Exp Dermatol, 16(2): 110-117.
69. Petrescu SM, Petrescu AJ, Titu HN, Dwek RA, Platt FM. (1997) Inhibition of N-glycan processing in B16 melanoma cells results in inactivation of tyrosinase but does not prevent its transport to the melanosome. J Biol Chem, 272(25): 15796-15803.
70. Ferrara N, Henzel WJ. (1989) Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. Biochem Biophys Res Commun, 161(2): 851-858.
71. Webb JD, Coleman ML, Pugh CW. (2009) Hypoxia, hypoxia-inducible factors (HIF), HIF hydroxylases and oxygen sensing. Cell Mol Life Sci, 66(22): 3539-3554.
72. Elsner M. (2011) New role for VEGF. Nat Biotechnol, 29(12): 1101.
73. Veeravagu A, Hsu AR, Cai W, Hou LC, Tse VC, Chen X. (2007) Vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor

inhibitors as anti-angiogenic agents in cancer therapy. Recent Pat Anticancer Drug Discov, 2(1): 59-71.

74. Ellis LM, Hicklin DJ. (2008) VEGF-targeted therapy: mechanisms of anti-tumour activity. Nat Rev Cancer, 8(8): 579-591.
75. Dann JM, Sykes PH, Mason DR, Evans JJ. (2009) Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor in endometrial tumour cells by resveratrol and EGCG. Gynecol Oncol, 113(3): 374-378.
76. Shirakami Y, Shimizu M, Adachi S, Sakai H, Nakagawa T, Yasuda Y, Tsurumi H, Hara Y, Moriwaki H. (2009) (-)-Epigallocatechin gallate suppresses the growth of human hepatocellular carcinoma cells by inhibiting activation of the vascular endothelial growth factor-vascular endothelial growth factor receptor axis. Cancer Sci, 100(10): 1957-1962.
77. Dube DH, Bertozzi CR. (2005) Glycans in cancer and inflammation. Potential for therapeutics and diagnostics. Nat Rev Drug Discov, 4(6): 477-488.
78. Duksin D, Mahoney WC. (1982) Relationship of the Structure and Biological-Activity of the Natural Homologs of Tunicamycin. J Biol Chem, 257(6): 3105-3109.
79. Sim KL, Perry D. (1997) Analysis of swainsonine and its early metabolic precursors in cultures of Metarhizium anisopliae. Glycoconjugate J, 14(5): 661-668.
80. Elbein AD. (1987) Inhibitors of the Biosynthesis and Processing of N-Linked Oligosaccharide Chains. Annu Rev Biochem, 56: 497-534.
81. Slusarewicz P, Warren G. (1995) 1-Deoxymannojirimycin Is a Noncompetitive Inhibitor of Mannosidase-Ii. Glycobiology, 5(2): 154-155.
82. Trudel GC, Holland PC. (1990) The Glycoprotein-Processing Inhibitors Bromoconduritol and N-Methyl-1-Deoxynojirimycin Alter the Adhesion Phenotype of Skeletal Myoblasts. Biochem Cell Biol, 68(12): 1411-1418.
83. Bartlett MRE, Warren HS, Cowden WB, Parish CR. (1994) Effects of the Antiinflammatory Compounds Castanospermine, Mannose-6-Phosphate and Fucoidan on Allograft-Rejection and Elicited Peritoneal Exudates. Immunol Cell Biol, 72(5): 367-374.

84. de-Freitas-Junior JC, Dos Reis Bastos LG, Freire-Neto CA, Du Rocher B, Abdelhay ES, Morgado-Diaz JA. (2012) N-glycan biosynthesis inhibitors induce in vitro anticancer activity in colorectal cancer cells. J Cell Biochem.
85. de Freitas JCM, Silva BDD, de Souza WF, de Araujo WM, Abdelhay ESFW, Morgado-Diaz JA. (2011) Inhibition of N-linked glycosylation by tunicamycin induces E-cadherin-mediated cell-cell adhesion and inhibits cell proliferation in undifferentiated human colon cancer cells. Cancer Chemoth Pharm, 68(1): 227-238.
86. Dennis JW. (1986) Effects of Swainsonine and Polyinosinic-Polycytidylic Acid on Murine Tumor-Cell Growth and Metastasis. Cancer Res, 46(10): 5131-5136.
87. Humphries MJ, Matsumoto K, White SL, Molyneux RJ, Olden K. (1990) An Assessment of the Effects of Swainsonine on Survival of Mice Injected with B16-F10 Melanoma-Cells. Clin Exp Metastas, 8(1): 89-102.
88. Dennis JW, Koch K, Yousefi S, Vanderelst I. (1990) Growth-Inhibition of Human-Melanoma Tumor Xenografts in Athymic Nude-Mice by Swainsonine. Cancer Res, 50(6): 1867-1872.
89. Goss PE, Baptiste J, Fernandes B, Baker M, Dennis JW. (1994) A Phase-I Study of Swainsonine in Patients with Advanced Malignancies. Cancer Res, 54(6): 1450-1457.
90. Shaheen PE, Stadler W, Elson P, Knox J, Winquist E, Bukowski RM. (2005) Phase II study of the efficacy and safety of oral GD0039 in patients with locally advanced or metastatic renal cell carcinoma. Invest New Drug, 23(6): 577-581.
91. Zhao Y, Liu W, Zhou Y, Zhang X, Murphy PV. (2010) N-(8-(3-Ethynylphenoxy)octyl-1-deoxynojirimycin suppresses growth and migration of human lung cancer cells. Bioorg Med Chem Lett, 20(24): 7540-7543.
92. Guerrera M, Ladisch S. (2003) N-Butyldeoxynojirimycin inhibits murine melanoma cell ganglioside metabolism and delays tumor onset. Cancer Lett, 201(1): 31-40.
93. Del Grosso F, De Mariano M, Passoni L, Luksch R, Tonini GP, Longo L. (2011) Inhibition of N-linked glycosylation impairs ALK phosphorylation and disrupts pro-survival signaling in neuroblastoma cell lines. BMC Cancer, 11: Artn 525. DOI: 10.1186/1471-2407-11-525.

94. Costa LM, Gouveia ST, Nobrega JA. (2002) Comparison of heating extraction procedures for Al, Ca, Mg, and Mn in tea samples. Anal Sci, 18(3): 313-318.
95. Sumpio BE, Cordova AC, Berke-Schlessel DW, Qin F, Chen QH. (2006) Green tea, the "Asian paradox," and cardiovascular disease. J Am Coll Surg, 202(5): 813-825.
96. Lippi G, Franchini M, Favaloro EJ, Targher G. (2010) Moderate red wine consumption and cardiovascular disease risk: beyond the "French paradox". Semin Thromb Hemost, 36(1): 59-70.
97. Suzuki Y, Miyoshi N, Isemura M. (2012) Health-promoting effects of green tea. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci, 88(3): 88-101.
98. Graham HN. (1992) Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry. Prev Med, 21(3): 334-350.
99. Macrae R, Robinson RK. Encyclopaedia of Food Science, Food Technology and Nutrition, ed. Sadler MJ. Academic Press, London, 1993.
100. Forrest GI. (1969) Effects of light and darkness on polyphenol distribution in the tea plant (Camellia sinensis L.). Biochem J, 113(5): 773-781.
101. Yao L, Caffin N, D'Arcy B, Jiang Y, Shi J, Singanusong R, Liu X, Datta N, Kakuda Y, Xu Y. (2005) Seasonal variations of phenolic compounds in Australia-grown tea (Camellia sinensis). J Agric Food Chem, 53(16): 6477-6483.
102. Galzitskaya OV, Finkelstein AV. (1999) A theoretical search for folding/unfolding nuclei in three-dimensional protein structures. Proc Natl Acad Sci U S A, 96(20): 11299-11304.
103. Ding EL, Hutfless SM, Ding X, Girotra S. (2006) Chocolate and prevention of cardiovascular disease: A systematic review. Nutr Metabolism, 3: Artn 2. DOI: 10.1186/1743-7075-3-2.
104. Siddiqui IA, Adhami VM, Saleern M, Mukhtar H. (2006) Beneficial effects of tea and its polyphenols against prostate cancer. Mol Nutr Food Res, 50(2): 130-143.
105. Lin YS, Tsai YJ, Tsay JS, Lin JK. (2003) Factors affecting the levels of tea polyphenols and caffeine in tea leaves. J Agric Food Chem, 51(7): 1864-1873.
106. Chyu KY, Babbidge SM, Zhao X, Dandillaya R, Rietveld AG, Yano J, Dimayuga P, Cercek B, Shah PK. (2004) Differential effects of green tea-derived catechin on

developing versus established atherosclerosis in apolipoprotein E-null mice. Circulation, 109(20): 2448-2453.

107. Ramesh E, Geraldine P, Thomas PA. (2010) Regulatory effect of epigallocatechin gallate on the expression of C-reactive protein and other inflammatory markers in an experimental model of atherosclerosis. Chem Biol Interact, 183(1): 125-132.
108. Mandel S, Youdim MB. (2004) Catechin polyphenols: neurodegeneration and neuroprotection in neurodegenerative diseases. Free Radic Biol Med, 37(3): 304-317.
109. Levites Y, Weinreb O, Maor G, Youdim MB, Mandel S. (2001) Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate prevents N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydro-pyridine-induced dopaminergic neurodegeneration. J Neurochem, 78(5): 1073-1082.
110. Skrzypczak-Jankun E, Jankun J. (2010) Theaflavin digallate inactivates plasminogen activator inhibitor: could tea help in Alzheimer's disease and obesity? Int J Mol Med, 26(1): 45-50.
111. Choi YT, Jung CH, Lee SR, Bae JH, Baek WK, Suh MH, Park J, Park CW, Suh SI. (2001) The green tea polyphenol (-)-epigallocatechin gallate attenuates beta-amyloid-induced neurotoxicity in cultured hippocampal neurons. Life Sci, 70(5): 603-614.
112. Dragicevic N, Smith A, Lin X, Yuan F, Copes N, Delic V, Tan J, Cao C, Shytle RD, Bradshaw PC. (2011) Green tea epigallocatechin-3-gallate (EGCG) and other flavonoids reduce Alzheimer's amyloid-induced mitochondrial dysfunction. J Alzheimers Dis, 26(3): 507-521.
113. Levites Y, Amit T, Mandel S, Youdim MB. (2003) Neuroprotection and neurorescue against Abeta toxicity and PKC-dependent release of nonamyloidogenic soluble precursor protein by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate. FASEB J, 17(8): 952-954.
114. Smith PK, Cowie H, Olafsson RF, Liefooghe AP, Almeida A, Araki H, del Barrio C, Costabile A, Dekleva B, Houndoumadi A, Kim K, Olafsson RP, Ortega R, Pain J, Pateraki L, Schafer M, Singer M, Smorti A, Toda Y, Tomasson H, Wenxin Z. (2002) Definitions of bullying: a comparison of terms used, and age and gender

differences, in a fourteen-country international comparison. Child Dev, 73(4): 1119-1133.

115. Tsuneki H, Ishizuka M, Terasawa M, Wu JB, Sasaoka T, Kimura I. (2004) Effect of green tea on blood glucose levels and serum proteomic patterns in diabetic (db/db) mice and on glucose metabolism in healthy humans. BMC Pharmacol, 4: 18.
116. Wu LY, Juan CC, Ho LT, Hsu YP, Hwang LS. (2004) Effect of green tea supplementation on insulin sensitivity in Sprague-Dawley rats. J Agric Food Chem, 52(3): 643-648.
117. Fu Z, Zhen W, Yuskavage J, Liu D. (2011) Epigallocatechin gallate delays the onset of type 1 diabetes in spontaneous non-obese diabetic mice. Br J Nutr, 105(8): 1218-1225.
118. Nance CL, Siwak EB, Shearer WT. (2009) Preclinical development of the green tea catechin, epigallocatechin gallate, as an HIV-1 therapy. J Allergy Clin Immunol, 123(2): 459-465.
119. Stapleton PD, Shah S, Anderson JC, Hara Y, Hamilton-Miller JM, Taylor PW. (2004) Modulation of beta-lactam resistance in Staphylococcus aureus by catechins and gallates. Int J Antimicrob Agents, 23(5): 462-467.
120. Cho YS, Schiller NL, Oh KH. (2008) Antibacterial effects of green tea polyphenols on clinical isolates of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Curr Microbiol, 57(6): 542-546.
121. Li S, Hattori T, Kodama EN. (2011) Epigallocatechin gallate inhibits the HIV reverse transcription step. Antivir Chem Chemother, 21(6): 239-243.
122. Kawai K, Tsuno NH, Kitayama J, Okaji Y, Yazawa K, Asakage M, Hori N, Watanabe T, Takahashi K, Nagawa H. (2003) Epigallocatechin gallate, the main component of tea polyphenol, binds to CD4 and interferes with gp120 binding. J Allergy Clin Immunol, 112(5): 951-957.
123. Williamson MP, McCormick TG, Nance CL, Shearer WT. (2006) Epigallocatechin gallate, the main polyphenol in green tea, binds to the T-cell receptor, CD4: Potential for HIV-1 therapy. J Allergy Clin Immunol, 118(6): 1369-1374.

124. Connors SK, Chornokur G, Kumar NB. (2011) New Insights Into the Mechanisms of Green Tea Catechins in the Chemoprevention of Prostate Cancer. Nutr Cancer.
125. Siddiqui IA, Asim M, Hafeez BB, Adhami VM, Tarapore RS, Mukhtar H. (2011) Green tea polyphenol EGCG blunts androgen receptor function in prostate cancer. FASEB J, 25(4): 1198-1207.
126. Mukhtar H, Ahmad N. (2000) Tea polyphenols: prevention of cancer and optimizing health. Am J Clin Nutr, 71(6 Suppl): 1698S-1702S; discussion 1703S-1694S.
127. Yang CS, Wang X, Lu G, Picinich SC. (2009) Cancer prevention by tea: animal studies, molecular mechanisms and human relevance. Nat Rev Cancer, 9(6): 429-439.
128. Chow HH, Hakim IA. (2011) Pharmacokinetic and chemoprevention studies on tea in humans. Pharmacol Res, 64(2): 105-112.
129. Shanafelt TD, Call TG, Zent CS, LaPlant B, Bowen DA, Roos M, Secreto CR, Ghosh AK, Kabat BF, Lee MJ, Yang CS, Jelinek DF, Erlichman C, Kay NE. (2009) Phase I trial of daily oral Polyphenon E in patients with asymptomatic Rai stage 0 to II chronic lymphocytic leukemia. J Clin Oncol, 27(23): 3808-3814.
130. Pan MH, Chiou YS, Wang YJ, Ho CT, Lin JK. (2011) Multistage carcinogenesis process as molecular targets in cancer chemoprevention by epicatechin-3-gallate. Food Funct, 2(2): 101-110.
131. Gouni-Berthold I, Sachinidis A. (2004) Molecular mechanisms explaining the preventive effects of catechins on the development of proliferative diseases. Curr Pharm Des, 10(11): 1261-1271.
132. Kwak IH, Shin YH, Kim M, Cha HY, Nam HJ, Lee BS, Chaudhary SC, Pai KS, Lee JH. (2011) Epigallocatechin-3-gallate inhibits paracrine and autocrine hepatocyte growth factor/scatter factor-induced tumor cell migration and invasion. Exp Mol Med, 43(2): 111-120.
133. Xu H, Becker CM, Lui WT, Chu CY, Davis TN, Kung AL, Birsner AE, D'Amato RJ, Wai Man GC, Wang CC. (2011) Green tea epigallocatechin-3-gallate inhibits angiogenesis and suppresses vascular endothelial growth factor C/vascular endothelial growth factor receptor 2 expression and signaling in experimental endometriosis in vivo. Fertil Steril, 96(4): 1021-1028.

134. Sazuka M, Murakami S, Isemura M, Satoh K, Nukiwa T. (1995) Inhibitory effects of green tea infusion on in vitro invasion and in vivo metastasis of mouse lung carcinoma cells. Cancer Lett, 98(1): 27-31.
135. Isemura M, Suzuki Y, Satoh K, Narumi K, Motomiya M. (1993) Effects of catechins on the mouse lung carcinoma cell adhesion to the endothelial cells. Cell Biol Int, 17(6): 559-564.
136. Ogata K, Mukae N, Suzuki Y, Satoh K, Narumi K, Nukiwa T, Isemura M. (1995) Effects of catechins on the mouse tumor cell adhesion to fibronectin. Planta Med, 61(5): 472-474.
137. Suzuki Y, Isemura M. (2001) Inhibitory effect of epigallocatechin gallate on adhesion of murine melanoma cells to laminin. Cancer Lett, 173(1): 15-20.
138. Waleh NS, Chao WR, Bensari A, Zaveri NT. (2005) Novel D-ring analog of epigallocatechin-3-gallate inhibits tumor growth and VEGF expression in breast carcinoma cells. Anticancer Res, 25(1A): 397-402.
139. Fujiki H, Suganuma M, Okabe S, Sueoka E, Suga K, Imai K, Nakachi K, Kimura S. (1999) Mechanistic findings of green tea as cancer preventive for humans. Proc Soc Exp Biol Med, 220(4): 225-228.
140. Fujiki H. (2005) Green tea: Health benefits as cancer preventive for humans. Chem Rec, 5(3): 119-132.
141. Ahn WS, Yoo J, Huh SW, Kim CK, Lee JM, Namkoong SE, Bae SM, Lee IP. (2003) Protective effects of green tea extracts (polyphenon E and EGCG) on human cervical lesions. Eur J Cancer Prev, 12(5): 383-390.
142. Sartippour MR, Shao ZM, Heber D, Beatty P, Zhang L, Liu C, Ellis L, Liu W, Go VL, Brooks MN. (2002) Green tea inhibits vascular endothelial growth factor (VEGF) induction in human breast cancer cells. J Nutr, 132(8): 2307-2311.
143. Ahn WS, Huh SW, Bae SM, Lee IP, Lee JM, Namkoong SE, Kim CK, Sin JI. (2003) A major constituent of green tea, EGCG, inhibits the growth of a human cervical cancer cell line, CaSki cells, through apoptosis, G(1) arrest, and regulation of gene expression. DNA Cell Biol, 22(3): 217-224.
144. Hastak K, Gupta S, Ahmad N, Agarwal MK, Agarwal ML, Mukhtar H. (2003) Role of p53 and NF-kappaB in epigallocatechin-3-gallate-induced apoptosis of LNCaP cells. Oncogene, 22(31): 4851-4859.

145. Mak JC. (2012) The Potential Role of Green Tea Catechins in Various Disease Therapies: Progress and Promise. Clin Exp Pharmacol Physiol.
146. Shankar S, Chen Q, Srivastava RK. (2008) Inhibition of PI3K/AKT and MEK/ERK pathways act synergistically to enhance antiangiogenic effects of EGCG through activation of FOXO transcription factor. J Mol Signal, 3: 7.
147. Lambert JD, Yang CS. (2003) Mechanisms of cancer prevention by tea constituents. J Nutr, 133(10): 3262S-3267S.
148. Shimizu M, Adachi S, Masuda M, Kozawa O, Moriwaki H. (2011) Cancer chemoprevention with green tea catechins by targeting receptor tyrosine kinases. Mol Nutr Food Res, 55(6): 832-843.
149. Schoonbroodt S, Piette J. (2000) Oxidative stress interference with the nuclear factor-kappa B activation pathways. Biochem Pharmacol, 60(8): 1075-1083.
150. Imai K, Suga K, Nakachi K. (1997) Cancer-preventive effects of drinking green tea among a Japanese population. Prev Med, 26(6): 769-775.
151. Shankar S, Ganapathy S, Hingorani SR, Srivastava RK. (2008) EGCG inhibits growth, invasion, angiogenesis and metastasis of pancreatic cancer. Front Biosci, 13: 440-452.
152. Hibasami H, Achiwa Y, Fujikawa T, Komiya T. (1996) Induction of programmed cell death (apoptosis) in human lymphoid leukemia cells by catechin compounds. Anticancer Res, 16(4A): 1943-1946.
153. Yang GY, Liao J, Li C, Chung J, Yurkow EJ, Ho CT, Yang CS. (2000) Effect of black and green tea polyphenols on c-jun phosphorylation and H(2)O(2) production in transformed and non-transformed human bronchial cell lines: possible mechanisms of cell growth inhibition and apoptosis induction. Carcinogenesis, 21(11): 2035-2039.
154. Ahmad N, Cheng P, Mukhtar H. (2000) Cell cycle dysregulation by green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate. Biochem Biophys Res Commun, 275(2): 328-334.
155. Fujiki H, Suganuma M, Okabe S, Sueoka N, Komori A, Sueoka E, Kozu T, Tada Y, Suga K, Imai K, Nakachi K. (1998) Cancer inhibition by green tea. Mutat Res, 402(1-2): 307-310.

156. Saeki K, Kobayashi N, Inazawa Y, Zhang H, Nishitoh H, Ichijo H, Isemura M, Yuo A. (2002) Oxidation-triggered c-Jun N-terminal kinase (JNK) and p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways for apoptosis in human leukaemic cells stimulated by epigallocatechin-3-gallate (EGCG): a distinct pathway from those of chemically induced and receptor-mediated apoptosis. Biochem J, 368(Pt 3): 705-720.
157. Hayakawa S, Saeki K, Sazuka M, Suzuki Y, Shoji Y, Ohta T, Kaji K, Yuo A, Isemura M. (2001) Apoptosis induction by epigallocatechin gallate involves its binding to Fas. Biochem Biophys Res Commun, 285(5): 1102-1106.
158. Qin J, Xie LP, Zheng XY, Wang YB, Bai Y, Shen HF, Li LC, Dahiya R. (2007) A component of green tea, (-)-epigallocatechin-3-gallate, promotes apoptosis in T24 human bladder cancer cells via modulation of the PI3K/Akt pathway and Bcl-2 family proteins. Biochem Biophys Res Commun, 354(4): 852-857.
159. Shankar S, Suthakar G, Srivastava RK. (2007) Epigallocatechin-3-gallate inhibits cell cycle and induces apoptosis in pancreatic cancer. Front Biosci, 12: 5039-5051.
160. Manna S, Banerjee S, Mukherjee S, Das S, Panda CK. (2006) Epigallocatechin gallate induced apoptosis in Sarcoma180 cells in vivo: mediated by p53 pathway and inhibition in U1B, U4-U6 UsnRNAs expression. Apoptosis, 11(12): 2267-2276.
161. Hastak K, Agarwal MK, Mukhtar H, Agarwal ML. (2005) Ablation of either p21 or Bax prevents p53-dependent apoptosis induced by green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate. FASEB J, 19(7): 789-791.
162. Fujiki H, Suganuma M, Okabe S, Sueoka E, Sueoka N, Fujimoto N, Goto Y, Matsuyama S, Imai K, Nakachi K. (2001) Cancer prevention with green tea and monitoring by a new biomarker, hnRNP B1. Mutat Res, 480-481: 299-304.
163. Das A, Banik NL, Ray SK. (2006) Mechanism of apoptosis with the involvement of calpain and caspase cascades in human malignant neuroblastoma SH-SY5Y cells exposed to flavonoids. Int J Cancer, 119(11): 2575-2585.
164. Chen ZP, Schell JB, Ho CT, Chen KY. (1998) Green tea epigallocatechin gallate shows a pronounced growth inhibitory effect on cancerous cells but not on their normal counterparts. Cancer Lett, 129(2): 173-179.

165. Ahmad N, Gupta S, Mukhtar H. (2000) Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate differentially modulates nuclear factor kappaB in cancer cells versus normal cells. Arch Biochem Biophys, 376(2): 338-346.
166. Aggarwal BB, Shishodia S. (2006) Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. Biochem Pharmacol, 71(10): 1397-1421.
167. Okada N, Tanabe H, Tazoe H, Ishigami Y, Fukutomi R, Yasui K, Isemura M. (2009) Differentiation-associated alteration in sensitivity to apoptosis induced by (-)-epigallocatechin-3-O-gallate in HL-60 cells. Biomed Res-Tokyo, 30(4): 201-206.
168. Min NY, Kim JH, Choi JH, Liang W, Ko YJ, Rhee S, Bang H, Ham SW, Park AJ, Lee KH. (2012) Selective death of cancer cells by preferential induction of reactive oxygen species in response to (-)-epigallocatechin-3-gallate. Biochem Biophys Res Commun, 421(1): 91-97.
169. Zhang G, Gurtu V, Kain SR, Yan G. (1997) Early detection of apoptosis using a fluorescent conjugate of annexin V. Biotechniques, 23(3): 525-531.
170. Darzynkiewicz Z, Bruno S, Delbino G, Gorczyca W, Hotz MA, Lassota P, Traganos F. (1992) Features of Apoptotic Cells Measured by Flow-Cytometry. Cytometry, 13(8): 795-808.
171. Tas J, Westerneng G. (1981) Fundamental-Aspects of the Interaction of Propidium Diiodide with Nucleic-Acids Studied in a Model System of Polyacrylamide Films. J Histochem Cytochem, 29(8): 929-936.
172. Lee K, Chan F, Samaha R, Stanley S, Stevens J, Tuason N. (2006) Gene expression profiling with target specific preamplified cDNA using a TaqMan (R) low density array. FEBS J, 273: 324-324.
173. Yuan JS, Reed A, Chen F, Stewart CN. (2006) Statistical analysis of real-time PCR data. BMC Bioinformatics, 7: Artn 85. DOI: 10.1186/1471-2105-7-85.
174. Treiman M, Caspersen C, Christensen SB. (1998) A tool coming of age: thapsigargin as an inhibitor of sarcoendoplasmic reticulum Ca2+-ATPases. Trends Pharmacol Sci, 19(4): 131-135.
175. Henne V, Soling HD. (1986) Guanosine 5'-triphosphate releases calcium from rat liver and guinea pig parotid gland endoplasmic reticulum independently of inositol 1,4,5-trisphosphate. FEBS Lett, 202(2): 267-273.

176. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem, 193(1): 265-275.
177. Romani A, Fulceri R, Pompella A, Benedetti A. (1988) MgATP-dependent, glucose 6-phosphate-stimulated liver microsomal Ca2+ accumulation: difference between rough and smooth microsomes. Arch Biochem Biophys, 266(1): 1-9.
178. Burchell A, Hume R, Burchell B. (1988) A new microtechnique for the analysis of the human hepatic microsomal glucose-6-phosphatase system. Clin Chim Acta, 173(2): 183-191.
179. Fulceri R, Banhegyi G, Gamberucci A, Giunti R, Mandl J, Benedetti A. (1994) Evidence for the Intraluminal Positioning of P-Nitrophenol Udp-Glucuronosyltransferase Activity in Rat-Liver Microsomal Vesicles. Arch Biochem Biophys, 309(1): 43-46.
180. Motulsky HJ. (1992) Fitting Curves to Data Using Nonlinear-Regression - a Practical and Nonmathematical Approach. FASEB J, 6(5): A2064-A2064.
181. Ando H, Kondoh H, Ichihashi M, Hearing VJ. (2007) Approaches to identify inhibitors of melanin biosynthesis via the quality control of tyrosinase. J Invest Dermatol, 127(4): 751-761.
182. Leyden JJ, Shergill B, Micali G, Downie J, Wallo W. (2011) Natural options for the management of hyperpigmentation. J Eur Acad Dermatol, 25(10): 1140-1145.
183. Chow HH, Cai Y, Hakim IA, Crowell JA, Shahi F, Brooks CA, Dorr RT, Hara Y, Alberts DS. (2003) Pharmacokinetics and safety of green tea polyphenols after multiple-dose administration of epigallocatechin gallate and polyphenon E in healthy individuals. Clin Canc Res, 9(9): 3312-3319.
184. Chow HH, Hakim IA, Vining DR, Crowell JA, Ranger-Moore J, Chew WM, Celaya CA, Rodney SR, Hara Y, Alberts DS. (2005) Effects of dosing condition on the oral bioavailability of green tea catechins after single-dose administration of Polyphenon E in healthy individuals. Clin Canc Res, 11(12): 4627-4633.
185. Del Rio D, Calani L, Cordero C, Salvatore S, Pellegrini N, Brighenti F. (2010) Bioavailability and catabolism of green tea flavan-3-ols in humans. Nutrition, 26(11-12): 1110-1116.

186. Piyaviriyakul S, Shimizu K, Asakawa T, Kan T, Siripong P, Oku N. (2011) Anti-angiogenic activity and intracellular distribution of epigallocatechin-3-gallate analogs. Biol Pharm Bull, 34(3): 396-400.
187. Kao YH, Hiipakka RA, Liao S. (2000) Modulation of endocrine systems and food intake by green tea epigallocatechin gallate. Endocrinology, 141(3): 980-987.
188. Koyama Y, Abe K, Sano Y, Ishizaki Y, Njelekela M, Shoji Y, Hara Y, Isemura M. (2004) Effects of green tea on gene expression of hepatic gluconeogenic enzymes in vivo. Planta Med, 70(11): 1100-1102.
189. Wolfram S, Wang Y, Thielecke F. (2006) Anti-obesity effects of green tea: from bedside to bench. Mol Nutr Food Res, 50(2): 176-187.
190. Iwata Y, Koizumi N. (2005) Unfolded protein response followed by induction of cell death in cultured tobacco cells treated with tunicamycin. Planta, 220(5): 804-807.
191. Pahl HL, Baeuerle PA. (1995) A novel signal transduction pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus is mediated by transcription factor NF-kappa B. EMBO J, 14(11): 2580-2588.
192. Boelens J, Lust S, Offner F, Bracke ME, Vanhoecke BW. (2007) Review. The endoplasmic reticulum: a target for new anticancer drugs. In Vivo, 21(2): 215-226.
193. Goss PE, Reid CL, Bailey D, Dennis JW. (1997) Phase IB clinical trial of the oligosaccharide processing inhibitor swainsonine in patients with advanced malignancies. Clin Canc Res, 3(7): 1077-1086.
194. Dennis JW. (1991) N-linked oligosaccharide processing and tumor cell biology. Semin Cancer Biol, 2(6): 411-420.
195. Elbein AD. (1991) Glycosidase inhibitors as antiviral and/or antitumor agents. Semin Cell Biol, 2(5): 309-317.
196. Jacob GS. (1995) Glycosylation inhibitors in biology and medicine. Curr Opin Struct Biol, 5(5): 605-611.
197. Sunkara PS, Bowlin TL, Liu PS, Sjoerdsma A. (1987) Antiretroviral activity of castanospermine and deoxynojirimycin, specific inhibitors of glycoprotein processing. Biochem Biophys Res Commun, 148(1): 206-210.

198. Sunkara PS, Kang MS, Bowlin TL, Liu PS, Tyms AS, Sjoerdsma A. (1990) Inhibition of glycoprotein processing and HIV replication by castanospermine analogues. Ann N Y Acad Sci, 616: 90-96.
199. Lust S, Vanhoecke B, Van Gele M, Philippe J, Bracke M, Offner F. (2010) The flavonoid tangeretin activates the unfolded protein response and synergizes with imatinib in the erythroleukemia cell line K562. Mol Nutr Food Res, 54(6): 823-832.
200. Sun XM, Huo XD, Luo T, Li MJ, Yin YC, Jiang YF. (2011) The anticancer flavonoid chrysin induces the unfolded protein response in hepatoma cells. J Cell Mol Med, 15(11): 2389-2398.
201. Sukhthankar M, Yamaguchi K, Lee SH, Mcentee MF, Eling TE, Hara Y, Baek SJ. (2008) A green tea component suppresses posttranslational expression of basic fibroblast growth factor in colorectal cancer. Gastroenterology, 134(7): 1972-1980.

10. Saját közlemények jegyzéke

10.1. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Gamberucci A*, **Konta L***, Colucci A, Giunti R, Magyar JÉ, Mandl J, Bánhegyi G, Benedetti A, Csala M. (2006) Green tea flavonols inhibit glucosidase II. Biochem Pharmacol, 72: 640-646. IF: 3,581 ***megosztott első szerzőség***

2. Magyar JÉ, Gamberucci A, **Konta L**, Margittai É, Mandl J, Bánhegyi G, Benedetti A, Csala M. (2009) Endoplasmic reticulum stress underlying the pro-apoptotic effect of epigallocatechin gallate in mouse hepatoma cells. Int J Biochem Cell Biol, 41: 694-700. IF: 4,009

3. **Konta L**, Száraz P, Magyar JÉ, Révész K, Bánhegyi G, Mandl J, Csala M. (2011) Inhibition of glycoprotein synthesis in the endoplasmic reticulum as a novel anticancer mechanism of (-)-epigallocatechin-3-gallate. BioFactors, 37: 468-476. IF: 4,933

10.2. Egyéb közlemények

1. Révész K, Tüttő A, **Konta L**. (2007) Zöldtea-flavanolok hatása az endoplazmás retikulum működésére. Orvosi Hetilap, 40**:** 1903-1907.

2. Révész K, Tüttő A, Szelényi P, **Konta L**. (2011) Tea flavan-3-ols as modulating factors in endoplasmic reticulum function. Nutr Res, 31: 731-740. IF: 1,974

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom a Semmelweis Egyetem Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Patobiokémiai Intézet Patobiokémiai Kutatócsoportja munkatársainak, ahol kezdetben TDK hallgatóként, majd doktorandusz hallgatóként folytattam tanulmányaimat és kutatómunkámat. Külön köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Csala Miklósnak, aki szakmai tanácsaival, és kritikai észrevételeivel nagyban segítette munkámat már TDK munkám kezdete óta. Köszönettel tartozom még Dr. Mandl József professzor úrnak, aki lehetővé tette, hogy kutatócsoportjában dolgozhassak. Emellett köszönet illeti a kísérletekhez nyújtott elméleti és gyakorlati hozzájárulásáért Dr. Száraz Pétert, Dr. Magyar Éva Juditot, Dr. Margittai Évát és Mile Valériát. A kísérletek egy része Olaszországban (Dipartimento di Fisiopatologia, Medicina Sperimentale e Sanità Pubblica, Università di Siena, Siena) készült, és ezért külön köszönet illeti Angelo Benedetti professzort, Angela Coluccit, Alessandra Gamberuccit és Roberta Giuntit.